



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GABIANE DOS REIS ANTUNES

**Diversidade e eficiência na promoção do crescimento
vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do
Semiárido**

Petrolina-PE
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GABIANE DOS REIS ANTUNES

**Diversidade e eficiência na promoção do crescimento
vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do
Semiárido**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF, Campus Ciências Agrárias como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Petrolina-PE
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABIANE DOS REIS ANTUNES

**Diversidade e eficiência na promoção do crescimento
vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do
Semiárido**

(Gherman Garcia Leal de Araújo, Doutor em Zootecnia-EMBRAPA).

(Adailson Feitoza de Jesus Santos, Doutor em Biotecnologia-UNEB)

(Claudio Mistura, Doutor em Zootecnia-UNEB)

Petrolina, 22 de Fevereiro de 2016.

Dedico

*Aos meus pais, Dulcinea e Geraldo.
Aos meus irmãos, Gerlane e Gean,
por todo o amor, apoio, amizade
e incentivo incondicionais,
em todos os momentos
da minha vida.
Eu amo vocês!*

Ofereço

*A meu amado vó, Nilton de Brito e meu querido primo Júnior
(In memoriam)
Saudades eternas!*

Agradecimentos

À Deus, porque sem ele nada disso seria possível.

À meu namorado Wilde, por todo o amor, carinho, apoio, amizade, “reclamações” e principalmente muita paciência. Obrigada por tonar a minha vida bem mais feliz. Amo você!

À UNIVASF pela oportunidade de aprendizado.

À EMBRAPA Semiárido, pelas instalações cedidas e oportunidade de vivenciar a pesquisa bem de perto.

À FACEPE, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus três orientadores:

Ao meu orientador nº1, Dr. Tadeu Voltolini, pelas oportunidades desde o estágio, obrigada pelo apoio, ensinamentos e por me mostrar que a Forragicultura vai muito mais além do que imaginava.

Ao meu orientador nº2, Dr. Paulo Ivan, pela paciência, apoio, ensinamentos, pela acessibilidade e por me fazer adorar esse novo mundo dos micro-organismos.

Ao meu orientador nº3, Dr. Gherman Garcia, não somente pelo belo “autógrafo”, mas também pela confiança e por ter me acolhido, além das generosas contribuições e ensinamentos.

À Rosângela Fonseca (Rosinha), pela imensa ajuda, apoio, disponibilidade e companheirismo nessa jornada de 2 anos.

À todos os funcionários da Embrapa Semiárido, pela disposição e por

colaborar sempre em tudo que foi necessário. Em especial:

À todos do laboratório de Microbiologia do Solo.

À todo do laboratório de Nutrição Animal.

Ao Dr. Carlos Gava, pela ajuda na realização desse trabalho.

À Hebert Mouse, pela grande ajuda e amizade.

Ao Sr. Luiz, pela grande ajuda, amizade, apoio e conselhos.

À DR^a Indra Escobar, pelos ensinamentos.

Aos meus grandes amigos: Thalita Freitas, Katherine Gomes, Tailane Ribeiro, Thaise Rosa, Andréia Ribeiro, Letícia, Filipe Napoleão, Alexandre Perazzo, Ana Arlete e todos os estagiários que passaram pela Embrapa e que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

Muito obrigada!!!

*Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a
fez tão importante.*

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar bactérias endofíticas oriundas de plantas forrageiras não leguminosas cultivadas na região semiárida, avaliar o seu potencial na fixação biológica do nitrogênio e promoção do crescimento em plantas, além de avaliar as respostas produtivas e teores de nitrogênio do sorgo inoculado com bactérias diazotróficas. Primeiramente, foram coletadas plantas adultas de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L), capim-tifton (*Cynodon dactylon*), sorgo-forrageiro (*Sorghum bicolor*), palma-forrageira (*Opuntia ficus-indica*) e maniçoba (*Manihot glaziovii*). Nas bactérias isoladas das raízes foram observadas características fenotípicas, bioquímicas e moleculares. A produção de ácido indolacético (AIA), a fixação de N e o índice de solubilização de fosfato foram obtidos a partir de ensaio em delineamento inteiramente casualizado com 61 tratamentos e 3 repetições, utilizando como testemunhas 2 bactérias (Ab-V5 e BR11417). Os dados quantitativos foram analisados por análise de variância (ANOVA) e quando significativos, foram comparados pelo Teste de Scott-Knott ($p > 0,05\%$). A avaliação das respostas produtivas no sorgo foi realizada em delineamento inteiramente casualizado com 67 tratamentos, sendo 61 bactérias isoladas das forrageiras, 2 testemunhas (Ab-V5 e BR11417) e 3 tratamentos nitrogenados (25%; 50% e 100% de N) em 4 repetições. Foram observadas $4,83 \times 10^4$ a $109,84 \times 10^4$ células por grama de raiz a partir das plantas forrageiras, obtendo-se 61 isolados bacterianos e 26 grupos fenotípicos. Todos os isolados apresentaram o gene *nifH* em pelo menos uma das duas reações de PCR. O sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA confirmou a presença de *Rhizobium*, *Bulkhoderia*, *Pseudomonas*, *Streptomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*. Os isolados com maiores produções *in vitro* de AIA com triptofano foram, B13, P32, B17, B10 e B11, a maioria destes, obtidos do capim-buffel. Na quantificação de N fixado, o isolado com maior produção foi o P20, com produção de $0,330 \mu\text{g N mL}^{-1}$. Dos 61 isolados, 8 foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio, destes, dois, foram identificados como *Rhizobium* (M18) e *Bacillus* (P32). No teste de produção de sideróforos, 3 isolados (buffel, palma e tifton) confirmaram a produção. No sorgo, quanto à massa seca de raiz, o isolado que proporcionou o maior valor foi o T8, obtido do capim-tifton, equivalente à aplicação de 100% de N. Na variável MSPA, a maior produção foi do tratamento com 100% de N (23.76 g/planta), não havendo diferença entre os isolados T8, B17 e P32. Quanto ao NAPA, também os maiores valores foram encontrados no tratamento nitrogenado com 100% de N, com produção de 2,23 mg, mas se igualando estatisticamente aos isolados B17 (*Bacillus*), B14A (*Cellulomonas*) com 2,13 e 2,08 mg, analisadas respectivamente. Há diversidade de bactérias diazotróficas nas plantas forrageiras da região semiárida com potencial para fixação de N, produção de fitormônios e sideróforos e solubilização de fosfato. A inoculação de bactérias diazotróficas no sorgo promove aumento da massa seca de raiz e parte aérea e nos teores de nitrogênio da parte aérea.

Palavras chave: Fixação de nitrogênio, Forragem, Produção AIA, produção de sideróforos, *Sorghum bicolor*.

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and characterize endophytic bacteria from forage non-leguminous plants grown in semi-arid region, assess their potential in the biological fixation of nitrogen and promote growth in plants, and to evaluate the productive response and nitrogen contents of the inoculated sorghum with nitrogen fixing bacteria. First, they collected adult plants of buffel grass (*Cenchrus ciliaris*), Tifton (*Cynodon dactylon*), sorghum forage (*Sorghum bicolor*), palm-forage (*Opuntia ficus-indica*) and maniçoba (*Manihot glaziovii*). In the isolated bacteria the roots were observed phenotypic, biochemical, and molecular nitrogen fixation (N). The production of indole acetic acid (IAA), the fixation of nitrogen and phosphate solubilization index were obtained from a completely randomized design in a test with 61 treatments and three repetitions, using as witnesses two bacteria (Ab-V5 and BR11417). Quantitative data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and when significant, they were compared by Scott-Knott test ($p > 0.05\%$). The evaluation of the productive responses in sorghum was conducted in a completely randomized design with 67 treatments and 61 bacteria isolated from forage, 2 isolates (Ab-V5 and BR11417) and three nitrogen treatments (25%, 50% and 100% N) 4 replicates. They were observed 4.83×10^4 to 109.84×10^4 cells per gram of roots from forage plants, yielding 61 bacterial isolates and 26 phenotypic groups. All isolates showed the nifH at least one of the two PCR reactions. The sequencing fragments of the 16S rRNA gene confirmed the presence of *Rhizobium*, *Bulkhoderia*, *Pseudomonas*, *Streptomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*. The isolates with higher yields in vitro IAA with tryptophan, B13, P32, B17, B10 and B11, most of these, obtained from the buffel grass. The quantification of N fixed, isolated with increased production was the P20, with production of $0.330 \text{ ug mL N}^{-1}$. Of the 61 strains, 8 were able to solubilize calcium phosphate, these two were identified as *Rhizobium* (M18) and *Bacillus* (P32). In siderophore production test, three isolates (buffel, palm and Tifton) confirmed the production. In sorghum, as the dry root mass, the isolate which provided the highest value was T8 obtained from Tifton, equivalent to application of 100% of N. In DMAP variable, the highest production was by treatment with 100% N (23.76 g / plant), with no difference between isolates T8, B17 and P32. As for the NAPA also the highest values were found in nitrogen treatment with 100% N, with production of 2.23 mg, but equaling statistically the isolated B17 (*Bacillus*), B14A (*Cellulomonas*) at 2.13 and 2.08 mg, respectively. There is diversity of nitrogen fixing bacteria in forage crops of semiarid region with the potential for nitrogen fixation, production of phytohormones and siderophores and phosphate solubilization. Inoculation of diazotrophs in sorghum promotes increased root dry weight, root and shoot and shoot nitrogen content.

Keywords: nitrogen fixation, forage, IAA Production, siderophores, Sorghum bicolor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentações esquemáticas para os locais de colonização de raízes de plantas por bactérias endofíticas.....	25
Figura 2. Biossíntese do ácido indol-3-acético (AIA), a partir do aminoácido triptofano.....	29
Figura 3. Dendrograma de similaridade baseado nas características fenotípicas de 61 isolados de bactérias diazotróficas oriundas de raízes de Capim-buffel, Capim tifton, Sorgo forrageiro, Palma forrageira e Maniçoba.....	48
Figura 4. Amplificação do gene <i>nifH</i> com os iniciadores PolF e PolR na primeira reação e <i>nifHF</i> e <i>nifHR</i> (nested) de isolados de bactérias endofíticas de capim-buffel.....	52
Figura 5. Árvore filogenética por sequenciamento do 16S rRNA dos isolados bacterianos endofíticos de plantas forrageiras.....	56
Figura 6. Produção de sideróforos pelos 61 isolados avaliada em meio CAS-Dygs.....	67
Figura 7. Halo de solubilização de bactérias isoladas do Sorgo (S14) e Maniçoba (M9) aos 5 dias.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias isoladas de plantas forrageiras capim-buffel, capim tifton, sorgo forrageiro, maniçoba e palma forrageira e seus respectivos locais de coleta.....	34
Tabela 2. Caracterização química dos solos dos locais de coleta das plantas forrageiras.....	35
Tabela 3. Caracterização química do solo utilizado no experimento de promoção de crescimento vegetal.....	42
Tabela 4. População de bactérias presentes nas raízes de Capim-buffel, Capim tifton, Sorgo forrageiro, Palma-forrageira e Maniçoba pela técnica de número mais provável (NMP), avaliados em meio de cultura BMGM.....	45
Tabela 5. Caracterização fenotípica de vinte e seis grupos fenotípicos obtidos através do agrupamento das bactérias diazotróficas isoladas de raízes de Capim-buffel, Capim tifton, Sorgo forrageiro, Palma-forrageira e Maniçoba (método de agrupamento UPGMA e Coeficiente de similaridade de Bray-Curtis).....	49
Tabela 6. Capacidade de formação de película em diferentes meios de cultura semissólido de bactérias presentes nas raízes de Capim-buffel, Capim tifton, Sorgo forrageiro, Palma-forrageira e Maniçoba.....	50
Tabela 7. Isolados positivos e negativos para presença do gene <i>nifH</i> nas duas reações de PCR – Pol e Nested.....	53
Tabela 8. Caracterização bioquímica (Ácido indol acético com triptofano-AIA C/T e sem triptofano AIA S/T; Nitrogênio Total-N; e Solubilização de fosfatos) de bactérias diazotróficas isoladas de raízes de capim-buffel, capim tifton, sorgo forrageiro, palma-forrageira e maniçoba.....	61
Tabela 9. Massa seca de raiz (MSR), massa de parte aérea seca (MPAS) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) de sorgo forrageiro testados com 61 bactérias diazotróficas isoladas de raízes de capim-buffel, capim tifton, sorgo forrageiro, palma-forrageira e maniçoba, 2 isolados (AbV5 e BR11417) e 4 tratamentos nitrogenados.....	70

Lista de abreviaturas e siglas

N₂: Nitrogênio atmosférico
%: porcentagem
DNA: Ácido desoxirribonucleico
RNA: Ácido Ribonucleico
CO₂: Dióxido de carbono
NO₂: Dióxido de nitrogênio
NH₃: Amônia
AIA: Ácido indolacético
µg: Micrograma
Kg: Quilograma
L: Litro
M.O: Matéria orgânica
pH: Potencial hidrogeniônico
H: Hidrogênio
Al: Alumínio
SB: Soma de bases
CTC: Capacidade troca de cátions
Na: Sódio
K: Potássio
Ca: Cálcio
P: Fósforo
Mg: Magnésio
NaCl: Cloreto de Sódio
HCl: Ácido clorídrico
pb: Pares de base
UFC: unidades formadoras de colônia
V%: Saturação de bases
H+Al: acidez potencial
C.E: Condutividade elétrica

Sumário

1. Introdução	16
2. Revisão de Literatura.....	18
2.1. Pastagem.....	18
2.1.2. Produção animal no Semiárido.....	18
2.1.3. Nutrição da Pastagem.....	20
2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio.....	22
2.2.1. Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas.....	23
2.2.2. Bactérias associadas à plantas forrageiras.....	25
2.3. Mecanismos de Promoção do crescimento.....	27
2.3.1. Fixação de Nitrogênio.....	27
2.3.2. Ácido indol-acético.....	28
2.3.3. Produção de Sideróforos.....	30
2.3.4. Solubilização de Fosfatos.....	31
3. Material e Métodos.....	33
3.1. Local de coleta e amostragem.....	33
3.2. Isolamento das bactérias.....	35
3.3. Capacidade formação de película em diferentes meios de cultura.....	36
3.4. Caracterização fenotípica das bactérias.....	37
3.5. Caracterização genotípica dos isolados bacterianos.....	37
3.5.1. Extração de DNA.....	37
3.5.2. Amplificação do gene nifH.....	38
3.6. Sequenciamento do rDNA16S.....	39
3.7. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento “ <i>in vitro</i> ”.....	39
3.7.1. Produção de AIA <i>in vitro</i>	39
3.8. Produção de Sideróforos.....	40
3.9. Solubilização de fosfato.....	40
3.10. Potencial de fixação de nitrogênio em meio semissólido.....	41
3.11. Ensaio para avaliação da promoção do crescimento vegetal.....	41
3.12. Análise dos dados.....	43
4. Resultados e Discussão.....	45
5. Conclusão.....	74
6. Referências Bibliográficas.....	75

1. Introdução

A pecuária tem grande importância econômica e social para o Brasil e para o Semiárido brasileiro. A alimentação dos animais ruminantes como os bovinos, caprinos e ovinos é realizada, em sua maioria, com o uso de pastos tropicais que, em geral, apresentam baixas produtividades e taxas de lotação associadas por serem pouco adotadas as práticas de manejo do pastejo e também de fertilização das pastagens especialmente a adubação com nitrogênio (N) (CECATO et al., 1996).

Apesar da fertilização dos pastos ser apontada como importante ferramenta para elevar a produtividade, na região semiárida aspectos relacionados a disponibilidade de adubos, o elevado preço destes insumos assim como o alto custo para a aplicação limitam o uso desta prática, havendo, portanto, a necessidade de outras alternativas que possam contribuir para o aporte de nutrientes para as áreas de pastagens sem onerar os custos de produção. Neste caso o uso de bactérias diazotróficas associativas pode ser uma alternativa.

De acordo com Hungria et al. (2010), a substituição parcial de 50% do fertilizante nitrogenado necessário para gramíneas em associação com bactérias diazotróficas poderia economizar cerca de US\$ 1,2 bilhões por ano, sugerindo que o uso de inoculantes poderia reduzir a utilização de fertilizantes químicos a nível mundial.

As bactérias endofíticas são um grupo de micro-organismos de elevada diversidade e habitam o interior de raízes e demais tecidos vegetais podendo propiciar efeitos benéficos sobre o crescimento de plantas, por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (REINHOLD HUREK e HUREK, 2011), facilitando para a planta o aporte de nutrientes contribuindo com a solubilização de fosfato e absorção de ferro, além de serem capazes de sintetizarem fitormônios como o ácido indolacético (AIA) (AHEMAD, 2014).

Sabendo da especificidade das bactérias diazotróficas por determinadas plantas, sugere que melhores respostas na promoção do crescimento dessas plantas possam ser alcançadas principalmente a partir micro-organismos hospedeiros naturais, que já se encontram adaptadas a essas espécies vegetais.

Deste modo, para plantas de importância e potencial forrageiro para o

Semiárido brasileiro como o capim-buffel, a palma-forrageira, o sorgo, a maniçoba e o capim-tifton 85, há escassez de informações sobre a presença, as quantidades que podem ser encontradas de bactérias diazotróficas, as características destes micro-organismos e, acima de tudo, o potencial para atuarem como promotores de crescimento nestas plantas forrageiras. Ao avaliar a ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio no capim-buffel e outras forrageiras, Moreira et al., (2013), observaram que as maiores densidades foram observadas no capim-buffel, $2,4 \times 10^4$ bactérias g^{-1} rizosféricas, sugerindo uma maior especificidade desses micro-organismos por essa espécie.

Assim, testou-se primeiramente a hipótese que há bactérias diazotróficas de plantas forrageiras da região semiárida com potencial para fixação de nitrogênio e de promover o crescimento de plantas. E, posteriormente analisou-se a hipótese de que bactérias diazotróficas isoladas de plantas forrageiras do Semiárido promovem o aumento no sistema radicular, na parte aérea e nos teores de N do sorgo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Pastagem

O Brasil tem atualmente uma posição de destaque como produtor mundial de alimentos, isso ocorre devido ao seu vasto território e suas características edafoclimáticas. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação (FAO, 2016) o país apresenta 851 milhões de hectares, desse total, 275 milhões (32,5%) estão ocupados com atividades agropecuárias, destes 23% são ocupados por pastagens nativas e/ou cultivadas. Dessa forma, a pecuária brasileira, acaba sendo praticada quase que exclusivamente em pastagens que são fontes de nutrientes para a produção de ruminantes com custo reduzido (AZENHA, 2014).

Apesar da importância como fonte de alimento, as pastagens têm sido utilizadas de forma inadequada. De acordo com Pedreira e Primavesi (2009), as pastagens apresentam taxas de lotação acima da capacidade suporte. Nos pastos que sofrem superpastejo há desequilíbrio entre a ciclagem de nutrientes e o crescimento da planta forrageira, ocasionando degradação dessas áreas (NASCIMENTO JUNIOR et al., 1999).

Segundo, Pedreira e Primavesi (2011) o Brasil possui cerca de 50 milhões de hectares de pastagens degradadas, contradizendo o cenário agropecuário, onde a demanda é crescente por alimentos e a preocupação é para que as produções sejam sustentáveis. Para isso, o bom uso das pastagens vem sendo uma das principais maneiras de preservar o meio ambiente e melhorar os índices zootécnicos dos rebanhos, uma vez que, ao manejá-las adequadamente seria possível aumentar a lotação média do país, melhorar o desempenho animal, diminuir o ciclo produtivo, reduzir a abertura de novas pastagens e manter a estabilidade ao longo do tempo (AZENHA, 2014).

2.1.2 Produção animal no Semiárido

Situado no Semiárido Brasileiro o Bioma Caatinga é o menos favorecido com unidade de conservação no Brasil visto que apenas 7,5% desse ecossistema se

encontra resguardados e delimitado como área de proteção. Ainda assim, o bioma continuará como um dos menos protegidos do país, já que pouco mais de 1% destas unidades são de Proteção Integral. De acordo com Alves et al. (2014), esse bioma possui uma rica diversidade de espécies vegetais e animais com total capacidade técnica de exploração.

Segundo Velloso et al. (2002) a região Nordeste está entre as regiões brasileiras que possuem maior variabilidade de aspectos físicos e florísticos, constituindo assim, um mosaico vegetacional composto de caducifólias, xerófilas e espinhosas que variam de acordo com os diferentes tipos de solo e com a disponibilidade de água. Na região é comum a irregularidade climática com grande variabilidade, espacial e temporal, de precipitação, apresentando ainda os valores mais extremos do país: a maior insolação, a menor nebulosidade, as maiores médias térmicas, as maiores taxas de evaporação e, sobretudo, os menores índices pluviométricos, em torno de 500 a 700 mm anuais (OLIVEIRA et al., 2006).

Nesta região, a pecuária é praticada, principalmente, de modo extensivo, sendo baseada na exploração das pastagens nativas e/ou introduzidas, resultando em baixo rendimento produtivo dos rebanhos caprinos, ovinos e bovinos (SOUSA e ARAÚJO FILHO, 2001). A produção agrícola nessas regiões caracteriza-se principalmente pela agricultura de sequeiro e pela pecuária extensiva, condição que acaba dificultando o desenvolvimento de pastagens nessa região (ALVES et al., 2014).

Além disso, os sistemas de criação baseados em pastagens nativas apresentam limitações quantitativas e/ou qualitativas, principalmente nas épocas de estiagem, sendo necessária a introdução de plantas forrageiras exóticas para a formação de pastagens cultivadas (ALVES, 2014). Essas pastagens são formadas, principalmente por gramíneas cultivadas em monocultivo ou, em consórcios com leguminosas.

