



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA RENORBIO

ERICA LÍVEA FERREIRA GUEDES CELESTINO

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ISOLADAS DA CAATINGA
ALAGOANA**

MACEIÓ

2019

ERICA LÍVEA FERREIRA GUEDES CELESTINO

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ISOLADAS DA CAATINGA
ALAGOANA**

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Renorbio da
Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto

MACEIÓ

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- C392b Celestino, Erica Lívea Ferreira Guedes.
 Bactérias promotoras de crescimento isoladas da caatinga alagoana / Erica Lívea Ferreira Guedes Celestino. – 2019.
 95 f. : il.
- Orientador: Cícero Eduardo Ramalho Neto.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.
- Bibliografias: f. 73-85.
Anexos: f. 86-95.
1. Caatinga. 2. Cactos. 3. Crescimento (Plantas). 4. Bactérias fixadoras de nitrogênio. 5. Bacteriologia. 6. Microbiologia industrial. I. Título.

CDU: 663.18

ERICA LÍVEA FERREIRA GUEDES CELESTINO

Bactérias promotoras de crescimento isoladas da caatinga alagoana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Aprovada em: 20/08/2019.

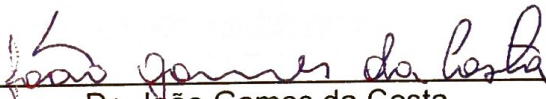
BANCA EXAMINADORA



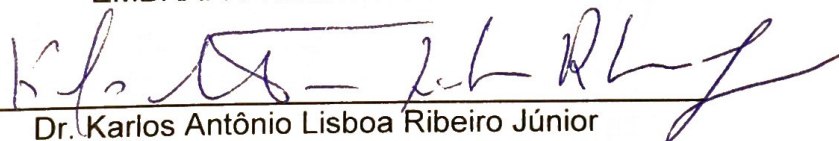
Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto
Orientador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL



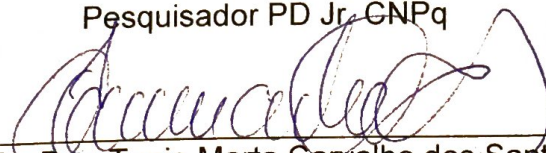
Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Universidade Federal de Alagoas – UFAL



Dr. João Gomes da Costa
EMBRAPA Tabuleiros Costeiros



Dr. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior
Pesquisador PD Jr. CNPq



Profa. Dra. Tania Marta Carvalho dos Santos
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Agradecimentos

À Deus, único Senhor e Salvador da minha vida, dono do meu ser, guardião dos meus anseios.

Ao amor da minha vida, meu companheiro, meu amigo, meu conselheiro, a quem eu amo, admiro, respeito, Ewerton Alves. Sem você eu não conseguia

À minha família linda, pai, mãe e irmã, maiores incentivadores e apoiadores que eu poderia ter na vida. Sem vocês eu não seria metade de mim.

À querida professora Tânia. Obrigada pelas palavras de incentivo durante a caminhada. Você é maravilhosa.

Ao meu orientador, Cícero Eduardo, pelos ensinamentos transmitidos e pela paciência de sempre.

Aos companheiros do laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da UFAL. Vocês são incríveis.

Ao laboratório de Genética Molecular e Proteômica pela disponibilidade dos recursos para realização deste trabalho

Aos funcionários do CECA pela colaboração diária na manutenção dos nossos laboratórios.

À coordenação do RENORBIO/UFAL, em especial a professora Marília, pelo apoio e as palavras de incentivo sempre ternas.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos demais que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A Caatinga é um bioma exclusivo do Brasil e possui características climáticas únicas, marcadas por altas temperaturas e baixa pluviosidade, podendo chegar a uma temperatura do solo de até 60°C. Esta possui uma grande riqueza de ambientes e espécies e boa parte dela não é encontrada em nenhum outro bioma. A família Cactaceae figura entre as principais representantes do bioma, dentre as quais destacam-se as plantas de mandacaru (*Cereus jamacaru*) e o xique-xique (*Pislosocereus gounellei*) pela alta distribuição e usos. Associados a estas plantas encontram-se microrganismos bem adaptados as condições ambientais na qual estão inseridos. O presente estudo objetivou identificar microrganismos associadas a rizosferas de cactáceas com recursos fisiológicos de defesas ao estresse hídrico e atributos de promoção de crescimento às plantas. Amostras de rizosfera de cactáceas foram coletadas nas cidades de Piranhas e Olho d'Água do Casado/AL em períodos secos. Com metodologias dependentes de cultivo, foram obtidos isolados bacterianos com mecanismos contra a dessecação, qualificadas como xerotolerantes e com característica de promoção de crescimento de plantas diretas e/ou indiretas, como produção de fitohormônios e a solubilização de fosfato. Dentre os isolados, foi possível identificar cepas do gênero *Bradyrhizobium*. Quando testadas em plantas de feijão, alguns dos isolados bacterianos promoveram aumentos na altura destas plantas.

Palavras-chave: Semiárido. Cactáceas. Promoção de crescimento. Estresse hídrico.

ABSTRACT

The Caatinga is an exclusive biome of Brazil and has unique climatic characteristics, marked by high temperatures and low rainfall, and in the dry season the temperature of the soil can reach 60 ° C. The Caatinga has a great wealth of environments and species and much of it is not found in any other biome. The Cactaceae family is one of the main representatives of the biome, among which the mandacaru (*Cereus jamacaru*) and the Xique-xique (*Pislosocereus gounellei*) stands out for the high and distribution and uses. Associated with these plants are microorganisms well adapted to the environmental conditions that are exposed. This study aimed to microorganisms associated with rhizosphere of cacti that have defense mechanisms to water stress and growth promotion plants. Rhizosphere samples were collected cacti in the cities of Piranhas and Olho d'Água do Casado / AL. With dependent methodology cultivation was isolated bacteria with mechanisms against water stress considered xerotolerant and plant growth promoting characteristic direct and / or indirect, such AIA production and solubilization of phosphate. Among the isolates, it was possible to identify strains of the genus *Bradyrhizobium*. When tested in bean plants, some of the bacterial isolates promoted increases in plant height.

Keywords: Semi-arid. Cactaceae. Promotion of growth. Drought stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

Ca₃(PO₄)₂ – Fosfato de Cálcio

°C – Graus Celsius

µg - Micrograma

AIA - Ácido Indol Acético

AP – Altura de Planta

Aw - Atividade de água

BPCPs - Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

CMC - Carbometilcelulose

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

cm - Centímetros

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

D.O. – Densidade Ótica

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

EPS - Exopolissacarídeos

fD1 – Primer universal

Fe - Ferro

FeCl₃ – Percloreto de Ferro

g - Grama

h - Horas

H₂O - Água

H₂S – Sulfeto de Hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC- Índice celulolítico

IGS - Intergenic Spacer

IPA - Ácido Indol-3-Pirúvico

IS - Índice de Solubilização

K - Potássio

KCl – Cloreto de potássio

KI- Iodeto de potássio

L - Litros

Mg - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Millimolar

MnSO₄ – Sulfato de Manganês

mol – Molécula-Grama

N₂ - Nitrogênio

NA – Nutriente Agar

Na - Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

Nbrip – Meio de cultura

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NF- Número de folhas

ng - Nanograma

NH₄⁺ - Amônia

nm - nanomolar

Ø – Diâmetro

ODC- Olho d'água do Casado

OH - Hidroxila

P - Fósforo

PCR - Polymerase Chain Reaction

PGPB - Plant Growth-Promoting Bacteria

pH - Potencial Hidrogeniônico

PIR- Piranhas

PO₄ - Fosfato

rD1 - Primer universal

rDNA - Recombinante ácido desoxirribonucleico ou Ribossomal ácido desoxirribonucleico

RPCP - Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas

rpm – Rotações por Minuto

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossômico

SO₄ - Sulfato

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

TSB – Tryptone Soy Broth

Tris-HCl – Solução tampão

Trp - Triptofano

UFC – Unidade de Formação de Colônias

UV- Ultravioleta

µg.mL - micrograma por mililitro

µL - Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das condições que os isolados foram submetidos para teste de produção de biofilme	41
Tabela 2 - Identificação dos isolados e respectivo lugar de coleta.....	44
Tabela 3 - Ausência (+) e presença (-) de motilidade.....	46
Tabela 4 - Ausência e presença de crescimento bacteriano em diferentes pH.	48
Tabela 5 - Isolados fixadores de nitrogênio de modo assimbiótico	49
Tabela 6 - Médias do diâmetro das colônias, halos de solubilização e índices de solubilização de fosfatos.....	52
Tabela 7 - Quantidade de P solúvel $\mu\text{g.mL}^{-1}$ detectado sob 15 dias de cultivo em Nbrp líquido.....	54
Tabela 8 - Isolados produtores de AIA.....	55
Tabela 9 - Médias de produção de AIA.....	56
Tabela 10 Médias de produção de citocininas e giberelinas	58
Tabela 11 - Interação microrganismos e sementes de feijão e milho	59
Tabela 12 - Médias de produção de EPS em duas fontes de carbono	62
Tabela 13 - Médias de formação de biofilmes em diferentes concentrações de sorbitol	63
Tabela 14 - Média de altura de planta (AP), número de folhas (NF) e peso seco em plantas de feijão tratadas com isolados bacterianos.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delimitação geográfica do semiárido brasileiro	16
Figura 2 -Transição do período seco e chuvoso na Caatinga. (A) Período seco (B) Período chuvoso	19
Figura 3 - Exemplos de plantas da família Cactacea. Coroa de frade (<i>Melocactus zahnntneri</i>) (A), Facheiro (<i>Pilosocereus pachycladus</i>) e mandacaru (<i>Cereus jamacaru</i>)(B), palma (<i>Opuntia spp</i>) (C).	20
Figura 4 - Ilustração da delimitação da região rizosférica	23
Figura 5 - Mandacaru (<i>Cereus jamacaru</i>) e Xique-xique (<i>Pilosocereus gounellei</i>).	31
Figura 6 - Representação gráfica do protocolo de colonização de sementes	39
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 1,0% . Extração de DNA total de 8 dos isolados provenientes da Caatinga alagoana em gel e amplificação do gene 16s, respectivamente.	43
Figura 8 -Provas positivos para motilidade.	47
Figura 9 - Crescimento em diferentes pH (isolado PIR1.2)	49
Figura 10 - Tratamento negativo (A) e positivo (B) para fixação de N ₂ em meio NFb. 50	
Figura 11 - Indicativo da produção (A) e da não produção (B) de celulase	51
Figura 12 - Eficiência de solubilização de fosfato baixa, média, alta e negativa, respectivamente.	53
Figura 13- Indicação qualitativa de produção de AIA pela presença (PIR2.1 e PIR1.2) e ausência do halo róseo (PIR1.1 e PIR1.2).	56
Figura 14 - Colonização de raízes por microrganismos. Respectivamente positiva e negativa.	60
Figura 15 - Frequência de produção de EPS	61
Figura 16 - Cultura não produtoras (A) e produtoras de EPS (B).	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Semiárido Brasileiro	16
2.2	O Bioma Caatinga	18
2.3	Família Cactaceae	19
2.4	Microrganismos rizosféricos.	22
2.4.1	Mecanismos de ação para promoção de crescimento de plantas por rizobactérias	24
2.4.1.1	Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	24
2.4.1.2	Solubilização de fosfatos	25
2.4.1.3	Produção de fito-hormônios	26
2.4.1.3.1	Citocininas e giberelinas	27
2.4.1.3.2	Ácido indol-acético (AIA)	27
2.4.1.4	Controle de fitopatógenos	28
2.4.2	Mecanismos de tolerância a estresses abióticos	29
2.4.2.1	Exopolissacarídeo (EPS)	29
2.4.2.2	Biofilmes	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Isolamento de Cepas Bacterianas Tolerantes a Estresse Hídrico.	31
3.2	Caracterização Morfológica e Fisiológica.	32
3.2.1	Coloração de Gram.	32
3.2.2	Motilidade.	32
3.2.3	Crescimento em diferentes pH.	33
3.3	Caracterização Molecular.	33
3.3.1	Extração de DNA genômico.	33
3.3.2	Amplificação do gene 16s rRNA.	34
3.3.3	Purificação dos produtos de PCR (protocolo fornecidos pela empresa).	34
3.3.4	Sequenciamento parcial do gene 16s	35
3.3.5	Busca por sequencias homólogas.	35
3.4	Caracterização para Promoção de Crescimento em Plantas.	35

3.4.1	Fixação de nitrogênio de modo assimbiótico em meio livre de nitrogênio (NFb).	35
3.4.2	Solubilização de fosfatos inorgânicos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).	36
3.4.2.1	Avaliação qualitativa.	36
3.4.2.2	Avaliação quantitativa.	36
3.4.3	Produção de ácido indol-acético (AIA)	37
3.4.3.1	Avaliação qualitativa	37
3.4.3.2	Avaliação quantitativa.	37
3.4.4	Avaliação da produção de citocininas e giberelinas.	38
3.4.5	Avaliação da produção de celulase.	38
3.4.6	Avaliação da colonização de raízes.	39
3.5	Mecanismos Contra Dessecação.	40
3.5.1	Avaliação de produção de EPS.	40
3.5.2	Avaliação de formação de biofilme.	41
3.5.2.1	Quantificação da produção de biofilme.	41
3.6	Avaliação de Promoção Crescimento em Plantas de Feijão em Baixa Disponibilidade Hídrica.	41
3.6.1	Desinfestação superficial de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	41
3.6.2	Microbiolização das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	42
3.6.3	Avaliação da promoção de crescimento em plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L em casa de vegetação	42
3.7	Análises estatísticas	42
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	43
4.1	Descrição dos Isolados Obtidos	43
4.2	Coloração de Gram, motilidade.	45
4.3	Crescimento em Diferentes pH	47
4.4	Fixação de Nitrogênio de Modo Assimbiótico.	49
4.5	Produção de Celulase	51
4.6	Solubilização de Fosfato.	52
4.6.1	Avaliação qualitativa	52
4.6.2	Avaliação quantitativa	53
4.7	Produção de Ácido indol acético	55

4.7.1	Avaliação qualitativa	55
4.7.2	Avaliação quantitativa	56
4.8	Produção de Citocininas e Giberelinas	57
4.9	Colonização de Raízes	59
4.10	Produção de EPS (exopolissacarídeos)	61
4.11	Produção de biofilme.	63
4.12	Promoção de Crescimento em Plantas de Feijão em Baixa Disponibilidade Hídrica	64
5	CONCLUSÃO	67
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Ambientes extremos são aqueles onde se acredita que a existência ou permanência de vida é escassa, possuindo pouca riqueza ou diversidade (ROTHSCHILD E MANCINELLI, 2001). Segundo os autores, o termo “extremo” inclui extremos físicos (por exemplo, temperatura, radiação ou pressão) e geoquímicos (por exemplo, dissecação, salinidade, pH, espécies dependentes de oxigênio ou potencial redox). Quando nos referimos aos ambientes extremos secos, incluímos distintos ambientes em todo o mundo que podem ser agrupados no tipo de clima árido e/ou tropical seco (KOTTEK et al, 2006).

Esses climas são caracterizados por apresentarem um pronunciado período seco, precipitação anual total média entre 380 e 760 mm (em regiões desérticas precipitação anual média pode ser <250 mm) e temperaturas elevadas (>17 °C) (PEEL et al, 2007). No Brasil, características climáticas semelhantes as supracitadas são encontradas na região do semiárido.

O semiárido brasileiro ocupa uma área de 969.589 km² e inclui os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, a maior parte da Paraíba e Pernambuco, Sudeste do Piauí, Oeste de Alagoas e Sergipe, região central da Bahia e uma faixa que se estende em Minas Gerais, seguindo o Rio São Francisco, juntamente com um enclave no vale seco da região média do rio Jequitinhonha (BRASIL, 2005). Apresentam médias anuais de temperaturas de 26 a 27,5° C, de insolação de 2800 h ano⁻¹ e de umidade relativa do ar em torno de 50% (MOURA et al, 2007).

No semiárido nordestino a vegetação predominante é a Caatinga, que apresenta plantas com alta resistência aos períodos de seca. A vegetação característica de caatinga apresenta adaptações para a sobrevivência em períodos de longas estiagem e temperaturas altas (KAVAMURA, 2012).

Tais adaptações podem incluir diferenciação da cutícula, controle estomático, armazenamento de água e associação com microrganismos, outras plantas e/ou animais (SIQUEIRA FILHO, 2012; CABRAL et al, 2013). Os microrganismos associados a estas plantas também se encontram bem adaptados às condições impostas pelo clima a qual estão expostos.

Desse modo, são pertinentes estudos de prospecção e identificação da microbiota associada as plantas que sobrevivam a condições extremas, como os presentes na região

semiárida, para elucidação do tipo de interação que existe entre esses organismos e as plantas, como também o potencial biotecnológico dessa microbiota para agricultura brasileira.

Neste contexto, este estudo objetivou: i) isolar bactérias associadas a rizosfera de plantas de Caatinga com características xerotolerantes; ii) identificar, nos isolados, possíveis mecanismos de promoção de crescimento em plantas; iii) identificar as espécies de bactérias selecionadas com ferramentas de biologia molecular.

O semiárido brasileiro é a área semiárida mais povoada do mundo e, em função das adversidades climáticas, associadas a outros fatores históricos, geográficos e políticos, que remontam centenas de anos, abriga a parcela mais pobre da população brasileira, com ocorrência de graves problemas sociais (MOURA et al, 2007).

Segundo Moura et al (2007) o clima do semiárido brasileiro é pouco diversificado, mesmo considerando a sua grande extensão territorial e se instalou entre 8 e 10.000 anos atrás e o comportamento das chuvas é documentado pelos viajantes desde a época do Império. Comparado com outras regiões semiáridas do mundo, onde chove entre 80 a 250 mm por ano, o Semiárido brasileiro é o mais chuvoso do planeta. Nele, cai do céu, em média, de 200 a 800 mm anuais, uma precipitação pluviométrica concentrada em poucos meses do ano e distribuída de forma irregular em todo semiárido (MOURA et al, 2007).

