

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

LUCAS SMITH PIMENTA

“RIZOBACTÉRIAS DA BACABA (*Oenocarpus bacaba* Mart.) – TOLERÂNCIA AO  
ALUMÍNIO E POTENCIAL COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE  
PLANTAS”

MANAUS, AM

2022

LUCAS SMITH PIMENTA

“RIZOBACTÉRIAS DA BACABA (*Oenocarpus bacaba* Mart.) – TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO E POTENCIAL COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

ORIENTADOR: DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

CO-ORIENTADOR: DR. JOSÉ ODAIR PEREIRA

MANAUS, AM

2022

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P644r Pimenta, Lucas Smith  
Rizobactérias da bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) – Tolerância  
ao alumínio e potencial como promotoras do crescimento de  
plantas / Lucas Smith Pimenta . 2022  
59 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Lúcio de Azevedo  
Coorientador: José Odair Pereira  
Tese (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bcp. 2. Estresse por Al. 3. Bioinoculante. 4. Agricultura  
tropical. I. Azevedo, João Lúcio de. II. Universidade Federal do  
Amazonas III. Título

LUCAS SMITH PIMENTA

“RIZOBACTÉRIAS DA BACABA (*Oenocarpus bacaba* Mart.) – TOLERÂNCIA  
AO ALUMÍNIO E POTENCIAL COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE  
PLANTAS”

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Amazonas como  
requisito para obtenção do título de Doutor  
em Biotecnologia.

Aprovado em 31 de agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, Presidente

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

Prof. Dr. Adolfo José da Mota, membro

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. José Ferreira da Silva, membro

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, membro

Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg, membro

Universidade Federal de Goiás

*Para Helô, pelo amor, companheirismo e apoio a mim dedicados. Obrigado por todas as memórias construídas ao longo dessa jornada, as quais guardarei para sempre com carinho enquanto criamos novas histórias.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, para muito além de orientador, por ter se tornado um amigo e uma referência a ser seguida como pesquisador e como pessoa. Obrigado por ter tornado a caminhada muito mais leve e pelas portas abertas.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, meu outro orientador que, assim como o primeiro, sempre me deu apoio, atenção e ofereceu sua calma e gentileza nos momentos necessários.

Ao Prof. Dr. Adolfo José da Mota, à Samara Ferreira dos Santos e demais colegas da UFAM. Obrigado pelo acolhimento em Manaus-AM, por todo o suporte oferecido e pelo conhecimento compartilhado durante o período inicial deste doutorado.

Aos Profs. Drs. Cirano José Ulhôa, Raphaella de Castro Georg, Arthur Mendes Bathaus e aos colegas da UFG. Obrigado por terem me recebido tão bem em Goiânia-GO, oferecendo o suporte necessário durante minha breve passagem por sua casa.

À Profa. Dra. Maria Carolina Quecine, à Dra. Joelma Marcon e aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP. Obrigado por me receberem de braços abertos em seu grupo de pesquisa e oferecerem toda a estrutura e suporte científico necessários ao desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por seu papel ímpar na ciência brasileira, oferecendo recursos para que novos cientistas possam concluir seus estudos de forma digna.

À minha amada, Heloisa Azevedo de Barros, sem a qual todo esse caminho provavelmente teria sido percorrido de forma diferente e muito menos incrível.

## RESUMO

Solos ácidos com concentrações elevadas de alumínio trivalente ( $Al^{3+}$ ) estão associados a baixas produtividades agrícolas devido à inibição do crescimento radicular. Bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) são importantes ferramentas na agricultura, sendo capazes de melhorar a nutrição de plantas e sua tolerância a estresses bióticos e abióticos. O objetivo desta pesquisa foi prospectar, a partir da rizosfera da bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.), BPCPs capazes de reduzir o estresse por  $Al^{3+}$  em soja e milho. Um total de 207 isolados bacterianos foi obtido a partir das raízes e do solo rizosférico (SR) da bacaba, dentre os quais 31 foram capazes de crescer após serem cultivados em meio Luria-Bertani (LB) com 14,8 mM  $AlCl_3$  e pH 4. Essas bactérias foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA e avaliados in vitro para a produção de auxinas, ACC-deaminase e sideróforos, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Quatro isolados foram selecionados dentre os mais promissores para serem utilizados em ensaios em casa de vegetação com soja e milho, a fim de verificar sua eficiência na promoção do crescimento de plantas em situação de estresse por  $Al^{3+}$ . Os isolados de *Klebsiella* sp. SR-1, SR-15, SR-76, e *Pantoea* sp. SR-98 apresentaram resultados positivos em todos os ensaios in vitro. No milho, os isolados SR-1, SR-15 e SR-76 aumentaram a biomassa de raízes. Em soja, todos os isolados avaliados produziram plantas mais altas em relação ao controle. Quando associados ao milho, todos os tratamentos reduziram o percentual de saturação por Al no solo rizosférico, com destaque para o isolado de *Klebsiella* sp. SR-15, o qual reduziu esta característica em 80%. Em soja, todos os tratamentos aumentaram a saturação por Al no solo em comparação ao controle não-inoculado. Desta forma, os resultados obtidos indicam que a interação de BPCPs com diferentes espécies vegetais pode produzir resultados opostos. Além disso, este estudo levanta a possibilidade de reduzir o estresse por Al em plantas em solos ácidos por meio do uso de BPCPs, promovendo maior produtividade e reduzindo os custos com insumos químicos.

**Palavras-chave:** BPCP; estresse por Al; bioinoculante; agricultura tropical.

## ABSTRACT

Acidic soils with high concentrations of trivalent aluminum ( $\text{Al}^{3+}$ ) are associated to low crop productivity due to the inhibition of root growth. Plant growth promoting bacteria (PGPB) are important tools in the agriculture, being able to improve plant nutrition and tolerance to biotic and abiotic stresses. The objective of this research was to prospect, from the rhizosphere of bacaba plants (*Oenocarpus bacaba* Mart.), PGPB capable of reducing the  $\text{Al}^{3+}$  stress in soybean and maize. A total of 207 bacterial isolates were obtained from the root and the rhizospheric soil (SR) of bacaba, among which 31 were able to grow after being cultivated in Luria-Bertani (LB) medium with 14.8 mM  $\text{AlCl}_3$  at pH 4. Those bacteria were identified by 16S rDNA gene sequencing and evaluated *in vitro* for the production of auxins, ACC-deaminase and siderophores, nitrogen fixation and phosphate solubilization. Four strains were selected among the most promising isolates to be used in greenhouse experiments with soybean and maize, in order to verify their plant growth-promoting efficiency in a situation of  $\text{Al}^{3+}$  stress. The isolates of *Klebsiella* sp. SR-1, SR-15, SR-76, and *Pantoea* sp. SR-98 presented positive results in all *in vitro* assays. In maize, isolates SR-1, SR-15 and SR-76 improved root biomass. In soybean, all tested isolates produced higher plants compared to the control. When associated to maize, all treatments reduced the percentage of Al saturation of the rhizospheric soil, especially isolate *Klebsiella* sp. SR-15, which reduced this index by 80%. In soybean, all the treatments increased the Al saturation of the soil in comparison to the non-inoculated control. Therefore, the results obtained indicate that the interaction of PGPB with different plant species might produce opposite results. Also, this study raises the possibility of mitigating Al-stress in plants growing in acidic soils by using PGPB, while promoting greater productivity and also reducing the costs with chemical inputs.