Outros importantes fatores que são associados às condições dos pastos no Brasil e, em especial, na região semiárida brasileira são as poucas práticas do manejo do pastejo aplicadas e a deficiente fertilização das pastagens (VOLTOLINI et al., 2010)

De maneira geral os solos do Semiárido nordestino apresentam baixos teores de matéria orgânica e, conseqüentemente, baixa disponibilidade de nutrientes para

as plantas. Neste caso, um dos nutrientes mais importantes, é o nitrogênio, porque participa diretamente da composição de diversas moléculas no interior das plantas e é o principal controlador dos processos fotossintéticos. Nesse contexto, a inserção de fontes externas de nitrogênio é imprescindível para a elevação da produção de biomassa de diversas plantas forrageiras que participam diretamente da dieta de animais, de modo a possibilitar reflexos positivos na rentabilidade do sistema produtivo (CUNHA et al., 2012).

2.1.3 Nutrição da pastagem

A utilização de uma espécie forrageira adaptada às regiões secas, com alto valor nutritivo e boa produção de biomassa vegetal não é suficiente para garantir a perenidade de uma pastagem, se a mesma não for bem manejada e receber reposição dos nutrientes essenciais. Estudos têm demonstrado que dentre os principais nutrientes exigidos pelas plantas forrageiras encontra-se o nitrogênio (N) (BODDEY et al., 1993).

O N possui papel fundamental no metabolismo vegetal por participar da biossíntese de proteínas e clorofilas e por estar presente no DNA, RNA e outras estruturas celulares (ANDRADE et al., 2003). De acordo com Yamada; Abdalla (2000) a dinâmica do N no ecossistema agrícola tem despertado interesse em virtude do aumento na demanda por alimentos. Por ser um elemento muito dinâmico no solo, o N está sujeito a perdas principalmente pela forma gasosa, o que torna essencial a eficiência do seu manejo.

O crescimento e a persistência das gramíneas nos trópicos tendem a ser limitados pela deficiência nutricional, principalmente de nitrogênio (N), uma vez que este nutriente acelera a formação e crescimento de novas folhas, além de aumentar a rebrota, o que contribui para a melhor recuperação do pasto (CECATO et al., 1996).

De acordo com Gimenes et al. (2011) a adubação em conjunto com outras práticas de manejo, exerce papel essencial no estabelecimento e manutenção das espécies forrageiras. Estas práticas favorecem o aumento da produção de massa seca e do valor nutricional, aumenta a capacidade suporte dos pastos e conseqüentemente eleva a produtividade animal por unidade de área, que é

indicador importante para a propriedade rural em áreas tropicais. Por estar diretamente ligado ao crescimento vegetal e ao perfilhamento das plantas, o nitrogênio é considerado um dos mais importantes no aumento da produtividade dos pastos, tornando a fertilização nitrogenada um fator fundamental para a utilização de práticas modernas de manejo de pastagens (ANDRADE et al., 2009; BRAMBILLA et al., 2012).

Santos et al. (2008) avaliaram a produção e a composição química do capim Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e da Braquiária decumbens (*Brachiaria decumbens* cv. Basilisk) com quatro adubações (sem adubo; N; P; NP; NK), observaram incrementos de até 110% na massa verde (MV) dos capins quando adubados com nitrogênio em relação à testemunha. Já, Gimenes et al. (2011), verificaram maiores porcentagens de folhas na massa de forragem pós-pastejo, além de maiores taxas de acúmulo de forragem, de lotação dos pastos e de ganho de peso por área com o uso da adubação nitrogenada.

Segundo a Associação Nacional para a Difusão de Adubos (ANDA, 2015), o mercado de fertilizantes brasileiro atingiu o patamar de 30,2 milhões de toneladas comercializadas em 2015, estando entre os quatro maiores consumidores mundiais de nutrientes para a formulação de fertilizantes, destacando-se os fertilizantes nitrogenados. Deste modo, a síntese dos principais adubos nitrogenados produzidos no mundo é originária do N² atmosférico e do hidrogênio, o qual é obtido de combustíveis fósseis, principalmente pelo gás natural e óleo combustível, acarretando em alto dispêndio energético, em torno de 1,2 a 1,8% de todo o consumo global de energia fóssil (CANTARELLA, 2007).

Apesar do potencial produtivo das forrageiras poder ser melhorado com a adubação nitrogenada, sua utilização tem sido limitada pelo custo, em virtude da extensão das áreas envolvidas e da necessidade de aplicações frequentes, além de poder ser facilmente perdido quando não associado à parte orgânica do solo (VITOR et al., 2008). Entretanto, outro agravante na utilização de fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, geralmente menor do que 50% (TRIVELIN; FRANCO, 2011).

Em pastagens tropicais com manejo extensivo e sem adubação nitrogenada como é o caso do Brasil, a disponibilidade de N depende, em grande parte, da mineralização do nitrogênio dos resíduos vegetais. Com isso, o balanço entre esses

processos pode variar com o tempo e, principalmente, com a natureza do resíduo orgânico em decomposição, além de depender da atividade microbiana do solo (AITA e GIACOMINI, 2007).

De acordo Bhattacharjee et al. (2008) o uso excessivo de fertilizantes pode levar a várias consequências que incluem: (i) contaminação das águas subterrâneas com o nitrato devido à lixiviação e desnitrificação tornando-se prejudicial para a saúde humana e animal, (ii) a contaminação da água de superfície pela eutrofização que podem surgir devido à lixiviação de nitrogênio na água afetando o crescimento de organismos aquáticos e (iii) produção de gases de efeito estufa CO_2 e NO_2 durante a fabricação de fertilizantes nitrogenados, o que contribui para o aumento do aquecimento global.

Para este caso, alternativas oferecidas pela própria natureza apresentam potencial para aumento de produtividade de forma sustentável. Uma dessas alternativas é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), seja via consórcio com leguminosas, ou uso de bactérias diazotróficas associadas com gramíneas forrageiras (BALDANI et al., 2002; REIS Jr., 2002; BODDEY et al., 2003).

2.2 Fixação biológica do Nitrogênio (FBN)

A FBN é um processo essencial para transformar o nitrogênio atmosférico (N_2), que não pode ser utilizada pela maioria dos micro-organismos e pelas plantas, na forma inorgânica combinada NH_3 (amônia), e a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas vitais em sistemas biológicos (CANTARELLA, 2007). A reação de redução do N_2 a NH_3 é realizada por muitos grupos de bactérias e alguns organismos do grupo Archaea que possuem a enzima nitrogenase, esses micro-organismos são conhecidos com fixadores de N ou bactérias diazotróficas (MOREIRA et al., 2010). Esses organismos se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade sendo classificadas como bactérias diazotróficas: de vida livre, associativas e simbióticas (CANTARELLA, 2007; PERIN, 2007).

Segundo Evans e Burris (1992), os organismos de vida livre fixam o nitrogênio para seu próprio uso. Enquanto que os diazotróficos associativos contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas

diferenciadas e, os simbióticos estabelecem uma interação com o hospedeiro muito estreita e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Alguns grupos de bactérias estabelecem simbiose com raízes de plantas leguminosas, e são conhecidas como rizóbios. Nesse tipo de simbiose ocorre a formação de estruturas nas raízes, chamadas de nódulos, onde as bactérias ficam alojadas e realizam o processo de captura e fixação do nitrogênio atmosférico. A associação entre rizóbio-leguminosa é muito importante para a agricultura, porque promove aumento significativo do nitrogênio no sistema solo-planta (DOBEREINER, 1989).

Um exemplo clássico da FBN está na cultura da soja. Segundo Hungria et al. (2007), a cultura da soja dispensa totalmente a adubação nitrogenada, uma vez que, em condições normais de cultivo, a FBN é capaz de suprir as necessidades de N da cultura com taxas de fixação de N superiores a 300 kg de N/ ha. Estima-se que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente seja de 139 e 170 milhões de toneladas de N ano⁻¹, enquanto que a fixação química contribui com 65 milhões de toneladas de N ano⁻¹ de modo que a substituição de fertilizantes químicos pela inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* na cultura da soja representa uma economia de cerca de R\$ 7,46 bilhões para agricultura brasileira (MOREIRA, 2008; CAVALCANTE et al., 2011).

De acordo com Hungria (2011), para 1.000 kg de grãos de soja são necessários 100 kg de N/ha, ao passo de que fertilizantes nitrogenados no país custam em média US\$ 1/kg, e o custo da fixação nitrogenada por meio da inoculação de bactérias diazotróficas gira em torno de US\$ 2/ha (HUNGRIA, 2011). Comparando os dados e aplicando esse cálculo às gramíneas forrageiras, onde a fixação dessas bactérias contribui em média com 50%, o plantio requer (50-300 kg de N ha⁻¹ano) (CANTARUTTI et al 1999), a economia é de até 50%.

Segundo Moreira et al. (2010), a contribuição da FBN associativa à nutrição vegetal não é tão significativa quanto as simbioses, entretanto se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais.

2.2.1. Fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas

No Brasil, os primeiros relatos de fixação biológica de nitrogênio em gramíneas são das pesquisas da Dra. Johanna Döbereiner, na década de 50. Seus estudos contribuíram no conhecimento da interação de micro-organismos diazotróficos na rizosfera de gramíneas. Diferente da maioria dos estudos na década de 1960, 1970 e 1980 que, em grande parte concentravam a sua atenção sobre as bactérias da rizosfera como prováveis fontes fixas de N, grande parte do interesse recente tem incidido sobre as bactérias que habitam o interior das próprias plantas, as "bactérias diazotróficas endofíticas " (DOBEREINER et al.,1995).

Segundo Schulz e Boyle (2006) as bactérias endofíticas foram definidas capazes de colonizar tecidos internos de plantas sem causar infecções sintomáticas ou efeitos negativos sobre o seu hospedeiro. De acordo com Cocking (2003), bactérias endofíticas possuem maiores vantagens em relação às rizosféricas em termos de fixação de nitrogênio, podendo fornecê-lo diretamente ao seu hospedeiro.

Além disso, segundo Reinhold-Hurek e Hurek (1998), essas vantagens são: (i) Quantidade de oxigênio baixo o suficiente para a expressão da enzima nitrogenase. (ii) As endofíticas são menos vulneráveis à concorrência com outros micro-organismos do solo. (iii) Essas bactérias permanecem protegidas de estresses abióticos e bióticos, ou seja, com melhores condições para a fixação do nitrogênio.

Acredita-se que as comunidades de bactérias endofíticas sejam determinadas por diversos fatores (HARDOIM et al., 2008). Segundo Rosenblueth Martinez-Romero (2006), as plantas oferecem um ambiente seletivo, filtrando grupos microbianos. Dessa forma, o genótipo da planta e o seu estado fisiológico, além de condições abióticas e manejo agrícola, podem afetar a diversidade microbiológica nos tecidos radiculares (HARDOIM, 2008).

A colonização bacteriana em não leguminosas é um processo complexo que envolve a interação de várias características, como os genes bacterianos e a resposta da planta. A colonização inicia-se com a migração para a raiz, em seguida ocorre à fixação da bactéria e a formação de uma micro colônia e no último estágio ocorre o crescimento e sobrevivência da população (SINGH et al., 2011). Embora o mecanismo molecular envolvido no processo de colonização não seja bem compreendido, sugere-se que existam semelhanças na colonização de bactérias patogênicas e endofíticas (KRAUSE et al., 2006)

A colonização radicular é o primeiro e mais importante passo no estabelecimento do microrganismo na planta. As bactérias são atraídas para rizosfera pelos exsudatos liberados pelas plantas, ricos em aminoácidos e açúcares. Nesse momento, as plantas emitem sinais a algumas bactérias enquanto inibe outras (COMPANT et al, 2010). Prieto et al. (2011) sugere que bactérias endofíticas mantem-se confinadas dentro de uma organela ou mais provavelmente um vacúolo que surge pelo estreitamento de uma estrutura interna nas membranas das raízes. Os possíveis locais de colonização por bactérias diazotróficas endofíticas na raiz são representados na Figura 1.

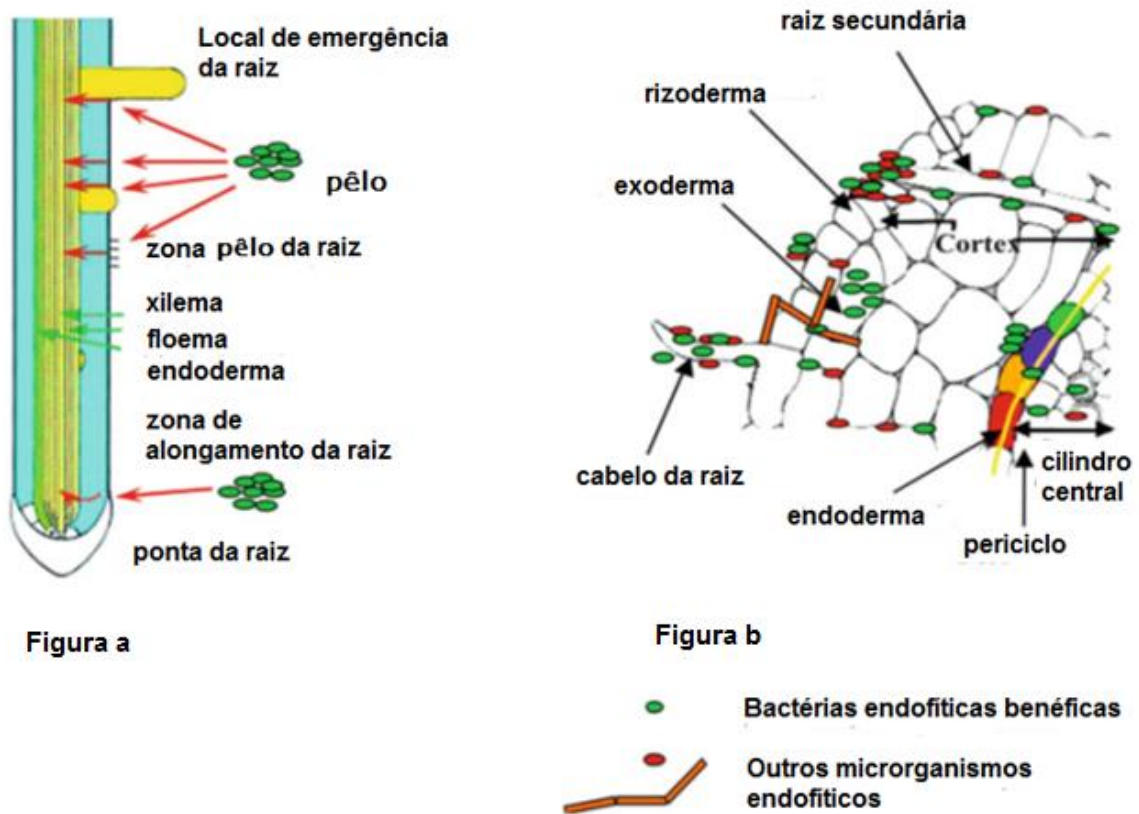


Figura 1. Apresentações esquemáticas para os locais de colonização de raízes de plantas por bactérias endofíticas. Na figura A representa seção longitudinal de possíveis locais na raiz que podem ser utilizados para a entrada de bactérias endofíticas. Na figura B representa a seção transversal de raiz mostrando a distribuição e colonização de bactérias endofíticas. Adaptado de Compant et al. (2010).

2.2.2 Bactérias associadas a plantas forrageiras

Apesar da região Semiárida apresentar algumas limitações como a escassez e irregularidade de chuvas, a vegetação nativa e as espécies introduzidas na região são bem diversificadas. Dentre elas, a palma-forrageira, o capim-buffel, o sorgo e a maniçoba são espécies forrageiras de grande importância, participando significativamente da dieta de ruminantes.

A maniçoba, pertencente ao mesmo gênero da mandioca, é uma planta nativa do Semiárido e que apresenta grande tolerância à seca (ARAÚJO; CAVALCANTI, 2002). Além dessa espécie, algumas plantas se mostraram perfeitamente adaptadas às condições do Semiárido, como o capim-buffel, sorgo e a palma-forrageira.

Sabendo das características benéficas de bactérias fixadoras de nitrogênio, acredita-se que a diversidade desses micro-organismos isolados a partir dessas plantas adaptadas pode ser elevada. A seleção dessas bactérias pode contribuir com a promoção do crescimento destas e de outras espécies forrageiras, no aumento da eficiência agrônômica, reduzindo assim os custos de produção e a poluição ambiental. Além disso, essas bactérias são capazes de contribuir na promoção do crescimento das plantas, acelerando a germinação das sementes, protegendo as plantas contra doenças, e promover o crescimento das raízes, utilizando diferentes estratégias (GARCIA et al., 2015).

Apesar da importância, há ainda poucos estudos relacionando os micro-organismos de regiões Semiáridas, bem como sua associação com plantas adaptadas a esses ambientes.

Costa e Melo (2005) isolaram bactérias endofíticas da palma forrageira, observaram quanto aos atributos de fixação de nitrogênio, que em 69 linhagens, 10 apresentaram o gene *nifH* (gene que expressa, se o micro-organismo é ou não um fixador) e concluíram que essas bactérias podem ser usadas na inoculação de plântulas de palma, visando um maior desenvolvimento em solos com déficit hídrico. Avaliando a ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio no capim-buffel e outras forrageiras, Moreira et al. (2013), observaram que as maiores densidades de micro-organismos foram observadas no capim-buffel, $2,4 \times 10^4$ bactérias g^{-1} na superfície da raiz.

Estudando a ocorrência de bactérias diazotróficas em sorgo forrageiro,

Bergamaschi et al. (2007), observaram 14 genótipos de sorgo forrageiro, sendo que 76 isolados obtidos foram aptos a fixar nitrogênio e produzir ácido indol-acético in vitro, seus resultados demonstraram o potencial desses isolados como possíveis promotores de crescimento vegetal.

Embora já se tenha alguns resultados experimentais, os estudos sobre a inoculação de bactérias diazotróficas, como alternativa para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados nas culturas forrageiras, estão em fase inicial, sendo necessários muitos estudos para desenvolver produtos eficientes, a partir de bactérias fixadoras de nitrogênio.

2.3. Mecanismos de promoção do crescimento

As bactérias endofíticas podem beneficiar o crescimento das plantas por meio de mecanismos de promoção de crescimento. Esses mecanismos podem ser de ação direta e/ou indireta. A ação direta envolve a produção de compostos fitoestimuladores pela bactérias e/ou sua atuação em alguns processos que resultam no aumento da disponibilidade de certos nutrientes. O efeito direto envolve a fixação de N^2 (BODDEY e DOBEREINER, 1995), produção de fitohormônios (OLIVEIRA, 2009), e solubilização de fosfatos (MARRA et al., 2012). Os mecanismos indiretos são relacionados à proteção da planta a micro-organismos patogênicos (SHANAHAN et al., 1992).

2.3.1. Fixação de N

Todas as bactérias diazotróficas possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, o qual, dentre outros substratos alternativos, reduz o nitrogênio atmosférico a amônia, tornando disponível para as plantas (DEAN e JACOBSON, 1992). E para que a fixação biológica ocorra, é necessário a expressão de um conjunto de genes denominado gene *nif* (nitrogen fixing), que codifica as proteínas envolvidas no processo de FBN.

A essência da enzima nitrogenase foi elucidada por Dean e Jacobson (1992). A enzima é constituída por dois componentes: 1) dinitrogenase redutase, que

representam proteínas e ferro, responsável por captar a energia necessária e 2) dinitrogenase, que tem um cofactor metálico, responsável pela conversão do N_2 a NH_3 . Na base do cofactor foram identificados três sistemas de fixação de diferentes N: Mo-dinitrogenase, V-nitrogenase, e Fe-nitrogenase.

Os genes *nif*, principalmente o *nifH*, têm sido utilizados como marcadores no estudo de organismos fixadores (BALDANI, 2002). Dessa forma, a detecção do gene *nifH* na amostra de DNA genômico de uma célula bacteriana rotulariam o isolado como um fixador de nitrogênio.

Espécies de bactérias que pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* estão associados às raízes de plantas e são capazes de exercer um efeito benéfico no crescimento vegetal (HIYAMA et al., 2013; JAMES; OLIVARES, 1997). De acordo com Kumar e Chandra (2008) além da fixação de nitrogênio, os rizóbios contribuem com a nutrição vegetal, mobilizando fósforo inorgânico e orgânico. Bactérias do gênero *Bacillus* são o mais abundante na rizosfera. Para Charest et al. (2005), metabólitos são liberadas por essas bactérias, afetando diretamente o ambiente e aumentando a disponibilidade de nutrientes para as plantas, conseqüentemente promovendo o crescimento vegetal.

Além dos *Bacillus*, bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam características que as tornam promotoras de crescimento. Praveen Kumar et al. (2012) inocularam bactérias isoladas de solos da Índia em plantas de sorgo para avaliarem o efeito de fixação de nitrogênio sobre o crescimento. As plantas que foram inoculadas apresentaram maior crescimento e absorção de nutrientes do que os controles, dentre eles o isolado P17(*Pseudomonas* sp.) que apresentou maior volume de raízes ($0,3\text{ cm}^3$), comprimento da parte aérea (36,2 cm), massa seca (152 mg), área foliar (31cm^2).

2.3.2. Ácido Indol -3-acético (AIA)

Vários fitohormônios são sintetizados pelas plantas e atuam no crescimento, desenvolvimento e diferenciação dos tecidos vegetais (SPAEPEN et al., 2009) e proteção contra os estresses abióticos e bióticos (TAGHAVI et al., 2009). Dentre

esses, as auxinas atuam diretamente na parte aérea e na arquitetura das raízes (TEALE et al., 2006). Uma das auxinas mais abundantes é o ácido indol-3-acético (AIA), que além de regular o crescimento vegetal, aumenta o crescimento radicular, contribuindo para uma melhor absorção de nutrientes. Além disso, o AIA pode contribuir no aumento do número e crescimento das raízes, além do alongamento dos pelos radiculares (DE SALAMONE et al., 2001), e exsudação radicular das plantas (REINHOLD-HUREK E HUREK, 2011).