Tanto a ausência ou escassez das chuvas, quanto a sua alta variabilidade espacial e temporal são responsáveis pela ocorrência das secas - um fenômeno natural e cíclico nesta região (ASA, 2017). Outro fator de influência é a pequena profundidade do solo, que reduz a capacidade de absorção da água da chuva, limitando assim, o abastecimento dos aquíferos subterrâneos (ASA, 2017). De acordo com os mesmos autores estima-se que mais de 90% da chuva não são aproveitadas devido à sua evaporação e ao seu escoamento superficial.

O déficit hídrico no semiárido é visto, quase sempre, sob o seu aspecto quantitativo, sem analisar a qualidade da água disponível. Esta visão conduz a “soluções” que priorizam a acumulação de água, como se a presença deste bem fosse suficiente para dirimir todos os problemas causados pela sua escassez (MOURA et al, 2007). Neste contexto, o gerenciamento dos recursos hídricos não deve ser realizado dissociando os aspectos quantitativos e qualitativos, para permitir uma visão ampla e conduzir a soluções apropriadas (MOURA et al 2007).

No semiárido ocorrem dois biomas: a Caatinga e o Cerrado, que estão presentes em 33% do nosso território nacional (54% dos estados brasileiros e 34% dos municípios), onde vivem 30% dos brasileiros (ASA, 2017).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e um dos mais ameaçados do globo. Conhecido como berço das águas, possui as maiores reservas subterrâneas de água doce

do mundo, que alimentam as grandes bacias hidrográficas da América do Sul (ASA, 2017). A vegetação nativa do Cerrado é responsável pela alimentação dos lençóis profundos, contudo, com a introdução da monocultura e pecuária extensiva, parte da vegetação já foi extinta impactando diretamente no funcionamento dos corpos hídricos (ASA,2017).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e o terceiro bioma mais degradado do país, depois da Mata Atlântica e do Cerrado, com 45% de sua área desmatada (ASA, 2017). A Caatinga tem uma importância fundamental para a biodiversidade do planeta pois 1/3 de suas plantas e 15% de seus animais são espécies exclusivas, que não existem em nenhuma outra parte do mundo (ASA, 2017).

2.2 O Bioma Caatinga

A Caatinga originalmente abrangia uma área de aproximadamente 1 milhão de km², atualmente, sua área remanescente é de 826.4411,23 km². O nome “caatinga” é de origem Tupi-Guarani e significa “floresta branca”, que certamente caracteriza bem o aspecto da vegetação na estação seca, quando as folhas caem e apenas os troncos brancos e brilhosos das árvores e arbustos permanecem na paisagem seca (ALBUQUERQUE e BANDEIRA, 1995).

A degradação ambiental generalizada na Caatinga tem origem no desmatamento, que ocorre de forma pulverizada. Isto se deve ao fato de que o vetor mais importante do desmatamento é a exploração predatória para satisfazer demandas por carvão vegetal e lenha para fins energéticos (MMA,2018)

Segundo os dados do Projeto de Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros desenvolvido pelo Ministério do Meio Ambiente (2011) dentre os biomas brasileiros, a Caatinga é o menos conhecido cientificamente e vem sendo tratado com baixa prioridade, não obstante ser um dos mais ameaçados, devido ao uso inadequado e insustentável dos seus solos e recursos naturais, e por ter cerca 1% de remanescentes protegidos por unidades de conservação.

Os resultados do projeto supracitado aponta que até o ano de 2009, a Caatinga teve 45,62% da sua vegetação suprimida tendo como referência a área total do bioma de 826.411,23 km².

Andrade-Lima (1981) individualiza a caatinga como uma vegetação arbórea e arbustiva na qual, em quase todas as espécies, predomina a caducidade das folhas sobre as outras formas de resistência às deficiências hídricas sem excluí-las; mais ou menos rica em cactáceas e bromeliáceas, com um grande número de outras espécies também espinhentas e vários endemismos.

Uma característica muito peculiar da Caatinga é a existência de duas estações bem contrastantes durante o ano, o inverno e o verão. De acordo com Maia (2004), o inverno é caracterizado por ser a estação da chuva, ocorrendo de três a cinco meses, com chuvas irregulares, torrenciais e de pouca duração, e a época da seca, ou seja, o verão, praticamente sem chuvas e que dura em torno de sete a nove meses (FERREIRA, 2014) (Figura 2).

Figura 2 -Transição do período seco e chuvoso na Caatinga. (A) Período seco (B) Período chuvoso



FOTO: FERREIRA, 2014

A vegetação de caatinga é constituída por diferentes padrões, que variam desde a estrutura de uma floresta, constituída de árvores muitas vezes com espinhos, caducifólias e semicaducifólias, com sub-bosque de arbustos caducifólios e ervas anuais onde predominas principalmente as leguminosas. Algumas famílias botânicas encontram-se bem representadas como as cactáceas e as euforbiáceas (QUEIROZ, 2006).

2.3 Família Cactaceae

A família Cactaceae é originária principalmente do México, ocorre em todos os continentes e é dividida em quatro subfamílias: Maihuenioideae, Pereskioideae,

Opuntioideae e Cactoideae (TAYLOR, ZAPPI, 2004). As suas espécies estão entre as mais típicas dos ambientes áridos e semiáridos, sendo encontradas desde o sudeste da Patagônia (Argentina) até o sul do Canadá, em habitats variados que vão desde regiões áridas até florestas úmidas (HUNT & TAYLOR, 1990; ANDERSON, 2001; MEIADO et al, 2012), entretanto, são mais frequentemente encontradas em regiões de clima quente e seco (TAYLOR & ZAPPI, 2004) (Figura 3).

Figura 3 - Exemplos de plantas da família Cactacea. Coroa de frade (*Melocactus zahntheri*) (A), Facheiro (*Pilosocereus pachycladus*) e mandacaru (*Cereus jamacaru*)(B), palma (*Opuntia* spp) (C).



FOTO: AUTORA, 2019

A família compreende 128 gêneros e 1450 espécies (HUNT et al, 2006, 2013). BFG (2015) reconhecem 39 gêneros e 261 espécies no território brasileiro, dos quais 14 gêneros e 188 espécies são endêmicas, com grande percentagem de espécies ameaçadas de extinção.

Os cactos são plantas perenes, xerófitas, suculentas, em geral espinhosas e que possuem hábitos diversos (BARROSO et al, 1978): arbóreo, arbustivo, subarbustivo, trepador, epifítico ou geófito, de raiz fibrosa ou tuberosa. No Brasil, a grande maioria dos cactos é encontrada em capoeiras e matas ciliares, nas regiões da Caatinga, Restingas e Mata Atlântica (GOMES, 2014).

Os membros da família Cactaceae são caracterizados através da presença de três tipos de ramos: além dos ramos vegetativos normais, temos as aréolas, que são ramos reduzidos capazes de produzir folhas, espinhos, outros ramos vegetativos e/ou flores, e os ramos floríferos nos quais o ovário da flor encontra-se imerso formando um hipanto de origem receptacular, externamente recoberto por tecidos vegetativos e, comumente dotado de aréolas, também denominado pericarpelo (BOKE, 1964).

Os caules são fotossintetizantes e apresenta formas diversas, geralmente cladódio ou filocládio, com capacidade de armazenar água e nutrientes, normalmente sem folhas. São capazes de auxiliar no desenvolvimento de ambientes, permitindo o estabelecimento de outros vegetais sobre rochas nuas (PAULA, RIBEIRO, 2004).

Nos caules, se encontram aréolas constituídas de gemas axilares, espinhos e pelos, de onde surgem flores, frutos e ramificações. Apresentam ainda flores noturnas ou diurnas, com numerosas tépalas e estames (PAULA e RIBEIRO, 2004). As flores noturnas, geralmente grandes, são de cores claras e a polinização é realizada por morcegos ou mariposas. Já as diurnas, geralmente menores, apresentam cores variadas, tais como branco, amarelo, alaranjado, esverdeado, cor-de-rosa, vermelho e violeta (PAULA e RIBEIRO, 2004). Os frutos são do tipo baga e apresentam numerosas sementes lisas, escuras e geralmente envoltas pela polpa do fruto (PAULA, RIBEIRO, 2004).

Muitas espécies são utilizadas pelas comunidades rurais para diversos fins, tendo significativa importância como recurso alimentar na região semiárida brasileira (LUCENA et al, 2013). São também utilizadas como forrageira (DAMASCENO et al,

2010; SILVA et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2010) e medicinal (ANDRADE et al, 2006), destacando-se entre estas espécies: *C. jamacaru* subsp. *jamacaru*, *Pilosocereus gounellei* subsp. *gounellei*, *Opuntia ficus-indica* Mill (ARAÚJO et al., 2010; CAVALCANTI e RESENDE, 2007; GALVÃO JÚNIOR et al, 2014).

Apesar de a flora ser razoavelmente bem documentada e estudada, as comunidades bacterianas presentes no solo e associadas às cactáceas têm sido negligenciadas e precisam descritas, registradas e documentadas, uma vez que estas comunidades têm papel fundamental na manutenção desse ecossistema (KAMAVURA, 2013).

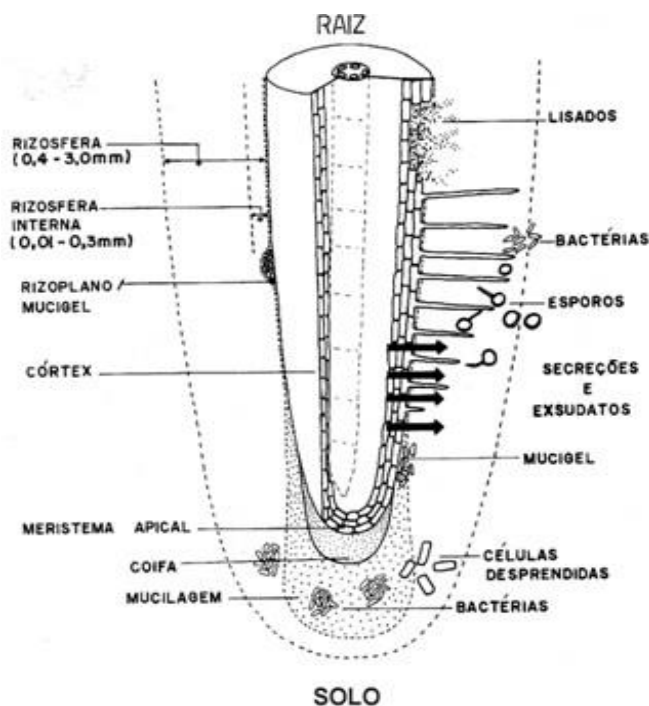
2.4 Microrganismos rizosféricos.

Os microrganismos são considerados a forma de vida mais abundante na biosfera, habitando desde os ambientes mais extremos e improváveis aos mais comuns (CHANAL et al, 2006; LOWE et al, 1993). Várias espécies de microrganismos ocorrem em diversos solos, pois é um habitat rico e complexo que disponibiliza água e nutrientes necessários para o crescimento, multiplicação e sobrevivência dos mesmos (DANTAS et al, 2009).

O solo é um recurso natural que pode abrigar uma alta biodiversidade de organismos. Estima-se que a diversidade de organismos abaixo do nível do solo seja muito superior àquela encontrada acima de seu nível. Grande parte desta biodiversidade é composta por populações de microrganismos com uma ampla diversidade genotípica e metabólica, sendo as bactérias seus principais representantes (LEITE, 2011)

Embora muitas bactérias estejam dispersas no solo, muitas vezes anexado às partículas do solo, muitas interagem com as raízes das plantas, numa região conhecida como rizosfera (Figura 4), área do solo diretamente influenciado pelas raízes. Bactérias que habitam essa região são nomeadas como rizobactérias (LYNCH, 1990).

Figura 4 - Ilustração da delimitação da região rizosférica



É bastante comum que a concentração de bactérias que se encontram em torno da rizosfera das plantas seja muito maior que a concentração bacteriana no resto do solo (LYNCH, 1990), isso ocorre devido presença de altos níveis de nutrientes, incluindo aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos que são exsudados das plantas (LYNCH e LEIJ, 2012).

Esses microrganismos desempenham papéis importantes no crescimento e na adequação ecológica de seu hospedeiro. Explorar esses microrganismos, desvendando suas possíveis relações com as plantas, lançou uma nova e fascinante área de investigações na pesquisa da rizosfera. Rizobactérias têm um papel proeminente no aumento da resistência das plantas a estresses bióticos e não biológicos (ETESAMI e BEATTIE, 2017; MEENA et al, 2017).

De acordo com Nihorimbere e colaboradores (2011) interações microbianas benéficas para a planta podem ser divididas em três categorias:

- Os microrganismos que, em associação com as plantas, são responsáveis pela sua nutrição (isto é, microrganismos que podem aumentar o fornecimento de nutrientes minerais à planta). Neste caso, embora a maioria

não possa interagir diretamente com a planta, seus efeitos nos parâmetros bióticos e abióticos do solo certamente têm impacto no crescimento das plantas.

- Microrganismos que estimulam o crescimento das plantas indiretamente, impedindo o crescimento ou a atividade de patógenos.
- Microrganismos responsáveis pela promoção direta do crescimento, por exemplo, pela produção de fito-hormônios.

As bactérias de rizosfera que exercem um efeito benéfico global sobre o crescimento das plantas são referidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (KLOEPPER E SCHROTH, 1978). A revisão publicada por Nihorimbere et al (2011) mostra que houve um aumento número de espécies bacterianas identificadas como RPCPs e isto é resultado de numerosos estudos que cobrem uma ampla gama de espécies microbianas e de plantas, além avanços feitos na taxonomia bacteriana e o progresso em nossa compreensão dos diferentes mecanismos de ação do rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs).

Alguns dos mecanismos conhecidos pelos quais as RPCPs podem ser benéficas para as plantas incluem: fornecimento de N₂ por planta através de fixação biológica de nitrogênio; a geração de fito-hormônios (ácido giberélico (GA), ácido indol-3-acético (IAA) e citocininas (CK); o controle de patógenos vegetais por mecanismos diferentes como geração de enzimas extracelulares hidrolizando a parede celular fúngica, solubilização e mineralização de nutrientes, particularmente fosfato mineral (GLICK, 2014; HAYAT et al, 2010). A partir disto, essas bactérias podem ser usadas em inóculos para biofertilização, fitoestimulação e biocontrole (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001) com aplicações na agricultura, horticultura, florestas e recuperação ambiental (LUCY et al, 2004).

2.4.1 Mecanismos de ação para promoção de crescimento de plantas por rizobactérias

2.4.1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio (N) é um elemento limitante ao desenvolvimento das plantas sendo classificado, dentro dos critérios de essencialidade, como macronutriente primário. Os solos da zona tropical são, em geral, pobres em N, requerendo o suprimento deste elemento para que sejam alcançadas altas produtividades nas lavouras. A matéria

orgânica é a principal fonte de N no solo, podendo o requerimento de N pelas plantas ser atendido via aplicação de fertilizantes nitrogenados (LEITE, 2011).

No ciclo biogeoquímico do N, a entrada deste elemento no solo possui uma via biológica resultante da interação entre grupos de procariotos diazotróficos e plantas vasculares, resultando no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A fixação biológica de nitrogênio atmosférico ocorre de acordo com uma reação, onde uma molécula de nitrogênio é convertida pela enzima nitrogenase, em duas moléculas de amônia que podem ser facilmente utilizadas pelas plantas (BHATTACHARJEE et al, 2008).

Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas que mostram a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, pode fornecê-lo às plantas por dois mecanismos: simbiótico e não-simbiótico (GUPTA et al, 2015).

A fixação simbiótica de nitrogênio é uma relação mutualística entre um microrganismo e a planta. O microrganismo entra primeiro na raiz e depois forma nódulos nos quais ocorre a fixação de nitrogênio (GUPTA et al, 2015). Os rizóbios são um vasto grupo de rizobactérias que têm a capacidade de estabelecer interações simbióticas pela colonização e formação de nódulos radiculares com plantas leguminosas, onde o nitrogênio é fixado em amônia e disponibilizado para a planta (AHMED e KIBRET, 2014). As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas amplamente apresentadas como simbioses são *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* com plantas leguminosas (ZHRAN, 2001).

Por outro lado, a fixação de nitrogênio não simbiótica é realizada por diazotróficos de vida livre e estimulando o crescimento de plantas não leguminosas, como rabanete e arroz. Bactérias rizosféricas não simbióticas fixadoras de azoto pertencentes já foram identificadas nos gêneros *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter* e *Pseudomonas* (BHATTACHARYYA e JHA, 2012, VESSEY, J.K, 2003).

2.4.1.2 Solubilização de fosfatos

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas devido à sua atuação em processos biológicos, tais como

metabolismo energético, biossíntese de fosfolipídios e ácido nucléico, transdução de sinal e regulação de atividade enzimática (ROCHA et al, 2007). É abundantemente disponível em solos em formas orgânicas e inorgânicas. As plantas são incapazes de utilizar fosfato porque 95-99% de fosfato está presente na forma insolúvel, imobilizada e precipitada (PANDEY e MAHESHWARI, 2007).

As plantas absorvem fosfato apenas em duas formas solúveis, os íons monobásicos (H_2PO_4^-) e os dibásicos (HPO_4^{2-}) (BHATTACHARYYA e JHA, 2012). As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas presentes no solo empregam diferentes estratégias para utilizar formas de fósforo não disponíveis e, por sua vez, também ajudam a disponibilizar fósforo para as plantas absorverem.

Formas inorgânicas de P são geralmente solubilizadas por rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) através da produção e excreção de ácidos orgânicos que, através de seus grupos hidroxilas e carboxilas, quelam cátions ligados ao fosfato convertendo-o em formas solúveis (BATISTA, 2017). Alguns ácidos orgânicos produzidos por RPCPs envolvidos na solubilização de fosfatos são os ácidos málico, glioxálico, succínico, fumárico, tartárico, α -ceto-butírico, oxálico, cítrico, láctico, 2-cetoglucônico e glucônico (BATISTA, 2017).

Rizobactérias solubilizadoras de fosfatos presentes nos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* já vem sendo utilizado como inoculantes do solo na agricultura para melhorar o crescimento e rendimento das plantas (BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

2.4.1.3 Produção de fito-hormônios

Uma ampla quantidade de microrganismos encontrados na rizosfera é capaz de produzir substâncias que regulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas produzem fitohormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas, que podem afetar a proliferação celular na arquitetura da raiz pela superprodução de raízes laterais e raízes (GUPTA et al, 2015).