**Keywords:** PGPB; Al-stress; bioinoculant; tropical agriculture.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de satélite da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (...)	17
Figura 2 – Coleta de sub-amostras e composição das amostras de solo no local de coleta (...)	17
Figura 3 – A - Planta jovem de bacaba ( <i>Oenocarpus bacaba</i> ) no local de coleta (...)	18
Figura 4 – Crescimento de bactérias endofíticas a partir de fragmentos de raízes (...)	19
Figura 5 – Quantificação da produção de ácido indol-3-acético (AIA) por bactérias	24
Figura 6 – Placas de petri contendo meio formulado com fosfato inorgânico	25
Figura 7 – Tubos de vidro contendo meio NFB livre de nitrogênio para avaliação das bactérias	27
Figura 8 – Avaliação da produção de sideróforos pelos isolados bacterianos (...)	28
Figura 9 – Avaliação indireta da atividade da enzima ACC-deaminase nos isolados (...)	29
Figura 10 – Reinoculação dos isolados bacterianos diretamente no solo (...)	31
Figura 11 – Detalhe do procedimento de lavagem das raízes de soja (...)	32
Figura 12 – Resultado das análises estatísticas dos dados biométricos (...)	45
Figura 13 – Saturação por Al (m%) média dos solos dos tratamentos (...)	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise química do solo do local de coleta das amostras (...)	33
Tabela 2 – Identificação dos isolados e características associadas a promoção do crescimento de plantas (...)	37

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1 Solos ácidos, alumínio e fitotoxicidade.....	2
2.2 A rizosfera.....	4
2.3 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs).....	6
2.4 Características associadas à promoção do crescimento de plantas.....	8
2.4.1 Produção de auxinas .....	8
2.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico.....	10
2.4.3 Fixação biológica de nitrogênio.....	11
2.4.4 Produção de sideróforos .....	13
2.4.5 Produção de ACC-deaminase .....	14
2.5 Bacaba ( <i>Oenocarpus bacaba</i> Mart.) .....	14
3 METODOLOGIA .....	16
3.1 Local de coleta das amostras.....	16
3.1.1 Coleta de amostras de solo .....	16
3.1.2 Coleta de raízes e solo rizosférico .....	17
3.2 Isolamento, purificação e armazenamento das bactérias.....	18
3.3 Tolerância à acidez e ao alumínio ( $Al^{3+}$ ).....	20
3.4 Identificação dos isolados .....	21
3.4.1 Extração do DNA genômico.....	21
3.4.2 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rDNA .....	22
3.5 Avaliação de características associadas à promoção do crescimento de plantas.....	23
3.5.1 Produção de auxinas .....	23
3.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico.....	25
3.5.3 Fixação biológica de nitrogênio.....	26
3.5.4 Produção de sideróforos .....	27
3.5.5 Atividade indireta da ACC-deaminase .....	29
3.6 Experimentos em casa de vegetação .....	30
3.7 Análise estatística de dados experimentais.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Análise do solo do local de isolamento .....	32
4.2 Isolamento e purificação das bactérias .....	34
4.3 Tolerância à acidez e ao $Al^{3+}$ .....	35
4.4 Identificação por meio do gene 16S rDNA e avaliação de características associadas à promoção do crescimento de plantas .....	36
4.5 Seleção dos isolados mais promissores nos ensaios <i>in vitro</i> .....	42
4.6 Desempenho dos isolados selecionados como bioinoculantes .....	44
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Os solos ácidos, aliados ao excesso de (Al), representam um dos maiores problemas na agricultura, tornando os cultivos suscetíveis ao estresse hídrico e nutricional. Além disso, o uso excessivo de fertilizantes químicos é um fator de risco para o meio ambiente e a economia, devendo ser reduzido por meio de novas tecnologias e boas práticas de manejo. Nos próximos 30 anos, estima-se que a população mundial chegará a 9,7 bilhões de pessoas, sendo que a maior parte desse crescimento irá ocorrer em países tropicais emergentes ou subdesenvolvidos (United Nations, 2019). Nesses países, a agricultura corresponde a parte significativa do produto interno bruto (PIB). Assim, existe uma grande urgência por iniciativas que maximizem a produção de alimentos de forma acessível e sustentável.

A partir da década de 1950, estudos relacionados à interação entre plantas e microrganismos (Döbereiner, 1953) passaram a ter um importante papel na segurança alimentar das nações. Desde então, este campo da ciência vem revelando diversos mecanismos através dos quais os microrganismos contribuem para o desenvolvimento vegetal e, com isso, desenvolvendo produtos que impactam positivamente diferentes aspectos da produção agrícola (Santos et al., 2019). Entretanto, apesar das perdas de produtividade associadas à acidez e ao excesso de íons  $Al^{3+}$  no solo, ainda são escassos os estudos sobre a utilização de microrganismos com foco neste problema (Mora et al., 2017).

A região amazônica, com grandes extensões territoriais sem intervenção humana, é reconhecida por possuir a maior biodiversidade do planeta, o que representa uma oportunidade para prospectar microrganismos com potenciais de aplicações biotecnológicas (Jesus et al., 2009). Além disso, os solos dessa região, em geral, são ácidos e apresentam elevada concentração de  $Al^{3+}$  (Moreira; Fageria, 2009), o que demanda adaptações de plantas e microrganismos a estas condições (Kochian et al., 2015). Assim, é pertinente sugerir que neste ambiente as raízes de algumas plantas se associem à microrganismos que contribuam para a sua adaptação e crescimento sob essas condições restritivas do solo.

O objetivo principal deste trabalho foi o de prospectar rizobactérias que apresentem funções associadas à promoção do crescimento de plantas em solos com alto teor de  $Al^{3+}$ .

Os objetivos específicos foram:

- I) isolar bactérias a partir de meio de cultivo complexo (Luria-Bertani);

- II) selecionar isolados tolerantes à acidez e ao  $\text{Al}^{3+}$  em meio de cultivo restritivo;
- III) identificar os isolados tolerantes ao  $\text{Al}^{3+}$  via sequenciamento do 16S rRNA;
- IV) avaliar *in vitro* os isolados quanto às funções associadas à promoção do crescimento de plantas;
- V) selecionar os isolados mais promissores e avalia-los em casa de vegetação como potenciais bioinoculantes para milho e soja cultivados em solo ácido com alta disponibilidade de  $\text{Al}^{3+}$ ;
- VI) verificar a redução do estresse por  $\text{Al}^{3+}$  nas plantas inoculadas por meio de parâmetros biométricos e análise química dos solos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Solos ácidos, alumínio e fitotoxicidade

A acidificação de solos tem se tornado um grave problema ambiental e econômico, pois limita a produtividade de culturas agrícolas. A acidificação do solo é um processo natural bastante comum em regiões tropicais, onde o grande volume de chuvas aumenta a lixiviação de cátions básicos e a quantidade de alumínio trocável (Ozawa et al., 1999). Esse processo pode, ainda, ser acelerado ao longo do tempo devido a práticas agronômicas intensivas, como por exemplo o aumento da concentração de íons  $\text{H}^+$  devido a aplicação excessiva de fertilizantes nitrogenados (Mora et al., 2017), a lixiviação de nitrogênio abaixo da zona radicular e o acúmulo desequilibrado de matéria orgânica (Odelade; Babalola, 2019; Silva, 2012). Estima-se que, atualmente, 40-50% dos solos agricultáveis do mundo sejam ácidos ( $\text{pH} \leq 5,5$ ), dentre os quais, 60% estão em países tropicais e subtropicais, onde a agricultura constitui parte fundamental da economia (Kochian et al., 2015). Somente no Brasil, mais de 500 milhões de hectares são constituídos por solos ácidos, representando dois terços de seu território total (Vitarello et al., 2005).

O alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre, depois do oxigênio e silício, representando 7% de sua massa total (Singh et al., 2017). O Al na forma de minerais aluminossilicatos está incorporado em grandes quantidades no solo, enquanto formas solúveis, capazes de influenciar sistemas biológicos, estão presentes em pequenas quantidades (Silva, 2012). Quando o valor do pH do solo é menor do que 5,5 ocorre a solubilização de

formas fitotóxicas do Al, dentre elas o íon trivalente  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  ( $\text{Al}^{3+}$ ), que é a forma mais prejudicial às plantas (Silva, 2012; Singh et al., 2017). O  $\text{Al}^{3+}$  prejudica o desenvolvimento vegetal de diversas formas, como por exemplo, ao gerar o desequilíbrio de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, ao aumentar o estresse oxidativo, ao interferir na parede celular e membrana plasmática, ao induzir a formação de calose nas raízes, ao causar desbalanço nutricional e ao inibir o desenvolvimento radicular (Silva, 2012).

Os danos ao sistema radicular são os primeiros e mais graves sintomas percebidos pela planta, o que limita diretamente o seu crescimento, por meio da redução de sua capacidade de absorver água e nutrientes (Kochian et al., 2015). Os ápices radiculares constituem região crítica para a toxidez do  $\text{Al}^{3+}$ , na qual os íons de  $\text{Al}^{3+}$  se acumulam nas paredes celulares, causando encurtamento e engrossamento das raízes e rapidamente inibindo a divisão e alongação celular (Kochian et al., 2015). Em solos ácidos e com elevada presença do  $\text{Al}^{3+}$ , frequentemente são observadas plantas com sintomas de deficiência de P, Fe, Ca e Mg, pois, além de reduzir a capacidade de assimilação das raízes, o Al pode se complexar com estes elementos, tornando-os indisponíveis para a planta (Kochian et al., 2015; Mora et al., 2017).

No Brasil, especialmente no estado do Amazonas, os solos são altamente intemperizados e lixiviados, o que, ao longo do tempo, conferiu-lhes características como elevada acidez e concentração de Al, além de baixa disponibilidade de nutrientes (Moreira; Fageria, 2009). Em um estudo feito por Lima et al. (2009), foram avaliados solos sob diferentes tipos de manejo em um município a oeste do estado do Amazonas, tendo sido observada a maior concentração de  $\text{Al}^{3+}$  em um solo proveniente de uma área de floresta pristina, ou seja, livre de qualquer interferência humana, com uma concentração deste metal três vezes maior que solos utilizados para a agricultura naquela mesma região. Em outro estudo na região amazônica, Mantovanelli et al. (2015) também observaram maior acidez e concentração de  $\text{Al}^{3+}$  em solos de áreas livres de qualquer intervenção humana. As possíveis causas relacionadas a elevada acidez dos solos de floresta amazônicos são a sua idade, o intemperismo típico da região e a contínua decomposição de matéria orgânica com consequente liberação de íons  $\text{H}^+$ , processo que é acelerado pelas elevadas temperaturas e umidade (Moreira; Fageria, 2009).

Na agricultura, a solução mais utilizada para corrigir a acidez do solo é a calagem, na qual se aplica a calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) ou dolomita ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ), que reduzem indiretamente a disponibilidade de elementos tóxicos como  $\text{Al}^{3+}$  e aumentam a disponibilidade de nutrientes

como N, P, K, S, Ca e Mg (Grover et al., 2017). A gessagem é outro processo utilizado para reduzir diretamente o teor de  $Al^{3+}$  em profundidade, por meio da aplicação de  $CaSO_4$ , entretanto não tem efeito sobre o pH do solo. Tais processos utilizam recursos minerais não-renováveis, têm um alto custo dependendo da região (Silva, 2012) e ainda contribuem direta e indiretamente para o aumento da emissão de  $CO_2$  na atmosfera (Grover et al., 2017).

Desta forma, e ainda de acordo com as tendências atuais de utilização de processos produtivos mais sustentáveis, a utilização de microrganismos como potenciais bioinoculantes adaptados a esses solos tem se tornado uma alternativa promissora para a agricultura (Enebe; Babalola, 2018; Ahemad; Kibret, 2014).

## **2.2 A rizosfera**

A rizosfera foi primeiramente definida como a interface entre o solo e a planta que é diretamente influenciada por compostos químicos liberados pelas raízes (Hiltner, 1904). Posteriormente, a definição de rizosfera se aprimorou para incluir a endosfera (espaço apoplástico dos tecidos radiculares), o rizoplano (a região superficial das raízes, abrangendo sua epiderme e a mucilagem) e a ectorizosfera (região compreendida entre o rizoplano e o solo adjacente) (McNear, 2013; Ramagnoli; Andreote, 2016).

Os microrganismos rizosféricos são aqueles que possuem a capacidade de colonizar o ambiente da rizosfera (Ahemad; Kibret, 2014), incluindo bactérias, fungos, oomicetos, nematóides, protozoários, algas, vírus, arqueobactérias e artrópodes (Mendes et al., 2013). Os microrganismos rizosféricos podem ser benéficos, auxiliando a planta na aquisição de nutrientes, atuando sobre seu metabolismo, protegendo contra patógenos e aumentando sua tolerância a estresses abióticos; mas também podem ser neutros ou prejudiciais para a planta, causando doenças (Mendes et al., 2013; Dhawi et al., 2015; Souza et al., 2015).

Além disso, os microrganismos presentes na rizosfera são responsáveis por diversos processos biogeoquímicos, como os ciclos do fósforo e do nitrogênio, por exemplo. Assim, a relação entre estes microrganismos e as plantas é um importante alvo de estudos, visto que não afeta somente os organismos diretamente envolvidos, mas também o meio ambiente, o clima e a vida em sua totalidade (Odelade; Babalola, 2019).

A diversidade microbiana na rizosfera é devida aos rizodepósitos (conjunto de células radiculares desprendidas, mucilagem e exsudatos), que atraem microrganismos capazes de utilizar estes compostos como fontes de carbono e outros nutrientes (Odelade; Babalola, 2019; Ramagnoli; Andreote, 2016). Exsudatos com alto peso molecular, como a mucilagem ou a celulose, não são facilmente utilizados por microrganismos, já compostos de baixo peso molecular como ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, proteínas e metabólitos secundários possuem uma ampla funcionalidade e são mais utilizados pelos microrganismos rizosféricos (McNear, 2013; Ramagnoli; Andreote, 2016). Por meio da exsudação de fontes de carbono específicas, as plantas são capazes de exercerem determinado nível de seleção por microrganismos capazes de complementar suas necessidades nutricionais (Andreote et al., 2014; Yang et al., 2012).

Os efeitos do  $Al^{3+}$  sobre plantas é amplamente descrito na literatura, entretanto este íon também afeta os microrganismos presentes no solo e interfere sobre a diversidade e abundância da comunidade microbiana associada às raízes, que por sua vez possui papel importante sobre a nutrição, fisiologia e desenvolvimento das plantas (Jesus et al., 2009; Mendes et al., 2013).