O AIA pode ser sintetizado a partir do triptofano. Esta transformação pode ser realizada por micro-organismos, que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra na presença de peroxidases e de radicais livres. Além da produção em tecidos da planta, a síntese de AIA é difundida entre bactérias associadas à planta e fornecem mecanismos relacionados ao crescimento de plantas. A biossíntese do AIA em algumas bactérias é mostrada através de diferentes rotas biossintéticas Figura 2. A biossíntese do AIA Trp-dependente ocorre por diversas vias. Foram propostas: 1) A via ácido indol-3-pirúvico (AIPy); 2) A via indol-3-acetamina (IAM) e 3) A via triptamina indol-3-acetaldoxima (IAOx) (MARCHIORO, 2005).

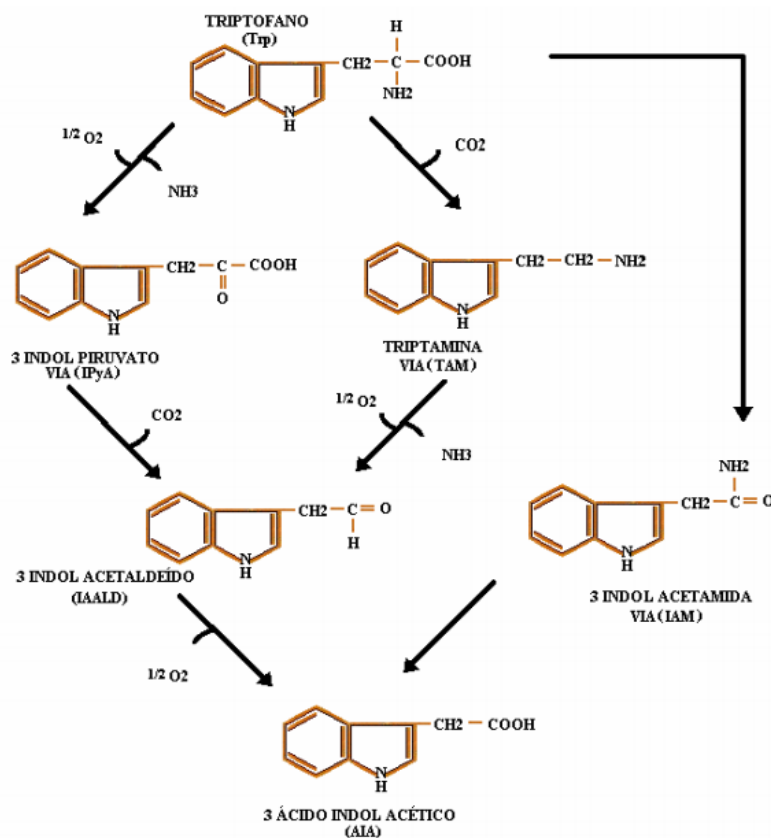


Figura 2. Biossíntese do ácido indol-3-acético (AIA), a partir do aminoácido triptofano (MARCHIORO,

2005).

Na via IAM o triptofano é transformado a IAM pela enzima Triptofano-2-monoxigenase, logo o IAM é transformado em AIA pela enzima 8 IAM hidrolase, codificada pelo gene *iaaH* (THEUNIS et al., 2004). Na via IPA, o triptofano é inicialmente convertido a IPA por uma aminotransferase (transaminação), em seguida, é descarboxilado através da indol-3-piruvato descarboxilase a indol-3-acetaldeído (IAAld) após isso é oxidado a AIA pela IAAld desidrogenase (PATTEN e GLICK, 2002).

São relatadas na literatura diversas bactérias produtoras de AIA, tais como: *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus* e *Burkholderia* (LATA; TILAK et al., 2002). Estudando bactérias endofíticas isolados do milho, Szilagyi-Zecchin et al. (2014) observaram que duas cepas de bactérias (*Enterobacter*-CNPSO 2480 e *Bacillus*-CNPSO 2481), se destacaram por aumentar o volume de raiz em 44% e 39%, respectivamente, e a germinação de 47% e 56%, respectivamente. Outras duas cepas de *Bacillus* (CNPSO 2477 e CNPSO 2478) mostraram capacidades extraordinárias para a produção de AIA, no entanto eles reduziram a germinação das sementes.

Em estudos visando isolar e determinar a diversidade de bactérias endofíticas em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*), Costa e Melo (2012), observaram que 14 isolados produziram AIA, variando entre 3,5 e 17,45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A produção de AIA por bactérias também por Haiyambo et al. (2015), esses autores isolaram bactérias a partir da rizosfera de *Pennisetum glaucum* e *Sorghum bicolor* e observaram oito isolados que foram consideradas eficientes em produzir AIA, sendo portanto capazes de promover o crescimento vegetal.

Avaliando o efeito da inoculação de rizóbios em gramíneas forrageiras (capim Tanzânia (*Panicum maximum*), Pensacola (*Paspalum sauriae*), capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e azevém (*Lolium multiflorum*), Moreira et al. (2013), observaram que todos os rizóbios avaliados produziram AIA, entretanto, o isolado mais promissor foi o Lc348, produzindo 60,7 ng mL^{-1} .

2.3.3 Produção de Sideróforos

O ferro é o quarto elemento mais abundante na terra, e um nutriente

essencial para quase todas as formas de vida. Todos os micro-organismos conhecidos até agora, com exceção de certos lactobacilos, exigem essencialmente ferro (NEILANDS, 1995). Apesar disso o ferro não é facilmente assimilado por uma bactéria ou plantas porque o íon férrico ou Fe^{+3} , que é a forma predominante na natureza, é pouco solúvel, de modo que a quantidade de ferro disponível para assimilação pelos organismos vivos é extremamente baixa (MA, 2005). Para estar disponível o Fe deve estar na forma Fe^{2+} e muitos micro-organismos desenvolveram mecanismos de quelar o Fe^{3+} , por meio da produção de sideróforos (SANTOS, 2004).

Ambos, micro-organismos e plantas necessitam de um nível elevado de ferro, e obter ferro suficiente torna-se um problema na rizosfera da planta visto que as bactérias e os fungos competem pelo ferro (GUERINOT, YING, 1994.; LOPER, BUYER, 1991). Nesse caso, para sobreviver com uma oferta limitada de ferro, as bactérias sintetizam sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular com potencial quelante de íons férricos, sendo estas moléculas sintetizadas principalmente por micro-organismos que crescem em ambientes com baixas concentrações de ferro. Em ambientes assim o papel desses compostos é recolher os íons de Fe do ambiente, tornando esse elemento químico disponível para a célula microbiana (HIDER, KONG, 2010.; NEILANDS, 1981).

Apesar da importância do ferro para os organismos vegetais, sabe-se que o crescimento das plantas não é geralmente afetado pela depleção de ferro na rizosfera, porque a maioria das plantas pode crescer em concentrações de ferro muito inferiores à maioria dos micro-organismos (O'SULLIVAN, O'GARA, 1992). No entanto, de acordo com Neilands, (1995), a concentração de pelo menos 1 mM de ferro seria necessária para um crescimento ótimo da maioria das espécies microbianas.

2.3.4 Solubilização de Fosfatos

Fósforo (P) é depois do nitrogênio, o mais importante nutriente limitante da produção agrícola (GOLDSTEIN, 1986). Embora a quantidade total de fósforo no solo possa ser alta, na maioria das vezes, este elemento não se encontra na sua forma lábil (GYANESHWAR et al., 2002). Em solos tropicais são necessárias

aplicações de fósforo inorgânico (Pi) no solo para garantir a produtividade das culturas. No entanto, os solos tropicais da região Semiárida, geralmente apresentam altos teores de Fe e Al, o que causa redução na disponibilidade de Pi no solo (NOVAIS e SMYTH, 1999). Exercendo um papel importante no ciclo natural do P, os micro-organismos são responsáveis pela liberação de ácidos orgânicos, que atuam como doadores de prótons e agentes quelantes aos íons Al e Fe, favorecendo a solubilização do fosfato inorgânico no solo (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999).

A literatura mostra a capacidade de diferentes grupos de bactérias em solubilizar compostos de fosfato inorgânico tais como fosfato de tricálcico, fosfato bicálcico e fosfato de rocha (SASHIDHAR e PODILE, 2010). Entre os gêneros bacterianos capazes de solubilizar fosfatos, encontram-se bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Gluconacetobacter* e *Erwinia* (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

Apesar do grande reservatório de fósforo, a quantidade de formas disponíveis para as plantas é geralmente baixa. Esta baixa disponibilidade de fósforo para plantas é porque a maioria dos solos o P é encontrado em formas insolúveis ao passo que as plantas absorvem-no apenas em duas formas solúveis, o monobásico (H_2PO_4^- e o dibásico (HPO_4^{2-}) (BHATTACHARYYA E JHA, 2012).

Avaliando a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico da *Gluconacetobacter diazotrophicus* Crespo et al. (2011) sugeriram que *G. diazotrophicus* foi um excelente candidato para ser utilizado como fertilizante organomineral, apresentando um fenótipo positivo para solubilização de fosfato. Para Silva Filho e Vidor (2001), a utilização de micro-organismos solubilizadores de fósforo é uma alternativa importante ao uso da adubação convencional, aproveitando melhor o fósforo presente no solo.

A fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias associadas a raízes de não leguminosas pode ser importante nas condições encontradas no semiárido, uma vez que o fornecimento de N via FBN pode melhorar a produtividade e o valor nutritivo das forrageiras, assim esta associação poderá, em médio prazo, contribuir para o desenvolvimento socioeconômico da região através da diminuição dos custos de produção.

3. Material e Métodos

3.1 Local de coleta e amostragem

Amostras de plantas saudáveis e adultas foram colhidas nos campos experimentais da Caatinga e Bebedouro pertencentes a Embrapa Semiárido e na área da Embrapa Produtos e Mercados, todas situadas no município de Petrolina, PE.

As espécies forrageiras colhidas foram o capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* (L.)), capim-tifton 85 (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), o sorgo-forrageiro (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) da variedade BRS ponta negra, a palma-forrageira (*Opuntia ficus indica* (L.) Miller, da cultivar gigante e a maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell. ARG.). As coletas do capim-buffel, palma-forrageira, capim tifton e sorgo forrageiro, aconteceram em Outubro de 2014, enquanto a maniçoba foi coletada em Janeiro de 2015, logo após o período chuvoso. Para cada espécie forrageira as amostras foram obtidas em duas áreas distintas, com exceção do capim-buffel que foi coletado apenas em um local.

- **Descrição das áreas de coleta**

O capim-buffel foi coletado no campo experimental Sistema (CBL), conhecido como Sistema Caatinga-Buffel-Leucena, O local apresentava somente a cultura do buffel, há alguns anos e tratava-se de um solo muito pedregoso e que estava muito seco por consequência da falta de chuva na região (AM5).

O capim tifton foi coletado em duas áreas distintas, na primeira área (AM1), no campo experimental de Bebedouro, nos piquetes de criação de ovinos, a área possuía adubação nitrogenada realizada há 4 meses antes da coleta e além disso, o pasto era constantemente irrigado. A segunda amostra foi coletada próximo ao tanque de criação de tilápias, no campo experimental da caatinga e na segunda área (AM2).

Outra cultura coletada para o estudo foi o sorgo forrageiro. Presente em duas áreas da Embrapa Produtos e Mercados, situada, próximo à sede da Embrapa Semiárido (AM3 e AM4).

A primeira amostra da palma-forrageira foi coletada no campo experimental da caatinga (AM6), nessa área, a palma recebia irrigação. Na segunda área, a

palma foi coletada na sede da Embrapa, no setor de Metabolismo Animal (AM7).

Por conta da escassez de chuvas, a maniçoba não apresentava folhas e nesse caso, sua coleta foi adiada para o início de 2015, logo após as primeiras chuvas. A coleta se deu em duas áreas pertencentes ao campo experimental da caatinga, Na primeira área, tratava-se de uma área de caatinga preservada (AM9) e na segunda área, as plantas ficavam próximas as áreas de experimento com o solo bastante pedregoso (AM8). Na Tabela 1, são apresentadas as coordenadas geográficas das áreas de coleta das plantas forrageiras e os respectivos isolados obtidos.

Tabela 1. Bactérias isoladas de plantas forrageiras (capim-buffel (B), sorgo forrageiro (S), capim-tifton (T), maniçoba (M) e palma-forrageira (P) e seus respectivos locais de coleta

Amostragem	Localização
AM1	S09° 08. 239' W040° 17.
AM2	S09° 04.192' W040° 19.575'
AM3	S09° 03. 282' W040° 16.824'
AM4	S09° 03. 145' W040° 17. 898'
AM5	S09° 04. 226' W040° 19. 590'
AM6	S09° 04.223' W040° 19.588'
AM7	S09° 04. 126' W040° 19.190'
AM8	S09° 04. 056' W040° 19.607'
AM9	S09° 04. 105' W040° 19. 715'

Em cada ponto de amostragem foi obtida uma amostra da planta inteira (parte aérea + raiz) composta formada por três amostras simples (uma planta), totalizando três repetições por área para cada espécie forrageira. Além disso, foram coletadas amostras compostas de solo a partir de cinco pontos na camada de 0-20 cm em cada área de coleta, totalizando 9 amostras de solo que seguiram para análises visando a determinação das características químicas no Laboratório de Solos da Embrapa Semiárido, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização química dos solos dos locais de coleta das plantas forrageiras

	C.E	pH	M.O	P	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V
ÁREA	mS cm ⁻¹	g kg ⁻¹	g dm ⁻³				C mol _c dm ⁻³				%
AM1	4,68	7,5	8,9	119,3	6,7	1,80	0,00	1,2	9,9	11,1	89,6
AM2	0,70	5,1	9,6	23,75	2,4	1,10	0,00	3,0	3,7	6,7	55,4
AM3	1,27	5,6	9,0	57,4	1,8	0,90	0,00	1,8	3,1	4,9	62,4
AM4	1,34	5,6	8,7	10,73	1,7	1,00	0,00	1,2	3,1	4,3	73,0
AM5	0,32	5,7	1,13	31,7	2,8	1,10	0,00	3,5	4,2	7,7	55,1
AM6	0,47	5,5	8,4	8,44	1,6	0,90	0,00	1,8	3,0	4,8	61,7
AM7	1,20	5,6	18,6	42,63	2,9	1,70	0,00	0,37	5,5	9,1	59,6
AM8	0,64	5,1	10,7	8,64	1,9	1,30	0,00	2,3	3,6	5,9	61,2
AM9	0,39	5,2	13,8	8,44	2,2	1,20	0,00	2,5	3,9	6,4	60,3

Laboratório de Solos-Embrapa Semiárido. AM= Amostra. AM1=Tifton ; AM2= Tifton ; AM3=Sorgo ; AM4= Sorgo ; AM5= Buffel ; AM6= Palma ; AM7= Palma ; AM8= Maniçoba ; AM9= Maniçoba . C.E: Condutividade elétrica; pH: Potencial hidrogeniônico. M.O: matéria orgânica; P: fósforo; Na: sódio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Al: alumínio; H+Al: acidez potencial; SB: saturação de bases; CTC: capacidade troca de cátions; V: saturação por bases.

3.2. Isolamento e purificação das bactérias

As plantas foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido para os procedimentos de isolamento. As raízes foram separadas da parte aérea, As raízes foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha e, desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 10 minutos. Posteriormente foram lavadas abundantemente com água destilada e autoclavada. As amostras foram fragmentadas e em seguida alíquotas de 10 g foram trituradas com 90 mL de NaCl 0,85% (p/v) em um

miniprocessador previamente desinfestado. Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} . Para cada uma das diluições, alíquotas de 0,1 mL, foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidros de penicilina contendo 7 mL do meio BMGM (glicose, manitol e ácido málico) semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Os frascos foram incubados a 28 °C, por dez dias, após esse período, aqueles que desenvolveram uma película microaerotáxica típica (próxima da superfície do meio de cultura) foram separadas em sua diluição menos concentrada, reinoculados no mesmo meio de cultura e incubados por dez dias. Aqueles que desenvolveram película após esta segunda incubação foram considerados positivos para determinação das populações de bactérias diazotróficas (Tabela 4), sendo assim utilizados para o isolamento das bactérias.

O padrão de crescimento das bactérias nas diferentes diluições do meio semissólido e repetições utilizadas foram tabulados e utilizados para a determinação da concentração total de bactérias diazotróficas por meio do método do número mais provável (NMP) (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). Após a confirmação do aparecimento da película em meio semissólido, as bactérias foram purificadas em placas de Petri contendo meio Dyg's (RODRIGUES NETO ET AL., 1986). Após a obtenção das culturas puras as bactérias foram reinoculadas em meio BMGM semissólido para a confirmação da capacidade de fixação do nitrogênio em condições assimióticas. Os frascos que continuaram a desenvolver a película foram reinoculados em placas de Petri contendo meio Dygs sólido. As bactérias puras foram inoculadas em Dyg's líquido com glicerol (25 % v/v) (BALDANI et al., 2014) e preservadas em freezer a -20°C e a -80°C na Coleção de Micro-organismos de interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA).

3.3 Capacidade de formação de película em diferentes meios de cultura

Os isolados foram inoculados em triplicata em frascos de vidros de penicilina contendo 7 mL dos meios: NFb (ácido málico, K_2HPO_4 , KOH, NaCl; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ -pH: 6,5), LGI(sacarose, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; KNO_3 - pH: 6,0-6,2) , LGI-P (100g sacarose; K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $MgSO_4 \cdot 2H_2O$; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; $Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -pH: 5,5-6,0) e JMV (manitol KH_2PO_4 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; NaCl; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - pH: 4,0-4,5) em diferentes diluições: 10^{-2} a 10^{-6} . Os frascos foram incubados a 28 °C, por dez

dias, após esse período, aqueles que desenvolveram uma película microaerotáxica típica (próxima da superfície do meio de cultura) foram separadas em sua diluição menos concentrada, reinoculados no mesmo meio de cultura e incubados por dez dias. Aqueles que desenvolveram película após esta segunda incubação foram considerados positivos para determinação das populações de bactérias diazotróficas.

3.4. Caracterização fenotípica das bactérias

As bactérias crescidas em meio Dyg's por um período de 48 h foram avaliadas quanto à sua cor, presença ou não de muco, tamanho (< ou > 2mm), elevação ou não, aparência (homogênea ou heterogênea) e transparência ou opacidade das colônias.

A similaridade entre os isolados foi avaliada por meio de suas características fenotípicas. Os dados foram tabulados em uma matriz binária. Os dados foram comparados e a similaridade entre os isolados foi estimada e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa PaSt, (HAMMER et al., 2001).

3.5. Caracterização genotípica dos isolados bacterianos

3.5.1. Extração de DNA

As bactérias foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5mL de meio Dyg's líquido sob agitação constante de 120 rpm por 48 horas em um agitador orbital. Após o crescimento bacteriano, foi retirada uma alíquota de 1mL, colocados em microtubos tipo eppendorf com capacidade para 1,5 mL e centrifugado a 6000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado o precipitado foi lavado por duas vezes com água destilada autoclavada. O precipitado foi submetido a três períodos de choque térmico com congelamento em freezer a -20°C e água fervente para o rompimento da membrana e extravasamento do DNA bacteriano segundo

metodologia de FERNANDES JÚNIOR et al. (2013).

3.5.2. Amplificação do gene *nifH*

Os micro-organismos endofíticos provenientes das plantas forrageiras foram caracterizados genotipicamente quanto a amplificação de um fragmento do gene *nifH* que codifica uma subunidade da enzima dinitrogenase do complexo enzimático nitrogenase.

Para a amplificação, adotou-se a estratégia de amplificação do gene *nifH* por PCR direto e pela metodologia de nested-PCR. A primeira reação utilizou o par de iniciadores PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (POLY et al., 2001) para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 360 pb do gene *nifH*. Esse par foi escolhido por amplificar uma região do gene *nifH* altamente conservada na maioria dos procariontes fixadores de N, além de ser um iniciador *nifH* universal. O segundo par de oligonucleotídeos iniciadores foi o *nifH*For (ACCCGCCTGATCCTG-CACGCCAAGG); *nifH*Rev (ACGATGTAGATTCCTGGGCCTTGTT), descrito por Soares et al. (2006) para amplificar fragmentos de sequências do gene *nifH*, com cerca de 314-317 pb.

A reação de PCR foi realizada mediante preparo do mix de soluções para um volume final de 10 µL, contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 1,2 mM, Taq DNA polimerase 1,0 U e 1,0 µM de cada iniciador PolF e PolR para a primeira reação. A segunda reação foi feita em 10 µL do mix de soluções mais 0,35 µL do produto da primeira PCR como molde. Os ciclos de amplificação constaram de: um ciclo de desnaturação inicial (5 minutos a 94° C); 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), anelamento (45 segundos a 55° C); extensão (1 minuto a 72° C); um ciclo de extensão final (10 minutos a 72° C); 4° C final em um termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems).

Os isolados que apresentaram amplificação positiva para este fragmento foram selecionados para os testes posteriores. As bactérias *nifH* positivas seguiram para análises bioquímicas dos mecanismos complementares de promoção do crescimento, como a produção de ácido indol-acético (AIA) com e sem triptofano, solubilização de fosfatos e capacidade de fixação biológica do nitrogênio (FBN).

3.6. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a amplificação do gene rDNA 16S, a reação foi dimensionada para 45µl contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ 3,0 mM, dNTP 1,0 mM, 1,0 U Taq DNA polimerase, água, 0,75 µM de cada primer iniciador. Os iniciadores utilizados foram o 27F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (WEISBURG et al., 1991).