2.4.1.3.1 Citocininas e giberelinas

Sintetizadas nas raízes, as citocininas são transportadas para todas as partes da planta através do xilema e são conhecidas por induzirem processos mitóticos nas células vegetais e promovem o retardo do envelhecimento das plantas. As giberelinas são hormônios sintetizados essencialmente nas raízes e nos brotos foliares, onde estimulam o crescimento de caules e folhas, no entanto, apresentam baixo efeito sobre o crescimento das raízes (OLIVEIRA et al, 2008). Quando em associação com as auxinas, as giberelinas auxiliam no desenvolvimento dos frutos e junto à citocininas, executam um importante papel nos mecanismos voltados a germinação das sementes (ROSS et al, 2002).

Várias rizobactérias promotoras do crescimento de plantas como *Azotobacter sp.*, *Rhizobium sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa* podem produzir citocininas ou giberelinas ou ambas para promover o crescimento de plantas (KANG et al, 2010).

2.4.1.3.2 Ácido indol-acético (AIA)

Entre os reguladores de crescimento de plantas, o ácido indol-acético (AIA) é a auxina natural mais comum encontrada nas plantas (MIRANSARI e SMITH, 2014).

Este fitormônio funciona como uma chave reguladora para muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas incluindo a divisão, extensão e diferenciação celular da planta; estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta a taxa de desenvolvimento do xilema e da raiz; inicia formação radicular lateral e adventícia; media respostas à luz, gravidade e florescimento; afeta a fotossíntese, a formação de pigmentos, a biossíntese de vários metabólitos e a resistência a condições estressantes (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011).

Interações entre bactérias que produzem AIA e plantas levam a resultados diferentes no que diz respeito à planta, variando da patogênese a fitoestimulação. Bactérias utilizam AIA para interagir com as plantas como parte de sua estratégia de colonização. O efeito de auxinas em plântulas é dependente da concentração. Mudanças de plantas distintas respondem diferencialmente a concentrações variáveis de auxinas (SARWAR e FRANKENBERGER, 1994) e tipos de microrganismos (AHMAD, AHMAD E KHAN, 2005).

Espécies de *Rhizobium* são utilizadas como um bioestimulante e biofertilizante para produção de trigo por causa da sua capacidade de produzir AIA e subsequentemente aumentar o sistema radicular das plantas, permitindo uma maior absorção de N, P e K. (ETESAMI et al, 2009). Isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Providencia* foram avaliados como inoculantes em plantas de feijão mungo (*Vigna radiata*). As três rizobactérias foram capazes de aumentar a biomassa, o tamanho e número de raízes e estes resultados foram atribuídos à habilidade dos isolados produzirem AIA, solubilizar fosfato e apresentar atividade desaminase simultaneamente (AKHTAR e ALI, 2011).

2.4.1.4 Controle de fitopatógenos

Os exsudatos de raízes podem atrair organismos benéficos, mas eles também podem ser igualmente atraentes para populações patogênicas (SCHROTH e HILDEBRAND, 1964), que muitos expressam virulência em apenas um número limitado de espécies hospedeiras. Muitos organismos patogênicos, bactérias e fungos, evoluíram com as plantas e apresentam um alto grau de especificidade do hospedeiro (RAAIJMAKERS et al, 2009).

Na natureza, no entanto, a doença das plantas é a exceção e não a regra, porque as condições que são otimizadas para o crescimento da planta podem não ser favoráveis para os patógenos (PAULITZ e BÈLANGER, 2001). As doenças das plantas desempenham um papel direto na destruição dos recursos naturais na agricultura. Em particular, os patógenos causam perdas importantes, sendo os fungos os mais agressivos.

A extensão de seus efeitos prejudiciais varia de sintomas leves a catástrofes, onde grandes áreas agrícolas podem ser destruídas. Assim, eles são grandes ameaças à produção de alimentos e à estabilidade do ecossistema em todo o mundo. Os agentes patogênicos bacterianos comuns e bem investigados incluem *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* spp. Os fitopatógenos fúngicos e oomicetos incluem membros de *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia* e *Verticillium* (TOURNAS e KATSOUDAS, 2005).

A colonização da raiz não só resulta em altas densidades populacionais de RPCPs no sistema radicular, mas também em metabólitos envolvidos na inibição direta de patógenos vegetais (SHODA, 2000; RAAIJMAKERS et al, 2002). Inclui antibiose, isto

é, a inibição do crescimento microbiano por antibióticos difusíveis e compostos orgânicos voláteis, toxinas e biosurfactantes, e parasitismo que pode envolver a produção de enzimas de degradação da parede celular, tais como quitinases, β -1,3-glucanase (COMPANT et al, 2005; HAAS et al, 2005).

Downer, Menge e Pond (2001) mostram que em experimentos com folhas de eucalipto, altas concentrações de enzimas com capacidade de degradar componentes celulares de *Phytophthora* impediram o desenvolvimento de doenças radiculares e que o fungo não foi capaz de colonizar este ambiente. Dunne e colaboradores (2000) mostraram que a superprodução de protease extracelular nas linhagens mutantes de *Stenotrophomonas maltophilia* W81 resultou em um melhor controle biológico do *Pythium ultimum*. Whipps (2001) verificou que excreção de quitinases e glucanases por espécies de *Trichoderma* e *Streptomyces* também tem mostrado um papel importante no micoparasitismo de fungos fitopatogênicos.

2.4.2 Mecanismos de tolerância a estresses abióticos

Em um ambiente natural, a maioria dos mecanismos usados pelo RPCP para o aumento do crescimento é comum, enquanto que sob condições de estresse, algumas cepas podem não ser capazes de se tornarem eficientes devido à sua incapacidade de sobreviver e competir no ambiente hostil. No entanto, certas cepas RPCP não apenas toleram condições de estresse, mas também têm a capacidade de promover o crescimento das plantas sob ambientes estressantes. (PARRAY et al, 2016).

No geral, RPCP alivia os efeitos do estresse hídrico sobre as plantas através da resistência à seca induzida por rizobactérias (IR), abrangendo modulações fisiológicas e bioquímicas. Vários métodos IR incluem alterações nos níveis fitohormonais, defesa antioxidante, exopolissacarídeos bacterianos (EPS) e numerosos metabólitos que contribuem para o ajuste osmótico, incluindo açúcares, poliaminas e aminoácidos (PARRAY et al, 2016).

2.4.2.1 Exopolissacarídeo (EPS)

Os exopolissacarídeos são produzidos por uma grande variedade de microrganismos (SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004), acumulando-se na superfície das células (CORONADO et al, 1996) e seu uso vem sendo associado a um mecanismo de

adaptação de rizóbios a uma grande variedade de condições estressantes ambientais como solos salinos, variações de temperatura e estresse hídrico. Possibilitam a degradação de alguns compostos, auxiliam os fitopatógenos na colonização, virulência e sobrevivência na planta hospedeira (ROPER et al, 2007), proteção a estresses ambientais (CORONADO et al, 1996).

Chang et al (2007), sugeriram que uma linhagem de *Pseudomonas putida* pode produzir um EPS denominado de alginato, capaz de influenciar o desenvolvimento de biofilme e respostas a condições limitantes de água. Estas respostas, facilitam a manutenção de um microambiente hidratado, protegendo a comunidade contra a desidratação. Pensando na exploração desses microrganismos, principalmente as RPCPs, novos compostos de importância comercial, podem ajudar no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas na agricultura (SILVI et al, 2013).

2.4.2.2 Biofilmes

O biofilme é definido como uma matriz com populações microbianas aderentes umas às outras e/ou a superfícies e interfaces, sendo a matriz composta por carboidratos extracelulares, proteína e até mesmo DNA (BRANDA et al, 2005; COSTERTON et al, 1995), que além de auxiliar no suporte contra as forças físicas, também ajuda na sobrevivência a várias condições de estresse, contra a dessecação e outros tipos de estresses ambientais (DANHORN e FUQUA, 2007; MONIER e LINDOW, 2003). Também pode auxiliar a colonização dos fitopatógenos vasculares, bloqueando a passagem de nutrientes para as plantas (NEWMAN et al, 2003).

Quando há condições externas desfavoráveis, a formação de biofilme é desencadeada, modificando a expressão gênica. O biofilme quando formado, altera o microambiente dos seus habitantes alterando a expressão de vários genes, levando a maturação do biofilme (JEFFERSON, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento de Cepas Bacterianas Tolerantes a Estresse Hídrico.

Amostras de solo rizosférico de mandacaru (*Cereus jamacaru*) e xique-xique (*Pilosocereus gounelleri*) (Figura 5) foram coletadas nos municípios de Piranhas e Olho d'Água do Casado. Estes foram escolhidos, para a realização da amostragem, por apresentarem menores índices de antropização, 0,32% e 0,09% por km² de vegetação do Bioma Caatinga (MMA, 2011), uma vez que buscamos mecanismos fisiológicos que toleram estresse hídrico, além de serem cidades circunvizinhas em Alagoas. As amostras de rizosfera foram coletadas a 10 cm de profundidade, quando possível, e a cerca de 0,5m de distância do caule. Foi considerado como solo de rizosfera toda a partícula de solo adsorvida às raízes das plantas, respeitando a margem considerada na literatura (HARTMAN et al, 2008).

Figura 5 - Mandacaru (*Cereus jamacaru*) e Xique-xique (*Pilosocereus gounellei*).



FOTO: AUTORA, 2019

Foi adotada uma classificação para os pontos de coleta como pouco antropizado, quando havia grande proporção de cactáceas, antropizado – para ambientes com pouca proporção de cactáceas e muito antropizado, quando haviam plantas de cactáceas isoladas no ambiente.

Foram coletadas sub-amostras de solo e estas foram acondicionadas em sacos plásticos e, posteriormente, homogeneizadas para formar amostras compostas. Em

seguida as amostras foram postas para secar ao ar por 24 horas. De cada amostra composta foi tomada uma sub-amostra de 10 gramas, que foi suspensa em 90ml de solução salina esterilizada. Após agitação foram feitas diluições em série (10^{-2} a 10^{-5}) (SANTOS et al, 2009). Utilizou-se apenas a diluição 10^{-5} para a obtenção dos isolados bacterianos.

Para tal, foi utilizado protocolo adaptado de PAULO (2010) onde foi pipetada uma alíquota de 0,1 ml que em seguida depositada em placas de Petri, contendo meio seletivo. As culturas foram incubadas, a temperatura constante de 28°C, por cinco dias. A seletividade do meio constituiu em adicionar um redutor de atividade de água ao meio de cultura Nutriente Ágar, no caso sacarose, na concentração 144g/100mL de água (Atividade de água (A_w) = 0,90).

3.2 Caracterização Morfológica e Fisiológica.

3.2.1 Coloração de Gram.

O processo de coloração consiste na capacidade que alguns microrganismos possuem em reter a coloração cristal violeta por descoloração com álcool em suas paredes celulares. Os que retém são os Gram positivos, os que se deixam descorar, são os Gram negativos. O método utilizado para este foi o descrito por Sinogas, Alho e Brito, 2004.

Tal método consiste em cobrir toda a lâmina com solução cristal violeta (corante roxo), aguardar um minuto, depois lavar rapidamente em água destilada. Em seguida cobrir a lâmina com solução de Lugol (mordente) por um minuto e após isso lavar em água destilada. Inclinando a lâmina e gotejar álcool absoluto por cerca de 30 segundos e lavar a lâmina rapidamente em água corrente. Cobrir com fucsina de gram e aguardar 30 segundos e por fim lavar a lâmina em água destilada e secar (sem esfregar). Depois, observar em microscópio ótico a coloração das paredes celulares dos isolados.

3.2.2 Motilidade.

O teste de motilidade foi realizado com meio de cultura específico com métodos descrito pelo fabricante (KASVI). Os isolados foram inoculados, pela técnica de picada central em meio semi-sólido SIM. São considerados positivos para motilidade, os isolados que cresceram ao longo da picada, formando uma nuvem sobre sua extensão.

3.2.3 Crescimento em diferentes pH.

Para avaliar a capacidade de crescimento em diferentes pH utilizou-se de protocolo adaptado por Leite (2011) onde os isolados foram inoculados por estriamento em placas de Petri contendo meio NA, tendo valores de pH de 4,5 e 9,95, ajustados com NaOH e HCl 1M, foram incubados e crescidos a uma temperatura de 28°C. A análise de crescimento foi determinada sete dias após a incubação. As placas que apresentavam crescimento dentro da estria foram consideradas como resultado positivo.

3.3 Caracterização Molecular.

3.3.1 Extração de DNA genômico.

Após a obtenção dos isolados, foi realizada a extração de DNA de acordo com Leal- Klevezas et al (1995) com algumas adaptações. Os isolados foram crescidos em Caldo Nutriente durante 24h, sob agitação constante a 28° C. Após isso, foram adicionados 1000 µL de tampão TE (pH 8,0) em 400µL da amostra, homogeneizada em vortex por 10 segundos e em seguida centrifugada a 1300x g por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 300 µL tampão de lise (10 µL de Pk 20 units/mg, 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%, 5 µL Tris- HCL 1M, 25 µL de EDTA 0,5M, 10 µL de NaCl 5M e 400 µL de água ultrapura). As amostras foram incubadas “overnight” a 28°C por 48h.

Após esse período, foi adicionado 500 µL de fenol, agitado vigorosamente com as mãos por 20 segundos. A suspensão foi centrifugada a 1300rpm por 5 minutos a 4° C. Logo após, 300 µL da fase aquosa obtida foi transferida para um novo tubo de 1500 µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a fase orgânica. Adicionou-se 300 µL de fenol-clorofórmio (150 µL de fenol+ 150 µL de clorofórmio), agitou-se vigorosamente com as mãos por 10 segundos e em seguida centrifugou-se 1300rpm por 30 min a 4° C. Após isso, transferiu-se a 200 µL da fase aquosa para um novo tubo de 1500 µL, tomando-se cuidado para não aspirar a interface orgânica. Adicionou-se 200 µL de isopropanol gelado e incubou-se por 4h a -20 °C.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1300rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 µL de etanol 70%. Logo, centrifugou-

se as amostras a 1300rpm por 30 min, desprezou-se o sobrenadante e deixou-se secar a temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 50 μL de TE (ph 8,0) e estocou-se a -20°C .

3.3.2 Amplificação do gene 16s rRNA.

A amplificação foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos universais rD1 (5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GG -3') e fD1 (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GA-3') (HEUER; SMALA, 1997). A reação foi composta por 1 μL do DNA (em torno de $44\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 2 μL dNTPs (25 mM), 0,5 μL primer rD1 (100 μM), 0,5 μL primer fD1 (100 μM), 0,9 μL da solução de MgCl_2 (50mM), 2,5 μL de tampão (Buffer 10X), 1 μL Taq DNA Polymerase e 16,6 μL de água ultrapura com volume final de 25 μL para a reação. As condições do termociclador foram desnaturação inicial 94°C por dois minutos, 25 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento a 55°C por um minuto, extensão a 72°C por trinta segundos e extensão final a 72°C por 15 minutos (MONTALDO, 2016). A separação dos produtos amplificados pela PCR foi feita em géis de agarose horizontais submersos na concentração de 1,5%, por 60 min a 110V.

Para obtenção do gel, a agarose foi fundida em tampão TBE 0,5x, em forno de microwaves, na potência máxima, deixando-a esfriar em temperatura ambiente até atingir aproximadamente 60°C , sendo em seguida adicionados brometo de etídio ($5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e agarose vertida na cuba da eletroforese. Uma vez a agarose solidificada, foram adicionados 1.800 mL de tampão TBE na cuba de eletroforese para submersão do gel solidificado. Os produtos da amplificação (5 μL) foram misturados com 2 μL de tampão de amostra (glicerol 30%, EDTA 100 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,30%) e aplicados nos poços do gel. Como padrão do peso molecular, foi usado 50 pb DNA ladder (Ludwig Biotecnologia). Os géis foram visualizados através da incidência de luz ultravioleta.

A purificação dos produtos de PCR e o sequenciamento das amostras foram realizados pela empresa MacroGen Inc. (Córéia do Sul).

3.3.3 Purificação dos produtos de PCR (protocolo fornecidos pela empresa).

A enzima utilizada foi a ExoASP-IT® (usb). O protocolo consistiu na mistura de 5 μL pós PCR com 2 μL de ExoASP-IT para um volume de reação de 7 μL . Após isso, a

mistura foi incubada a 37° C por 15 min para degradar os primers e nucleotídeos remanescentes e em seguida incubada a 80 C por 15 min para inativar a enzima.

3.3.4 Sequenciamento parcial do gene 16s

Os materiais empregados foram o kit de sequenciamento em ciclo Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems); sequenciador: ABI 3730xl DNA Analyzer (96 capilares); termociclador: DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD).

O sequenciamento unidirecional foi realizado com o primer fD1. As reações de sequenciamento seguiram-se de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.5 Busca por sequências homólogas.

A busca por sequências foi feita no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências encontradas foram alinhadas usando algoritmo da família BLAST onde as porcentagens da identidade e da similaridade nestes alinhamentos foram calculadas. Conforme Sales (2006) o valor de “E” (e-valeu), parâmetro estimado pelo BLAST expressa a dificuldade para encontrar uma sequência perfeitamente idêntica, ou seja, quanto menor o valor, menor a chance de tal comparação ter sido encontrada casualmente.

O programa BLAST desenvolvido pelo NCBI é um instrumento de análise e identificação de genes. Pode executar busca de sequências em todos os bancos de dados de DNA encontrando os melhores *scores* de alinhamentos locais entre a sua sequência e o banco de dados; baseados em programas que alinham sequências não espaçadas (SALES, 2006).

3.4 Caracterização para Promoção de Crescimento em Plantas.

3.4.1 Fixação de nitrogênio de modo assimbiótico em meio livre de nitrogênio (NFb).

As bactérias foram testadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio de modo assimbiótico de acordo com Döbereiner (1989) em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb). Tubos de ensaio com 10 mL do meio NFb foram inoculados em triplicata com 100 µL de inóculo bacteriano (10^8 UF.mL⁻¹ (D.O₅₅₀=0,1)). Foram consideradas positivas aquelas que apresentaram uma película visível de crescimento abaixo da superfície do meio após sete dias de incubação.