O papel dos microrganismos na adaptação de plantas a solos ácidos e com elevadas concentrações de  $Al^{3+}$  já foi investigado em arábido (*Arabidopsis*) (Farh et al., 2017) e em culturas como o trigo (Mahoney et al., 2017), azevém (Mora et al., 2017), milho (Dhawi et al., 2015), arroz (Souza et al., 2013) e soja (Yang et al., 2012). Dentre os mecanismos bacterianos que podem estar relacionados à redução do estresse por  $Al^{3+}$  em plantas encontram-se a produção de sideróforos, de ácidos orgânicos, de ácido indol-3-acético e até a regulação da expressão de proteínas relacionadas ao estresse por Al em plantas (Batista et al., 2018; Farh et al., 2017; Mora et al., 2017; Wang et al., 2013; Yang et al., 2012).

Algumas bactérias isoladas a partir da rizosfera de plantas crescendo em solos ácidos com elevada concentração de Al podem apresentar tolerância a estas condições em meio de cultivo (Konishi et al., 1994; Mora et al., 2017). Alguns dos gêneros bacterianos dos quais já foram obtidas linhagens tolerantes a metais como o Al, são: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Leifsonia*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Okibacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax*, entre outros (Farh et al., 2017; Konishi et al., 1994; Mora et al., 2017).

Atualmente, os principais desafios para o desenvolvimento de inoculantes biológicos são encontrar microrganismos capazes de colonizar uma ampla diversidade de plantas cultivadas e sobreviverem em ambientes sujeitos a diversos tipos de estresse (Santos et al., 2019). Nesse contexto, há uma crescente busca por bactérias que, além de possuírem mecanismos relacionados a promoção do crescimento de plantas, também possam aumentar a tolerância da planta a estresses por metais (Ahemad; Kibret, 2014).

### **2.3 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)**

As bactérias rizosféricas incluem aquelas presentes no espaço apoplástico das raízes, nas suas superfícies externas ou no solo adjacente sob influência dos exsudatos radiculares. Aquelas que são capazes de colonizar competitivamente a rizosfera e apresentam atributos benéficos para as plantas são classificadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (Di Benedetto et al., 2017; Farh et al., 2017).

As RPCPs encontradas no espaço apoplástico do tecido radicular são classificadas como endofíticas. Estas se beneficiam utilizando nutrientes da planta, possuem um ambiente física e quimicamente mais estável e são protegidas contra a elevada competição no meio externo (Andreote et al., 2014). Já as RPCPs encontradas na superfície radicular ou nos solos adjacentes, são classificadas como associativas e beneficiam-se majoritariamente dos compostos de baixo peso molecular presentes nos exsudatos radiculares (Andreote et al., 2014).

As RPCPs podem, ainda, serem classificadas em três categorias, de acordo com seu papel na interação planta-microrganismo (Odelade; Babalola, 2019), sendo estas: I) bioprotetores – são RPCPs que atuam como agentes de controle biológico, inibindo a presença de patógenos (bactérias, fungos, vírus, insetos e nematóides), por meio da liberação de, por exemplo, sideróforos e antibióticos; II) biofertilizantes – são RPCPs que aumentam a absorção de nutrientes pela planta por meio de mecanismos como a fixação biológica de N<sub>2</sub>, solubilização de fósforo inorgânico e mineralização de fosfato orgânico, além da liberação de ácidos orgânicos, e; III) bioestimulantes – são RPCPs que produzem fitohormônios (ex: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno), vitaminas ou riboflavinas, além de poderem



degradar compostos químicos complexos potencialmente tóxicos como pesticidas, herbicidas ou inseticidas.

Diversos estudos publicados têm foco na utilização de microrganismos que alteram a rizosfera e aumentam a disponibilidade de macro e micronutrientes para a planta (Dhawi et al., 2015; Shameer; Prasad, 2018), permitindo substituir parcial ou completamente o uso de insumos químicos (Batista et al., 2018; Di Benedetto et al., 2017; Shameer; Prasad, 2018). Este processo também pode ser feito com foco na redução de danos causados por infestações de plantas invasoras ou no aumento da tolerância dos cultivos à seca, metais pesados, salinidade excessiva e outros estresses ambientais (Ahemad; Kibret, 2014).

Estudos já demonstraram que RPCPs que colonizam diferentes ambientes rizosféricos atuam de maneira sinérgica na promoção do crescimento de plantas. Além disso, a utilização de rizobactérias que apresentam múltiplos mecanismos de promoção do crescimento de plantas tende a ser mais eficiente do que utilizar múltiplas RPCPs com mecanismos singulares distintos (Emami et al., 2019). Alguns exemplos de mecanismos frequentemente observados simultaneamente em RPCPs incluem a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a solubilização de fosfato inorgânico (Pi) e a produção de auxinas, ácidos orgânicos ou sideróforos (Batista et al., 2018; Dhawi et al., 2015; Mora et al., 2017; Souza et al., 2015).

A inoculação de sementes com RPCPs vem sendo utilizada na agricultura para favorecer o desenvolvimento das plantas de maneira mais sustentável. Este processo pode ser feito por meio da aplicação do inoculante no sulco de plantio, bacterização de sementes ou associando ambas as técnicas. Apesar de seus inúmeros benefícios, o uso de RPCPs na agricultura é limitado devido a resultados inconsistentes, pois sua eficiência depende da capacidade da bactéria se adaptar a solos com propriedades físico-químicas diversas, o que afeta seu metabolismo e capacidade de colonizar a planta competitivamente (Shammer; Prasad, 2018).

Desta forma, é importante procurar RPCPs capazes de sobreviver em ambientes restritivos e que mantenham sua capacidade de colonizar e promover o crescimento da planta (Shameer; Prasad, 2018).

## 2.4 Características associadas a promoção do crescimento de plantas

### 2.4.1 Produção de auxinas

Dentre as auxinas, o ácido indol-3-acético (AIA) é o hormônio vegetal mais comum, podendo ser produzido por plantas, fungos e bactérias (Fu et al., 2015). Os efeitos mais conhecidos do AIA sobre a planta incluem um rápido aumento no crescimento da planta por meio do estímulo na elongação celular ou, de maneira mais lenta, na divisão e diferenciação celular (Lüthen, 2015). Nas raízes, a expansão celular promovida pelo AIA produzido por microrganismos beneficia a planta pois, ao afrouxar a parede celular, aumenta a área superficial dos pêlos radiculares e melhora a absorção de nutrientes (Bilal et al., 2018).

O AIA está envolvido em diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal e seus efeitos benéficos ou prejudiciais dependem de sua concentração (Sukweenadhi et al., 2015). Já foi demonstrado que concentrações muito elevadas do AIA podem inibir o desenvolvimento radicular por meio do estímulo a síntese do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), uma molécula precursora do etileno, que por sua vez é um hormônio vegetal associado a processos como maturação e senescência (Glick, 2014; Sun et al., 2010). Assim, conclui-se que outro fator importante a ser considerado é o nível endógeno de produção de AIA por determinada espécie de planta, visto que este pode ser determinante na relação positiva ou negativa com bactérias produtoras deste fitohormônio (Glick, 2014).