A amplificação foi realizada em termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems) e consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 min 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente. Os produtos de PCR foram purificados com kit de purificação Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), para o sequenciamento do DNA, as amostras purificadas foram enviadas para a empresa Macrogen Inc., em Seul, Coréia do Sul, onde o sequenciamento foi realizado em uma plataforma ABI 3037xl (Applied Biosystems)

A qualidade das sequências do gene 16S rRNA foi avaliada por meio do programa SeqScanner v. 2.0 (Applied Biosystems). As sequências com qualidade satisfatória e com tamanho igual ou superior a 1000 pb foram utilizadas para a análise comparativa com as sequências depositadas do GeneBank do NCBI, usando a ferramenta Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências disponíveis no GeneBank com alta similaridade, bem como algumas sequências de estirpes tipo de espécies próximas foram baixadas para o alinhamento e a construção da árvore filogenética. O alinhamento foi feito com o algoritmo CrustalW e a árvore foi construída com o método estatístico Neighbour-Joining utilizando o método Jukes-Cantor para cálculo das distâncias. As análises de alinhamento e filogenia foram feitas com o auxílio do Programa Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013).

3.7 Avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento “in vitro”

3.7.1 Produção de ácido indolacético *in vitro* (AIA)

Para a quantificação do AIA produzido “in vitro” foi realizada para os 61 isolados obtidos das espécies forrageiras, além de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) como bactéria de referência. As bactérias foram inoculadas em meio líquido Dyg's com e sem suplementação de triptofano, a partir de um pré-inóculo (bactérias inoculadas em 5 mL de meio líquido Dyg's, e incubadas sob agitação constante (100 rpm) durante 3 dias). Após esse período avaliou-se a densidade ótica (DO) das culturas a 540 nm em espectrofotômetro, ajustando-se a concentração das culturas para DO₅₄₀ 0,3. Após o ajuste da DO, alíquotas de 1mL foram centrifugadas durante 3 min a 6000 g, e 250 µL do sobrenadante foram reservados. Nas alíquotas de sobrenadante, 100 µL de reagente de Salkowski (2% de FeCl³ 0,5 M em 35% de ácido perclórico) foram adicionados a 150 µL do sobrenadante e incubados no escuro durante 30 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 530 nm. Para a estimativa da produção de AIA, foi utilizada uma curva padrão, previamente obtida, com concentrações conhecidas de AIA sintético: 0, 50, 100, 150, 200 µg.L⁻¹.

3.8. Produção de sideróforos

Para avaliação da produção de sideróforos “in vitro”, as bactérias foram crescidas em meio Dyg's líquido. Os isolados foram crescidos por 48 h a 28°C sob agitação constante. Uma alíquota de 1,5 mL do caldo de cultivo foi centrifugado, e 1 mL do sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de sideróforos. Uma alíquota de 150 uL do sobrenadante amostrado foi colocado em poços de placas de microtitulação com 96 poços (placas de ELISA) contendo 150uL do CAS (6 mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio–HDTMA; 1,5 mL solução de FeCl₃.6H₂O; 4,307g piperazina anidra; 6,25 MI HCl). A placa foi coberta e protegida no escuro por 30 minutos, tempo necessário para a mudança da coloração. Os poços que apresentaram mudança de cor do azul para amarelo ou laranja, foram considerados positivos para a produção de sideróforos. Seguindo a metodologia adaptada de SCHWYN E NEILANDS (1987).

3.9. Solubilização de fosfato de cálcio

As bactérias foram avaliadas quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido. As bactérias foram crescidas em meio líquido Dygs por 24 h, a 28° C sob agitação constante de 100 rpm. Alíquotas de 10 µL do caldo de cultivo bacteriano foram colocadas em triplicatas em pontos equidistantes de placas de Petri com meio de cultura GL contendo: glicose 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g.L⁻¹ e ágar 15 g.L⁻¹, antes da distribuição em placas, foram adicionados ao meio 100 mL.L⁻¹ de cloreto de cálcio (10%) e 50 mL.L⁻¹ de fosfato de sódio bibásico (10%) (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). O crescimento das colônias e/ou a formação do halo de solubilização foram realizadas cinco dias após a inoculação. Para o cálculo do Índice de Solubilização, foi feita a razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia correspondente e para cada placa, calculada a média das três réplicas que formaram uma repetição.

3.10. Potencial de fixação de nitrogênio em meio semissólido

Para avaliação o potencial para a FBN as bactérias foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio Dyg's por 48 h. Após o crescimento a DO₆₀₀ foi ajustada para 0,5 em espectrofotômetro (aproximadamente 10⁸ UFC mL⁻¹), Uma alíquota de 100 µL de cada caldo de cultivo com a DO ajustada para os 61 isolados e 3 bactérias de referência conhecido (AbV5; BR322 e BR11417), foram inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio BMGM semissólido em triplicatas e incubados a temperatura ambiente por cinco dias. Após o crescimento bacteriano com a formação da película característica da fixação do N in vitro em condições microaerofílicas, as amostras foram homogeneizadas manualmente e foram congeladas a - 20°C, por 24 horas. Após esse processo, os tubos foram aquecidos em micro-ondas por 1 minuto. Da solução resultante (meio + conteúdo celular) foram utilizados 5 mL em tubos de ensaio para digestão pelo método semimicro Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995).

3.11. Ensaio para a avaliação da promoção do crescimento vegetal

O experimento foi conduzido em bancadas a pleno sol no setor de Metabolismo Animal da Embrapa Semiárido, em Petrolina-PE. O clima local é classificado como semiárido quente BSw^h, conforme classificação de Koeppen, sendo as coordenadas geográficas 09° 09' de latitude sul e 40° 22' de longitude oeste. Durante o período experimental, a média da temperatura do ar foi de 29,3°C, com precipitação de apenas 1 mm no mês de dezembro e com 46% de umidade relativa do ar. Para este ensaio, utilizou-se como substrato uma amostra do horizonte superficial de um Argissolo Vermelho-Amarelo coletada no Campo Experimental de Bebedouro, nas dependências da Embrapa Semiárido. Uma amostra composta do solo utilizado no experimento foi analisada quanto às suas características químicas, de acordo com Embrapa (1997), que estão apresentadas na Tabela 3. Como o solo não apresentou limitações, com relação à sua fertilidade, para este tipo de experimento, não foram feitas adubações corretivas.

Tabela 3. Caracterização química do solo utilizado no experimento de promoção de crescimento vegetal

C.E mS cm ⁻¹	Ph g kg ⁻¹	M.O g dm ⁻³	P	K	Na	Ca C mol _c dm ⁻³	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V %
2,28	6,9	10,0	51,06	0,75	0,21	3,9	1,60	0,00	2,1	6,5	8,5	75,6

C.E: Condutividade elétrica; pH: Potencial hidrogeniônico. M.O: matéria orgânica; P: fósforo; K: potássio; Na: sódio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Al: alumínio; H+Al: acidez potencial; SB: saturação de bases; CTC: capacidade troca de cátions; V: saturação por bases.

Foi utilizado o sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor*) BRS Ponta Negra como planta modelo para todas as bactérias avaliadas. O experimento foi implantado utilizando vasos de 3kg, com início no dia 03/10/15 e finalizado no dia 03/12/15, seguindo o delineamento inteiramente casualizado com 63 tratamentos inoculados, sendo 61 isolados provenientes das espécies forrageiras (buffel, sorgo, palma, maniçoba e tifton) além da inoculação de 2 estirpes de referência (AbV5 e BR11417). Também foram testados 3 tratamentos nitrogenados (25%; 50%; e 100% de nitrogênio na dose de 100kg N/há, referente a necessidade da cultura) a testemunha absoluta, sem inoculação e sem nitrogênio em quatro repetições, totalizando 268 unidades experimentais.

Para a inoculação, as bactérias foram crescidas em meio Dygs líquido por 48 h. A semeadura foi feita diretamente nos vasos com cinco sementes por vaso. A inoculação foi feita logo após a semeadura com a aplicação de 5 mL do caldo

bacteriano, contendo em torno de 10^8 células mL^{-1} diretamente sobre todas as sementes que foram imediatamente cobertas com solo. O desbaste foi realizado 10 dias após a germinação deixando apenas duas plantas por vaso. Nos tratamentos nitrogenados foi aplicada uma dose de nitrato de amônio, 7 dias após o desbaste, e a segunda dose 20 dias depois da primeira. As doses de nitrato de amônia foram ajustadas para as concentrações equivalentes às adubações de 25, 50 e 100 kg de N/ha). A irrigação das plantas foi realizada duas vezes ao dia (manhã e tarde), com água destilada. No primeiro mês o volume de água utilizada para irrigar as plantas foi 200 mL/dia, e a partir daí foi 300 a 400 mL/dia. As variáveis analisadas foram: Massa da raiz seca (MRS- g/planta), Massa da Parte Aérea seca (MPAS-g/planta) e nitrogênio acumulado na parte área (NAPA-mg/planta).

No momento da colheita, foi efetuado um corte rente ao solo, separando-as em parte aérea e raiz. A parte aérea foi armazenada em sacos de papel e levadas a estufa de 65°C de ventilação forçada, onde permaneceu por 72 horas, até atingirem a massa constante para a determinação da MPAS. As raízes foram lavadas, armazenadas em sacos de papel e secas e pesadas como descrito anteriormente.

Após pesagem as amostras da MPAS foram moídas em moinho tipo *Willey*, com peneiras de diâmetro de 1mm, e em seguida no moinho de bola para a determinação das concentrações de nitrogênio, adotando-se o método semimicro Kjeldahl.

3.12. Análise dos dados

A similaridade entre os isolados através de suas características fenotípicas, foi avaliada por uma matriz binária, sendo atribuído valores positivos para a presença da característica e valor negativo para ausência da característica. Os dados foram comparados e a similaridade entre os isolados foi estimada e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa PAST, versão 2001.

Nas análises quantitativas (AIA com e sem triptofano, produção de nitrogênio *in vitro*, solubilização de fosfato, sideróforos e o ensaio para promoção do crescimento), os dados foram submetidos à análise de variância através do teste de

comparação de médias (Scott-Knott) com significância de ($p > 0,05\%$) através do Software Sisvar 5.0.

4. Resultados e Discussão

- **Quantificação das populações diazotróficas e caracterização fenotípica dos isolados**

A população de bactérias encontrada nas raízes das plantas forrageiras estudadas variou de $4,83 \times 10^4$ a $109,84 \times 10^4$ células por grama de raiz (Tabela 4).

Tabela 4. População de bactérias potencialmente diazotróficas presentes nas raízes de capim-buffel, capim-tifton, sorgo forrageiro, palma-forrageira e maniçoba pela técnica de número mais provável (NMP), avaliados em meio de cultura BMGM

Espécie	Repetição	NMP	IC (Mínimo)	IC (Máximo)
Capim-buffel	AR1	$4,83 \times 10^4$	2,43	10,48
	AR2	$4,83 \times 10^4$	2,43	10,48
Capim Tifton	AR1	$14,93 \times 10^4$	5,56	50,58
	AR2	$9,32 \times 10^4$	3,33	38,55
Sorgo Forrageiro	AR1	$46,20 \times 10^4$	17,83	240,76
	AR2	$46,20 \times 10^4$	17,83	240,76
Palma Forrageira	AR1	$109,84 \times 10^4$	38,22	478,76
	AR2	$9,32 \times 10^4$	3,33	38,55
Maniçoba	AR1	$109,84 \times 10^4$	38,22	478,76
	AR2	$4,83 \times 10^4$	2,43	10,48

IC: Índice de confiabilidade. Probabilidade 95%

A densidade total de bactérias foi maior nas primeiras áreas de coleta da Maniçoba e da Palma forrageira. As maiores densidades populacionais foram encontradas nas duas espécies de plantas que são bem-adaptadas à região Semiárida, sendo a Maniçoba um representante nativo da Caatinga. Plantas da Caatinga têm sido utilizadas como importantes fontes de micro-organismos, seja em estudos de diversidade ou em estudos de prospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico. Antunes et al. (2015) quantificaram comunidades diazotróficas endofíticas em Coroa de frade (*Melocactus sp.*) que é uma planta

nativa da Caatinga e encontraram valores que variaram de $7,48 \times 10^4$ a $109,85 \times 10^4$ células por grama de raiz, indicando que plantas nativas possuem elevada população de bactérias potencialmente diazotróficas. Avaliando a ocorrência de bactérias diazotróficas nos capins buffel e andropogon, Moreira et al. (2013) observaram as maiores densidades populacionais nas amostras superficiais das raízes do capim-buffel (24×10^3 bactérias g^{-1} de raiz fresca) em relação ao capim Andropogon que registrou as maiores densidades ($46 \times 10^3 g^{-1}$ bactérias de raiz fresca) entre as gramíneas.

Também avaliando a ocorrência de bactérias, Santos et al. (2013) encontraram valores próximos aos encontrados neste estudo em raízes lavadas e desinfestadas de capim-buffel (4,0- 44,0 NMP $\times 10^3$ bactérias/g raiz). Entretanto, os autores afirmaram não encontrar bactérias potencialmente diazotróficas durante o período seco, diferente do resultado encontrado nesse trabalho.

Um fator que pode ter contribuído para este resultado seria a possível maior disponibilidade de água para estas plantas (umidade nas plantas ou no solo), uma vez que, a palma estava em constante irrigação e a coleta da maniçoba ocorreu após o período de chuvas. De acordo com Baldani et al. (1999), a ocorrência e atividade dessas bactérias no solo e na planta são fortemente influenciadas por fatores abióticos como a umidade do solo. Sobre isso Moreira; Siqueira (2006) explicam que a água em conjunto com a temperatura influi na atividade enzimática, favorecendo o metabolismo microbiano, nesse caso, determinadas características fisiológicas das bactérias podem ter sido ativadas com o aumento da umidade no solo.

Os estudos de Osaki e Netto (2009), Lopes et al. (2011), indicam que além da umidade, a quantidade e a qualidade do material orgânico do ambiente são as principais variáveis responsáveis pela dinâmica dos micro-organismos no solo.

Com relação às características culturais em meio Dyg's, dentre os 61 isolados, 76,6% apresentaram tamanho menor que 2 mm. No que diz respeito aparência da colônia, 93,3% foram colônias heterogêneas e 73,3% foram translúcidas (Tabela 5). As bactérias diferenciaram-se em amarelas (41,6%), cremes (30%), brancas (25%), marrom (1,6%) e cinza (1,6%). Todos os isolados produziram muco, entretanto, somente 61% produziram pouco muco. Apesar das plantas forrageiras analisadas neste estudo estarem em ambientes próximos, a análise

fenotípica indicou elevada diversidade destes micro-organismos. Neste caso, esta diversidade pode estar relacionada às diferenças entre as espécies vegetais de origem das bactérias, segundo Compant et al. (2010) as bactérias são atraídas e inibidas pelas plantas por meio de exsudatos rico em açúcares que são liberados pelas raízes. E plantas de diferentes espécies provavelmente exsudam compostos distintos que resultam na colonização por diferentes grupos bacterianos

No dendrograma de similaridade foi possível observar a formação de vinte e seis grupos fenotípicos com 100% de similaridade, demonstrando a diversidade da coleção (Figura 3). Pode-se observar também que todos os isolados apresentam similaridade superior a 40%. Dentre estes grupos, 13 são grupos raros, ou seja, formados por apenas um isolado bacteriano, outro dado que reforça a grande diversidade dos isolados da coleção. A tabela 5 foi derivada do agrupamento do dendrograma de similaridade, demonstrando as características fenotípicas de cada grupo.

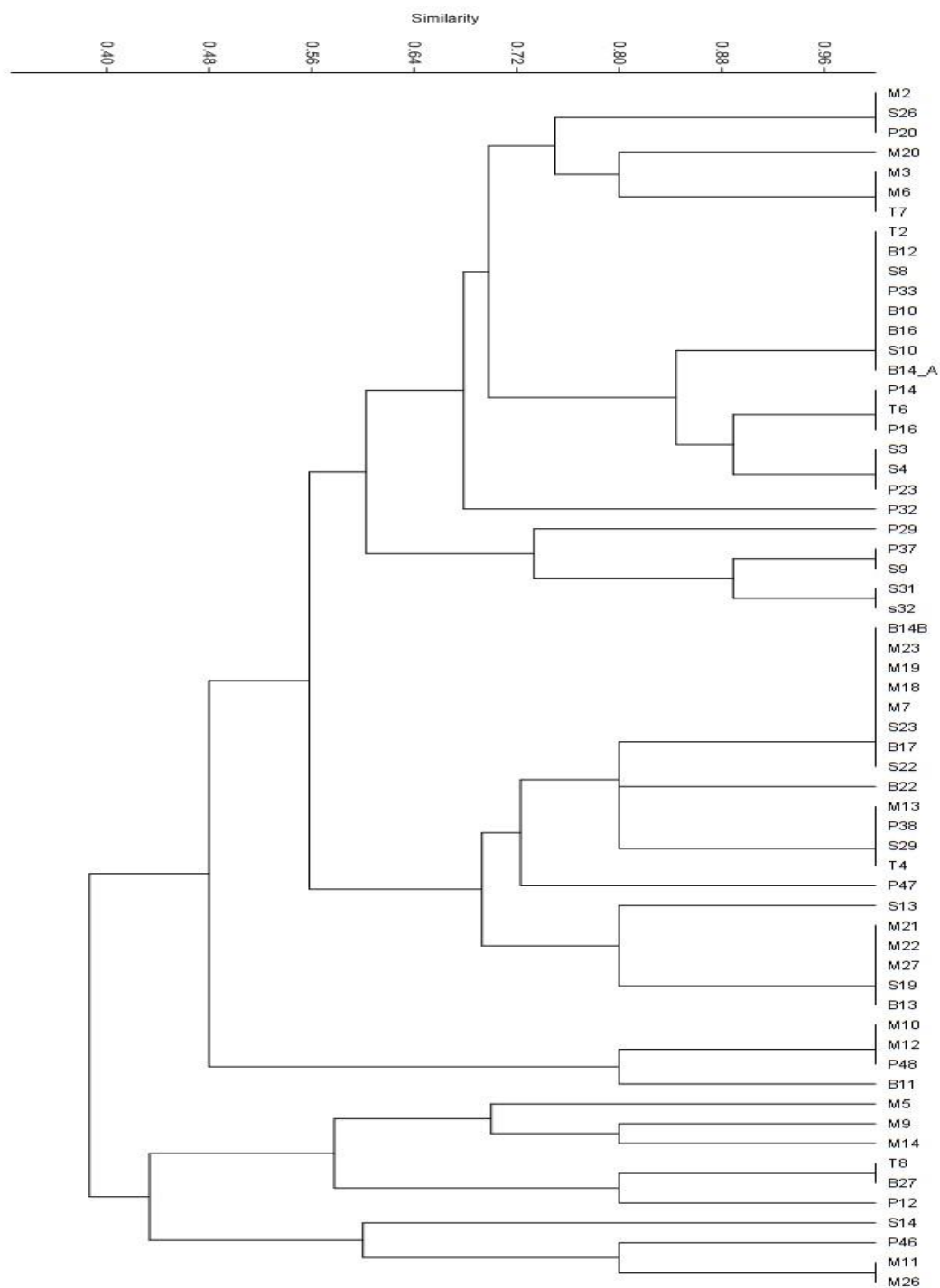


Figura 3. Dendrograma de similaridade baseado nas características fenotípicas de 61 isolados de bactérias diazotróficas oriundas de raízes de capim-buffel, capim tifton, sorgo forrageiro, palma forrageira e maniçoba.

Tabela 5. Caracterização fenotípica de vinte e seis grupos fenotípicos obtidos por meio do agrupamento das bactérias diazotróficas isoladas de raízes de Capim-buffel, Capim tifton, Sorgo forrageiro, Palma-forrageira e Maniçoba (método de agrupamento UPGMA e Coeficiente de similaridade de Bray- Curtis).

Grupos (n° de isolados)	TC	AC	TC2	CC	QM
Grupo 1 (3)	<2	He	Tr	Br	MM
Grupo 2 (1)	<2	He	Tr	Am	MM
Grupo 3 (3)	>2	He	Tr	Cr	SM
Grupo 4 (8)	>2	He	Tr	Br	SM
Grupo 5 (3)	>2	He	Tr	Am	MM
Grupo 6 (3)	<2	He	Tr	Br	PM
Grupo 7 (1)	<2	He	Tr	Am	PM
Grupo 8 (1)	<2	He	Tr	Am	PM
Grupo 9 (2)	>2	Ho	Tr	Cr	PM
Grupo 10 (2)	>2	He	Op	Ma	MM
Grupo 11 (8)	>2	He	Tr	Am	MM
Grupo 12 (1)	>2	He	Op	Am	MM
Grupo 13 (4)	>2	He	Tr	Cr	PM
Grupo 14 (1)	>2	He	Op	Br	PM
Grupo 15 (1)	>2	Ho	Tr	Am	PM
Grupo 16 (5)	<2	Ho	Tr	Br	PM
Grupo 17 (3)	<2	He	Tr	Br	PM
Grupo 18 (1)	<2	He	Op	Br	PM
Grupo 19 (1)	>2	He	Tr	Am	MM
Grupo 20 (1)	>2	He	Op	Am	PM
Grupo 21 (1)	<2	He	Op	Cr	MM
Grupo 22 (2)	>2	He	Op	Cr	MM
Grupo 23 (1)	>2	He	Tr	Cr	PM
Grupo 24 (1)	>2	He	Tr	Ci	MM
Grupo 25 (1)	>2	He	Tr	Am	PM
Grupo 26 (2)	<2	He	Tr	Am	MM

¹Grupo fenotípico dos isolados ²TC1 – tamanho da colônia (> 2 mm a <2 mm); AP- aparência da colônia (Ho: homogênea, He: heterogênea); TC2- transparência da colônia (Op: opaca, Tr: translúcida) CC - cor da colônia (Am: amarela, Br: branca, Cr: creme, Ma: marrom) QM - quantidade de muco (MM: muito, PM: pouco, (-): Ausência de muco).
SM: Sem muco

Todos os 61 isolados formaram película em meio BMGM. Em meio NFb, JMV, LGI, LGI-P (80,3; 49,1; 54 e 44,2%) formaram película, respectivamente (Tabela 6), sugerindo potencial para fixação de nitrogênio em diferentes condições de disponibilidade de carbono, pHs e potenciais osmóticos.