3.4.2 Solubilização de fosfatos inorgânicos (Ca₃(PO₄)₂).

3.4.2.1 Avaliação qualitativa.

Os isolados foram testados inoculando-os em placas de Petri contendo meio NBRIP suplementado com 1,5% de ágar (NAUTIYAL, 1999). Este método é baseado na adição de fosfato insolúvel a um meio, gerando turbidez. Os microrganismos capazes de solubilizar fosfato inorgânico (P-Ca) produzem um halo transparente ao redor das colônias. A incubação foi realizada a 28°C e o halo e o diâmetro das colônias foram medidos após os 15 dias de incubação. A partir dos valores obtidos em triplicata, foi feita a média e foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo de solubilização e o diâmetro obtido para a colônia (BERRAQUEIRO et al, 1976). Então, a solubilização foi classificada de acordo com os índices obtidos (IS menor que 2 = baixa solubilização; IS entre 2 e 3 = média solubilização; IS maior que 3 = alta solubilização) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Os isolados positivos para solubilização de fosfato foram submetidos para avaliação quantitativa.

3.4.2.2 Avaliação quantitativa.

Os isolados foram semeados em meio líquido NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium*) (NAUTIYAL, 1999), constituído de 1,0% glicose; 0,5% Ca₃(PO₄)₂; 0,5% MgCl₂.6H₂O; 0,02% KCl; 0,025% MgSO₄.7H₂O; 0,01% (NH₄)₂SO₄. O pH foi ajustado para 7,0 antes da autoclavagem. A análise quantitativa da solubilização de P-Ca foi realizada de acordo com Nautiyal (1999) com algumas modificações. Tubos de ensaio com 10 mL do meio NBRIP foram inoculados em triplicata com 100 µL de inóculo bacteriano (10⁸ UFC.mL⁻¹ (DO₅₅₀=0,1)).

O controle constituiu-se de tubos com 10 mL de meio NBRIP sem inóculo. Os tubos foram incubados por 15 dias a 28°C em agitação a 120 rpm. Decorrido o tempo de incubação, 1000 µL de cada amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. Então, a 145 µL de cada amostra foram adicionados 570 µL de água destilada e 285 µL do reagente molibdato-vanadato de amônio (5% molibdato de amônio e 0,25% vanadato de amônio; 1:1, v/v) (MALAVOLTA, 1989; SILVA, 1999).

O espectrofotômetro foi zerado utilizando-se o controle negativo constituído de 145 µL do meio NBRIP sem inóculo, 570 µL de água destilada e 285 µL do reagente molibdato-vanadato de amônio. Após 10 minutos da adição do reagente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) a 420 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela formação de uma coloração amarelada. Os resultados obtidos em absorvância (valores de x), foram convertidos em concentração de P ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (y) por meio da equação $y = (0,3041x^2 + 0,2566x + 0,0213) * 1000$. O pH do meio foi medido apenas ao fim dos 15 dias de solubilização.

A capacidade de solubilização foi ainda classificada em baixa solubilização quando menor $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; média solubilização quando entre 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$; alta solubilização quando entre $101-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e elevada solubilização quando maior $501 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O pH das soluções (inóculo bacteriano + meio de cultura) foram medidos ao fim dos 15 dias de avaliação.

3.4.3 Produção de ácido indol-acético (AIA)

3.4.3.1 Avaliação qualitativa

O método utilizado foi adaptado de Cattelan et al (1999). Inoculou-se os isolados em meio Nutriente Ágar enriquecido com 5mM de L-triptofano. Logo após, as placas foram cobertas com membrana de nitrocelulose e incubadas a 28° por 48h no escuro. Decorrido o tempo as membranas foram removidas para outra placa, impregnadas com solução de Salkowski e novamente incubadas no escuro por 30 minutos. O aparecimento de um halo róseo na membrana é indicativo de produção de AIA.

3.4.3.2 Avaliação quantitativa.

A produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). Tubos de ensaio com 10 mL do meio NA suplementado com 5 mM de L-triptofano foram inoculados em duplicatas com 100 µL de inóculo bacteriano. As culturas foram mantidas a 28°C no escuro, sob agitação constante, durante 24 horas. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos, para obtenção do sobrenadante.

A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada por meio da mistura de 750 μ L do reagente de Salkowski (1,2g FeCl_3 ; 42,1 mL H_2SO_4 ; 57,89 mL H_2O destilada), seguido da leitura da DO a 530 nm em espectrofotômetro (modelo SP22), após 30 minutos de incubação no escuro (HARTMANN et al., 1983). A concentração de AIA no meio de cultura (y) foi determinada pela comparação com uma curva padrão, utilizando-se AIA comercial, por meio da equação $y=34,507x^2+43,802x+0,843$, onde x equivale aos valores de absorbância obtidos.

Os isolados foram classificados de acordo com Hartmann et al (1983) que estabelece os seguintes parâmetros para produção de AIA: baixa produção ($<1\mu\text{g.mL}^{-1}$); média produção ($1-10\mu\text{g.mL}^{-1}$); alta produção ($11-50\mu\text{g.mL}^{-1}$) e elevada produção ($>51\mu\text{g.mL}^{-1}$).

3.4.4 Avaliação da produção de citocininas e giberelinas.

Foi utilizado o método adaptado do bioensaio do cotilédone de rabanete para determinação de citocininas descrito por Letham (1971). O método permite a detecção de citocininas e giberelinas ao mesmo tempo. Para a produção de giberelinas e citocininas foram utilizados cotilédones e hipocótilos de rabanete. As sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro previamente esterilizado e umedecido, incubadas no escuro à temperatura ambiente por um período de 72 horas. Foram selecionados os cinco menores cotilédones, pesados e colocados em placas de Petri com papel filtro umedecido do inóculo de cada isolado com a parte das nervuras voltadas para baixo, junto com 5mm de hipocótilos. O inóculo constou de 1mL de cada isolado, crescidos em meio Caldo Nutriente durante 48h sob agitação constante a rotação 100rpm. Para as testemunhas, foi utilizada caldo nutriente água destilada. Os tratamentos foram incubados em temperatura ambiente sob luz fluorescente fraca contínua.

Após três dias, os cotilédones e hipocótilos foram secados com papel absorvente, pesados e medidos em balança analítica, onde o peso foi comparado com aquele da testemunha.

3.4.5 Avaliação da produção de celulase.

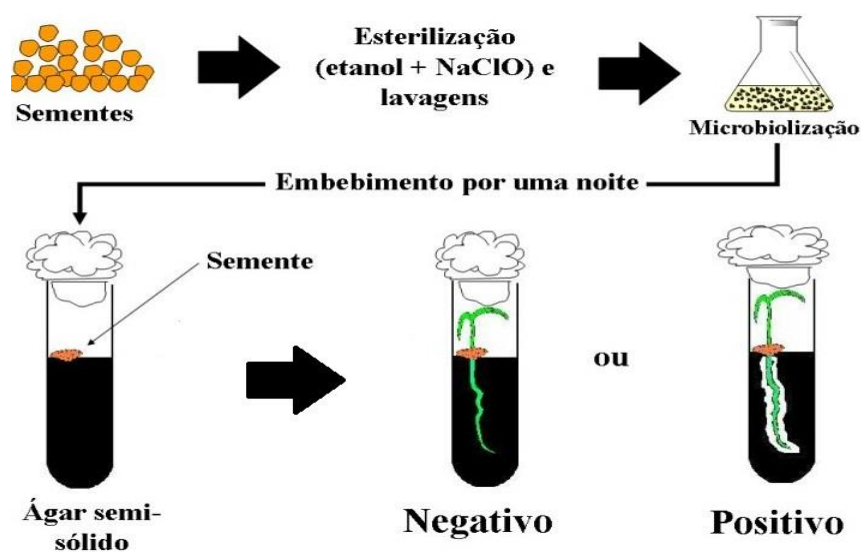
A capacidade de degradação de celulose foi verificada pela semeadura de 5 μ L de cada isolado em meio sólido CMC agar (0,2% NaNO_3 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,05% MgSO_4 ;

0,05% KCl; 0,2% carboximetilcelulose sódico (CMC); 0,02% peptona; 1,7% agar). Após incubação a 28°C por 48 h, as placas foram coradas com iodo (0,666% KI; 0,333% iodo) por 5 minutos (KASANA et al, 2008) e foram medidos os diâmetros da colônia e do halo de degradação e foi calculado o índice celulolítico (IC) baseado na razão entre o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia (TEATHER; WOOD, 1982).

3.4.6 Avaliação da colonização de raízes.

Para realização da colonização de raiz foram utilizadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays L.*), culturas que figuram entre as principais cultivadas nas cidades onde as amostras de solo rizosférico foram coletadas segundo dados da SEPLANDE (2014). As sementes passaram por uma desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 2,5 % por um minuto e depois, lavadas com água destilada e esterilizada (Figura 6). Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em gerbox preto, sobre papel filtro umedecido. Após quatro dias foi feita a primeira contagem das sementes germinadas, e estas colocadas em suspensões bacterianas, correspondentes aos tratamentos de inoculação, por 10 min., após isso colocadas em tubos de ensaio contendo Ágar água a 0,3 %.

Figura 6 - Representação gráfica do protocolo de colonização de sementes



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, demonstrando a formação da colônia bacteriana. 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 (Figura 6).

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.

3.5 Mecanismos Contra Dessecação.

3.5.1 Avaliação de produção de EPS.

O método utilizado foi adaptado de Kamavura (2012). Foram inoculados 5 µl dos isolados bacterianos crescidos em meio Tryptone Soya Broth (TSB) (10%) em discos de 5 mmØ em meio de cultura modificado de Guimarães et al (1999) (2% de extrato de levedura; 1,5% K₂HPO₄; 0,02% MgSO₄; 0,0015% MnSO₄; 0,0015% FeSO₄; 0,003% CaCl₂; 0,0015% NaCl; 1,5% agar) adicionado de 10% de glicose e sacarose. Os meios foram submetidos a incubação a 28°C durante 48h, para meio com sacarose, e 96h, para meio com dextrose.

A produção de EPS foi caracterizada visualmente mediante medida do halo do EPS produzido, sendo + (pouca produção - halo de EPS ≤ 10 mmØ), ++ (média produção - halo de EPS de 10-14 mmØ) e +++ (ótima produção - halo de EPS ≥ 14 mmØ). A confirmação da produção de EPS foi realizada pelo método químico, misturando uma alça de platina impregnada com a colônia em 2 mL de álcool etílico, onde linhagens que não produzem EPS ao serem misturadas em álcool etílico ficam em suspensão, deixando o meio turvo. Já o EPS produzido pelas linhagens, ao ser misturado com o álcool etílico, é precipitado.

3.5.2 Avaliação de formação de biofilme.

Foram inoculados 100 µl dos isolados bacterianos crescidos em meio TSB (10%) ((10⁸ UFC.mL⁻¹ (DO₅₅₀=0,1)) em tubos de polipropileno do tipo eppendorf com 900 µl de meio TSB (10%) adicionado ou não de sorbitol de acordo com Tabela 1, em triplicata. Após incubação por 96 horas a temperatura ambiente, o conteúdo de cada tubo foi homogeneizado por pipetagem e foi medida a absorvância em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) a 600 nm para verificar o crescimento. As células planctônicas foram removidas e cada tubo foi lavado três vezes com água destilada, seguida de adição de 1000 µl de solução de cristal violeta a 0,1% em cada tubo. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, os tubos foram lavados novamente três vezes com água destilada (adaptado de O'TOOLE e KOLTER, 1998).

Tabela 1 - Descrição das condições que os isolados foram submetidos para teste de produção de biofilme

Condições	Tratamento
C1	Sem Sorbitol
C2	0,06 M
C3	0,6 M Sorbitol

3.5.2.1 Quantificação da produção de biofilme.

A formação de biofilme foi quantificada mediante adição de 1000 µl de álcool etílico (95%) em cada tubo para solubilização do cristal violeta incorporado à parede. A densidade óptica (DO) do corante solubilizado foi determinada em espectrofotômetro a 560 nm.

3.6 Avaliação de Promoção Crescimento em Plantas de Feijão em Baixa Disponibilidade Hídrica.

3.6.1 Desinfestação superficial de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio 2% (7 minutos), álcool 70% (1 minuto), seguido de três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada.

3.6.2 Microbiolização das sementes de *Phaseolus vulgaris* L.

As bactérias foram inoculadas separadamente em Erlenmeyers com meio NA 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⁻¹ (DO550=0,1) com solução salina a 0,85% esterilizada e as sementes de feijão desinfestadas foram imersas por uma hora nas suspensões bacterianas. As sementes do tratamento controle, sem bactérias, foram imersas pelo mesmo período em solução salina a 0,85% esterilizada.

3.6.3 Avaliação da promoção de crescimento em plantas de *Phaseolus vulgaris* L em casa de vegetação

Os experimentos de plantio foram realizados em casa de vegetação de forma casualizada, com três repetições, em copos plásticos de 500mL em substrato comercial não autoclavado. As condições de rega foram estabelecidas da seguinte maneira: regas livres, uma vez por dia, na primeira semana. Regas livres a cada dois dias, na segunda semana e regas livres a cada três dias na terceira semana. Foram utilizadas plantas sem inóculo bacteriano (testemunha). A avaliação da promoção de crescimento das plantas pelas rizobactérias foi baseada na altura da parte aérea, peso seco da planta e número de folhas.

3.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise variância as médias foram comparadas a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott usando o software SISVAR 5.6 (UFLA) (FERREIRA, 2008).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Descrição dos Isolados Obtidos

Foram isoladas um total de doze cepas bacterianas com capacidade de crescer em baixa atividade de água (Tabela 2). 58,3% deles foram isolados da rizosfera de mandacaru e desses 85,7% são da cidade de Piranhas, que apresenta maior índice de antropização no Bioma Caatinga que a cidade de Olho d'Água do Casado. Antes da identificação por métodos moleculares os isolados foram nomeados segundo a cidade de origem seguido do ponto de coleta.

A água é imprescindível para o desenvolvimento de todos os organismos vivos, pois dependem da mesma para a manutenção de suas atividades fisiológica. Para as bactérias consideradas xerotolerantes, são definidos valores mínimos de atividade de água (Aw) 0,900 GRANT, 2004). No presente estudo, as bactérias que apresentaram crescimento em meio de cultura com baixa atividade de Aw (0,90) podem ser classificadas como xerotolerantes.

Para todos os isolados ao método para extração de DNA foram eficientes, porém a amplificação do gene 16S rRNA com os primers rD1 e fD1 só foi possível em 5 deles (Figura 7).

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 1,0% . Extração de DNA total de 8 dos isolados provenientes da Caatinga alagoana em gel e amplificação do gene 16s, respectivamente.

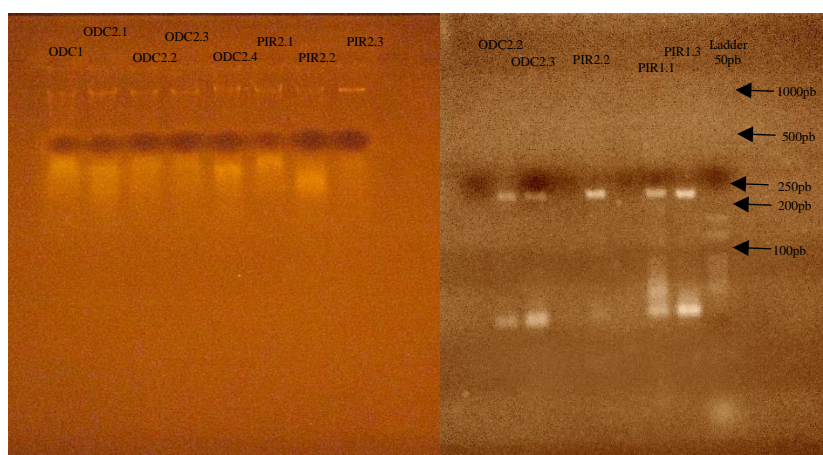


FOTO: AUTORA, 2019

No presente estudo, a comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com o banco de dados *NCBI* mostrou que três isolados tiveram afiliação taxonômica ao gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 2).

Tabela 2 - Identificação dos isolados e respectivo lugar de coleta.

Identificação	Isolado	Cidade de coleta	Rizosfera	Ambiente
-	ODC1	Olho d'Água do Casado	Mandacaru	Pouco antropizado
-	ODC2.1	Olho d'Água do Casado	Xique xique	Pouco antropizado
<i>Bradyrhizobim</i> sp.	ODC2.2	Olho d'Água do Casado	Xique xique	Pouco antropizado
-	ODC2.3	Olho d'Água do Casado	Xique xique	Pouco antropizado
-	ODC2.4	Olho d'Água do Casado	Xique xique	Pouco antropizado
-	PIR2.1	Piranhas	Mandacaru	Muito Antropizado
<i>Bradyrhizobim</i> sp.	PIR2.2	Piranhas	Mandacaru	Muito Antropizado
-	PIR2.3	Piranhas	Mandacaru	Muito Antropizado
-	ODC2.5	Olho d'Água do Casado	Xique xique	Pouco antropizado
-	PIR1.1	Piranhas	Mandacaru	Antropizado
-	PIR1.2	Piranhas	Mandacaru	Antropizado
<i>Bradyrhizobim</i> sp.	PIR1.3	Piranhas	Mandacaru	Antropizado

Os isolados ODC2.1 e PIR1.1 também foram sequenciados, porém não foi possível encontrada sequências similares no banco de dados *NCBI*. O programa *BLAST*, software a qual as sequencias de DNA foram submetidos, desenvolvido pelo *NCBI* é um instrumento de análise e identificação dos genes pode executar busca de sequências em todos os bancos de dados de DNA em menos de 15 segundos encontrando os melhores scores de alinhamentos locais entre a sua sequência e o banco de dados; baseado em programas que alinham sequencias não espaçadas.

Os resultados encontrados neste trabalho aliados a eficiência do programa *BLAST* e a amplitude do banco de dados do *NCBI* indicam que os organismos analisados podem não ter sido caracterizados molecularmente e/ou suas sequências genômicas ainda não

estão registradas no referido banco (ANEXO I). Outros detalhes do sequenciamento podem ser observados no ANEXOS II e III.