Dentre as hipóteses que explicam a influência do AIA sobre o alongamento celular está a “teoria do crescimento ácido”, que cita dois mecanismos pelos quais o AIA aumenta o efluxo de  $H^+$  através da membrana plasmática das células vegetais: I) aumento da atividade da  $H^+$ -ATPase após ligação com receptores de auxinas na membrana celular, e; II) aumento da síntese de  $H^+$ -ATPase por meio de mensageiros secundários no citoplasma. Em ambos os casos o efluxo de  $H^+$  reduz o pH do apoplasto e ativa as expansinas, que são enzimas que atuam quebrando pontes de hidrogênio entre os polímeros que constituem a parede celular, permitindo que as células absorvam mais água e nutrientes e se expandam (Lüthen, 2015).

Dentre as vias metabólicas por meio das quais o AIA pode ser produzido por bactérias, as mais frequentemente observadas são as que utilizam o aminoácido triptofano como precursor, e sua adição aos meios de cultivo invariavelmente aumenta a produção deste

fitohormônio (Spaepen; Vanderleyden, 2011). O triptofano é um dos aminoácidos presentes nos exsudatos radiculares, o que pode ser uma explicação para a prevalência dessa rota metabólica entre isolados bacterianos obtidos na rizosfera (Shameer; Prasad, 2018). Dessa forma, a quantidade de triptofano presente nos exsudatos radiculares de uma determinada espécie vegetal é um fator determinante para que a planta seja beneficiada pela ação de rizobactérias produtoras de auxinas (Kravchenko et al., 2004).

Em bactérias, há evidências que o AIA regula respostas fisiológicas (Fu et al., 2015) e a expressão de alguns genes, o que pode aumentar a sua tolerância a condições estressantes, tais como a elevada acidez e o estresse oxidativo (Bianco et al., 2006). Entretanto, de fato o AIA não possui função de hormônio em células bacterianas, sendo assim a evolução convergente desta molécula provavelmente está relacionada com funções de sinalização recíproca na interação bactéria-planta (Fu et al., 2015; Spaepen; Vanderleyden, 2011).

Na rizosfera o AIA estimula a secreção de exsudatos radiculares, o que aumenta a oferta de nutrientes para os microrganismos rizosféricos e, ao mesmo tempo, facilita a tolerância da planta a metais potencialmente tóxicos como alumínio (Al) e zinco (Zn) (Etesami; Maheshwari, 2018). O  $Al^{3+}$  pode interagir com vias de sinalização de auxinas, interferindo no sistema de transporte polar desse fitohormônio e, conseqüentemente, reduzindo o acúmulo e distribuição de AIA nas raízes, prejudicando seu crescimento (Sun et al., 2010; Wang et al., 2016b). Em um experimento de toxidez com Al e Zn, plantas de soja inoculadas com microrganismos produtores de fitohormônios (AIA e giberelinas) apresentaram menor acúmulo e transporte de metais nas raízes, sofreram menos estresse oxidativo, acumularam mais macronutrientes (N, P, K e S) e foram capazes de modular a atividade enzimática no solo sob condições de estresse (Bilal et al., 2018).

Em experimentos *in vitro*, a adição de AIA ao meio de cultivo promoveu o aumento do pH rizosférico e estimulou a exsudação de ácidos orgânicos (citrato e malato) nos ápices radiculares, o que reduziu a atividade tóxica do  $Al^{3+}$  e evitou seu acúmulo nos tecidos da planta (Wang et al., 2013; Wang et al., 2016a). Especula-se que o aumento na exsudação de ácidos orgânicos em ápices radiculares de plantas inoculadas com microrganismos produtores de AIA esteja relacionado a algum mecanismo de ação desse hormônio sobre o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) (Bianco; Defez, 2010), o que torna este um interessante alvo de estudos para redução do estresse por  $Al^{3+}$ .

### 2.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo (P) é um elemento essencial para a vida, pois faz parte de ácidos nucleicos, fosfolípidos, proteínas e metabolismo energético (ATP) (Bini; Lopez, 2016). Em plantas, o fósforo é o segundo nutriente mais demandado, após o nitrogênio (Sukweenadhi et al., 2015). Os principais reservatórios de íons fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) são as rochas, que por meio de longos períodos sob processos biogeoquímicos são degradadas e passam a compor uma parte do solo, possivelmente liberando  $\text{PO}_4^{-3}$ .

Apesar de o P ser abundante no solo em suas formas orgânica (Po) e inorgânica (Pi), ele ainda é um fator limitante para o crescimento vegetal, mesmo em solos férteis. Verifica-se que sua baixa mobilidade e disponibilidade para as plantas está relacionada a sua adsorção (fixação) com íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ), que são especialmente abundantes em solos tropicais (Bianco; Defez, 2010; Sylvester-Bradley et al., 1982).

Além disso, por ser solúvel, o  $\text{PO}_4^{-3}$  é facilmente lixiviado em regiões com chuvas frequentes, como a região Amazônica. Com isso, na agricultura, ocorre uma demanda constante pela aplicação de fertilizantes fosfatados para aumentar a produtividade das culturas, o que gera um custo considerável, além de ocasionar o acúmulo de resíduos de P e, conseqüentemente, a eutrofização de ambientes (Zheng et al., 2019).

As formas inorgânicas dos íons fosfato (Pi) são absorvidas por plantas e microrganismos, que realizam sua conversão (solubilização) para formas orgânicas (Po) e, posteriormente, por meio de processos como rizodeposição, morte celular e decomposição pela microbiota do solo, o fosfato é convertido (mineralização) novamente para formas inorgânicas (Bini; Lopez, 2016).

Tanto em plantas quanto em microrganismos, os principais mecanismos de solubilização de P envolvem a acidificação do ambiente externo por meio da excreção de  $\text{H}^+$ , da exsudação de ácidos orgânicos e da biosíntese de enzimas fosfatases (Bianco; Defez, 2010). O  $\text{H}^+$  e os ácidos orgânicos enfraquecem a ligação do P com metais por meio de ligação competitiva, tornando-o mais acessível para a planta (Zheng et al., 2019), enquanto as fosfatases estão envolvidas com a mineralização de formas orgânicas do fósforo (Bianco; Defez, 2010).

Os microrganismos solubilizadores, também chamados de mobilizadores de P, desempenham papéis importantes no ciclo do P, atuando na mineralização do Po e na solubilização do Pi. Estes microrganismos podem ser encontrados na maioria dos solos e associados a diversas espécies de plantas na região amazônica, com destaque para a rizosfera de leguminosas e gramíneas (Sylvester-Bradley et al., 1982). A capacidade de solubilizar fosfatos é uma característica mais frequentemente observada em bactérias rizosféricas em comparação a bactérias não-rizosféricas ou de vida livre (Sukweenadhi et al., 2015).

Desta forma, a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico (BSPi) é uma importante estratégia para explorar melhor as fontes de P imobilizado no solo e reduzir os efeitos negativos, ambientais e econômicos da dependência de fertilizantes fosfatados na agricultura (Sukweenadhi et al., 2015).

### **2.4.3 Fixação biológica de nitrogênio**

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes com maior demanda no metabolismo vegetal e faz parte de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteínas (enzimas, peptídeos e aminoácidos). Este elemento se encontra em grande concentração na forma gasosa ( $N_2$ ), representando aproximadamente 78% da composição da atmosfera terrestre. Entretanto o  $N_2$  atmosférico não é assimilável pelas plantas e sua incorporação como nutriente, na agricultura, ocorre majoritariamente por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN), pela decomposição de matéria orgânica ou pela aplicação de fertilizantes nitrogenados ao solo (Dias, 2016; Mora et al., 2017).