A nitrogenase, a enzima presente em organismos diazotróficos é altamente sensível ao oxigênio e necessita de condições anaeróbias para sobreviver. Apesar

disso, as bactérias diazotróficas precisam regular o suprimento de oxigênio para seu próprio benefício e ao mesmo tempo proteger a nitrogenase contra seu efeito deletério. Dessa forma, esses micro-organismos desenvolveram estratégias para limitar o acesso do oxigênio à essa enzima, como por exemplo a formação de uma película microaerotáxica. Dessa forma, bactérias que produzem essa película podem ser consideradas positivas para a presença da nitrogenase.

Dentre os 61 isolados, 15 foram capazes de formar película em todos os meios testados indicando uma grande versatilidade metabólica.

Observou-se predominância de bactérias (80,3%) que utilizam preferencialmente o malato, fonte de carbono do meio NFb. Notou-se também, elevado número de bactérias que utilizaram indistintamente malato e sacarose do meio LGI (54%), pois cresceram em NFb e LGI, indicando versatilidade metabólica destes isolados.

Além disso, os micro-organismos isolados a partir do capim tifton se destacaram pela alta percentagem de formação de película, em que de 80 a 100% dos isolados formaram película nos diferentes meios (NFb, JMV, LGI, e LGI-P), o que reforça a versatilidade metabólica e plasticidade dos isolados com potencial para fixação de N em diferentes condições. A amostra 1 (Tabela 2), refere-se a isolados do capim tifton que foram obtidos em área com elevada condutividade elétrica ($4,68 \text{ mS cm}^{-1}$) em decorrência do ponto de coleta do capim estar próxima ao tanque de criação de peixes, que por sua vez é abastecido com efluente da dessalinização, o que confere a essa área um ambiente estressante para seus habitantes (espécies vegetais e micro-organismos), colaborando para a seleção de populações adaptadas. Desta forma, a elevada condutividade elétrica gera grande estresse osmótico e iônico se igualando ao meio LGI-P que é saturado com 100 gramas de sacarose por litro de meio.

Tabela 6. Capacidade de formação de película em diferentes meios de cultura semissólido de bactérias presentes nas raízes de capim-buffel (B), capim tifton (T), sorgo forrageiro (S), palma-forrageira (P) e maniçoba (M).

Isolado	NFb	JMV	LGI	LGI-P
B13	-	-	-	-
B17	+	-	-	-
B16	-	-	+	-
B10	+	+	+	+

B12	+	+	+	+
B11	+	-	-	+
B14A	-	-	-	-
B22	+	+	+	-
B14B	+	+	+	-
B27	+	-	-	-
S14	+	+	+	+
S31	+	+	+	+
S29	+	+	+	-
S26	+	+	-	-
S13	+	+	-	-
S9	+	+	+	+
S10	+	+	+	-
S23	-	-	-	-
S22	-	+	-	-
S19	+	-	+	-
S8	+	-	-	+
S3	+	+	+	-
S4	+	-	+	+
S32	+	+	-	-
T4	-	-	+	+
T2	+	+	+	+
T6	+	+	+	+
T7	+	+	-	+
T8	+	+	+	+
M26	+	+	+	+
M11	+	-	-	-
M19	+	+	+	-
M18	-	+	-	-
M15	+	-	-	-
M5	-	+	-	+
M3	+	-	-	-
M10	-	+	+	+
M7	+	-	+	-
M9	+	+	-	+
M6	+	+	+	+
M20	+	-	-	-
M13	+	-	+	-
M12	+	-	-	+
M2	-	-	+	-
M22	+	-	+	-
M27	-	-	+	-
M14	+	-	-	+
M21	+	-	-	-
M23	+	+	+	+
P32	-	-	-	+
P38	+	-	-	+
P37	+	-	+	+
P14	+	-	+	-
P46	+	-	-	-

P47	+	-	+	-
P29	+	-	-	-
P20	+	+	+	+
P48	+	-	-	+
P23	+	+	+	+
P12	+	+	-	-
P33	+	+	+	-

- **Caracterização molecular dos isolados**

A banda correspondente a um fragmento do gene *nifH* com cerca de 360 pb foi observado em 42 isolados na primeira reação utilizando os pares de iniciadores PolF e PolR. Entretanto, adotando-se a estratégia do nested-PCR com os iniciadores *nifH*for e *nifH*rev, foi possível observar a banda característica em torno de 320 pb (Figura 4).

O *nifH* é um gene de grande importância pois a enzima responsável pela fixação de nitrogênio, a nitrogenase, tem sua subunidade codificada por ele, dessa forma, o *nifH* serve como marcador molecular ideal para esses micro-organismos (DESLIPPE E EGGER, 2006), uma vez que a presença de um fragmento correspondente a este gene o caracteriza como um organismo diazotrófico.



Figura 4. Amplificação do gene *nifH* com os iniciadores PolF e PolR na primeira reação e *nifH*F e *nifH*R (nested) de isolados de bactérias endofíticas de capim-buffel. M=marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen).

Todos os 61 isolados foram positivos para o gene *nifH*, 42 isolados positivos na primeira reação (POL) e os 61 isolados apresentaram *nif* positivo na segunda

reação (nested-PCR) (Tabela 7).

Os primers (nifHFor; nifHRev) para serem utilizados na reação de nested PCR, foram projetados por Soares et al. (2006) com o objetivo de combinar várias sequencias nifH de bactérias encontradas no banco de dados GenBank, como: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcuss*, e *Azobacter*. Esses primers também foram descritos no estudo de (FERNANDES JÚNIOR et al., 2015).

Neste estudo, as duas técnicas (PCR direto e nested-PCR), serviram de complementação, visto que ao realizar somente a primeira reação o risco de se perder muitos isolados (por não terem amplificado) era grande, por isso a técnica de nested-PCR é de grande importância para não sub ou superestimar os isolados.

Tabela 7. Isolados positivos e negativos para presença do gene *nifH* nas duas reações de PCR – Pol e Nested

Isolados	Pol	Nested
B13	-	+
B17	-	+
B16	+	+
B10	-	+
B12	-	+
B11	+	+
B14A	-	+
B22	-	+
B14B	-	+
B27	-	+
S14	+	+
S31	-	+
S29	+	+
S26	-	+
S13	-	+
S9	+	+
S10	+	+
S23	-	+
S22	-	+
S19	+	+
S8	-	+
S3	-	+
S4	-	+
S32	+	+
T2	-	+
T4	+	+
T6	+	+
T7	+	+
T8	+	+

M26	+	+
M11	+	+
M19	+	+
M18	+	+
M15	+	+
M5	-	+
M3	+	+
M10	+	+
M7	+	+
M9	+	+
M6	+	+
M20	+	+
M13	+	+
M12	+	+
M2	+	+
M22	+	+
M27	+	+
M14	+	+
M21	+	+
M23	+	+
P32	+	+
P38	+	+
P37	+	+
P14	-	+
P46	+	+
P47	+	+
P29	+	+
P20	+	+
P48	+	+
P23	+	+
P12	+	+
P33	+	+

De acordo com Zehr et al. (1996), a amplificação do gene *nifH* é uma ferramenta útil para confirmar o potencial de fixação de N.

Com relação ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, a análise da qualidade das sequências por meio do programa SeqScanner v. 2.0, permitiu a seleção de 33 sequências de boa qualidade que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética.

O gene 16S é um gene universal e que apresenta características conservativas, dessa forma contribui como indicador de como os micro-organismos estão relacionados durante sua evolução ao longo de milhares de anos. Assim, a similaridade entre sequências indica uma origem comum de genes que se

correspondem, o que possibilita o uso dessas sequências na identificação bacteriana.

De acordo com o a comparação das 33 sequências satisfatórias com aquelas disponíveis no GeneBank, pode-se observar alta variabilidade genética entre as bactérias isoladas das diferentes plantas forrageiras, uma vez que as bactérias foram classificadas em 9 gêneros (Figura 5).

Algumas das bactérias diazotróficas endofíticas mais comumente associadas a não leguminosas, *Herbaspirillum* sp. e *Azospirillum* sp. não foram encontrados no presente estudo. Nos estudos realizados com essas espécies, normalmente é utilizado meio NFb e JNFb para o isolamento, ao contrário do meio BMGM que foi utilizado. Essa pode ser a razão do não aparecimento dos organismos diazotróficos descritos acima. Esses resultados corroboram com Magnani (2005), que também não encontrou esses micro-organismos em cana de açúcar. Em um estudo para avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas em *Tripogon spicatus*, uma espécie de gramínea nativa da Caatinga utilizando o meio BMGM semissólido, Fernandes-Júnior et al. (2015) também não obtiveram bactérias dos gêneros supracitados, e sim, predominaram *Bacillus* e *Enterobacter*, bactérias também obtidas neste estudo.

Vale ressaltar que o meio BMGM é um meio não seletivo com três fontes de C, que permite a obtenção de uma gama maior de isolados bacterianos comparados com os meios semiseletivos NFb e JNFb, que apresentam a sua composição química formulada para as características fisiológicas de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, por exemplo. Assim, em estudos com o objetivo de se obter uma maior gama de micro-organismos, pertencentes a diferentes gêneros, o meio BMGM é indicado em detrimento aos meios semisseletivos citados.

Com relação à biodiversidade, os 33 isolados bacterianos foram classificados como pertencentes aos gêneros *Rhizobium* (6 isolados), *Bulkhoderia* (2 isolados), *Pseudomonas* (3 isolados), *Stenotrophomonas* (3 isolados), *Enterobacter* (3 isolados), *Agrobacterium* (1 isolado), *Celulomonas* (2 isolados), *Paenebacillus* (4 isolados) e *Bacillus* (9 isolados). Avaliando as espécies forrageiras estudadas, o gênero *Rhizobium* foi encontrado apenas na maniçoba, e o gênero *Bacillus* foi encontrado nas 3 espécies vegetais: Buffel, palma e maniçoba.

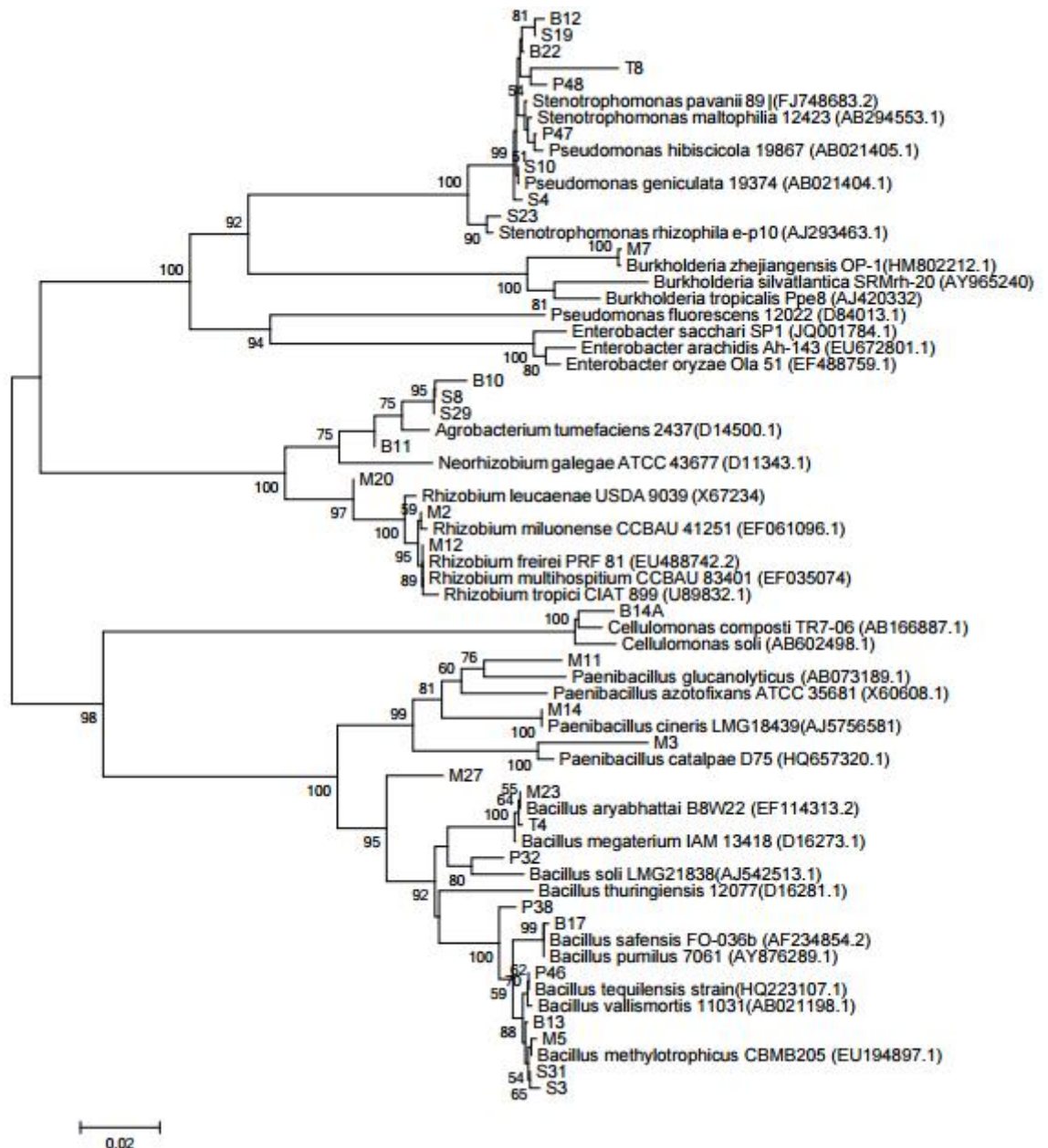


Figura 5. Árvore filogenética com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA de 33 isolados bacterianos endofíticos de plantas forrageiras e "type strains" de referência. O método de agrupamento utilizado foi o Neighbour-Joining com o algoritmo Jukes-Cantor. Os números nos nós da árvore representam o Bootstrap (1000 réplicas), sendo apresentados apenas os valores de bootstrap superiores a 50%.

Dentre as bactérias identificadas, a maior ocorrência de foi do gênero *Bacillus*. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse gênero ser um dos mais abundantes na rizosfera e ser capaz de formar estruturas de resistência, como os endósporos (FREITAS et al.,1997) podendo permanecer por anos mesmo em

ambientes adversos, como os ambientes áridos e semiáridos.

Além da abundância e capacidade de formar estruturas de resistência, diversos *Bacillus* podem colonizar eficazmente as raízes de espécies vegetais e estabelecer associações endofíticas benéficas (AMBROSINI et al., 2016).

O segundo maior gênero encontrado foi o gênero *Rhizobium*, sendo todas encontradas na maniçoba. Isso pode estar atribuído à presença de leguminosas próximas a área de coleta, podendo ter ocorrido uma migração desses rizóbios às raízes da maniçoba. Na natureza isso pode ser considerado comum, entretanto não é comum a abundância de rizóbios encontrados em raízes de não leguminosas. Dessa forma, essas bactérias ao colonizarem naturalmente a maniçoba, que é uma planta nativa da caatinga, possa contribuir com diferentes mecanismos de promoção de crescimento.

Ao Demonstrarem a resistência dos *Bacillus* em condições de extrema aridez, Paulino-Lima et al. (2013) isolaram bactérias de cinco locais diferentes no deserto do Atacama (Chile) e encontraram *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* e também *Pseudomonas stutzeri*. Estas características podem auxiliar na manutenção destas bactérias nos solos do Semiárido, mesmo em uma época de longa estiagem, como a que está ocorrendo ao longo dos últimos anos. Em estudos avaliando a diversidade de bactérias promotoras de crescimento endofíticas ou rizosféricas em espécies nativas da Caatinga, bactérias do gênero *Bacillus* são comumente isoladas (Kavamura et al., 2013; Fernandes-Júnior et al., 2015), o que endossa a hipótese da persistência destes isolados nos solos da região.

Matiru e Dakora (2004) ao encontrarem elevada diversidade de rizóbios em raízes de sorgo, sugerem que a infecção de não leguminosas por rizóbios é provavelmente mais ocorrente na natureza do que se imagina. Segundo Yanni et al.(1997), a penetração dessas bactérias nas raízes ocorre por meio de rupturas na epiderme e das fissuras criadas durante a emergência de raízes laterais

A capacidade de *Rhizobium* em promover o crescimento de cereais tais como o milho, cevada e arroz já é bem conhecida (PEIX et al., 2001; YANNI et al., 2001; MISHRA et al., 2006). Para Saharan e Nehra (2011), quando colonizam as raízes de plantas não leguminosas os rizóbios podem se comportar como promotores de crescimento vegetal. Em arroz, *Rhizobium leguminosarum* migraram e colonizaram raízes laterais. Em plantas de milho, inoculados com *Azorhizobium caulinodans*

apresentaram maior teor de NPK nos grãos (PRAYITNO et al., 1999; SAIKIA et al., 2003).

Em um sistema de consórcio de milho (*Zea mays*) com feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) no México, isolados de *Rhizobium etli*, uma espécie de rizóbio comumente associado ao *Phaseolus* na América Central foi isolado como endofítico do milho (Gutiérrez-Zamora e Martínez-Romero, 2001), mostrando que os simbiontes de leguminosas podem infectar não leguminosas próximas.

Dos 33 isolados, 3 deles foram considerados do gênero *Pseudomonas*, esse gênero *Pseudomonas* são um grupo de bactérias muito versáteis, encontrados de forma abundante na natureza, e bem adaptadas a numerosos nichos ecológicos devido a sua simples exigência nutricional (PAULSEN et al.2005). Várias espécies vegetais já foram descritas por terem sido colonizadas por *Pseudomonas* spp., cenoura (Surette et al. (2003), café (Vega et al. 2005), canola (Misko e Germida, 2002), algodão (MCINROY E KLOEPPER, 1995).

Na literatura esse gênero vem sendo bastante descrito (Barea et ai, 2005; Fox et al, 2011), descrevendo o potencial desses micro-organismos na promoção do crescimento das plantas (Glick 1995; Basan e Holguin 1998), além de proteção contra micro-organismos fitopatógenos (Gerhardson, 2002). Para Ahmad Gholam (2010) a promoção do crescimento e controle de doenças por *Pseudomonas* são processos complexos inter-relacionados que envolvem mecanismos diretos e indiretos que incluem sínteses de alguns metabólitos (auxina, citocinina e giberelinas), e a produção de antibióticos.

No que diz respeito à promoção do crescimento, essas bactérias ao habitarem a rizosfera oferece nutrientes, microelementos além de hormônios para a planta, portanto exercem seus efeitos positivos de forma não ativa, colonizando a superfície de tecidos das plantas e também podendo se estabelecer dentro dos tecidos vegetais como endófitos (ROSENBLUETH E MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Vários estudos demonstraram que o gênero *Stenotrophomonas* apresenta grande versatilidade metabólica, além disso, são bactérias altamente adaptáveis a ambientes hostis e com limitações de nutrientes, o que as tornam importantes para condições do Semiárido.

Os membros desse gênero apresenta um importante papel ecológico no ciclo do nitrogênio e são capazes de promover interações benéficas com plantas. Esse

gênero é comumente encontrado em associação com diversas espécies vegetais, tais como: pepino (Mahaffee e Kloepper, 1997); batata (Berg, 2002); girassol (Schwieger e Tebbe, 2000); milho (Chelius e Triplett, 2000) e arroz (MEHNAZ, 2001).

Por meio de suas observações, Suckstorff e Berg (2003) afirmaram que *Stenotrophomonas*, pode promover a produtividade da planta por meio de diferentes mecanismos, devido à produção de ácido indol-3-acético, hormônio que influencia no crescimento de plantas, e fixação de nitrogênio (LIBA et al., 2006).

Dessa forma, *Stenotrophomonas* são candidatos promissores para aplicações biotecnológicas na agricultura, pois sua inoculação poderia influenciar o desenvolvimento vegetal, resultando no reforço do crescimento. Por exemplo, promoção de crescimento teve acréscimos de até 180% para o trigo, tomate, alface e cenoura em solos altamente salinizados do Uzbequistão (BERG et al., 2010).

As plantas são conhecidas por exsudar uma vasta gama de substâncias (VANCURA E HANZLIKOVA, 1972). A capacidade de *Enterobacter* em utilizar uma grande variedade de açúcares, pode contribuir para o sucesso da adaptação desta espécie em raízes de diferentes plantas. Esse gênero é comumente descrito em milho, arroz, algodão, pepino, feijão, batata-doce e sisal (MCLNROY E KLOEPPER, 1995; MORALES-GARCIA et al., 2011).

Nesse caso, a falta de especificidade do hospedeiro é um bom atributo, podendo assim ser utilizada para o cultivo de uma ampla gama de culturas. Esse gênero também é conhecido por ser promotor de crescimento, principalmente pela produção de níveis elevados de hormônio de crescimento vegetal (auxina), a importância do AIA é notável, pois a biossíntese da auxina participa diretamente de muitos processos do desenvolvimento nas plantas, incluindo a embriogênese, crescimento de plântulas e desenvolvimento da flor (ZHAO, 2010). Comprovando a existência desse gênero em gramíneas, Szilagyi-Zecchin et al. (2014), encontraram seis bactérias endofíticas de raízes de milho, e as identificaram como *Bacillus sp.* e como *Enterobacter sp.*, por sequenciamento do gene de rRNA 16S. Ao avaliarem bactérias endofíticas isoladas de cana de açúcar, Magnani (2005), também encontrou basicamente bactérias do gênero *Enterobacter* e *Pseudomonas*.

Nos últimos anos, tem havido um interesse considerável na utilização de bactérias do gênero *Burkholderia* na promoção de crescimento, porque vários destes mecanismos foram detectados para este gênero. Esses micro-organismos são

descritos como tendo a capacidade para fixar N₂ (Elliot et al., 2007; Elliot et al., 2007), solubilizar fosfatos (Caballero-Mellado et al., 2007; PEIX et al., 2001), e várias estirpes têm sido utilizados como agentes de biocontrole devido à sua capacidade em inibir muitos fungos que causam doenças das plantas (Li et al., 2009; PEIX et al., 2001). Estirpes deste gênero também são capazes de produzir fitormônios e sideróforos (COMPANT et al., 2008).