Em pesquisas futuras, análises de outras regiões dos genomas devem ser realizadas para a elucidação da identificação destes organismos e o registro da associação dos mesmos em rizosferas de cactáceas presentes no Bioma Caatinga.

Normander e Prosser (2000) relatam que as comunidades bacterianas rizosféricas têm origem do solo ao redor, entretanto na rizosfera parece ocorrer uma seleção (efeito rizosférico), de modo que os exsudatos radiculares criam um nicho que influencia quais microrganismos devem colonizar a rizosfera, alterando a composição e diversidade de microrganismos rizosféricos de uma maneira específica para cada planta (GRAYSTON et al, 1998). Esse efeito também foi observado por Kamavarua (2012).

A diversidade bacteriana na Caatinga já foi registrada por diversos autores (TAKETANI et al, 2015; BONONI et al, 2016; KAMAVURA, 2012, FERREIRA et al, 2016). Os autores citam como destaque as famílias Actinomycetales e Solirubrobacterales (Actinobacteria); Rhizobiales (Alphaproteobacteria); Burkholderiales (Betaproteobacteria); Myxococcales e Desulfuromonadales (Deltaproteobacteria) e Alteromonadales, Chromatiales, Enterobacterales, Pseudomonadales e Xanthomonadales (Gammaproteobacteria).

Esses microrganismos são conhecidos como importantes na ciclagem de vários nutrientes no solo, como Rhizobiales e Burkholderiales – fixadores de nitrogênio e Myxococcales e Desulfobacterales – bactérias redutoras de sulfato (FERREIRA et al, 2016).

4.2 Coloração de Gram, motilidade.

Dos doze isolados, apenas o ODC2.3 é Gram positivo. O teste em meio SIM revelou que 83,3% dos isolados apresentam motilidade, (Tabela 3). Tratamentos positivos para motilidade são demonstrados na Figura 8.

Tabela 3 - Ausência (+) e presença (-) de motilidade.

Isolado	Motilidade	Gram
ODC1	+	Negativa
ODC2.1	+	Negativa
ODC2.2	+	Negativa
ODC2.3	+	Positiva
ODC2.4	+	Negativa
PIR2.1	+	Negativa
PIR2.2	+	Negativa
PIR2.3	+	Negativa
ODC2.5	+	Negativa
PIR1.1	-	Negativa
PIR1.2	-	Negativa
PIR1.3	-	Negativa

Motilidade é uma importante estratégia usadas por bactérias para se mover em direção a moléculas atraentes, permitindo-lhes alcançar nichos com altas concentrações de nutrientes, como a rizosfera (ALLARD-MASSICOTTE et al, 2016). Fan et al (2012) comprovaram que exsudatos de raízes de milho contribuem para quimiotaxia e motilidade de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.

Na rizosfera, devido à seletividade das raízes, podem predominar bactérias Gram-negativas, como observado na rizosfera de trigo (FISCHER et al, 2007). No entanto, o número e grupos de bactérias podem ser afetados pelo tipo de solo e de vegetais, práticas de manejo do solo e condições climáticas (SILVA e NAHAS 2002, VIANA et al, 2011, RAMOS et al, 2012).

Gorlach-Lira e Coutinho (2007), estudando solo rizosférico da caatinga, perceberam que 16% dos seus isolados bacterianos demonstraram perfil Gram-negativo (todos bastonetes), enquanto que 83% apresentaram perfil Gram-positivo e, destes, 70% demonstraram forma filamentosa (actinomicetos) e 30% forma de bastonete.

Figura 8 -Provas positivos para motilidade.

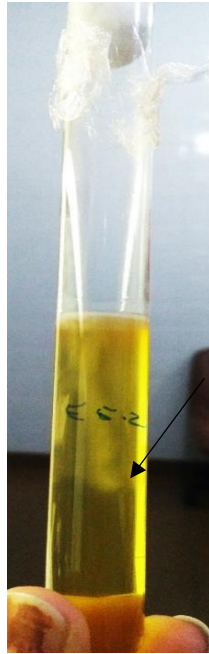


FOTO: AUTORA, 2019

4.3 Crescimento em Diferentes pH

Com exceção do isolado PIR2.1 em pH 4,56, todos os outros tiveram a capacidade de crescer em diferentes pH (Tabela 4 e Figura 9)

Tabela 4 - Ausência e presença de crescimento bacteriano em diferentes pH.

Isolado	4,56	9,95
ODC1	+	+
ODC2.1	+	+
ODC2.2	+	+
ODC2.3	+	+
ODC2.4	+	+
PIR2.1	-	+
PIR2.2	+	+
PIR2.3	+	+
ODC2.5	+	+
PIR1.1	+	+
PIR1.2	+	+
PIR1.3	+	+

O pH do solo é um dos atributos edáficos que limita a presença de microrganismos no solo (BROCKWELL et al, 1991). Um estudo feito por Fierer e Jackson (2006) relacionando atributos edáficos e a fitogeografia com índices de diversidades bacteriana relatou que o pH do solo é sem dúvida o melhor preditor de diversidade e riqueza, com menores índices em solos mais ácidos.

Giondo et al (2008) verificaram, que o pH do solo foi a principal característica edáfica a afetar a diversidade das populações de *Bradyrhizobium* spp, isoladas de nódulos de soja e que a menor diversidade foi encontrada nos solos com pH mais ácido. Stroschein (2007) também observou a capacidade de *Bradyrhizobium* sp crescer em diferentes pHs (pH 4,5,6,7 e 8).

Figura 9 - Crescimento em diferentes pH (isolado PIR1.2)



FOTO: AUTORA, 2019

4.4 Fixação de Nitrogênio de Modo Assimbiótico.

Os isolados que mostraram capacidade de fixar nitrogênio estão descritos na Tabela 5 e pode-se observar a película indicadora de fixação de nitrogênio (Figura 10).

Tabela 5 - Isolados fixadores de nitrogênio de modo assimbiótico

Isolado	NFb
ODC1	-
ODC2.1	-
ODC2.2	+
ODC2.3	+
ODC2.4	+
PIR2.1	+
PIR2.2	+
PIR2.3	+
ODC2.5	+
PIR1.1	-
PIR1.2	+
PIR1.3	+

O nitrogênio é um elemento essencial no desenvolvimento e crescimento das plantas. Representa cerca de 2% da matéria seca total da planta que entra na cadeia

alimentar (SANTI et al, 2013). Estresses ambientais, como salinidade e seca, também podem influenciar o conteúdo de N da planta, reduzindo o crescimento das raízes e, assim, reduzindo a área de superfície para a absorção de nutrientes, como os fertilizantes inorgânicos (ETESAMI e BEATTIE, 2017)

Figura 10 - Tratamento negativo (A) e positivo (B) para fixação de N₂ em meio NFb.

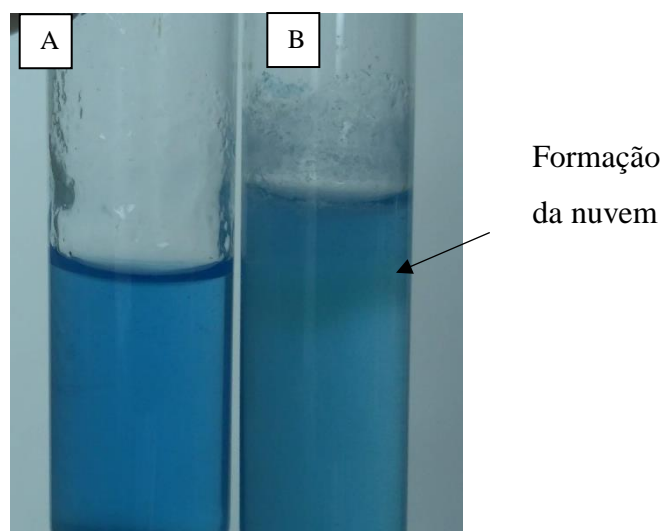


FOTO: AUTORA, 2019

Rizobactérias diazotróficas foram identificadas em vários gêneros de proteobactérias alfa e beta, incluindo *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbasprillum*, *Glucenobacter* e *Pseudomonas* (BALDANI et al, 2000; COCKING, 2009; RICHARDSON et al, 2009)

Braga (2015) isolou 80 estirpes bacterianas com capacidade fixar nitrogênio em estudo feito na rizosfera de jurema branca (*Mimosa artemisiana*) nos estados da Bahia e Pernambuco, dentre essas as espécies *Bacillus anthracis*, *Bacillus siamensis*, *Paenibacillus kribbensis*, *Sphingobacterium spiritivorum*. Leite (2011) testou e caracterizou cepas de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum* provenientes de solos da região submédica do Vale do São Francisco, situada dentro da zona climática do Semiárido do Nordeste do Brasil, para mecanismos de promoção de crescimento.

A busca por microrganismos capazes de realizar a fixação de nitrogênio de modo assimbiótico é interessante, tendo em vista a substituição dos fertilizantes químicos que

podem ser facilmente lixiviados, aumentando a poluição aquática causada pela eutrofização (FRANCHE et al, 2009).

4.5 Produção de Celulase

Para a enzima celulase, apenas os isolados 11 e 19 apresentaram capacidade de produção, com índices celulolíticos de 1,5 e 2,7, respectivamente. Diferentemente, Kavamura (2012), prospectando rizobactérias benéficas em plantas da família *Cactacea*, encontrou maior frequência de microrganismos com capacidade de degradação de celulose quando isolados em períodos de seca. Dentre os organismos encontrados no estudo citado haviam cepas de *Bacillus* spp. e *Nocardia* sp. que apresentaram índices celulolíticos maiores que 4. Dos 29 isolados bacterianos da rizosfera de milho caracterizados por Ramos et al (2018), 19 produziram halo de hidrólise em Ágar CMC, com índices variando entre 1,2 e 5,6.

Para a comunidade bacteriana, a produção de enzimas auxilia no crescimento e sobrevivência da população, por aumentar a disponibilização de nutrientes, evitar a ação de algumas substâncias deletérias e o desenvolvimento de organismos patogênicos. A Figura 11 ilustra a produção de celulase (A) pela formação do halo em volta da colônia.

Figura 11 - Indicativo da produção (A) e da não produção (B) de celulase

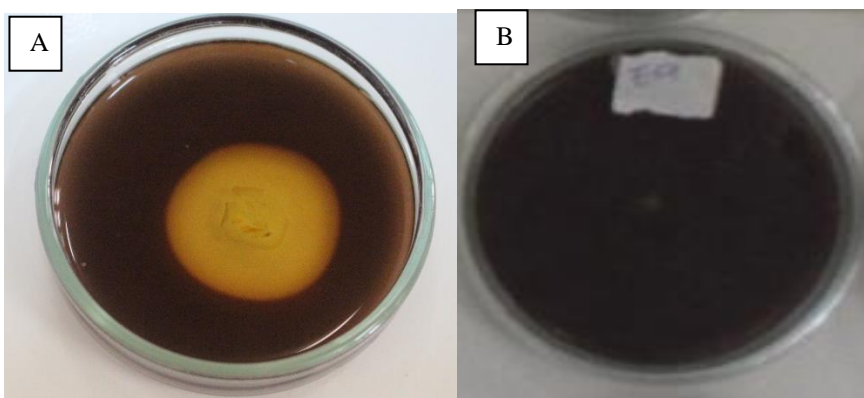


FOTO: AUTORA, 2019

4.6 Solubilização de Fosfato.

4.6.1 Avaliação qualitativa

Para solubilização de fosfato, onze isolados demonstraram capacidade de solubilizar fosfato tricalcico em meio sólido (Tabela 6), 50 % desses apresentaram índices de solubilização entre 2,0 e 2,08, sendo assim a eficiência de solubilização foi classificada como média. Apenas o isolado ODC2.1 apresentou alta capacidade de solubilização de fosfatos, diferindo significativamente dos demais. O isolado PIR1.1 não apresentou crescimento (Figura 12). Os índices de solubilização e suas respectivas classificações estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Médias do diâmetro das colônias, halos de solubilização e índices de solubilização de fosfatos.

Isolado	Colônia (mm)	Halo (mm)	Índice de Solubilização	Classificação
ODC1	10,8	12,9	1,2	Baixa
ODC2.1	7,2	27,1	3,8	Alta
ODC2.2	11,0	31,2	2,8	Média
ODC2.3	12,4	31,1	2,5	Média
ODC2.4	10,6	21,9	2,1	Média
PIR2.1	7,1	13,7	1,9	Baixa
PIR2.2	9,7	22,3	2,3	Média
PIR2.3	8,3	18,1	2,2	Média
ODC2.5	9,9	13,3	1,3	Baixa
PIR1.1	-	-	-	-
PIR1.2	13,6	20,6	1,5	Baixa
PIR1.3	11,2	13,7	1,2	Baixa

Lins (2014) estudando o potencial de actinobactérias provenientes de Caatinga, encontrou 75 linhagens capazes de solubilizar fosfato com índices de solubilização variando entre 1,15 e 2,17. Carvalho et al (2016) isolou bactérias aptas a solubilizar fosfato das raízes de *Cereus*, quando a planta estava em seu habitat natural, no município Irauçuba, região caracterizada pelo clima tropical quente semiárido.

As cepas de *Bradyrhizobium* identificadas neste estudo demonstraram índices de solubilização diferentes especialmente se comparadas ao lugar de seu isolamento. *Bradyrhizobium* proveniente de Olho d'água do Casado demonstrou maior eficiência na solubilização de fosfato que as cepas isoladas dos solos de Piranhas.

Os microrganismos encontrados neste estudo podem desempenhar um importante papel na disponibilidade de fósforo para as plantas, por isso ensaios para a validação de um novo produto biotecnológico em substituição parcial e/ou total aos fertilizantes fosforados sintéticos devem ser realizados em pesquisas futuras.

Figura 12 - Eficiência de solubilização de fosfato baixa, média, alta e negativa, respectivamente.

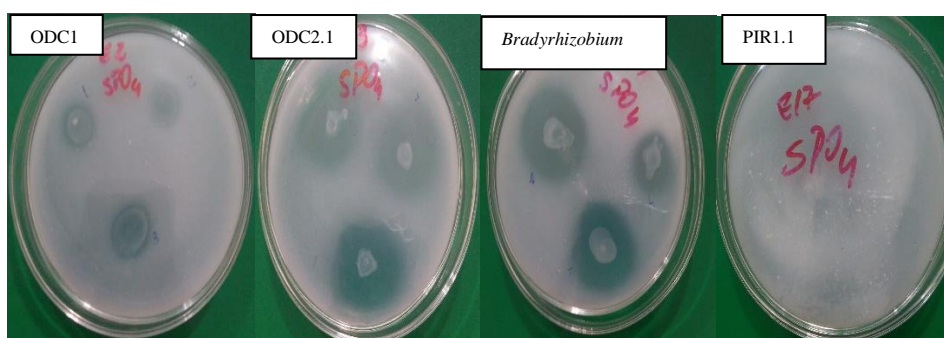


FOTO: AUTORA, 2019

4.6.2 Avaliação quantitativa

Os isolados demonstraram comportamento igual ao longo dos dias alcançando as máximas solubilização ao décimo dia de experimento, como pode ser observado através das médias descritas na Tabela 7. Aos 15 dias de avaliação, foi identificado uma contaminação fungica no isolado ODC1 e por isso a avaliação deste dia foi descartada.

Os isolados não apresentaram diferenças estatística entre médias de solubilização aos 5 e aos 10 dias. No entanto, aos 15 dias os isolados ODC2.1, PIR2.2, PIR2.3, ODC2.5 apresentaram médias significativamente maiores em relação aos outros.

Tabela 7 - Quantidade de P solúvel $\mu\text{g.mL}^{-1}$ detectado sob 15 dias de cultivo em Nbríp líquido

Isolado	5	Classificação	10	Classificação	15	Classificação	pH
ODC1	63,56	Média	223,39	Alta	-	-	-
ODC2.1	55,35	Média	102,29	Alta	77,34	Média	4,64
ODC2.2	62,62	Média	218,11	Alta	55,65	Média	5,17
ODC2.3	61,82	Média	105,41	Alta	43,62	Baixa	5,11
ODC2.4	100,08	Média	143,54	Alta	48,42	Baixa	4,89
PIR2.1	63,53	Média	188,38	Alta	36,77	Baixa	5,33
PIR2.2	100,8	Média	50,35	Média	64,21	Média	5,16
PIR2.3	61,14	Média	214,81	Alta	76,98	Média	5,51
ODC2.5	61,82	Média	147,58	Alta	71,03	Média	5,5
PIR1.1	-	-	-	-	-	-	-
PIR1.2	72,28	Média	108,43	Alta	49,05	Baixa	4,37
PIR1.3	55,48	Média	192,2	Alta	55,65	Média	4,33

Para os isolados obtidos por Kavamura (2012) durante o período de seca em solos de caatinga, 42% apresentam alta solubilização, com médias entre 101 e 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$. Montaldo (2016) isolou 24 cepas bacterianas de solos com cana-de-açúcar em Alagoas e obteve 66,6% dos isolados capazes de solubilizar 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A RPCP solubilizadoras de fosfato estão incluídas nos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus* e *Serratia*, (OTEINO et al, 2015).

A capacidade dos microrganismos em solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis tem sido atribuída à redução do pH ao seu redor. Segundo Stumm e Morgan (1995) e Whitelaw (2000) a redução do pH promove maior solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis tais como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, AlPO_4 e FePO_4 , fato que corrobora os resultados encontrado neste estudo. Marra (2012) e Zaidi et al (2009) ainda relacionam outros mecanismos relacionados à solubilização de fosfato como produção de ácidos inorgânicos, produção de exopolissacarídeos, produção de H_2S .

4.7 Produção de Ácido indol acético

4.7.1 Avaliação qualitativa

Dobbelaere (2003) cita que a capacidade de sintetizar ácido indolacético, é característica generalizada entre as rizobactérias. Entretanto, dois isolados avaliados (Tabela 8) não foram capazes de produzir o hormônio AIA. Esse fato foi confirmado, pela ausência do halo róseo apresentada pelos isolados, na presença do reagente de Salkowski, indicando o resultado negativo para o método utilizado na avaliação Figura 13.