A aplicação de fertilizantes nitrogenados no solo pode representar um dos maiores custos produtivos em algumas culturas e, ainda assim, não ser totalmente aproveitado pelas plantas, visto que moléculas como o nitrato ( $NO_3^-$ ) podem ser rapidamente lixiviadas, especialmente em regiões em que a chuva é frequente (Di Benedetto et al., 2017). A excessiva adição e a frequente lixiviação de compostos nitrogenados estão associados a prejuízos econômicos e ambientais, pois aumentam a acidificação do solo, a eutrofização de lençóis freáticos e a frequência de chuvas ácidas (Cassetari et al., 2016).

A FBN é desempenhada por microrganismos diazotróficos (bactérias, algas, fungos e leveduras) que possuem o complexo da enzima nitrogenase, responsável por catalisar a

conversão do  $N_2$  atmosférico em amônia ( $NH_3$ ), a qual é convertida por microrganismos nitrificadores em nitrito ( $NO_2^-$ ) e finalmente em nitrato ( $NO_3^-$ ). O amônio ( $NH_4^+$ ) proveniente da decomposição da matéria orgânica no solo e o nitrato ( $NO_3^-$ ) são as duas formas do N que podem ser assimilados pelas plantas e, dessa forma, incorporar esse nutriente na cadeia alimentar (Cassetari et al., 2016).

Os microrganismos diazotróficos são divididos em três grupos: os de vida livre, que fixam o nitrogênio para uso próprio; os associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas; e os simbióticos, que estabelecem uma relação estreita com a planta e, em alguns casos, formam estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Os microrganismos diazotróficos podem ser aeróbios ou microaeróbios e podem viver em ambientes com disponibilidade de  $O_2$  maior (superfície do solo, ectorizosfera) ou menor (rizoplane e endosfera). Com isso, não é raro encontrar bactérias diazotróficas nos ambientes rizosférico e endofítico, onde se associam às plantas de maneira mutuamente benéfica, fornecendo nitrogênio e utilizando moléculas produzidas pela planta como fontes de carbono e nutrientes para seu próprio crescimento e multiplicação (Andreote et al., 2014).

A associação mais emblemática entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio é a simbiose que ocorre entre leguminosas e bactérias dos gêneros *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*, as quais colonizam o apoplasto radicular formando nódulos que praticamente eliminam a necessidade de aplicação de compostos nitrogenados em algumas culturas de leguminosas, como soja ou feijão (Döbereiner et al., 1995).

De fato, a eficiência de fixação de nitrogênio observada em bactérias noduladoras é incomparável, porém se restringe às leguminosas (Mendes et al., 2013). Contudo, outros gêneros de bactérias fixadoras podem ser encontrados associados a diferentes espécies de plantas, como gramíneas e cereais, fornecendo quantidades menores de nitrogênio, mas que, ainda assim, representam uma redução significativa na dependência de compostos nitrogenados (Boddey; Döbereiner, 1988). É o caso de algumas bactérias pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum* e *Bacillus* que são comumente isolados a partir de espécies vegetais como o arroz, o milho, o sorgo, o trigo, a cana-de-açúcar e outras gramíneas, inclusive na região amazônica (Boddey; Döbereiner, 1988; Cassetari et al., 2016).

Diferentemente dos microrganismos diazotróficos simbióticos, os associativos apresentam menor especificidade quanto aos ambientes ou espécies vegetais em que são encontrados (Cassetari et al., 2016), apresentando assim um potencial interessante para utilização como bioinoculantes em mais de uma espécie vegetal.

#### **2.4.4. Produção de sideróforos**

Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular produzidos e excretados por microrganismos com o objetivo de obter íons de ferro (Fe), o qual é um nutriente geralmente pouco disponível no ambiente do solo. Estas moléculas apresentam elevada afinidade pelo Fe, sendo capazes de sequestrá-lo a partir de outros compostos, orgânicos ou inorgânicos, onde se encontra quelado. A partir desse processo, tanto os microrganismos quanto plantas são capazes de absorver o complexo Fe-sideróforo, obtendo assim uma quantidade suficiente deste micronutriente para seu desenvolvimento (Kramer et al., 2020).

Existem diversas classes de sideróforos descritas na literatura, sendo os hidroxamatos e catecolaminas as mais frequentemente observadas em bactérias. A produção de sideróforos pode ser analisada de forma qualitativa ou quantitativa a partir de ensaios colorimétricos em meio de cultivo contendo o corante cromoazurol S (CAS) ligado ao Fe (Kramer et al., 2020; Silva-Stenico et al., 2005; Schwyn e Neilands, 1987). O resultado positivo é observado por meio de alterações na coloração do meio azulado, as quais variam, conforme o tipo de sideróforo produzido, entre tons alaranjados (catecolaminas) ou arroxeados (hidroxamatos).

Além do aspecto nutricional, outra importante função agrônômica dos sideróforos é a sua função como supressor de populações de patógenos no ambiente rizosférico, visto que, ao quelar o Fe, este torna-se ainda menos disponível para os microrganismos prejudiciais, inviabilizando sua multiplicação e infecção da planta (Gu et al., 2020).

#### 2.4.5. Produção de ACC-deaminase

O balanço hormonal adequado é um fator primordial para o pleno desenvolvimento vegetal. O etileno é um dos fitohormônios mais estudados, visto que está associado a processos como maturação de frutos e senescência de flores e outros tecidos vegetais (Nascimento et al., 2014). Um dos precursores do etileno é o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), o qual tem a sua produção aumentada nos tecidos vegetais na presença de situações de estresse biótico ou abiótico (Glick, 2014; Nascimento et al., 2014; Danish et al., 2020).

Estudos demonstraram que a síntese de etileno em resposta a estresses ocorre de forma gradual, sendo a intensidade da produção aumentada de acordo com a duração ou severidade da situação adversa. Além dos estresses, existe ainda a produção de etileno induzida pelo AIA, em uma reação que se inicia com a produção excessiva de SAM, que por sua vez se converte em ACC pela ação da enzima ACC-sintase e, por fim, se converte em etileno pela ação da enzima ACC-oxidase (Glick, 2014).

Assim, bactérias produtoras da enzima ACC-deaminase são capazes de atuar como um dreno ao excesso deste precursor nos tecidos vegetais, protegendo a planta contra os efeitos deletérios do etileno (Singh et al., 2022). Além disso, a degradação do ACC por esta enzima resulta na produção de  $\alpha$ -cetobutirato e amônia, a qual pode tornar-se uma fonte de nitrogênio para uso pela célula bacteriana ou vegetal (Nascimento et al., 2014).

#### 2.5 Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.)

Popularmente conhecida como bacaba, a *Oenocarpus bacaba* Mart. é uma monocotiledônea nativa da Amazônia, pertencente à família botânica Arecaceae, da ordem Arecales, que inclui as espécies conhecidas pelo nome comum de palmeiras (Ferreira, 2005). Esta espécie encontra-se distribuída ao longo da Bacia Amazônica, com maior frequência nos estados do Amazonas e Pará e possui como habitat a mata virgem alta de terra firme.



A planta pode atingir 20 m de altura e produz frutos arredondados com 1,5 cm de diâmetro e casca de cor roxo-escuro, organizados em cachos com 1,5 m de comprimento contendo de 6-20 kg de frutos cada (Ferreira, 2005).