Bem como os demais gêneros, *Agrobacterium* é comumente descrito na literatura como um promotor de crescimento, tais como: capacidade para produzir hormônios vegetais, como auxinas (Egamberdiyeva, 2005), citocininas (García de Salamone et al., 2001), e giberelinas (Gutiérrez Mañero et al., 2001); b) fixação de nitrogênio (Canbolat et al., 2006); c) solubilização de fosfato inorgânico (Jeon et al., 2003)

Espécies de *Paenibacillus* têm sido isolados de uma grande variedade de fontes incluindo, solo, água, rizosfera de plantas, raízes de árvores, materiais vegetais, alimentos, forragem (DAANE et al., 2002). Esses micro-organismos são capazes de sintetizar hormônios vegetais como a auxina e citocinina, além de solubilizar o fósforo do solo (RAZA et al., 2008). Além disso, essas bactérias podem contribuir no controle de patógenos do solo, tais como fungos e nematoides (TIMMUSK et al., 2009).

Um gênero inesperado encontrado nesse estudo foi o *Cellulomonas*, pertencente ao isolado do capim-buffel (B14A). Esse gênero é pouco descrito em trabalhos sobre promoção de crescimento, entretanto, Zinniel et al. (2002) isolando bactérias endofíticas do trigo, encontrou esse gênero entre os demais que colonizavam essa espécie vegetal.

- **Mecanismos de promoção do crescimento vegetal “in vitro”**

Todos os isolados foram capazes de produzir AIA em ao menos uma das duas condições testadas, ou seja, na presença ou ausência de L-triptofano como suplementação do meio de cultura (Tabela 8). Os valores de AIA com triptofano variaram de 20,50 µg mL⁻¹ no isolado M23 (*Bacillus* sp.) à 242,99 µg mL⁻¹ no isolado B13 (*Bacillus* sp.). Comparando entre bactérias, os isolados mais promissores para a

produção de AIA com triptofano foram, B13 (*Bacillus* sp.), P32 (*Bacillus* sp.), B17 (*Bacillus* sp.), B10 (*Agrobacterium* sp.), B11 (*Neorhizobium* sp.) e o isolado S14, se comparados com o controle, a estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense* que produziu 40,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Lidström (2006) observou que *Bacillus* sp. possui propriedades especializadas onde permite seu crescimento em numerosos gêneros e espécies vegetais.

Tabela 8. Caracterização bioquímica (Ácido indol acético com triptofano –AIA C/T e sem triptofano AIA S/T; Nitrogênio Total- N; e Solubilização de fosfatos) de bactérias diazotróficas isoladas de raízes de capim-buffel, capim tifton, sorgo forrageiro, palma-forrageira e maniçoba.

Isolados	AIA C/T ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AIA S/T ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	N (g/mL)	Índice de solubilização
Capim-buffel				
B13	242,99 ^{aA}	82,92 ^{Bb}	53,0 ^{Ad}	NS
B17	105,81 ^{aB}	80,79 ^{Bb}	90,0 ^{Ac}	NS
B16	101,94 ^{aB}	84,28 ^{bB}	70,0 ^{aD}	NS
B10	96,12 ^{aB}	77,88 ^{Bb}	83,0 ^{Ac}	NS
B12	92,23 ^{aB}	74,77 ^{Bb}	63,0 ^{bD}	NS
B11	92,04 ^{aB}	97,08 ^{aA}	83,0 ^{bC}	NS
B14A	91,85 ^{aB}	77,10 ^{Bb}	40,0 ^{bE}	NS
B22	88,36 ^{aB}	77,69 ^{Bb}	60,0 ^{bD}	NS
B14B	83,89 ^{aB}	74,19 ^{bB}	43,0 ^{cD}	NS
B27	81,95 ^{aB}	91,46 ^{Ab}	63,0 ^{Cd}	NS
Sorgo-forrageiro				
S14	180,51 ^{aA}	109,70 ^{aA}	70,0 ^{aD}	1,111 ^a
S31	92,43 ^{aB}	78,85 ^{bB}	50,0 ^{aD}	NS
S29	90,88 ^{aB}	66,05 ^{bB}	83,0 ^{aC}	NS
S26	90,49 ^{aB}	85,64 ^{bB}	66,0 ^{aD}	NS
S13	86,80 ^{aB}	113,97 ^{aA}	63,0 ^{aD}	NS
S9	84,67 ^{aB}	70,70 ^{bB}	63,0 ^{aD}	NS
S10	79,82 ^{aB}	74,00 ^{bB}	70,0 ^{aD}	NS
S23	78,66 ^{aB}	85,06 ^{bB}	76,0 ^{aD}	NS
S22	77,10 ^{aB}	79,04 ^{bB}	106,0 ^{aC}	NS
S19	32,85 ^{cC}	29,47 ^{cD}	66,0 ^{aD}	NS
S8	31,67 ^{cC}	24,49 ^{cD}	50,0 ^{aD}	NS
S3	30,37 ^{cC}	29,99 ^{cD}	80,0 ^{aD}	NS
S4	30,37 ^{cC}	29,99 ^{cD}	70,0 ^{aD}	NS
S32	30,34 ^{cC}	27,04 ^{cD}	70,0 ^{aD}	NS
Capim-tifton				
T4	91,27 ^{aB}	86,41 ^{aB}	66,0 ^{aD}	NS
T2	91,27 ^{aB}	76,52 ^{aB}	13,0 ^{bE}	NS
T6	90,49 ^{aB}	115,13 ^{aA}	16,0 ^{bF}	NS
T7	81,95 ^{aB}	70,70 ^{aB}	06,0 ^{bF}	NS
T8	76,71 ^{aB}	75,25 ^{aB}	26,0 ^{bF}	NS
Maniçoba				

M26	86,03 ^{ab}	39,17 ^{bC}	03,0 ^{eF}	NS
M11	83,31 ^{ab}	47,52 ^{aC}	50,0 ^{bD}	NS
M19	79,63 ^{ab}	49,64 ^{aC}	86,0 ^{aC}	0,220 ^a
M18	75,74 ^{ab}	39,38 ^{bC}	70,0 ^{aD}	NS
M15	74,97 ^{ab}	45,72 ^{aC}	00,0 ^{eF}	0,290 ^a
M5	73,03 ^{bB}	52,60 ^{aC}	53,0 ^{bD}	NS
M3	68,57 ^{bB}	44,77 ^{aC}	00,0 ^{fF}	NS
M10	65,85 ^{bB}	54,31 ^{aC}	66,0 ^{bD}	NS
M7	64,85 ^{bB}	48,37 ^{aC}	86,0 ^{aC}	NS
M9	41,28 ^{cC}	30,79 ^{dD}	13,0 ^{eF}	0,290 ^a
M6	38,57 ^{cC}	25,76 ^{dD}	20,0 ^{dF}	NS
M20	35,88 ^{cC}	19,20 ^{dD}	53,0 ^{bD}	NS
M13	31,48 ^{dC}	33,91 ^{cD}	10,0 ^{eF}	NS
M12	30,42 ^{dC}	26,60 ^{dD}	73,0 ^{aD}	NS
M2	29,78 ^{dC}	28,30 ^{dD}	46,0 ^{bD}	-NS
M22	29,36 ^{dC}	25,76 ^{dD}	33,0 ^{dE}	0,570 ^a
M27	27,13 ^{dC}	22,26 ^{dD}	0,0 ^{fF}	NS
M14	26,48 ^{dC}	38,48 ^{dC}	06,0 ^{eF}	NS
M21	23,24 ^{dC}	33,65 ^{cD}	00,0 ^{fF}	NS
M23	20,50 ^{dC}	31,83 ^{cD}	63,0 ^{Bd}	NS
Palma- forrageira				
P32	132,79 ^{abB}	61,27 ^{abB}	16,0 ^{eF}	0,180 ^a
P38	80,81 ^{bB}	44,14 ^{Bc}	50,0 ^{dD}	NS
P37	79,04 ^{bB}	48,90 ^{Bc}	96,0 ^{cD}	0,290 ^a
P14	77,04 ^{bB}	44,67 ^{bC}	40,0 ^{eE}	0,180 ^a
P46	77,30 ^{bB}	40,86 ^{Bc}	66,0 ^{dD}	NS
P47	76,71 ^{bB}	41,18 ^{Bc}	70,0 ^{dD}	NS
P29	76,52 ^{bB}	45,30 ^{bC}	36,0 ^{bB}	NS
P20	74,77 ^{bB}	43,50 ^{Bc}	330,0 ^{aA}	NS
P48	74,00 ^{bB}	44,24 ^{Bc}	63,0 ^{dD}	NS
P23	71,28 ^{bB}	45,51 ^{bC}	80,0 ^{dC}	NS
P12	69,15 ^{cB}	42,45 ^{cC}	36,0 ^{eE}	NS
P33	61,00 ^{dB}	26,29 ^{dD}	93,0 ^{cC}	NS
Estirpes de referência				
AbV5	40,93 ^C	10,93 ^e	66,0 ^d	
BR322	ND	ND	0,0 ^f	
BR11417	ND	ND	53,0 ^d	

AIA C/T: Ácido indol acético com triptofano; AIA S/T: Ácido indol acético sem triptofano. Letras minúsculas compara entre todos os isolados. Letras maiúsculas comparam entre bactérias de um mesmo hospedeiro - Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% (p<0,05)

NS: Não solubilizou.

ND: Não determinado.

As concentrações de AIA no meio de cultura onde as bactérias do presente estudo foram são superiores aos valores comumente descritos na literatura. De acordo com Reis Júnior et al. (2004), bactérias isoladas de *Brachiaria* spp. produziram quantidades de compostos relacionados com AIA variando entre 0,61 e 19,27 µg mL⁻¹. Kuss et al. (2007), isolaram bactérias de arroz, encontraram valores

que variavam de 2,79 a 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA. Corroborando com os dados encontrados no presente estudo, Silva et al. (2013) avaliaram bactérias isoladas de *Brachiaria*, observaram elevada produção de AIA com triptofano que variava de 0,39 à 195 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo os maiores valores encontrados para *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp. e *Rhodospirillaceae* (195,40; 169,32; 167,19; e 145,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente).

A elevada produção de AIA também foi observada por Fernandes Júnior et al. (2015), ao isolar bactérias do *Tripogon spicatus*, o isolado ESA 0015 produziu 82 $\mu\text{g mL}^{-1}$, superior a estirpe de referência (BR11417).

De acordo com Spaepen et al. (2007), a biossíntese de auxinas por bactérias ocorre em diferentes rotas metabólicas, sendo o triptofano o principal precursor para síntese de AIA. Todos os isolados sintetizaram AIA tanto pela via dependente quanto por via independente de L-triptofano. Sendo que, grande parte apresentavam maiores valores quando na presença do aminoácido. Esses resultados corroboram com Silva et al. (2013), ao isolar bactérias da rizosfera de *Brachiaria brizantha* observaram maiores produções de AIA na presença do triptofano.

As maiores produções de AIA sem triptofano foram registradas nos isolados B11 (*Neorhizobium* sp.) 97,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, S13 e S14 (113,97 e 109,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e T6 (115,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Costa et al. (2013) avaliando a capacidade de produção de AIA por rizóbios de feijão-caupi, observaram que a maioria dos isolados testados apresentavam produção de AIA superior no meio de cultura suplementado com o L-triptofano, entretanto havia isolados que produziram mais AIA em meio de cultura sem L-triptofano. Da mesma forma, os resultados deste estudo demonstraram que dos 61 isolados avaliados 11 apresentaram maiores valores absolutos para a produção de AIA no meio sem L-triptofano, indicando mais de uma via metabólica está envolvida na produção de AIA por estes isolados.

No que diz respeito à comparação entre espécies vegetais, os isolados mais promissores na síntese de AIA com triptofano foram os isolados do capim buffel, com produção de 81,95 à 242,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A segunda espécie com maior produção foi o Sorgo forrageiro, com o isolado S14, produzindo 180,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, o isolado de Palma forrageira, P32 (*Bacillus* sp.) produziu 132,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Maniçoba apresentou as menores produções com ou sem a presença do triptofano, com médias variando de 20,50 até 86,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com triptofano e sem triptofano, 19,20 à

54,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O que indica que esta característica está intrinsecamente ligada à espécie vegetal hospedeira.

Diversos micro-organismos tais como *Agrobacterium* sp., *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp.p, e *Pseudomonas* sp. podem promover o crescimento vegetal aumentando o comprimento das raízes e o número de pelos radiculares por meio da síntese de AIA. Mas a produção de AIA microbiano pode modificar a auxina endógena para nível ótimo ou acima do ótimo, resultando na indução ou inibição do crescimento da planta (PATTEN E GLICK, 1996). A resposta da auxina depende do estágio de desenvolvimento da raiz da planta, o qual influi na composição e quantidade dos exsudatos liberados pela raiz (PILET et al., 1979). Desta forma, esses resultados mostram o nicho explorado como um ambiente seletivo para as bactérias produtoras de AIA.

Avaliando a capacidade da incorporação de N no meio de cultura via FBN, predominaram os gêneros *Bacillus* e *Rhizobium*, como maiores fixadores de N (Tabela 8). Destes, o isolado mais promissor foi o P20, isolado da Palma forrageira, com produção de 330 $\mu\text{g N mL}$. Comparando entre espécies vegetais, o maior número de isolados e com maior produção de N, foram os isolados de capim buffel, com produção média de 53; 90; 70 e 83 $\mu\text{g mL}$ para os isolados B13 (*Bacillus* sp.); B17 (*Bacillus* sp.); B16 e B10 (*Agrobacterium* sp.), respectivamente. Os isolados da Maniçoba, M19; M18 (*Rhizobium* sp.) e M12 (*Rhizobium* sp.), produziram, 86; 70 e 73 $\mu\text{g mL}$.

Comprovando o potencial de *Bacillus* sp. sobre o crescimento vegetal, Rana et al. (2012) avaliaram o consórcio bacteriano de *Bacillus* sp. com o trigo, sobre a fixação de N, e observaram um aprimoramento de 14-34% nos parâmetros biométricos da planta e 28-60% no teor de micronutrientes em relação ao controle. Também avaliando o efeito da fixação de nitrogênio, Mia et al. (2010) inocularam *Bacillus sphaericus* em plantas de banana e observaram efeito sobre a fixação de N, demonstrando que a inoculação de bactérias aumentou o grupo com rendimento de até 51% em relação ao grupo controle. Em plantas de arroz, Barua et al. (2012) avaliaram o efeito da inoculação de *Agrobacterium* sp e *Bacillus* em arroz e observou que o isolado Can6 (*Bacillus* sp.) aumentou a produção e absorção de N em 7,16, e 35,42% de arroz, respectivamente, em comparação ao controle. Ambrosini et al. (2016) também selecionaram *Bacillus* sp. para a promoção do

crescimento de girassol e dentre os isolados testados uma estirpe de *Bacillus mucoïdes* se destacou por promover tanto o crescimento radicular com da parte aérea por mecanismos como a FBN.

Ambrosini et al. (2016) também selecionaram *Bacillus* sp. para a promoção do crescimento de girassol e dentre os isolados testados uma estirpe de *Bacillus mucoïdes* se destacou por promover tanto o crescimento radicular com da parte aérea por mecanismos como a FBN.

Juntamente com os hormônios, o N é um importante modulador da arquitetura das raízes. Assim, o N poderia participar e, possivelmente, integrar diferentes etapas envolvidas na criação de uma associação benéfica e bem-sucedida desempenhando um papel fundamental na determinação da eficiência da interação planta-bactéria (CARVALHO et al. 2014). Além disso, a produção de fitohormônios tem grande influência sobre a fixação de N. Para Carvalho et al. (2014) a regulação hormonal aumenta o crescimento da raiz e parte área de superfície, proporcionando mais sítios para a bactéria para invadir, colonizar, e fixar N, e mais área para absorção de N, que resulta em um aumento nos níveis endógenos de N. Dessa forma, o equilíbrio perfeito em todos estes mecanismos é importante para o estabelecimento de uma associação benéfica e bem-sucedida, com efeitos positivos no crescimento das plantas.

Existem evidências de que o teor de N no solo pode regular colonização bacteriana. Oliveira et al. (2003) observaram que o número de bactérias endofíticas isoladas de tecidos de cana diminuiu em plantas que foram adubadas com altas doses de N, em comparação com plantas que receberam pequenas doses de fertilizante nitrogenado. Além disso, parece que diferente espécies bacterianas respondem de formas diferentes ao nitrogênio, Berger et al. (2013) observaram que as bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Enterobacter* melhor colonizam tomateiros mesmo com altas concentrações de nitrogênio.

Acredita-se que diazotróficos são capazes de transferir e fixar N para a planta, levando em consideração o estado de N endógeno em células de plantas. Em paralelo, este processo é autorregulado por um feedback, sendo regulada negativamente por altos níveis de amônio, o que pode ser fornecido tanto pelo FBN como pela assimilação de compostos nitrogenados do solo (CARVALHO et al. 2014).

- **Produção de Sideróforos**

O cultivo em meio Dyg's permitiu observar, por meio da mudança de coloração do azul para o amarelo alaranjado que 3 dos 61 isolados foram considerados positivos para a produção de sideróforos (Figura 6). A avaliação qualitativa da produção de sideróforos depende de uma reação de mobilização de ferro provocada por uma variação do pH, promovendo assim a alteração da cor azul para o amarelo ou laranja. A pouca quantidade de isolados que apresentaram produção pode ser corroborada com o estudo de Haiyambo et al. (2015), isolando bactérias do sorgo observou que apenas 4 dos seus 21 isolados LCS 11/02, LCM1-14, WSS2-47 e LSM1-65, foram capazes de produzir sideróforos.

Além disso, por meio de sua ligação com metais, os sideróforos podem reduzir a formação de radicais livres na região da rizosfera, protegendo a degradação oxidativa de auxinas, permitindo a esses hormônios cumprirem seu papel de promotores de crescimento de plantas (DIMKPA et al., 2009).

A estimulação do alongamento radicular e produção de biomassa de diferentes espécies de plantas inoculadas com bactérias diazotróficas têm sido demonstradas em vários estudos, especialmente quando as plantas estão sujeitas a condições de crescimento estressantes (TANK E SARAF 2009; SIDDIQUEE et al. 2012), principalmente à seca e a salinidade (MUNNS, 2005), características comuns a região Semiárida. Dessa forma, a presença de outras características de promoção do crescimento como o ácido indolacético (AIA), produção de sideróforos, solubilização do fosfato, pode fornecer benefícios adicionais para a tolerância ao estresse nas plantas contribuindo com a melhoria do seu crescimento.

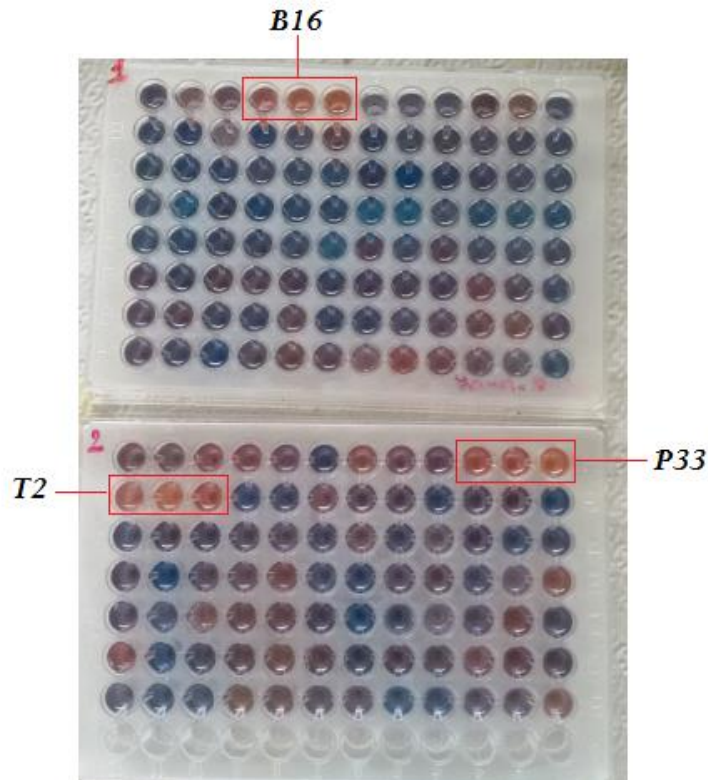


Figura 6. Produção de sideróforos pelos 61 isolados avaliada em meio CAS-Dygs

- **Solubilização de fosfato**

Observou-se que de 61 isolados, 8 foram considerados positivos para solubilização de fosfato, através da formação do halo (Figura 7). Esses isolados foram S14; M19; M18; M9; M22; P32; P37; P14 (Tabela 8). Apesar do maior halo ser encontrado no isolado S14, não foram observadas diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os isolados.

Dos isolados produtores de halo de solubilização, dois foram identificados como *Rhizobium* sp. (M18), com índice de solubilização de 0,290 e *Bacillus* sp. (P32), índice de solubilização de 0,180. O capim-buffel e a maniçoba não apresentaram isolados capazes de solubilizar fosfatos. Costa e Melo (2012), encontraram duas estirpes isoladas da palma forrageira, sendo uma de *Ochrobactrum anthropic* e outra de *Stenotrophomonas maltophilia*, positivos para solubilização de fosfato.