Tabela 8 - Isolados produtores de AIA

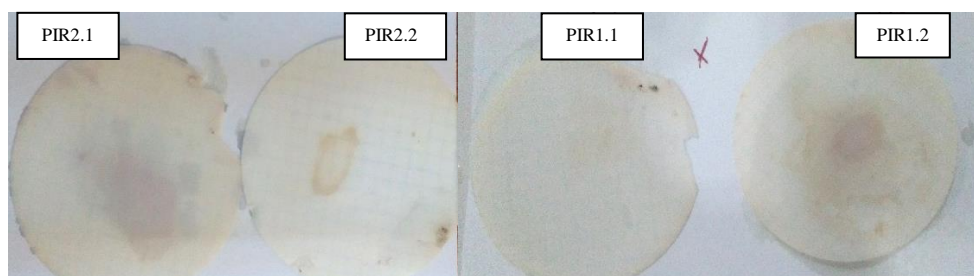
Isolado	AIA
ODC1	+
ODC2.1	+
ODC2.2	+
ODC2.3	+
ODC2.4	+
PIR2.1	+
PIR2.2	-
PIR2.3	+
ODC2.5	+
PIR1.1	-
PIR1.2	+
PIR1.3	+

Segundo CERIGIOLI (2005), o AIA bacteriano é obtido na fase estacionária por ser um metabólito secundário, porém a duração da fase estacionária depende de cada espécie. Dessa forma, é necessário conhecer o comportamento de cada isolado, para realizar a leitura da síntese de auxina em diferentes tempos do desenvolvimento bacteriano, possibilitando a determinação do período em que ocorre a síntese máxima do hormônio (INUI, 2009).

Bactérias da rizosfera produtoras de AIA podem desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estádios de desenvolvimento e no processo de enraizamento. Sabe-se que esse estímulo é dependente da dosagem do hormônio, pois o excesso dele pode retardar ou até inibir o

crescimento do vegetal (INUI, 2009). RPCPs que produzem AIA podem aumentar o crescimento das raízes e, portanto, restaurar a nutrição de N e outros minerais (ETESAMI e BEATTIE, 2017).

Figura 13- Indicação qualitativa de produção de AIA pela presença (PIR2.1 e PIR1.2) e ausência do halo róseo (PIR1.1 e PIR1.2).



4.7.2 Avaliação quantitativa

Dentre as 10 bactérias qualificadas como produtoras de AIA, nove obtiveram médias acima de $11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e apenas o isolado PIR2.3 abaixo de $11 \mu\text{g.mL}^{-1}$, obtendo entre os isolados, moderada, alta e média produção deste fitohormônio. Os isolados OSC2.3, ODC2.4, ODC2.5, PIR1.2, e PIR1.3 diferiram significativamente das demais com médias entre $21,49$ a $24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido indolacético (

Tabela 9 - Médias de produção de AIA

).

Tabela 9 - Médias de produção de AIA

Isolados	Médias ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	AIA
ODC1	14,62b	Alta
ODC2.1	22,36a	Alta
ODC2.2	16,33b	Alta
ODC2.3	14,71b	Alta
ODC2.4	23,69a	Alta
PIR2.1	13,64b	Alta
PIR2.2	-	-
PIR2.3	10,77b	Média
ODC2.5	22,55a	Alta
PIR1.1	-	-

PIR1.2	21,49a	
PIR1.3	24,00a	Alta

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott–Knott a 5% de probabilidade

As cepas de *Bradyrhizobium* sp. ODC2.2 e PIR1.3 apresentaram médias de 16,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto a PIR2.2, que também foi identificada como *Bradyrhizobium* sp, neste estudo não apresentou produção de AIA. De acordo com Mirza et al (2001), a síntese desta auxina pode ser influenciada pelas condições de cultura, estágio de crescimento do isolado e disponibilidade de substrato. Isso pode explicar a variação na síntese de AIA por linhagens pertencentes ao mesmo gênero.

No estudo realizado por Shokri e Emtiazi (2010), foi avaliada a produção de ácido 3-indolacético em 35 bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solo e raízes de plantas e foi observado que os gêneros *Rhizobium* e *Paenibacillus* apresentaram concentrações de ácido 3-indolacético respectivamente de 5,23 e 4,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo também concentrações bastante inferiores em relação ao observado com as rizobactérias nesta pesquisa.

Agronomicamente, bactérias produtoras de reguladores de crescimento desempenham um papel importante na promoção de crescimento de plantas (DOBBELAERE, 2003). Em especial, a auxina AIA promove estímulos à planta agindo tanto no alongamento quanto na divisão e diferenciação celular (DOBBELAERE, 2003). Este fitohormônio apresenta resultados variados em relação as diferentes culturas, e pode promover o crescimento radicular das plantas quando em concentrações adequadas (DOBBELAERE et al, 1999).

Resultados positivos para produção de AIA por rizobactérias isoladas dos solos de semiárido também foram encontrados por Kavamura (2012), Lins (2014) e Braga (2015).

4.8 Produção de Citocininas e Giberelinas

As médias produção de peso e comprimento estão descritas na Tabela 10. Dentre os isolados avaliados os isolados ODC1, ODC2.1, ODC2.3, ODC2.4, ODC2.5, PIR1.1 e a testemunha obtiveram médias superiores estatisticamente para aumentos de peso em relação aos outros isolados.

Já para as médias de comprimento, os isolados ODC1, ODC2.1, ODC2.3, PIR2.3, ODC2.5, PIR1.3 foram significativamente superiores aos outros isolados e a testemunha, indicando que esses isolados são produtores de giberelinas. E por este motivo também proporcionar aumentos no peso dos cotilédones de rabanete.

Segundo Cattelan (1999), os isolados produtores de citocininas promovem o aumento da massa dos cotilédones, mas não o crescimento dos hipocótilos; já os isolados produtores de giberelinas aumentam tanto a massa dos cotilédones quanto o comprimento dos hipocótilos.

Tabela 10 Médias de produção de citocininas e giberelinas

Isolado	Peso/Citocinina(g)	Comprimento/Giberelina (mm)
Testemunha	0,027 a	5 b
ODC1	0,024 a	6 a
ODC2.1	0,026 a	6 a
ODC2.2	0,021 b	5 b
ODC2.3	0,022 a	5,67 a
ODC2.4	0,020 a	5,67 a
PIR2.1	0,017 b	5 b
PIR2.2	0,014 b	5 b
PIR2.3	0,019 b	6 a
ODC2.5	0, 023 a	6 a
PIR1.1	0, 028 a	5 b
PIR1.2	0, 020 b	5 b
PIR1.3	0,017 b	5,67 a

Letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott–Knott a 5% de probabilidade

Rizobactérias isoladas de feijoeiro promoveram médias entre 0,027 a 0,080 g a cotilédones de rabanete indicando uma potencial produção de citocinas, enquanto para a o teste de produção de giberelinas as médias foram entre 4,5 e 3,44 (BUBANZ, 2018).

As giberelinas e citocininas possuem importante atuação na germinação das sementes (TAIZ e ZEIGER, 2004). Entretanto, as citocininas ao contrário das giberelinas, são capazes de influenciar no crescimento radicular, e atuam estimulando a divisão e

diferenciação celular. Diferentes autores apontam para os benefícios das citocininas sobre as plantas, agindo principalmente sobre o crescimento foliar, promoção do aumento da área foliar, melhoria na abertura estomática em algumas espécies, desenvolvimento dos cloroplastos e a acumulação de clorofila, retardando o envelhecimento das plantas (DAVIE, 1995; MARCHIORO, 2005; GARCIA, 2006).

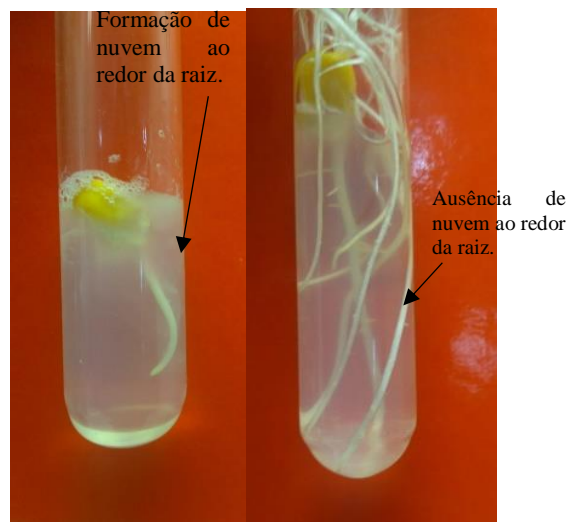
4.9 Colonização de Raízes

Métodos *in vitro* possuem a vantagem da avaliação célere da capacidade de microrganismos em colonizarem as raízes das plantas, possibilitando assim a seleção de possíveis agentes promotores de crescimento e biocontrole com maior rapidez (BUBANZ, 2018). Dessa forma, após o método de visualização em ágar-água, a colonização em semente de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) estão retratadas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Visualização de resultados positivos e negativos podem ser observados na Figura 14.

Tabela 11 - Interação microrganismos e sementes de feijão e milho

Isolados	FEIJÃO		MILHO	
	Colonização do colo	Sistema radicular	Colonização do colo	Sistema radicular
ODC1	+	+	-	-
ODC2.1	-	-	-	+
ODC2.2	+	+	+	+
ODC2.3	+	+	-	-
ODC2.4	+	+	-	+
PIR2.1	+	+	+	+
PIR2.2	-	-	+	+
PIR2.3	+	+	-	+
ODC2.5	+	+	+	+
PIR1.1	+	+	+	+
PIR1.2	-	-	+	+
PIR1.3	+	+	+	+

Figura 14 - Colonização de raízes por microrganismos. Respectivamente positiva e negativa.



Os isolados ODC2.1, *Bradyrhizobium* sp, PIR1.2 não colonizaram de nenhum modo as sementes de feijão, e os ODC1 e ODC2.3 não colonizaram as de milho. Ainda nas sementes de milho, os isolados ODC2.1, ODC2.4 e PIR2.3 colonizaram as raízes das plantas e não o colo.

Konusny-Andreani e Andreani (2014) estudando a promoção de crescimento de espécies de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* em alface, constataram a colonização de duas estirpes, SEMIA 6156 e SEMIA 4077, na região do colo e ao longo das raízes em três cultivares diferentes, enquanto a estirpe UCCB 001 colonizou somente as raízes. Os autores citam ainda que a colonização de bactérias em raízes de plantas é diretamente influenciada pela composição dos exsudatos radiculares, uma vez que algumas bactérias apresentam uma especificidade quanto a fonte de carbono utilizada em seu metabolismo.

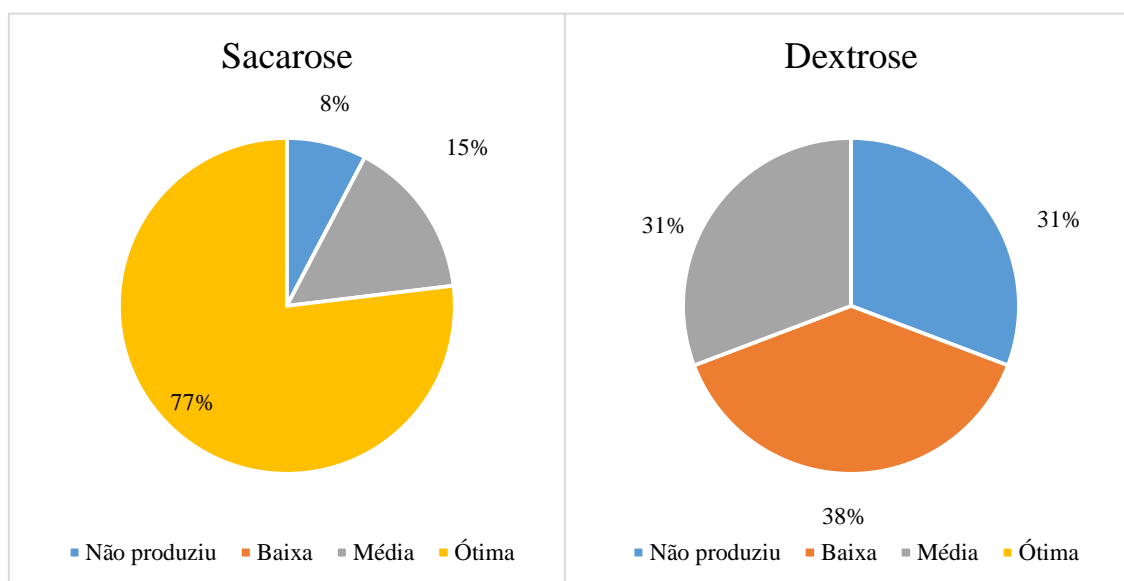
Segundo Lucon (2008), a colonização radicular por rizobactérias é capaz de beneficiar as plantas de diversas formas, principalmente, devido a ação direta no sítio de infecção de possíveis patógenos. Freitas (1994) cita que o estabelecimento do microrganismo na rizosfera garante sua interação com a planta, mesmo que essa relação possa ser prejudicial.

4.10 Produção de EPS (exopolissacarídeos)

Todos os isolados demonstraram, variando a fonte de carbono, a capacidade de produzir EPS. No entanto, as maiores frequências de ótimas produção de EPS ocorreram quando a sacarose era a fonte de carbono disponível (Figura 15). Este fato pode ser explicado por a sacarose ter mais carbono ($C_{12}H_{22}O_{11}$) em sua composição que a dextrose ($C_6H_{12}O_6$). Isto é corroborado por Donot et al (2012) quando relatam que os meios que contêm uma alta proporção de carbono são favoráveis para a produção de polissacarídeos.

Outros fatores como pH, temperatura, sistema microbiano, entre outros, podem também influenciar a produção estrutura e composição de EPS por microrganismos (DONOT et al, 2012). A Figura 16 ilustra bactérias promotoras e não promotoras de EPS.

Figura 15 - Frequência de produção de EPS



A Tabela 12 descreve as médias de produção de EPS pelos isolados nas diferentes fontes de carbono. Verificou-se que os isolados PIR2.3 e PIR1.1 demonstraram maiores médias de produção em meio com sacarose enquanto o isolado ODC2.1 não apresentou produção. Já quando usamos a dextrose como fonte de carbono os isolados PIR2.1, ODC2.5, PIR1.2, ODC2.1, não apresentaram produção de EPS e as médias de produção dos outros isolados não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 12 - Médias de produção de EPS em duas fontes de carbono

Isolado	Ø do halo (mm)	
	Sacarose	Dextrose
ODC1	20,9b	9,2 a
ODC2.1	Não produziu	6,4 a
ODC2.2	15,2 c	12,0 a
ODC2.3	20,8 b	7,8 a
ODC2.4	16,6 c	11,0a
PIR2.1	15,4 c	Não produziu
PIR2.2	10,5c	9,6 a
PIR2.3	37,6 a	9,2 a
ODC2.5	19,5 b	Não produziu
PIR1.1	31,8 a	12,6 a
PIR1.2	24,0 b	Não produziu
PIR1.3	22,3 b	Não produziu

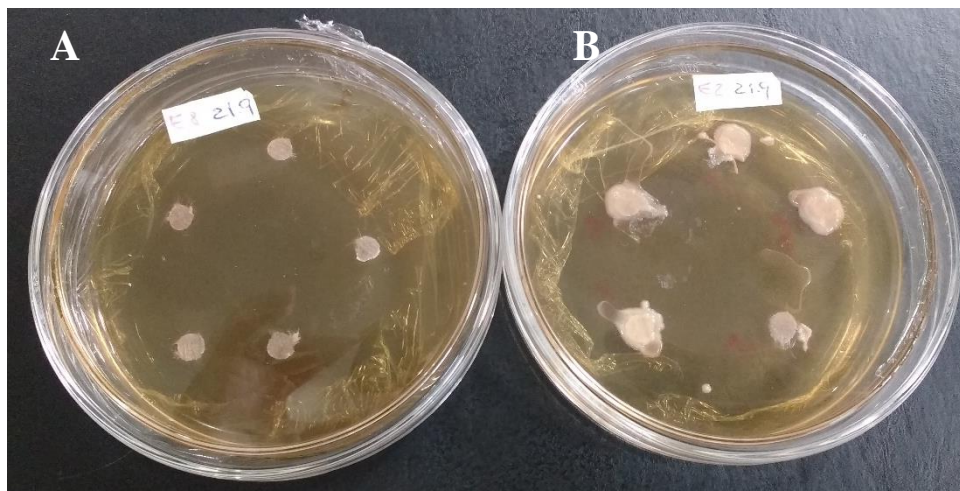
Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott- Knott ($p < 0.05$)).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) por micróbios protege-os de condições inóspitas e permite a sua sobrevivência. EPS fornece um microambiente que retém a água e seca mais lentamente do que o ambiente circundante, protegendo assim as bactérias e as raízes das plantas contra a dessecação (HEPPER, 1975). Foi demonstrado que a produção de EPS por bactérias melhora a permeabilidade aumentando a agregação do solo e mantendo maior potencial hídrico ao redor das raízes, aumentando assim a absorção de nutrientes pela planta com um aumento no crescimento das plantas e proteção contra o estresse hídrico (MILLER e WOOD, 1996; ALAMI et al, 2000; SELVAKUMAR et al, 2012).

A inoculação de estirpes bacterianas produtoras de EPS *Proteus penneri* (Pp1), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa2) e *Alcaligenes faecalis* (AF3), em sementes de milho, juntamente com os respectivos EPS, melhorou a umidade do solo, biomassa vegetal, comprimento de raiz e parte aérea e área foliar. Sob estresse hídrico, as plantas inoculadas

apresentaram aumento no teor relativo de água, proteína, açúcar e prolina e diminuíram as atividades das enzimas antioxidantes (NASEEM e BANO, 2014).

Figura 16 - Cultura não produtoras (A) e produtoras de EPS (B).



4.11 Produção de biofilme.

Todos os isolados apresentaram capacidade de produção de formação de biofilme, porém não apresentaram médias significativamente diferente quando comparados entre si (Tabela 13).

Quando comparados em função da concentração de sorbitol, os isolados ODC2.1, ODC2.5, PIR1.3, demonstraram maior capacidade de formação de biofilme no tratamento sem sorbitol. Estes resultados sugerem uma menor adaptabilidade a estresses hídricos desses isolados, uma vez que o sorbitol foi utilizado como redutor de atividade de água, ou seja, quanto maior era a concentração de sorbitol, menor a quantidade de água livremente disponíveis para os isolados.