Assim como o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), o fruto da bacaba é rico em compostos bioativos benéficos para a saúde humana, como fenóis e antocianinas (Neves et al., 2015). Por meio de um processo semelhante ao realizado com o açaí, a bacaba fornece um alimento de sabor agradável, com elevado teor de óleo, geralmente consumido com ingredientes como farinha de mandioca e açúcar (Araújo; Lopes, 2012; Ferreira, 2005). O óleo extraído a partir de seus frutos apresenta características físico-químicas e organolépticas muito semelhantes as do azeite de oliva (Neves et al., 2015).

Entretanto, ao contrário do açaí, que se popularizou nacional e internacionalmente, o consumo da bacaba ainda se restringe às regiões nas quais a planta é nativa (Neves et al., 2015). Nestas regiões, a maior demanda pelo fruto ocorre durante a entressafra do açaí, que coincide justamente com a safra da bacaba (Nogueira; de Santana, 2009). Entretanto, a produção da bacaba ainda é majoritariamente extrativista, o que compromete a oferta e a qualidade deste produto (Nogueira; de Santana, 2009).

Popularmente, o óleo da bacaba também é utilizado como expectorante para tratar infecções pulmonares como bronquite ou tuberculose, oferecendo excelentes resultados (Araújo; Lopes, 2012; Ferreira, 2005). Estudos recentes demonstraram que o extrato fenólico da bacaba induziu, *in vitro*, a apoptose de uma linhagem celular usada para estudar o câncer de mama (Finco et al., 2016). Além disso, este extrato também atenuou a adipogênese ao modular a expressão gênica em uma linhagem de pré-adipócitos (Lauvai et al., 2017).

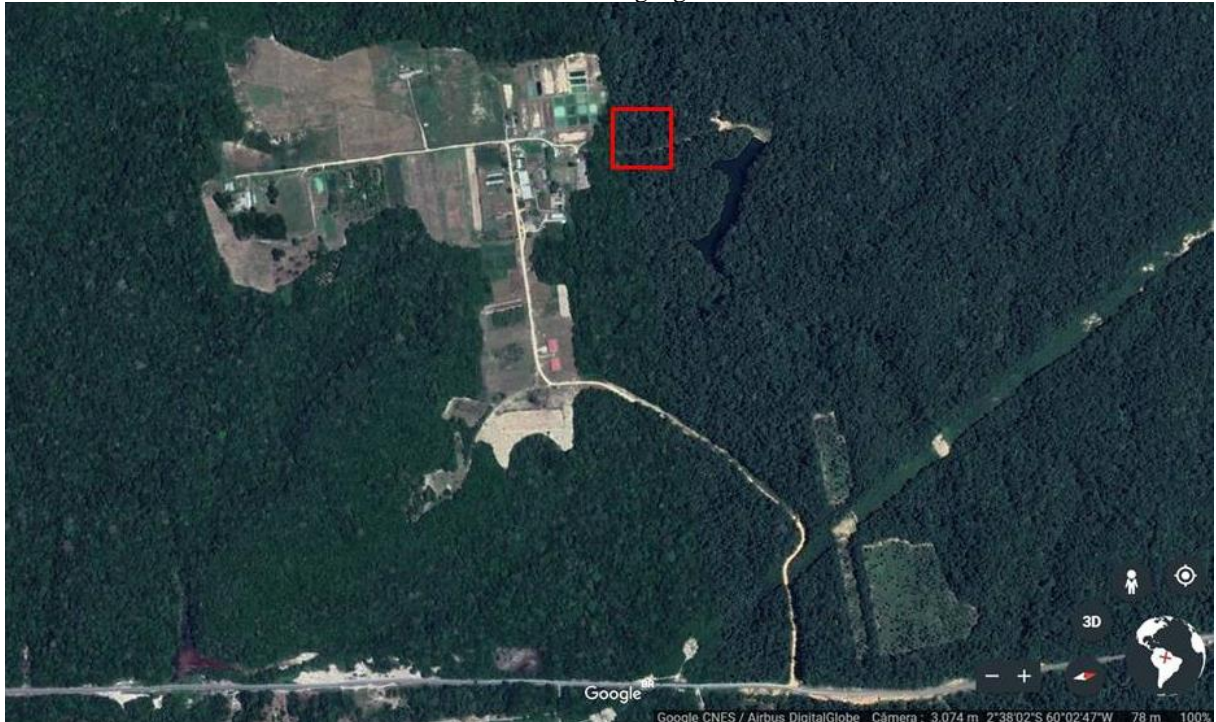
Recentemente, Diniz et al. (2020) publicaram um estudo sobre os fungos endofíticos associados à bacaba e sua atividade enzimática (amilases, celulases, lipases e proteases), tendo obtido linhagens com potencial biotecnológico. Não foram encontrados estudos publicados sobre bactérias associadas à bacaba ou seu potencial como promotoras do crescimento de plantas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Local de coleta das amostras

As coletas das amostras de raízes e solos foram realizadas em uma área de floresta pristina dentro da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP-UFAM, BR 174 – Km 922, Manaus/AM, Brasil) (FIGURA 1).

Figura 1 – Imagem de satélite da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP-UFAM), BR 174 – Km 922, Manaus/AM, Brasil. Destaque em vermelho para a área de floresta pristina onde foram coletadas as amostras de solo e raízes. Coordenadas geográficas 2°38'43"S 60°03'11"O



Fonte: Google Earth (2018).

##### 3.1.1 Coleta de amostras de solo

Foram coletadas amostras de solo para análise de composição química nas profundidades de 0-20 cm e 20-40 cm, seguindo as instruções do manual fornecido pelo Laboratório de Solos da UFAM. As amostras de cada profundidade foram compostas por 20 sub-amostras com aproximadamente 200 g de solo cada. Além disso, todas as sub-amostras foram coletadas a uma distância aproximada de 1,5 m das plantas selecionadas para a coleta

de raízes e solo rizosférico (FIGURA 2-A). As subamostras foram misturadas e homogeneizadas em baldes (FIGURA 2-B), a partir dos quais foram coletadas duas amostras compostas, com 200 g cada, das profundidades de 0-20 cm e 20-40 cm.

Figura 2 – Coleta de sub-amostras e composição das amostras de solo no local de coleta, uma área de floresta pristina. A - Cova feita para coletar amostras nas profundidades de 0-20 cm e 20-40 cm; B - Baldes utilizados para misturar as sub-amostras e sacos plástico esterilizados utilizados para armazenar as amostras compostas de cada profundidade. Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP-UFAM), BR 174 – Km 922, Manaus/AM, Brasil



Fonte: O autor (2018).

Essas amostras foram armazenadas em sacos plásticos esterilizados (FIGURA 2-B) e transportadas resfriadas até o Laboratório de Solos da UFAM, onde foram analisadas quanto as suas características químicas: pH, acidez potencial (H+Al), teores de fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), conteúdo de matéria orgânica (MO), capacidade de troca catiônica (CTC), soma de bases (SB), saturação por bases e saturação por alumínio (m%).