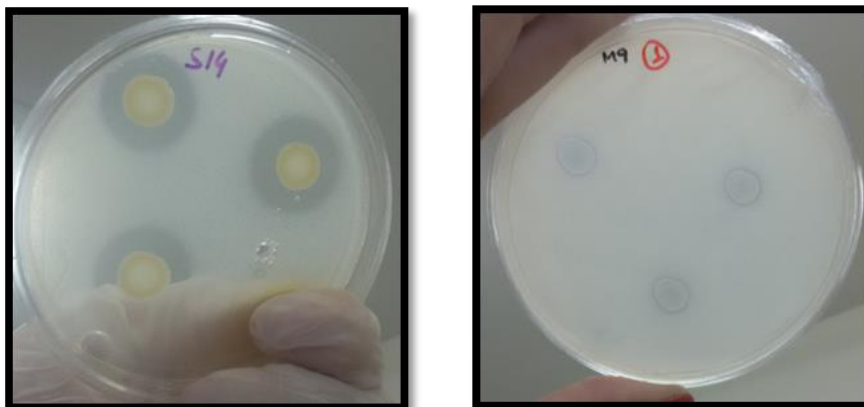


Figura 7. Halo de solubilização de bactérias isoladas do Sorgo (S14) e Maniçoba (M9) aos 5 dias.

Segundo Dobbelaere et al (2003), o fósforo (P) é considerado um dos elementos insolúveis na natureza com menos de 5% do conteúdo total de P no solo disponível para as plantas. Gêneros bacterianos, tais como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* são relatadas como os mais significativos solubilizadores de fosfato (BHATTACHARYYA E JHA, 2012). Tipicamente, a solubilização de fósforo inorgânico ocorre porque a bactéria produz ácidos orgânicos e que quando desprotonados, os radicais competem com o fosfato pelo cátion ligante.

Além de fornecer P para as plantas, as bactérias de solubilização de fosfato também aumentam o crescimento de plantas, estimulando a eficiência da FBN, e contribuindo com o aumento da disponibilidade de outros oligoelementos como Zn, Cu e Na (AHMAD et al., 2008; ZAIDI et al., 2009).

- **Ensaio da Promoção de Crescimento**

Houve diferença na MRS (g de MS/planta), MPAS (g de MS/planta) e NAPA (mg/ planta) do sorgo inoculado com as diferentes bactérias diazotróficas. A bactéria T8 e a aplicação de 100% de N proporcionaram as maiores MRS, sendo semelhantes entre si. No MPAS, diversas bactérias diazotróficas: P32, P38, B17, B22, B27, S14, S31, S29, S26, S13, S10, S23, S22, S4, S32, T6, T7, M15, M7, M6, M13, M12, M22, M27, P14, P46, P29, P20, P12 e P33 proporcionaram maiores

valores e se assemelharam à aplicação de 25, 50 e 100% de N (Tabela 9). É importante ressaltar que os isolados foram superiores ao tratamento inoculado com (Ab-V5), produzindo apenas 4,15 g/planta, tendo em vista que essa estirpe foi isolada do milho, e que apresenta características semelhantes com o sorgo, era de se esperar que a inoculação proporcionaria melhores resultados.

As maiores concentrações de NAPA foram obtidos com as bactérias: B13, B17, B16, B11, B14A, B22, B14B, B27, S31, S29, S13, S9, S23, S22, S19, S8, S4, T2, T6, M7, M9, M6, M13, M2, M27, M14, M21, M23, P32, P38, P14, P46 e P29. Estes valores foram equivalentes aos proporcionados pela aplicação de 50 e 100% do N (Tabela 9).

Em todas as variáveis analisadas, o tratamento com 100% de nitrogênio apresentou as maiores médias, entretanto, na variável MRS apresentou a maior produção entre os tratamentos inoculados e nitrogenados (10,43 mg/planta). Nas demais variáveis, não houve diferença entre os tratamentos 50, 100% e a estirpe Ab-V5.

O isolado T8 (*Stenotrophomonas* sp.) apresentou incrementos de 234% na MRS e 36,5% na variável MPAS se comparado com a testemunha absoluta, isso pode ter ocorrido em virtude da elevada produção de fitohormônios principalmente o AIA, que participa diretamente no crescimento radicular, dessa forma, raízes mais bem desenvolvidas podem garantir uma maior nutrição por meio dos nutrientes presentes no solo e contribuir também com o aumento da parte aérea da planta. Nos testes *in vitro*, era esperado que alguns isolados, tais como: B13, P32, B17 e B10, registrassem as maiores médias em relação às massas de raízes e parte aérea seca, no entanto, apenas o isolado B17, correspondeu a expectativa no aumento da parte aérea. Isso pode ter ocorrido, pois, os testes *in vitro* podem ser apenas indicativos do que esperar nos testes com inoculação. Na realidade são vários os fatores que influenciam no insucesso da inoculação, bem como, o estresse ambiental (acidez do solo, disponibilidade de água e temperatura), as características físico-químicas do solo e a competitividade com bactérias nativas do solo.

O isolado P20 também promoveu aumento na massa seca de raiz, com média de 6,02 g, em seguida, os isolados T6, S23 (*Stenotrophomonas* sp.), S32, B17 (*Bacillus* sp.), M22, S29 (*Agrobacterium* sp.) com produção de 5,97; 5,70; 5,65; 5,45; 5,42 e 5,35 g/planta, respectivamente.

Na variável massa seca de parte área e raiz, os maiores resultados também foram observados com o tratamento com 100% de adubação nitrogenada, mas não havendo diferença estatística entre os isolados: T8; B17; T6, P32 (*Bacillus*); P48 (*Stenotrophomonas*), com produções médias de 23,08; 22,92; 20,75; 19,17 e 19,16 gramas. Nessa variável, a menor produção foi observada nos isolados do sorgo forrageiro S3 e S19 (*Pseudomonas*) com 3,77; 4,15 gramas.

Esse resultado difere dos valores encontrados por Mareque et al. (2015), ao avaliarem o potencial de promoção de crescimento de bactérias sobre o sorgo, não observaram diferenças significativas da inoculação de *Rhizobium* sp. UYSB12 e *Enterobacter* sp. UYSB34 nas variáveis: massa seca de raiz e massa seca de parte área em comparação com o controle negativo e positivo (*Azospirillum brasiliense*).

O efeito promotor que essas bactérias exercem sobre o crescimento das plantas é provocada pelo alongamento da raiz o que leva a absorção de água e minerais para a planta hospedeira (AHMAD, 2008).

Tabela 9. Peso seco de raiz (MSR), peso seco de parte área e raiz (MSPR) e nitrogênio acumulado na parte área (NAPA) de sorgo forrageiro testados com 61 bactérias diazotróficas isoladas de raízes de capim buffel, capim tifton, sorgo forrageiro, palma-forrageira e maniçoba, 2 isolados (AbV5 e BR11417) e 4 tratamentos nitrogenados

Isolado	MRS (g/ planta)	MPAS (g/ planta)	NAPA (mg/planta)
B13	2,27 ^c	9.45 ^b	1.66 ^a
B17	5.45 ^b	22.92 ^a	2.13 ^a
B16	1.10 ^c	4.70 ^b	1.77 ^a
B10	3.30 ^c	12.87 ^b	1.47 ^b
B12	1.02 ^c	7.72 ^b	1.40 ^b
B11	1.72 ^c	11.17 ^b	1.58 ^a
B14A	0.67 ^c	6.52 ^b	2.08 ^a
B22	4.40 ^b	17.10 ^a	2.03 ^a
B14B	1.80 ^c	9.65 ^b	2.00 ^a
B27	2.65 ^b	14.50 ^a	1.92 ^a
S14	3.57 ^c	16.32 ^a	1.42 ^b
S31	4.82 ^b	18.42 ^a	1.68 ^a
S29	5.35 ^b	18.65 ^a	1,68 ^a
S26	4.32 ^b	17.20 ^a	1.47 ^b
S13	3.20 ^c	13.32 ^b	2.00 ^a
S9	0.47 ^c	4.15 ^b	2.20 ^a
S10	4.42 ^b	16.90 ^a	1.00 ^b
S23	5.70 ^b	18.77 ^a	2.26 ^a
S22	2.70 ^c	10.52 ^b	2.24 ^a
S19	2.37 ^c	7.32 ^b	2.11 ^a

Isolado	MRS (g/ planta)	MPAS (g/ planta)	NAPA (mg/planta)
S8	1.40 ^c	10.42 ^b	1.92 ^a
S3	3.37 ^c	3.77 ^b	1,44 ^b
S4	3.86 ^b	14.10 ^a	1.79 ^a
S32	5.65 ^b	18.85 ^a	1.26 ^b
T4	1.90 ^c	11.30 ^b	1.31 ^b
T2	3.05 ^c	12.52 ^b	1.76 ^a
T6	5.97 ^b	20.75 ^a	2.10 ^a
T7	4.60 ^b	16.57 ^a	1.39 ^b
T8	9.77 ^a	23.08 ^a	1.13 ^b
M26	3.10 ^c	12.52 ^b	1.22 ^b
M11	2.22 ^c	8.22 ^b	1.54 ^b
M19	2.83 ^c	7.60 ^b	0.55 ^b
M18	3.10 ^c	8.67 ^b	0.49 ^b
M15	2.97 ^c	14.32 ^a	1.50 ^b
M5	2.95 ^c	11.35 ^b	1.26 ^b
M3	3.97 ^b	11.45 ^b	1.42 ^b
M10	3.87 ^b	10.82 ^b	1.42 ^b
M7	3.83 ^b	14.40 ^a	1.79 ^a
M9	1.50 ^c	5.82 ^b	2.00 ^a
M6	4.57 ^b	19.32 ^a	1.71 ^a
M20	3.30 ^c	12.10 ^b	1,26 ^b
M13	2.85 ^c	14.27 ^a	1.92 ^a
M12	3.35 ^c	13.67 ^a	1.18 ^b
M2	1.92 ^c	12.00 ^b	2.03 ^a
M22	5.42 ^b	17.10 ^a	0.63 ^b
M27	3.27 ^c	14.77 ^a	1.74 ^a
M14	1.50 ^c	8.83 ^b	1.79 ^a
M21	5.50 ^b	10.80 ^b	1,63 ^a
M23	1.37 ^c	8.52 ^b	1.74 ^a
P32	4.77 ^b	19.17 ^a	1.82 ^a
P38	3.82 ^b	17.55 ^a	1.89 ^a
P37	1.40 ^c	11.80 ^b	1.29 ^b
P14	2.87 ^c	17.42 ^a	2.21 ^a
P46	4.17 ^b	15.42 ^a	2.02 ^a
P47	1.10 ^c	12.60 ^b	1.29 ^b
P29	4.42 ^b	15.65 ^a	2.05 ^a
P20	6.02 ^b	17.77 ^a	1.55 ^b
P48	4.30 ^b	19.16 ^a	1.08 ^b
P23	2.45 ^c	12.60 ^b	1.53 ^b
P12	3.82 ^b	15.02 ^a	1.37 ^b
P33	2.90 ^c	14.33 ^a	1.42 ^b
Ab-V5	4.15 ^b	15.05 ^a	1.58 ^a
BR11417	2.72 ^c	13.32 ^b	1.52 ^b
S.I	2.92 ^c	16.90 ^a	0.60 ^b
25% N	3.80 ^b	15.95 ^a	0.63 ^b
50% N	3.50 ^c	14.53 ^a	2.10 ^a
100% N	10.43 ^a	23.76 ^a	2.23 ^a

Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade \ (P<0,05). MRS: Massa de raiz seca; MPAS: Massa de parte aérea seca; NAPA: Nitrogênio acumulado na parte aérea.

Foi observada significância (p<0,05%) para a variável nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA), os valores variaram de 0,49 a 2,42 mg de N/planta nos isolados M18 (*Rhizobium*) e adubação com 100% de nitrogênio respectivamente.

Como já era esperado o tratamento com 100% de nitrogênio registraria a maior produção de NAPA, entretanto não houve diferença estatística para alguns isolados como: B17 (*Bacillus*), B14A (*Cellulomonas*) e M2 (*Rhizobium*), se comparados com a testemunha absoluta que apresentou produção de 0,60 mg de N/planta.

Como observada anteriormente na (Tabela 8), na variável N incorporado ao meio de cultura semissólido, a espécie forrageira com isolados mais promissores na produção de N *in vitro* foi o capim buffel. Neste experimento isso também se repetiu, os isolados obtidos do capim-buffel apresentaram elevada capacidade de fixar N quando inoculados no sorgo, com produção na média geral de 1,80 mg de N/planta. As menores produções foram registradas também nos isolados da maniçoba, com média de 1,44 mg N, seguidas pelo tifton, palma e sorgo (1,53; 1,62 e 1,74 mg N/planta).

Demonstrando a eficiência da inoculação de bactérias sobre o teor de nitrogênio na parte aérea do milho, Araújo (2014) observou que a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* no milho garantiu incrementos de 14,74% em relação ao controle (20,34 mg/planta).

Segundo Perazzo et al. (2013), a altura da planta é determinante no comportamento do sorgo. Neste caso, quando de porte alto, geralmente apresenta maior produção de biomassa, devido ao maior percentual colmo e lâmina foliar. Mas em plantas de menor porte, como foi o caso deste estudo, com apenas 60 dias de crescimento, a planta apresentava um maior percentual de panículas, maior teor de MS na parte área do sorgo e provavelmente maior valor nutritivo.

Os isolados B13 (*Bacillus*), B17(*Bacillus*), B10 (*Agrobacterium*) e B11(*Neorhizobium*) apresentaram elevada capacidade de produção de AIA. Os isolados S14 e M22 apresentaram elevada capacidade de solubilizar fosfatos. Além disso, os isolados P33, T2 e B16 são produtores de sideróforos. Os resultados do experimento de inoculação no sorgo demonstraram que estas bactérias apresentaram a

capacidade de promover o crescimento vegetal comparado com as testemunhas absoluta e estirpes de referência, além de induzir o acúmulo de N na parte aérea em quantidades similares ao controle com 100% de N. Esses resultados indicam o potencial destes isolados para futuros ensaios em condições de campo com fins de recomendação para a produção de inoculantes.

5. Conclusões

Há em todos os ambientes estudados grande diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, sendo a maniçoba a espécie com maior número de isolados.

Todos os isolados são produtores de AIA na presença e ausência de triptofano, e apresentam valores elevados quando comparados na literatura. Destes, os isolados B13; P32; B17 e B10 foram considerados os mais promissores na produção de AIA com triptofano.

Na capacidade de fixação de nitrogênio predominam os gêneros *Bacillus* e *Rhizobium*. Destes, os isolados com maior produção são provenientes do capim buffel.

Dos 61 isolados, 13% são capazes de solubilizar fosfato de cálcio, desse total a maioria dos isolados é proveniente das raízes de maniçoba.

A grande maioria dos isolados são promissores nas características avaliadas, dentre eles: T8, P20, B17 são capazes de aumentar o massa de raiz seca. Destes, os isolados T8 e B17 também promove aumento na parte área do sorgo. Bem como os isolados M2 e B14A aumentam o nitrogênio na parte aérea.

Desta forma, grande parte dos isolados é considerada promissora para serem testados como futuros inoculantes.

6. Referências Bibliográficas

AITA, C; GIACOMINI, S.J. Matéria orgânica do solo, nitrogênio e enxofre nos diversos sistemas de exploração agrícola. In: SIMPÓSIO SOBRE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, Piracicaba, 2007. **Anais...** Piracicaba, IPNI Brasil, 2007. 722p.

AHEMAD M, KIBRET M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **J King Saud Univ Sci** 26(1):1–20, 2014.

AHEMAD, M., KHAN, M.S., 2010. Influence of selective herbicides on plant growth promoting traits of phosphate solubilizing *Enterobacter asburiae* strain PS2. **Res. J. Microbiol.** 5, 849–857.

AHEMAD, F., AHMAD, I., KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163, 173–181, 2008

ALVES, F.G.S.; FELIX, B.A.; PEIXOTO, M.S.M.; SANTOS, P.M.; COSTA, R.B.; SALES, R.O. **Considerações sobre manejo de pastagens na região semiárida do Brasil: Uma Revisão.** *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal.* v. 08, n. 4, p. 259-284, out-dez, 2014.

AMBROSINI, A., STEFANSKI, T., LISBOA, B.B., BENEDUZI, A., VARGAS, L.K., PASSAGLIA, L.M.P. Diazotrophic bacilli isolated from the sunflower rhizosphere and the potential of *Bacillus mycooides* B38V as biofertiliser *Annals of Applied Biology*, v. 168, 1744-7348. 2016

ANDA, **Associação Nacional para a Difusão de Adubos. Estatísticas: Indicadores.** Disponível em: <http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>. Acesso em 10 out 2015.

ANDRADE, A.C.; FONSECA, D.M.; QUEIROZ, D.S.; SALGADO, L.T.; CECOS, P.R. Adubação nitrogenada e potássica em capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. Cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição especial, p.1643-1651, 2003).

ANDRADE, A.C.; RODRIGUES, B.H.N.; MAGALHÃES, J.A.; CECOS, P.R.; MENDES, F.M.A. Adubação nitrogenada e irrigação dos capins tangola (*brachiaria* spp.) E digitaria (*digitaria* sp): massa de forragem e recuperação de nitrogênio. **Revista Científica de Produção Animal**, v.11, p.1-14, 2009.

ANTUNES, G. R. ; ESCOBAR, I. E. C ; CAVALCANTE, A. B. ; PINTO, T. F. ; FERNANDES JR, P.I . Quantificação das Comunidades de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio associadas à *Melocactus* sp. In: IV Congresso de Palma e outras Cactáceas, 2015, Salvador. IV .**Anais...**Congresso de Palma e outras Cactáceas, 2015.

ARAÚJO, E.O. **Quantificação da contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho.** Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados Mato Grosso do Sul. Tese de Doutorado, 2014.

ARAÚJO, G.G.L.; CAVALCANTI, J. Potencial de utilização da maniçoba. In: SIMPÓSIO PARAIBANO DE ZOOTECNIA, 3, 2002, Areia-PB, **Anais...** Areia, 2002. CDROM.

AZENHA, M.V. ALTURAS DE PASTOS DE CAPIM-MARANDU NA INTERFACE SOLO-PLANTA. **Tese de Doutorado.** UNESP. JABOTICABAL. 2014.

BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. & CARVALHO, J.G., eds. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, 1999. p.621-666.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V. L.D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane-reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v.29, p.417-423, 2002.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v.384, p.413-431, 2014.

BAREA, J.; POZO, M.; AZCÓN, R. & AZCÓN-AGUILAR, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 417, pp 1761-1778, ISSN 0022-0957

BARUA, S.; TRIPATHI, S.; CHAKRABORTY, A.; GHOSH, S.; CHAKRABARTI, K. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. **Microbiological Research**, v. 167, p.95-102. 2012.

BASHAN Y, HOLGUIN G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30:1225–1228

BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D.de.; CAMARGO, F.A.O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.37, n.3, p.727-733, 2007.

BERG, M. J.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Transducing and storing energy. The light reactions of photosynthesis. In: FREEMAN, W. H.; et al. **Biochemistry**. 2002.

BERG G, EGAMBERDIEVA D, LUGTENBERG B. AND HAGEMANN M (2010) Symbiotic Plant-Microbe Interactions: Stress protection, plant growth promotion and biocontrol by *Stenotrophomonas*. In: *Symbiosis and Stress: Joint Ventures in Biology*. Series title: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology 17, (Seckbach JMG and Grube M, Eds), pp 00–00. Springer, in press.

BERGER, B.; BROCK, A.K.; RUPPEL, S. Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter radicincitans* in *Solanum lycopersicum*. **Plant soil**, 370: 641-652. 2013

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

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

BODDEY, R.M. Green energy from sugar cane. **Chemistry and Industry**, v.12, p.355-358, 1993.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BRAMBILLA, D.M.; NABINGER, C.; KUNRATH, T.R.; CARVALHO, P.C.F.; BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.1-15

CABALLERO-MELLADO, J., ONOFRE-LEMUS, J., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., MARTINEZAGUILAR, L. (2007) The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5308–5319.

CANBOLAT M. Y., BARIK K., CAKMAKCI R., SAHIN F. 2006. Effects of mineral and biofertilizers on barley growth on compacted soil. *ACTA AGRIC. SCANDINAVICA, SECTION B PLANT SOIL SCI.*, 1651-1913, Vol. 56, 4: 324-332

CANTARELLA, H. **Nitrogênio**. In: NOVAIS, R.F. Fertilidade do solo, Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciências do solo, 1017 p. 2007.

CANTARUTTI, R. B.; MARTINS, C. E.; CARVALHO, M. M. de; FONSECA, D. M. da; ARRUDA, M. L.; VILELA, H.; OLIVEIRA, F. T. T. de. **Pastagens**. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARAES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. (Ed.). Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5a. aproximação. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p. 331-341.

CARVALHO, M.A.C.; YAMASHITA, O.M.; SILVA, A.F. Cultivares de alface em diferentes ambientes de cultivo e adubos orgânicos no norte mato-grossense. **Multitemas**, Campo Grande, v.45, n.1, p.47- 59, 2014.

CAVALCANTE, V.A., DÖBEREINER, J. 1988. A new acidtolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil** 108: 23:31.

CAVALCANTE, R.; KOZUSNY, D. I.; ANDREANI, R.; DA FONSECA, L. Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Cana de Açúcar. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 64, p. 5803-5813, 2011.

CECATO, U.; GOMES, L.H.; ASSIS, M.A. Avaliação de cultivares do gênero *Cynodon*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. p.114-116.

CHAREST, M.H.; BEAUCHAMP, C.J.; ANTOUN, H.; 2005. Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. **FEMS Microbiology Ecology**, 52(Suppl 2): 219–227.