Tabela 13 - Médias de formação de biofilmes em diferentes concentrações de sorbitol

Isolado	0	0,06	0,6
ODC1	1045,33aA	830,6aA	857,83aA
ODC2.1	1000,83aA	706,0bA	840,33bA
ODC2.2	908,33aA	841,33aA	881,66aA
ODC2.3	848,16aA	836,16aA	845,0aA
ODC2.4	887,66aA	830,16aA	791,33aA

PIR2.1	885,83aA	868,67aA	865,50aA
PIR2.2	1010,33aA	819,66aA	817,16aA
PIR2.3	937,5aA	894,66aA	882,66aA
ODC2.5	1164,66aA	814,0bA	659,0bA
PIR1.1	990,16aA	937,66aA	789,33aA
PIR1.2	918,0aA	675,33aA	840,33aA
PIR1.3	1136,5aA	875,6bA	826,83bA

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Nas linhas, letras minúsculas, nas colunas, letras maiúsculas (Teste de Scott- Knott ($p < .05$))

A formação de biofilme, parece ser uma característica amplamente disseminada entre as rizobactérias. Estudos nos mais diversos ambientes e culturas detectaram rizobactérias com essa característica (MONTALDO, 2016; BRAGA, 2015; BOGINO, NIEVAS E GIORDANO, 2015).

De acordo com Morris e Monier, (2003) as bactérias associadas às plantas são frequentemente visualizadas em comunidades denominadas agregados, microcolônias e biofilmes. Os biofilmes bacterianos são uma comunidade estruturada de células, aderidas a um substrato biótico ou não, inseridas em uma matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias (COSTERTON, 1999). O processo de formação dos biofilmes envolve a adesão da bactéria ao substrato e a agregação das células umas às outras.

4.12 Promoção de Crescimento em Plantas de Feijão em Baixa Disponibilidade Hídrica

Dentre as variáveis analisadas em plantas de feijão, houve diferença significativa apenas entre as médias de altura de planta quando tratadas com os isolados bacterianos. O tratamento com isolado ODC2.2 apresentou a menor média, 15,95 cm, enquanto o isolado ODC2.1 apresentou a maior média, com 23,45 cm. Para as variáveis número de folhas e peso seco, não houve variabilidade estatística entre as médias (Tabela 14).

Tabela 14 - Média de altura de planta (AP), número de folhas (NF) e peso seco em plantas de feijão tratadas com isolados bacterianos.

Isolado	AP	NF	Peso seco
Testemunha	21,48a	5,3a	3,43 a
ODC1	18,56b	3,7 a	2,54 a
ODC2.1	23,45 a	5,33 a	3,21 a
ODC2.2	15,95 c	5,2 a	1,45 a
ODC2.3	19,74b	5,26 a	2,44 a
ODC2.4	21,04a	4,9 a	2,82 a
PIR2.1	20,20 a	6,2 a	2,89 a
PIR2.2	18,70b	6,7 a	2,04 a
PIR2.3	20,09 a	4,10 a	2,82 a
ODC2.5	18,79b	6,73 a	1,77 a
PIR1.1	20,29a	4,5 a	3,80 a
PIR1.2	20,5a	5,20 a	2,18 a
PIR1.3	22,5a	4,53 a	3,57 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si

O estudo feito por Rodriguez et al (2012) mostrou que a inoculação *Bradyrhizobium* e a coinoculação com outras espécies de BPCPs também promoveram aumentos para altura de plantas de feijão. *Bradyrhizobium* sp também teve efeitos positivos sobre o desenvolvimento de mudas de alface utilizando como parâmetro a altura das plântulas (KOZUSNY-ANDREANI e ANDREANI JÚNIOR, 2014).

Linhagens de *Bacillus* spp., *Pantoea* sp. e *Serratia* sp. isolados da rizosfera de *C. jamacaru*, *P. gounellei* e *Melocactus* sp. foram capazes de promover aumentos na área foliar, comprimento do caule e peso seco na parte aérea de plantas de milho sob fornecimento reduzido de água (KAVAMURA, 2012).

O fato das linhagens possuírem múltiplas características de RPCP pode, muitas vezes, não conferir a promoção de crescimento a plantas, Kumar et al, (2012) demonstraram isso quando testou uma linhagem de *Pseudomonas* em plantas de trigo e a mesmo não proporcionou nenhum crescimento a planta, mesmo sendo comprovada sua capacidade solubilização de fosfatos e produção de ácido giberélico testadas *in vitro*.

Além disso, alguns fatores podem influenciar no estabelecimento das bactérias com a rizosfera das plantas, dentre eles a especificidade da interação planta-microrganismos (COELHO et al, 2007), a competição da bactéria inserida no ambiente com os outros microrganismos já presente no solo, o modo de ação e a própria ocorrência do benefício de BPCP's variam com a espécie de planta e/ou bactéria. (ARAÚJO, 2008).

5 CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados neste trabalho é possível inferir que todos os isolados encontrados neste estudo possuem mecanismos de proteção contra a dessecação, mecanismos de ação que envolvem a produção de EPS e biofilme e que com exceção do isolado PIR1.1, todos os outros isolados possuem pelo menos três mecanismos diretos de promoção de crescimento em plantas. Além disso, Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são capazes de crescer em meio com baixa atividade de água.

Os resultados deste trabalho mostram que é possível a elaboração de um produto biotecnológico, nos moldes de inoculantes microbianos, para uso na produção agrícola, já que foi possível identificar nos microorganismos deste trabalho mecanismos de promoção de crescimento em plantas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Estudos em outras regiões genoma dos isolados ODC2.1 e PIR1.1 deverão ser realizadas para elucidação de sua identificação, bem como estudos da sua biologia e fisiologia.
- Novas reações para amplificação do gene 16S e outros genes em regiões conservadas devem ser feitas a fim da identificação das espécies bacterianas com potencial de promoção de crescimento em plantas encontradas neste trabalho.
- Sugere-se a realização de experimentos que testem especificidade destas bactérias com culturas exploradas economicamente em regiões com baixa pluviosidade.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: **Current perspective**. Journal of King Saud University – Science, v. 26, p. 1-20, 2014.
- AHMAD, F; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *fluorescent Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turk J Biol**, v. 29, p. 29–34, 2005.
- AHMAD, J.S; BAKER, R. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*, **Ecology and Epidemiology, Saint Paul**, v. 77, n. 2, p. 358-362, 1987.
- AKHTAR, S; ALI, B. Evaluation of rhizobacteria as non-rhizobial inoculants for mung beans. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.13, p.1723-1729, (2011).
- ALAMI, Y; ACHOUAK, W; MAROL, C; HEULIN, T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. **Appl Environ Microb**, v. 66, p.3393–3398, 2000.
- ALBUQUERQUE, S. G; BANDEIRA G. R. L. Effect of thinning and slashing on forage phytomass from a caatinga of Petrolina, Pernambuco, Brazil, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p. 885-891, 1995.
- ALLARD-MASSICOTTE, R; TESSIER, L; LÉCUYER, F; LAKSHMANAN, V; LUCIER, J.F; GARNEAU, D; BEAUREGARD, P.B.. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. **mBio**, v. 7, n. 6, e01664-16. 2016.
- ALLISON, S.D ; JASTROW, J.D. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 38, p. 3245-3256, 2006.
- ALVES, J. J. A. A. Degradação Da Caatinga: Uma Investigação Ecogeográfica Caatinga (Mossoró, Brasil), **Revista Caatinga**, v.22, n3, p 126-135, julho/setembro, 2009
- ALVES, J. J. A. Geocologia da caatinga no semi-árido do Nordeste brasileiro. **CLIMEP: Climatologia e Estudos da Paisagem**, Rio Claro, v.2, n.1, p. 58-71, 2007.
- ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Oregon: Timber Press, 2001.
- ANDRADE, C.T.S, MARQUES, J.G.W, ZAPPI, D.C. 2006. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8(3): 36-42.
- ANDRADE-LIMA, D. A. The caatinga dominium. **Revista Brasileira de Botanica**. Rio de Janeiro, v.4, n.1, p. 149-153, 1981.

ARAÚJO, K.D; DANTAS, R.T; ANDRADE, A.P; PARENTE, H.N; SILVA, E.E. Uso de espécies da caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri – PB. **RA'E GA**, v.20, p157-171, 2010.

ASA, Articulação do semiárido. É no semiárido que a vida pulsa.2017. Disponível em: <http://www.asabrasil.org.br/semiárido>.

AUBRÉVILLE, A. **Étude écologique des principales formations végétales du Brésil, et contribution à la connaissance des forêts de l' Amazonie**. Paris: Centre Technique Forestier Tropical, 1961.

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

BARROSO, G; GUIMARÃES, E; ICHASO, C; COSTA, C; PEIXOTO, A. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**, v 1. São Paulo: LTC/ Edusp, 1978.

BATISTA, B.D. **Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp RZ2MS9: dos genes ao campo**. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - ESALQ/USP, Piracicaba.

BFG - The Brazil Flora Group - Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, p. 199-209, 2008.

BHATTACHARYYA, P.N; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (RPCP): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, p.1327- 1350, 2012.

BLOEMBERG, G.V; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant-growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr Opin Plant Biol**, v.4, p.343–50,2001.

BOGINO, P.C; NIEVAS, F. L; GIORDANO, W. A review: Quorum sensing in *Bradyrhizobium*. **Applied Soil Ecology**, v. 94, p. 49-58, 2015.

BOKE, N.H. 1964. The cactus gynoeceum: a new interpretation. *American Journal of Botany* 51: 598-610. BRANDA, S.S; VIK, S; FRIEDMAN, L; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 20-26, 2005.

BRAGA, A.P. A. **Rizobactérias nativas da caatinga com potencial para redução dos efeitos da seca em soja**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Esalq/ USP, Piracicaba.

BUBANZ, H.C.S. **Potencial de rizobactérias para a promoção de crescimento vegetal**. (Trabalho de conclusão de curso). UFFS. 2018

CABRAL G. A. L., SAMPAIO E. V. S. B., ALMEIDA-CORTEZ J. Estrutura Espacial e Biomassa da Parte Aérea em Diferentes Estádios Sucessionais de Caatinga, Santa Terezinha-PB. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, n. 3, p. 566-574, 2013.

CARNEIRO, A.M; FARIAS-SINGER, R; RAMOS, R.A; NILSON, A.D. Cactos do Rio Grande do Sul, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016, 224 p.

CATTELAN, A.J; HARTEL, P.G; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soyabean growth, **Soil Sci Soc Am J**, v.63, p.1670–1680, 1999.

CAVALCANTI, N.B; RESENDE, G.M. Consumo de xiquexique (*Pilocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl por caprinos no semi-árido da Bahia. **Revista Caatinga**, 20(1): 22-27, 2007.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de Bactérias Endofíticas de Raízes de Milho (*Zea mays* L.) e Potencial Para Promoção Do Crescimento Vegetal**. 2016. Tese (Doutorado em). - UFSC. 2005.

CHANG, W.-S; van de MROTEL, M ; NIELSEN, L; GUZMAN. G.N; LI, X; HALVERSON, L. J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 22, p. 8290-8299, 2007.

COCKING EC. The challenge of establishing symbiotic nitrogen fixation in cereals. In: Emerich DW, Krishnan HB. eds. **Nitrogen fixation in crop production**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 35–63. 2009.

CORONADO, C.; SÁNCHEZ-ANDDÚJAR, B.; PALOMARES, A.J. Rhizobium extracellular structures in the symbiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 127-136, 1996.

COSTERTON, J. W. et al. The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. (**Reprinted from Developments in Industrial Microbiology**. v. 26, p. 249-261, 1985). **J Ind Microbiol Biot**. v. 22, p 551-563, 1999.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPINSCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711- 745, 1995.

CUNHA, T. J. F.; PETRERE, V. G.; SILVA, D. J.; MENDES, A. M. S.; MELO, R. F. de; OLIVEIRA NETO, M. B. de; SILVA, M. S. L. da; ALVAREZ, I. A. **Principais solos do semiárido tropical brasileiro: caracterização, potencialidades, limitações, fertilidade e manejo**. In: SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.

DAMASCENO, M.M; SOUTO, J.S; SOUTO, P.C. Etnoconhecimento de espécies forrageiras no semi-árido da Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental Espírito Santo do Pinhal**, v.7, n.3, p 219-228, 2010.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 61, p. 401-422, 2007.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P.; FARIAS, M. F.; NOGUEIRA, V. F. B. Interações Entre Grupos de Microorganismos Com a Rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n.2, p. 213–218, 2009.

DAVIES, P. J. **The plant hormones: their nature, occurrence and functions**. In: Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. DAVIES, P. J. (Ed.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, p. 1-15, 1995.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R.L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 67, p. 69-77, 1999.

DOBBELAERE, S., J. VANDERLEYDEN, AND Y. OKON. **Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere**. Crit. Rev. Plant Sci, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOBBELAERE, S; CROONENBORGH, A; THYS, A; BROEK, A.V; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v.212, p.153-162, 1999.

DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil**, The Hague, v. 110, 207-212, 1989.

DONOT, F; FONTANA, A; BACCOU, J.C; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydr. Polym**, v. 87, p. 951–962, 2012.

DOWNER, A.J.; MENGE, J.A.; POND, E. Association of cellulytic enzyme activities in Eucalyptus mulches with biological control of *Phytophthora cinnamomi*. **Biological Control**, Orlando, v. 91, n. 9, p. 847-855, 2001.

DUNNE, C; MOËNNE-LOCCOZ, Y; de BRUIJN, F.J; O’GARA, F. Overproduction of an inducible extracelular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. **Microbiology**, v.146, 2069-2078, 2000.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; JADIDI, M; ALIAKBARI, A. Effect of superior IAA producing rhizobia on N, P, K uptake by Wheat grown under greenhouse condition. **World Journal of Applied Sciences**, v. 6 (Suppl 12), p. 1629-1633, 2009.

- ETESAMI, H; BEATTIE, G.A. Plant-Microbe Interactions in Adaptation of Agricultural Crops to Abiotic Stress Conditions. **Probiotics and Plant Health**, Springer, p. 163-200, 2017.
- FAN, B; CARVALHAIS, L.C; BECKER, A; FEDOSEYENKO D, von WIRÉN, N; BORRISS, R. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. **BMC Microbiology**, v.12, n.116, 2012.
- FERRERIA, C. **Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na Caatinga**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - ESALQ/ USP, Piracicaba.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008
- FISCHER, S.E; FISCHER S, I; MAGRIS, MORI, G, B. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 895-903, 2007.
- FRANCHE, C; LINDSTRO'M, K; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, v.321, p. 35–59, 2009.
- GALVÃO JÚNIOR, J.G.B; SILVA, J.B.A; MORAIS, J.H.G; LIMA, R.N. Palma forrageira na alimentação de ruminantes: cultivo e utilização. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 2, p.78-85, 2014.
- GARCIA, A.S; BRANQUINHO EGDA, MENUCHI ACTP, ERLACHER KC, DOMINGUES MCS. Efeito de reguladores vegetais na germinção e desenvolvimento da semente *Strelitzia reginae*. **Thesis São Paulo ano III**, v. 5, 161-176, 2006.
- GOETTSCHE, B, et al. High proportion of cactus species threatened with extinction. **Nature plants**, v. 1, n.15142, 2015.
- GOMES, G.R. Família Cactacea: breve revisão sobre sua descrição e importância. **Revista Técnico-Científica do CREA PR**, v. 2, p. 1-10, 2014.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**.v. 26, p. 192-195, 1951.
- GORLACH-LIRA, K; COUTINHO, H.D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 135-141, 2007.
- GRANT, W.D. Life at low water activity, **Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences**, London, v 359, p. 1249-1267, 2004.
- GUPTA, G, PARIHAR, S.S, AHIRWAR, N, K. SNEHIS, SINGH,V. Plant growth rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture, **Microbial & Biochemical Technology**, v.7, n. 2, p. 096-102, 2015.

- HARDHAM, A.R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2007.
- HARTMAN, A; ROTHBALLER, M; SCHMIDT, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v.312, p.7-14. 2008
- HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 916-923, 1983.
- HEPPER, C.M. **Extracellular polysaccharides of soil bacteria**. In: WALKER, N, editor. Soil microbiology, a critical review. New York: Wiley; 1975; p. 93–111.
- HUNT, D; TAYLOR, N.P; CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon**. DH Books, Milborne Port, 2006, 900p.
- INUI, R. N. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UNESP.
- IPCC. Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland: **IPCC**, 2014. 151 p.
- JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, p. 163-173, 2004.
- KANG, B.G; KIM, W.T; YUN, H.S; CHANG, S.C. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. **Plant Biotechnol Rep**, v. 4, p. 179-183, 2010.
- KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, p. 503-507, 2008.
- KAVAMURA, V. N. et al. Screening oh brazilian cacti rhizobacteria for Plant growth under drought. **Microbiological Research**. v. 168, p, 183-191, 2013.
- KAVAMURA, V.N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. 2012.Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Esalq/USP, Piracicaba.
- KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA. **Anegrs. Proceedings**. Anegrs: INRA.v.4, p. 879-882, 1978.

KOTTEK, M., GRIESER, J., BECK, C., RUDOLF, B., RUBEL, F. World map of the Köppen-Geiger climate classification update. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, n. 3. p 259-263, 2006.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I., ANDREANI JUNIOR, R. Colonização rizosférica e promoção de crescimento por rizóbio em mudas de alface. **Nucleus**. V. 11, n 2, 443-451, 2014.

LAL, RATTAN. Carbon sequestration in dryland ecosystems. **Environmental Management**, v. 33, n. 4, p. 528–544, 2004.

LEITE, J. **Caracterização de bactérias nativas de solo do semiárido brasileiro isoladas de nodulos de feijão-caupi**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência) - UFRRJ. Seropédica.

LETHAM, D. S. Regulators of cell division in plant tissues: A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons, **Physiol. Pl.** v. 25, p.397–401, 1971.

LINS, M.R.C.R. **Seleção de actinobactérias da rizosfera da caatinga com potencial para promoção de crescimento vegetal**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial – UFPE, Recife).

LUCENA, C.M.; LUCENA, R.F.P; COSTA, G.M; CARVALHO, T.K.N; COSTA, G.G.S; ALVES, R.R.N; PEREIRA, D.D; RIBEIRO, J.E.S; ALVES, C.A.B; QUIRINO, Z.G.M, NUNES, E.N. Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.9, n.62, p. 1-23, 2013.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. **Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v.43, n.6, p.691-697, 2008.

LUCY, M; REED, E; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.86, p.1–25, 2004.

LYNCH, J.M. **The Rhizosphere**. New York: John Wiley, 1990. 458p.

LYNCH, J.M; LEJI, F. **Rhizosphere**. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2012

M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB). **Microbial Ecology**, Orlando, v. 51, p. 56-69, 2001.

MacELROY, R.D. Some comments on the evolution of extremophiles. **Biosystems**, Limerick, v. 6, p. 74-75, 1974.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo, D&Z, Computação Gráfica e Editora, 10p., 2004.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; DE OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e Alicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1989. 201 pp.

- MARCHIORO, T.E.L. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) UFP, Curitiba.
- MARRA, L.M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - UFLA.
- MEENA, K.K., Sorty, A.M., Bitla, U.M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Singh, D.P., Prabha, R., Sahu, P.K., Gupta, V.K., 2017. Abiotic stress responses and microbemediated mitigation in plants: the omics strategies. *Front. Plant Sci.* 8.
- MEHRVARZ, S.; CHAICHI, M.R.; ALIKHANI, H.A. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barely (*Hordeum vulgare* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, Dubai, v. 3, n. 6, p. 822-828, 2008.
- MEIADO, M.V.; SILVA, F.F.S.; BARBOSA, D.C.A.; SIQUEIRA FILHO, J.A. Diásporos da Caatinga: uma revisão. In: SIQUEIRA FILHO, J.A. (Org.). **Flora das Caatingas do Rio São Francisco: História Natural e Conservação**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial, 2012, p.306-365.
- MILLER, K.J; WOOD, J.M. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p.101–136, 1996.
- MIRANSARI, M; SMITH, D.L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p.110- 112, 2014.
- MMA. Ministerio do Meio Ambiente. **Plano de Ação para a Prevenção e Controle do Desmatamento na Caatinga**. 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/florestas/controle-e-prevenção-do-desmatamento/plano-de-ação-para-caatinga—ppcaatinga.html>
- MMA. Ministerio do Meio Ambiente. **Projeto de Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite - PMDBBS**. 2011. Disponível em: http://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomass/PMDBBS%20-%20CAATINGA.html
- MONIER, J.M, LINDOW, S.E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promote aggregate formation on leaf surfaces. **PNAS**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15077-15982, 2003.
- MONTALDO, Y. C. **Biopreservação e isolamento bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal**. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Renorbio/ Ufal, Maceió.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, Editora UFLA, 2006. 729p.

MORRIS, C.E. MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annu Rev Phytopathol.** v. 41, p. 429-453, 2003.

MOURA, M.S.S; GALVINCIO, J. D; BRITO, L. T. de L.; S, I. I. S; SILVA, T. G. F. da. Clima e água de chuva no semi-árido. In: BRITO, L. T. de L.; MOURA, M. S. B. de; GAMA, G. F. B. (Ed.). **Potencialidades da água de chuva no Semi-Árido brasileiro.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. cap 2 p. 37-59.

NASEEM, H; BANO, A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize, **J Plant Interact**, v. 9, p.689–701, 2014.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

NEWMAN, K.L; ALMEIDA, R.P.P; PURCELL, A.H; LINDOW, S.E. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7319-27, 2003.

NIHORIMBERE. V; ONGENA, M; SMARGIASSI, M; THORNAT, P. Beneficial effect of the rizosphere microbial community for plant growth and health. **Biotechnoplogy Agronomic Social Enviroment**, v. 15, n 2, p. 327-337, 2011. O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis, **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 449-461, 1998.

OLIVEIRA, A. B. de; DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L. Multiplicação e enraizamento in vitro do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.). **Plant Cell Culture Micropropagation**. v. 4, p. 48-54, 2008.

OLIVEIRA, F.T; SOUTO, J.S; SILVA, R.P; FILHO, F.C.A, PEREIRA JÚNIOR, E.B. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. **Revista Verde**, v.5, n.4, p. 27-37, 2010.

OTEINO, N; LALLY, R.D; KIWANUKA, S; LLOYD, A; RYAN, D; GERMAINE, K.J; DOWLING, D.N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Front. Microbiol.** v. 6, 745, 2015.

PANDEY. P; MAHESHWARI, D.K. Two sp. microbial consortium for growth promotion of *Cajanus Cajan*. **Current Science**, v.92, p.1137-1142, 2007.

PARRAY, J, A, JAN, S, KAMILI, A.N, QADRI, R., A. EGAMBERDIEVA, D, AHAMAD, P. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal Plant Growth Reg.** v. 35, n., 3, p. 1-26, 2016.

PAULA, C. C., RIBEIRO, O. B. C. **Cultivo prático de cactáceas.** Viçosa: UFV, 2004.

PAULITZ, T.C; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems, **Annu. Rev. Microbiol**, v. 39, p. 103- 133, The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms

PAULO, E.M. **Encapsulamento de *Lactobacillus acidophilus* por atomização em spray drying, utilizando exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias lácticas**. 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

PEEL, M. C., FINLAYSON, B. L., MCMAHO, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

PEREIRA JÚNIOR, J. S. **Nova delimitação do semi-árido brasileiro**. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados: Brasília, 2007.

POTTS, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 58, n. 4, p. 755-805, 1994.

QUEIROZ, L.P. Flowering plants of the Brazilian Semi-Arid. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. cap. 6, p. 45-50.

RAAIJMAKERS J.M; PAULITZ, T.C., STEINBERG, C; ALABOUVETTE, C; MOËNNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms, **Plant Soil**, v.321, p.341-361, 2009

RAAIJMAKERS J.M; VLAMI, M; de SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.81, 537-547, 2002.

RAMOS, M.L.G; MENEGHIN, M. F.S; PEDROSOS, C; GUIMARÃES, C.M; KONRAD, M. L. F. Efeito dos sistemas de manejo e plantio sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, em solo de Cerrado. **Bioscience Journal**, v.28, p. 58-68, 2012.

RAMOS, R.F; SOBUCKI, L; ROHRING, B; LUDWIG, J; DAROIT, D.J. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférica e não rizosféricos em cultura de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 3, p. 417-427, 2018.

RICHARDSON A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Aust. J. Plant Physiol**, v. 28, p. 897–906. 2001.

RICHARDSON, A.E; BAREA, J.M; McNEILL, A.M; PRIGENT-COMBARET C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, n. 321, p. 111–117, 2009.

ROPER, M.C.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M.; KIRKPATRICK, B.C. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in

planta. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7252-7258, 2007.

ROSS, J. J.; O'NEIL, D.P; WOLBANG, C.M; SYMONS, G.M. Auxin-Gibberellin Interactions and Their Role in Plant Growth. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 20, p 346-353, 2002.

ROTHSCHIL, L.J; MANCINELLI, R.L. Life in extreme environments. **Nature**. n.409, p. 1092-1101, 2001.

SANTOS, S.N.; KAVAMURA, V.N.; SILVA, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Plant growth promoter rhizobacteria in plants inhabiting harsh tropical environments and its role in agricultural improvements. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.). **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 251-272. (Microbiology Monographs 18).

SARWAR, M.; FRANKENBERGER, W. T. Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. **Plant and Soil**, v. 160 (Suppl 1), p. 97-104. (1994).

SCHROTH M.N; HILDEBRAND D.C. Influence of plant exudates on root-infecting fungi, **Annu. Rev. Phytopathol**, v.2, p.101-132, 1964.

SELVAKUMAR, G; PANNEERSELVAM, P; GANESHAMURTHY, A.N. **Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops**. In: MAHESHWARI, D.K, editor. **Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management**, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2012; p. 205-224.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases, **J. Biosci. Bioeng**, v. 89, 515-521. 2000

SHOKRI, D.; EMTIAZI, G. "Indole-3-acetic Acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-symbiotic Nitrogen-fixing Bacteria and Its Optimization by Taguchi Design." **Current Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 217-25, 2010.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.24, p.311-319, 2000.

SILVA JGM, Silva DS, Ferreira MA, Lima GFC, Melo AAS e Diniz MCNM. 2005. Xique-xique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl.) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p 1408-1417.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Solos, 1999. 370p.

SILVA, P; NAHAS E. Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 304-310, 2002.

SILVI, S.; BARGHINI, P.; AQUILANTI, A.; JUAREZ-JIMENEZ, B.; FENICE, M. Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp producing high levels of exopolysaccharide. **Microbial Cell Factories**, San Diego, v. 34, p. 233-245, 2013.

SINDHU, S.S.; DADARWAL, K.R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. **Microbiological Research**, Pavia, v. 156, p. 353-358, 2001. 409, p. 1092-1101, 2001.

SINOGAS, C; ALHO, L; BRITO, I. *Microbiologia: textos de apoio e manual prático*. Universidade de Évora, 2014. 83p

SIQUEIRA FILHO, J. A et al. Flora das Caatingas do Rio São Francisco. In: SIQUEIRA FILHO, J.A. (org.). **A Flora das Caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial, p. 446-542, 2012.

SOUZA, D.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic Chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters**. 3.ed. Wiley, New York, 1995. 1022p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed, Artmed, 2004.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D.C. **Cacti of Eastern Brazil**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2004. 511p.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen, **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, p. 777-780, 1982.

TOURNAS, V.H; KATSOUDAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits, **Int. J. Food Microbiol**, v. 105, p. 11-17, 2005.

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

VIANA, L.T; BUSTEMANTE, M.M.C; MOLINA, M; PINTO, A. S; KISSELLE, K; ZEEP, R; BURKE, R.A. Microbial communities in Cerrado soils under native vegetation subjected to prescribed fire and under pasture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p.1665-1672, 2011.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, New York, v.69, p.99-151, 2000.

ZAHRAN, H.H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p.143-153,2001.

ZAIDI, A.; SAGHIR, M.; AHEMAD, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbial strategies for crop improvement**. Berlin: Springer- Verlag, 2009. cap. 2, p. 23-50.

ANEXO

ANEXO I – Resultados obtidos após BLAST

Query				Subject							Score			Identities			Strand
Name	Length	Start	End	DB	Accession	Gene	Ref. ID	Length	Start	End	Bit	Raw	E-Value	Matches	Total	Pct.(%)	
190520-021_A01_ODC2.1_fd1.a b1	44	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
190520-021_C01_ODC2.2_fd1.a b1	42	10	42	-	KY246976.1	Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	1480	8	1480	62.1	33	4e-07	33	33	100	Plus/Plus
190520-021_E01_PIR2.2_fd1.ab 1	41	10	41	-	KY246976.1	Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RNA gene,	0	1480	8	1479	60.2	32	1e-06	32	32	100	Plus/Plus

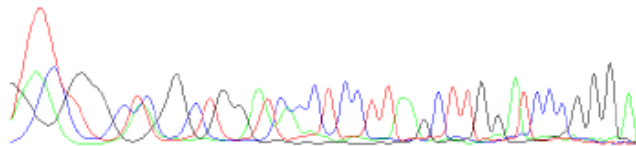
						partial sequence												
190520- 021_G01_ISO17_fD1.ab 1	41	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
190520- 021_I01_ISO20_fD1.ab1	42	10	42	-	1	Bradyrhizobiu m sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence KY246976.	0	1480	8	0	1	33	4e-07	33	33	100	Plus/Plus	

ANEXO II - Eletrofanogramas: representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida por cada nucleotídeos de DNA sequenciado.

File: ISO3_fD1.ab1 Run Ended: 2019/5/21 22:45:49 Signal G:5030 A:3169 C:6848 T:6489
 Sample: ISO3_fD1 Lane: 15 Base spacing: -15.016356 41 bases in 547 scans Page 1 of 1



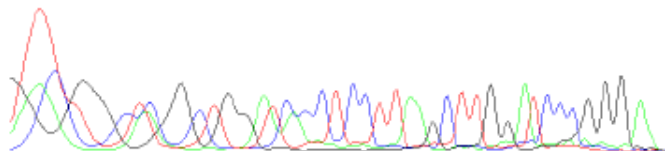
GGAC TG CTC 10 GCTGGATGACCTCCTTAAGCTTGGATCCC GGG 40



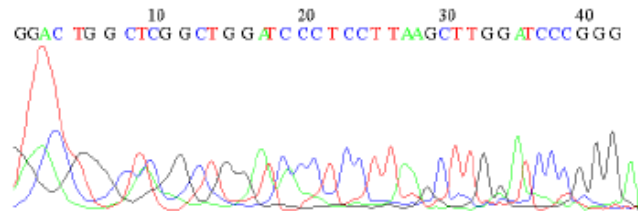
File: ISO4_fD1.ab1 Run Ended: 2019/5/21 22:45:49 Signal G:5428 A:3516 C:7766 T:7092
 Sample: ISO4_fD1 Lane: 13 Base spacing: -15.016356 42 bases in 562 scans Page 1 of 1



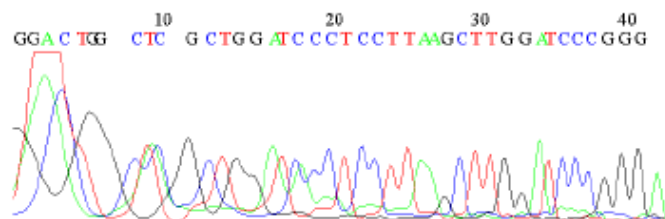
GGAC TG CTC 10 GCTGGATGACCTCCTTAAGCTTGGATCCC GGG A 40



File: ISO9_fD1.ab1 Run Ended: 2019/5/21 22:45:49 Signal G:973 A:606 C:1337 T:1296
 Sample: ISO9_fD1 Lane: 11 Base spacing: -15.016356 42 bases in 546 scans Page 1 of 1

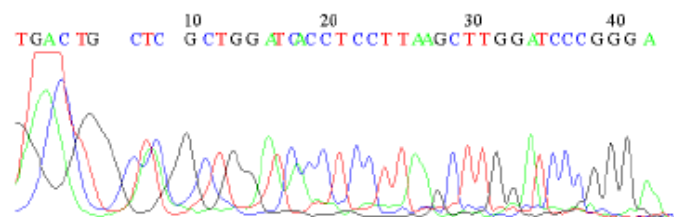


File: ISO17_fD1.ab1 Run Ended: 2019/5/21 22:45:49 Signal G:2608 A:1857 C:3753 T:3562
 Sample: ISO17_fD1 Lane: 9 Base spacing: -15.016356 41 bases in 548 scans Page 1 of 1





File: ISO20_fD1.ab1 Run Ended: 2019/5/21 22:45:49 Signal G:1654 A:1401 C:3137 T:2727
Sample: ISO20_fD1 Lane: 7 Base spacing: -15.016356 42 bases in 566 scans Page 1 of 1



Anexo III – Resultados da busca das sequencias feitas no BLAST do NCBI.

ISOLADO ODC2.1

BLASTN 2.6.0+

Reference:

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000),
"A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000;
7(1-2):203-14.

Database: Nucleotide collection (nt)
43,634,103 sequences; 150,987,822,336 total letters

Query= 190520-021_A01_IS03_fd1.ab1 1 44

Length=44

***** No hits found *****

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped		
Lambda	K	H
1.28	0.460	0.850

Effective search space used: 2095503189444

Database: Nucleotide collection (nt)
Posted date: Jul 24, 2017 3:20 PM
Number of letters in database: 150,987,822,336
Number of sequences in database: 43,634,103

Matrix: blastn matrix 1 -2
Gap Penalties: Existence: 0, Extension: 2.5

ISOLADO ODC2.2

BLASTN 2.6.0+

Reference:

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000),
"A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000;
7(1-2):203-14.

Database: Nucleotide collection (nt)
43,634,103 sequences; 150,987,822,336 total letters

Query= 190520-021_C01_IS04_fd1.ab1 1 42

Length=42

Sequences producing significant alignments:

Score E
(Bits) Value

[KY246976.1](#) Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RN... [62.1](#) 4e-07

>[KY246976.1](#) Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1480

Score = 62.1 bits (33), Expect = 4e-07
Identities = 33/33 (100%), Gaps = 0/33 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 10 GCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGGATCCCCGGGA 42
      |||
Sbjct 1448 GCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGGATCCCCGGGA 1480
```

ISOLADO PIR2.2

BLASTN 2.6.0+

[Reference:](#)

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000),
"A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000;
7(1-2):203-14.

Database: Nucleotide collection (nt)
43,634,103 sequences; 150,987,822,336 total letters

Query= 190520-021_E01_IS09_fD1.ab1 1 41

Length=41

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
KY246976.1 Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RN...	60.2	1e-06

>[KY246976.1](#) Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1480

Score = 60.2 bits (32), Expect = 1e-06
Identities = 32/32 (100%), Gaps = 0/32 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query   10      GCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGGATCCCGGG   41
          |||
Sbjct  1448    GCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGGATCCCGGG   1479

```

ISOLADO PIR1.1

BLASTN 2.6.0+

[Reference:](#)

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000),
"A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000;
7(1-2):203-14.

Database: Nucleotide collection (nt)
43,634,103 sequences; 150,987,822,336 total letters

Query= 190520-021_G01_IS017_fD1.ab1 1 41

Length=41

***** No hits found *****

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped

Lambda	K	H
1.28	0.460	0.850

Effective search space used: 1646466791706

Database: Nucleotide collection (nt)
Posted date: Jul 24, 2017 3:20 PM
Number of letters in database: 150,987,822,336
Number of sequences in database: 43,634,103

Matrix: blastn matrix 1 -2
Gap Penalties: Existence: 0, Extension: 2.5

ISOLADO PIR1.3

BLASTN 2.6.0+

Reference:

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000),
"A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000;
7(1-2):203-14.

Database: Nucleotide collection (nt)
43,634,103 sequences; 150,987,822,336 total letters

Query= 190520-021_I01_IS020_fD1.ab1 1 42

Length=42

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
KY246976.1 Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RN...	62.1	4e-07

>[KY246976.1](#) Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5074 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1480

Score = 62.1 bits (33), Expect = 4e-07
Identities = 33/33 (100%), Gaps = 0/33 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query  10      GCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGGATCCC GGGA  42
      |||
Sbjct 1448    GCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGGATCCC GGGA 1480

```