- CHELIUS, M. K. & TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 783–787 (2000).
- COCKING, E. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant Soil**, 252:169-175, 2003.
- COMPANT, S., NOWAK, J., COENYE, T., CLEMENT, C., AIT BARKA, E.(2008) Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 607–626.
- COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.42, p.669-678, 2010.
- COSTA, F.E.C.; MELO, I.S. Isolamento de bactérias associadas à palma e prospecção do potencial de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio. **Agrotropica** 17:23-26. 2005.
- COSTA, F.E.C.; MELO, I.S. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(6), p. 1345-1353,2012.
- CRESPO, J.M.; BOIARDI, J.L.; LUNA, M.F. **Mineral phosphate Solubilization activity of gluconacetobacter diazotrophicus under P-limitation and plant root environment.** *Agricultural Sciences*. Vol.2. n.1.p.16-22. 2011.
- CUNHA, D. N.F.V.; GOMES, E. S.; MARTUSCELLO, J.A. et al. Morfometria e acúmulo de biomassa em palma forrageira sob doses de nitrogênio. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.13, n.4, p.1156-1165, 2012.
- DAANE, L.L., HARJONO, I., BARNS, S.M., LAUNEN, L.A., PALLERONI, N.J., HAGGBLOM, M.M. 2002. PAH. Degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 131–139.
- DEAN, D.R.; JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.763-834.

DE SALAMONE, I.; HYNES, R.; NELSON, L. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, v.47, p.404-411, 2001.

DESLIPPE, J. AND EGGER, K.: Molecular Diversity of nifH Genes from Bacteria Associated with High Arctic Dwarf Shrubs, **Microb. Ecol.**, 51, 516–525, 2006.

DIMKPA CO, MERTEN D, SVATOS A, BÜCHEL G AND KOTHE E (2009) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* 5:687-1696.

DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.4, n.8, jan./abr. 1989.

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

EGAMBERDIYEVA D. 2005. Plant-growthpromoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. *J. PLANT NUTRIT. SOIL SCI.* 168: 94-99.

ELLIOT, G.N., CHEN, W.M., CHOU, J.H., WANG, H.C., SHEU, S.Y., PERIN, L., REIS, V.M., MOULIN, L., SIMON, M.F., BONTEMPS, C., SUTHERLAND, J.M., BESSI, R., FARIA, S.M., TRINICK, M.J., PRESCOTT, A.R., SPRENT, J.I., JAMES, E.K. (2007) *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytol.* 173, 168–180.

ELLIOTT, G., CHEN, W.M., BONTEMPS, C., CHOU, J.H., YOUNG, J.P.W., SPRENT, J.I., JAMES, E.K. (2007) Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. *Ann. Bot.* 100, 1403–1411.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ABALLEROMELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.2790-798, 2001.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. **Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years**. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a Amplificação Simultânea de Fragmentos dos Genes nifH e nodC em Bactérias Isoladas de Nódulos de Leguminosas.** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158).

FERNANDES JÚNIOR, P.I.; AIDAR, S.T.; MORGANTE, C.V.; GAVA, C.A.T.; ZILLI, J.E.; SOUZA, L. S.B.; MARINHO, R.C.N.; NÓBREGA, R.S.A.; BRASIL, M.S.; SEIDO, S.L.; MARTINS, L.M.V. The Resurrection Plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) Harbors a Diversity of Plant Growth Promoting Bacteria in Northeastern Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39:993-1002, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO, 2016, **Brazil**. Disponível em: <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA>>. Acesso em: 10/05/2016.

FOX, S.L; O'HARA, G. & BRÄU, L.(2011). Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer* (Sinorhizobium) *medicae* WSM419. *Plant and Soil*, Vol. 348, No.1-2, pp. 245-254, ISSN 0032-079X

FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, New York, 24:358-364, 1997.

GARCIA, T.V.; KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. *AGRICULTURAL MICROBIOLOGY* . 2015.

GERHARDSON B (2002) Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol* 20:338–343 GIMENES, F.M.A.; SILVA, S.C.; FIALHO, C.A.; GOMES, M.B.; BERNDT, A.; GERDES, L.; COLOZZA, M.T. Ganho de peso e produtividade animal em capim marandu sob pastejo rotativo e adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.7, p.751-759, 2011.

GIMENES, F.M.A.; SILVA, S.C.; FIALHO, C.A.; GOMES, M.B.; BERNDT, A.; GERDES, L.; COLOZZA, M.T. Ganho de peso e produtividade animal em capim-marandú sob pastejo rotativo e adubação nitrogenada. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.7, p.751-759, jul. 2011.

GLICK B (1995) The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117

GOLDSTEIN, A.H. (1986) Bacterial mineral phosphate solubilization: Historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1, 57-65.

GUERINOT ML, YING Y (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* 104:815–820

GUTIERRÉZ-ZAMORA, M.L. & MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.*, 91:117-126, 2001.

GUTIÉRREZ-MAÑERO F.J., RAMOS-SOLANO B., PROBANZA A., MEHOUACHI J., TADEO F.R., TALON M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *PHYSIOL. PLANT.* 111: 206-211.

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

HAIYAMBO, D.H.; CHIMWAMUROMBEL, P.M.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and Screening of Rhizosphere Bacteria from Grasses in East Kavango Region of Namibia for Plant Growth Promoting Characteristics. *Curr Microbiol.* 2015.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, Boulder, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trend in Microbiology*, v.16, n.10, p. 463-471, 2008.

HIDER RC, KONG X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep.* 27:637–657, 2010.

HIYAMA, T., MOMOSE, A., NISHIMURA, K., ISHIZAKI, N., ISHIKAWA, S., YAMAMOTO, M., HUNG, N.V.P., CHAMAIPORN, A., RUAMRUNGSRI, S., OHTAKE, N., SUEYOSHI, K., OHYAMA, T. Estimation of contribution of nitrogen fixation in sugarcane (*Saccharum officinarum*) plants with 15N dilution method in relation to nitrogen supply period. *Bull. Facul. Agric.* Niigata Univ., 66:11-19, 2013.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283).

HUNGRIA M, CAMPO RJ, SOUZA EM AND PEDROSA FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413-425.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2011. 38p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 2176-2937, n.325).

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. ***CRC Crit. Rev. in Plant Sci.***, 17:77-119, 1997.

JEON J.S., LEE S.S., KIM H.Y., AHN T.S., SONG H.G. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J. MICROBIOL.* 41: 271-276.

KAVAMURA VN, SANTOS SN, SILVA JL, PARMA MM, ÁVILA LA, VISCONTI A, ZUCCHI TD, TAKETANI RG, ANDREOTE FD, MELO IS. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. ***Microbiol Res.*** 2013;168:183-91.

KRAUSE, A.; RAMAKUMAR, A.; BARTELS, D.; BATTISTONI, F.; BEKEL, T.; BOCH, J.; BÖHM, M.; FRIEDRICH, F.; HUREK, T.; KRAUSE, L.; LINKE, B.; MCHARDY, A.C.; SARKAR, A.; SCHNEIKER, S.; SYED, A.A.; THAUER, R.; VORHÖLTER, F.J.; WEIDNER, S.; PÜHLER, A.; REINHOLD-HUREK, B.; KAISER, O.; GOESMANN, A. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. ***Nature Biotechnology***, v.24, p.385-391, 2006.

KUMAR R, CHANDRA R. Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* Bv. *viciae* strain competition and symbiotic performance in Lentil. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4 (Suppl 3): 297-301, 2008.

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLORES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, 42:1459-1465, 2007.

LATA, S.A.K.; TILAK, K.V.B.R. Biofertilizers to augment soil fertility and crop production. *In* Soil Fertility and Crop Production Science Publishers, USA. Edited by Krishna KR, 279–312, 2002

LIBA, C.M.; FERRARA, F.I.; MANFIO, G.P.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALBUQUERQUE, R.C.; PAVAN, C.; RAMOS, P.L.; MOREIRA-FILHO, C.A.; BARBOSA, H.R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford,. V.101, p.1076-1086, 2006.

LIDSTROM, M. E. Aerobic methylotrophic prokaryotes, *In* A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, NY. P. 618-634, 2006.

LOPER JE, BUYER JS (1991) Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol Plant Microbe Interact* 4:5–13

LOPES, E. L. N. et al. Microbial biomass and soil chemical properties under different land use systems in northeastern Pará. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 35, n. 4, p. 1127-1139, 2011.

MA, J.F. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. **Crit Rev Plant Sci**. 2005;24:267–281.

MAGNANI, G.S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana de açúcar**. 2005. 93 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MAGALHÃES, P.C.; DURAES, F.O.M.; SCHAFFERT, R.E. Fisiologia da planta de sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. 46p. (Circular Técnica, 3).
MARCHIORO, L. E. T. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. **Dissertação de mestrado**. Curitiba. 74p. 2005.

MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Microb. Ecol**. 34, 210–223 (1997)

MCINROY JA, KLOEPPER JW (1995) Survey of indigenous bacterial endophytes

from cotton and sweet corn. **Plant Soil** 173:337–342

MEHNAZ, S. Et al. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 47, 110–117 (2001)

MISKO AL, GERMIDA JJ (2002) Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from roots of fieldgrown canola. *FEMS Microbiol Ecol* 42:399–407

MAREQUE, C., TAULÉ, C., BERACOCHEA, M., & BATTISTONI, F. (2015). Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology*, 65(2), 1057-1067.

MARRA, L.M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**. The Hague, v.353, p.289-307, 2012.

MARCHIORO, LUIZ E. T. **Produção de Ácido Indol Acético e Derivados por Bactérias Fixadoras de Nitrogênio**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná - UFPR. 75p, 2005.

MATIRU, V.N.; DAKORA, F.D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, p.1-7, 2004.

MCINROY, J.A AND J. W. KLOEPPER, "Survey of Indigenous Bacterial Endophytes from Cotton and Sweet Corn," **Plant and Soil**, Vol. 173, No. 2, 1995 pp. 337-342.

MIA, M.A.B.; SHAMSUDDIN, Z.H.; MAHMOOD, M. Use of plant growth promoting bacteria in banana: A new insight for sustainable banana production. **Int J Agr Biol** 12:459-467, 2010.

MISHRA RP, SINGH RK, JAISWAL HK, KUMAR V, MAURYA S. *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Curr Microbiol.** 2006;52:383–389.

MMA - Ministério do Meio Ambiente, 2016. **Caatinga**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>

MORALES-GARCÍA, E.D.; D. A. JUÁREZ-HERNÁNDEZ, C. ARAGÓN-HERNÁNDEZ, M. A. MASCARUA-ESPARZA, M. R. BUSTILLOS-CRISTALES, L. E. FUENTES-RAMÍREZ, R. D. MARTÍNEZ CONTRERAS AND J. MUÑOZ-ROJAS, "Growth Response of Maize Plantlets Inoculated with *Enterobacter* sp., as a Model for Alternative Agriculture," **Revista Argentina de Microbiología**, Vol. 43, No. 4, 2011 pp. 287-293.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA, 2008. 768 p.; p.13-42.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2 ed. Lavras, UFLA, 2006, p.729.

MOREIRA, F. M. de S.; SILVA, K. da; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74-79, 2010.

MOREIRA, F. T. A., SANTOS, D. R., SILVA, G. H., ALENCAR, L. S. Ocorrência De Bactérias do Gênero *Azospirillum* spp. associadas a gramíneas forrageiras no Semiárido Nordeste. **HOLOS**, Ano 29, Vol. 3. 2013.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, v. 167, p. 645–663, 2005.

NASCIMENTO JÚNIOR, D.; OLIVEIRA, R. L.; DIOGO, J.M.S. **Manejo de Pastagens**. In: http://www.tdnet.com.br/domicio/MANEJO_DE_PASTAGENS.HTM, 1999.

NEILANDS, J.B. Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* 50: 715-731. 1981.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **J Biol Chem** 270(45): 26723-26726. 1995.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 399p.

OLIVEIRA, M. B. L.; SANTOS, A. J. B.; MANZI, A. O.; ALVALÁ, R. C. S.; CORREIA, M. F.; MOURA, M. S. B. Trocas de energia e fluxo de carbono entre a vegetação de caatinga e atmosfera no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Meteorologia**,

v.21, p.378-386, 2006.

OLIVEIRA, S.M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão-caupi, feijão comum e siratro**. 2009.66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OSAKI, F.; NETTO, S. P. Flutuação da população de bactérias sob floresta ombrófila mista e povoamento de *Pinus taeda* L. *Floresta*, v. 39, p. 845-852, 2009

O'SULLIVAN DJ & F O'GARA. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiology Review** 56: 662-676.

PATTEN, C.L. E GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 42, p. 207-230, 1996.

PATTEN, C.L; GLICK, B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. **Canadian journal microbiology**, v,48, p.635-642, 2002.

PAULINO- LIMA, I.G.; AZUA-BUSTOS, A.; VICUÑA, R.; GONZÁLEZ-SILVA, C.; SALAS, L.; TEIXEIRA, L.; ROSADA, A.; LEITÃO, A.A.C.; LAGE, C. solation of UVC-Tolerant Bacteria from the Hyperarid Atacama Desert, Chile. **Microbial ecology** 65 (2), 325-335, 2013.

PAULSEN IT, PRESS CM, RAVEL J, KOBAYASHI DY, MYERS GSA, MAVRODI DV, DEBOY RT, SESHADRI R, REN QH, MADUPU R, DODSON RJ, DURKIN AS, BRINKAC LM, DAUGHERTY SC, SULLIVAN SA, ROSOVITZ MJ, GWINN ML, ZHOU LW, SCHNEIDER DJ, CARTINHO SW, NELSON WC, WEIDMAN J, WATKINS K, TRAN K, KHOURI H, PIERSON EA, PIERSON LS, THOMASHOW LS, LOPER JE (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Nat Biotechnol** 23:873–878

PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. Aspectos ambientais na bovinocultura. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed., Jaboticabal, 2011. Cap. 16, p.521-536. ALVES, J.J.A.; CAATINGA DO CARIRI PARAIBANO. **Geonomos**. Minas Gerais, v.17, n.1. 2009.

PEIX, A., MATEOS, P.F., RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MARTINEZ-MOLINA, E., VELAZQUEZ, E. (2001) Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biol. Biochem.** 33, 1927–1935

PERAZZO, A. F.; SANTOS, E. M.; PINHO, R. M. A.; CAMPOS, F. S.; RAMOS, J. P. F.; AQUINO, M. M.; SILVA, T. C.; BEZERRA, H. F. C. Características agronômicas e eficiência do uso da chuva em cultivares de sorgo no semiárido. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1771-1776, 2013.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero Burkholderia em associação com cana-de-açúcar e descrição de Burkholderia silvatlantica**. 2007. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2007.

PILET, P.E.; ELLIOTT, M.C.; MOLONEY, M.M. Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. **Planta**, Berlin, v.146, n.4, p.405-408, 1979.

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, 152: 95-103.

PRAVEEN KUMAR, G.P.; DESAI, S.; AMALRAJ, L.D.E.; AHMED, M.H.S.K.; REDDY, G. Plant Growth Promoting *Pseudomonas* spp. from Diverse Agro-Ecosystems of India for L. **J. Biofert Biopest** 2012.

PRAYITNO, J. ET AL., Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice roots. Aust. J. **Plant Physiol.**, 1999, 26, 521–535.

PRIETO P, SCHILIRO E, MALDONADO-GONZALEZ MM, VALDERRAMA R, BARROSO-ALBARRACIN JB, MERCADO-BLANCO J. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. **Microb Ecol** 62:435–445, 2011.

RANA A, SAHARAN B, JOSHI M, PRASANNA R, KUMAR K, NAIN L. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Ann Microbiol.** 2012;4:893–900.

RAZA W, YANG W, SHEN QR (2008) *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. **J Plant Pathol** 90:419–430

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their

function. CRC Critical Reviews in **Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 29-54, 1998.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Plant Biolog**, v.14, p.1-9, 2011.

REIS JUNIOR, F.B. Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, 2002. 97p. (**Tese de Doutorado**).

REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Intra-specific diversity study of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria* species. **Symbiosis**, v.36, p.41-56, 2004.

RODRÍGUEZ, H. AND FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **biotechnol Adv** **17**,319–339, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v.19, p.827-837, 2006.

SAHARAN, B.S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v.2011, p.1-30, 2011.

SAIKIA, S. P., JAIN, VANITA AND SRIVASTAVA, G. C., Effect of *Azospirillum* and *Azorhizobium* on maize yield. *Indian J. Plant Physiol. Spec. Issue*, 2003, 539–544.

SANTOS, Durvalina M. M. *Disciplina de Fisiologia Vegetal*, UNESP, Jaboticabal. 2004. 8p.

SANTOS, L.C.; BONOMO, P; SILVA, C.F.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M.; PATÊS, N.M.S. Produção e composição química da *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens* submetidas a diferentes adubações. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.856-866, 2008.

SANTOS, M.C.M.; SANTOS, D.R.; BAKKE, O.A.; BAKKE, I.A. Ocorrência e Atividade de Bactérias Diazotróficas em Forrageiras cultivadas na região Semiárida no Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 1, p. 27-34, jan.-mar., 2013.

SCHWIEGER, F. & TEBBE, C. C. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) — linking of 16S rRNA genebased single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 3556–3565 (2000)

SASHIDHAR, B.; PODILE, A.R. (2010) Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. **Journal of Applied Microbiology**, 109, 1-12.

SCHULZ B.; BOYLE, C. What are endophytes? In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T. N. (Edit.). **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer Verlag, p. 1-13, 2006.

SIDDIQUEE, M.H., F. MOHAMMAD, M.M.A. KHAN AND M.H. ALWHAIBI. 2012. Cumulative effect of nitrogen and sulphur on *Brassica juncea* L. genotypes under NaCl stress. *Protoplasma*, 249: 139-153.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. **Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.36, n.12, p.1495-1508, 2001.

SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO AF, ANDREOTE FD, CARDOSO EJBN. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World J Microbiol Biotechnol.** 2013;29:163-71.

SHANAHAN, P.; OSULLIVAN, D.J.; SIMPSON, P.; GLENNON, J.D.; OGARA, F. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological-parameters influencing its production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.1, p.353-358, 1992.

SINGH, J.S.; ABHILASH, P.C.; SINGH, H.B.; SINGH, R.P.; SINGH, D.P. Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future perspectives. **Gene** 480 (1-2): 1-9, 2011.

SOARES, R.S.; ROESCH, L.F.W.; ZANATTA, G.; CAMARGO, F.A.O.; ASSAGLIA, L.M.P. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Appl. Soil Ecol.** 33:221-234, 2006.

SOUSA, F.B.; ARAÚJO FILHO, J.A. **Avaliação e seleção de forrageiras nativas e exóticas para o Semiárido brasileiro**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2001. 12p.(Embrapa Caprinos. Circular Técnica, 23).

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R. Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol. Rev.**, 31:425-448, 2007.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y.; Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. In: VAN LOON, L. C. (Ed.). **Advances in Botanical Research**, Burlington: Academic Press, v. 51, p.283-320, 2009.

SUCKSTORFF I., BERG G. Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. **J. Appl. Microbiol.** 95 656–663 10.1046/j.1365-2672.2003.

SURETTE MA, STURZ AV, LADA RR, NOWAK J (2003) Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant Soil** 253:381– 390

SUZUKI, N. A. Caatinga é um dos biomas mais ameaçados do planeta. **Revista de Eco 21**. Tricontinental Editora. Rio de Janeiro-RJ, ed. 114, 2006.

SZILAGYI-ZECCHIN, V.J.; IKEDA, A.C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D. KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L.V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**. 2014.

TAGHAVI S. et al. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. **Appl. Environ. Microbiol**, 748–757, 2009.

TAIZ L; ZEIGER E. 2006. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed. 719p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, v. 24, n.8, p.1596-1599. 2007.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., AND KUMAR, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol.** 30,

2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.

TANK, N. AND M. SARAF. 2009. Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. *J. Basic Microbiolo.*, 49(2): 195-204.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.847–859, 2006.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Boletim Técnico nº 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 174 p.

TIMMUSK S., VAN WEST P., GOW N.A.R., PAUL HUFFSTUTLER R., 2009. *Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1473-1481

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.1153–1161, 2004.

TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J. Adubação Nitrogenada e a Sustentabilidade de Agrossistemas. In: FILHO, O. K.; MAFRA, A. L.; GATIBONI, L. C. (Org.). Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2011. v. 7, p.193-219.

VANČURA, V. AND N. HANZLIKOVÁ, "Root Exudates of Plants IV. Differences in Chemical Composition of Seed and Seedlings Exudates," *Plant and Soil*, Vol. 36, No. 1-3, 1972, pp. 271-282. doi:10.1007/BF01373482

VEGA, F.E.; RIPOLL, M.P.; POSADA, F.; BUYER, J. (2005) Endophytic bacteria in *Coffea Arabica*. **J Basic Microbiol** 45:371–380.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C. (eds.). **Ecorregiões. Proposta para o Bioma Caatinga**. Recife: APNE/ICANC do Brasil, 76p, II, 2002.

VITOR, C.M.T.; FONSECA, D.M.; MOREIRA, L.M.; FAGUNDES, J.L.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I.; . Rendimento e composição química do capim-

braquiária introduzido em pastagem degradada de capim-gordura. **Revista Brasileira de Zootecnia**.v. 37, p. 2107-2114, 2008 .

VOLTOLINI, T. V.; SANTOS, F. A. P.; MARTINEZ, J. C.; IMAIZUMI, H.; CLARINDO, R. L.; PENATI, M. A. Produção e composição do leite de vacas mantidas em pastagens de capim-elefante submetidas a duas frequências de pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 121-127, 2010.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. e. Como melhorar a eficiência da adubação nitrogenada do milho? **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n. 91, p. 1-5, set. 2000.

YANNI, Y.G., R.Y. RIZK, V. CORICH, A. SQUARTINI, K. NINKE, S. PHILIPHOLLINGSWORTH, G. ORGAMBIDE, F. DE BRUJIN, J. STOLTZFUS, D. BUCKLEY, T.M. SCHMIDT, P.F. MATEOS, J.K. LADHA AND F.B. DAZZO, 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of potential to promote rice growth. **Plant Soil**, 194: 99–114.

YANNI, Y.G. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p.845-870, 2001.

ZHAO, Y. "Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development," *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 61, pp. 49-64.201.

ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHMED, M.; OVES, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.56, p.263-284, 2009.

ZEHR, J.P.; CAPONE, D.G. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. **Microb Ecol** 32:263-281, 1996.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, B.; FENG, Z.; KUCZZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68,p.2198-2208, 2002.