### 3.1.2 Coleta de raízes e solo rizosférico

As amostras de raízes e solo rizosférico foram coletadas a partir de seis plantas de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) (FIGURA 3-A) jovens e de aparência saudável, selecionadas aleatoriamente dentro da área de coleta. Durante a coleta, foram utilizados equipamentos como pás, enxadas, pinças, tesouras, bisturis, sacos de coleta e luvas devidamente esterilizados. Foram cavadas covas próximas da parte aérea das plantas, tendo sido o sistema radicular acessado cuidadosamente para evitar a quebra de raízes (FIGURA 3-B).

Figura 3 – A - Planta jovem de bacaba (*Oenocarpus bacaba*) no local de coleta, uma área de floresta pristina; B - Vista lateral da cova cavada para acessar as raízes da planta. Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP-UFAM), BR 174 – Km 922, Manaus/AM, Brasil



Fonte: O autor (2018).

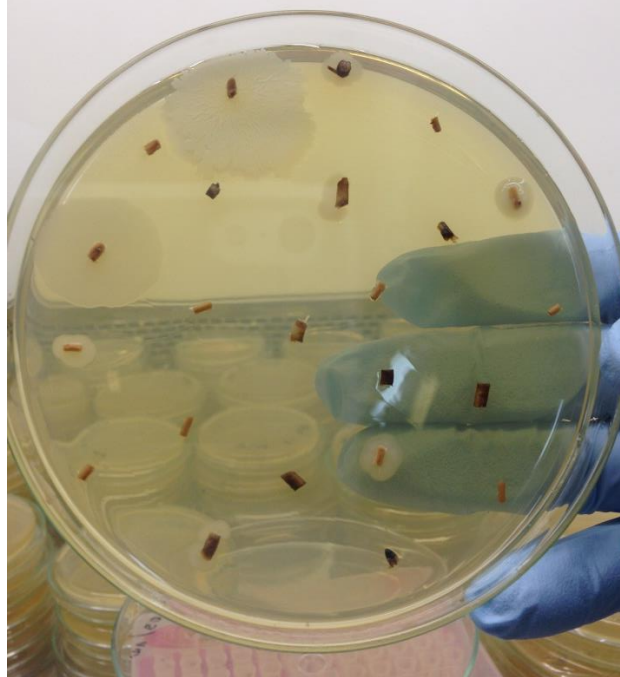
As raízes foram coletadas em sacos plásticos esterilizados, mantendo o solo rizosférico aderido e foram imediatamente armazenadas em uma caixa térmica resfriada com gelo. Logo após a coleta, o material foi transportado para o Laboratório de Biodegradação, no setor de Biotecnologia da UFAM (Manaus, AM), onde foi feito o isolamento de bactérias rizosféricas.

### 3.2 Isolamento, purificação e armazenamento das bactérias

O isolamento das bactérias foi realizado a partir de três fontes: solo rizosférico, fragmentos de raízes e raízes maceradas. Para o isolamento de bactérias endofíticas, as raízes foram lavadas com água corrente para retirada de resíduos de poeira e solo e, em seguida, foi realizada a desinfecção superficial por imersão em etanol 70% durante 1 minuto, depois em hipoclorito de sódio (NaOCl) 4% por 4 minutos, novamente em etanol 70% por 30 segundos e finalmente enxaguadas duas vezes com água destilada esterilizada (Azevedo et al., 2014). A eficiência da esterilização superficial foi confirmada plaqueando uma amostra da água da última lavagem do tecido radicular (Mora et al., 2017).

O isolamento de bactérias endofíticas foi realizado de acordo com Azevedo et al. (2014). As raízes desinfectadas superficialmente foram cortadas transversalmente, com auxílio de um bisturi esterilizado. Uma parcela dos fragmentos foi plaqueada em meio Luria Bertani (LB) ágar suplementado com o antifúngico fluconazol ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (FIGURA 4).

Figura 4 – Crescimento de bactérias endofíticas a partir de fragmentos de raízes de bacaba em meio LB ágar



Fonte: O autor (2018).

A outra parcela dos fragmentos de raiz foi macerada em uma solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada, na proporção de 1,0 g de raiz para 3,0 ml de solução, utilizando cadinho e pistilo. A seguir, foi feito um processo de enriquecimento a partir das raízes maceradas e do solo rizosférico, adicionando 10 g das amostras em erlenmeyers contendo 90 mL de meio LB esterilizado suplementado com fluconazol ( $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e agitadas a 150 rpm durante 24 h. A seguir, a partir das soluções enriquecidas, foram feitas diluições seriadas entre  $10^{-1}$  e  $10^{-6}$  utilizando solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Por fim, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram espalhadas em duplicata na superfície de placas com meio LB ágar e foram incubadas invertidas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 72h.

O crescimento bacteriano nas placas foi acompanhado durante 7 dias e a purificação foi realizada repicando colônias isoladas com características visuais distintas (forma, borda, superfície, pigmentação, consistência) para novas placas de meio LB ágar por meio de estrias de esgotamento. A repicagem foi realizada pelo menos duas vezes para confirmar a pureza dos cultivos (Azevedo et al., 2014). Os isolados receberam códigos de acordo com seu

material de origem (SR – solo rizosférico; FR – fragmentos de raízes; RM – raízes maceradas) e ordem de isolamento (ex: SR-1, FR-3, RM-5).

Em seguida, os isolados bacterianos foram inoculados em tubos Falcon (15 mL) contendo 5 mL de meio LB 100% e incubados a 150 rpm durante 24-48 h, até que o meio ficasse turvo, indicando crescimento bacteriano. Por fim, os isolados foram preservados em quadruplicata, em criotubos de 2 mL com tampa de rosca, em glicerol 30% (750 µL da cultura em 750 µL de glicerol 60%) e armazenados à -80°C (Azevedo et al., 2014).

### **3.3 Tolerância à acidez e ao alumínio (Al<sup>3+</sup>)**

A tolerância à acidez e ao Al<sup>3+</sup> das bactérias foram ensaiadas em meio LB suplementado com 14,82 mM de Al, equivalente a 400 ppm, fornecido por meio de uma solução 1 M de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), e pH regulado para 4,0 utilizando soluções 1 M de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), quando necessário.

As bactérias foram reativadas inoculando 100 µL do estoque em tubos Falcon (15 mL) com 5 mL de meio LB, os quais foram incubados sob agitação de 150 rpm durante 24-48 h, até que o meio apresentasse turbidez. Em seguida, 100 µL de cada amostra reativada foram transferidos para tubos com o meio LB suplementado com Al, sendo novamente incubadas sob agitação de 150 rpm por 24 h.

Por fim, após o cultivo em meio suplementado com Al, foram espalhadas alíquotas de 50 µl sobre placas de Petri contendo meio LB ágar e cultivadas em estufa a 28°C por até 72h, a fim de verificar aquelas que se mantiveram viáveis após exposição ao Al<sup>3+</sup> em meio ácido. Os ensaios posteriores foram realizados apenas com as bactérias que apresentaram resultados positivos neste ensaio.

### 3.4 Identificação dos isolados

#### 3.4.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com Sambrook et al. (1989) a partir de culturas frescas feitas em tubos com 5 mL de meio LB 100% e cultivadas durante 24 h a 28°C e 150 rpm.

Após esse período, 4 mL da suspensão bacteriana foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos para formar o *pellet* celular e o sobrenadante foi descartado. A lavagem das células, para remoção do restante do meio de cultivo, foi feita duas vezes por meio da adição de 400 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), ressuspensão as células com auxílio de uma micropipeta, centrifugação e descarte do sobrenadante.

Após a lavagem, foram adicionados sobre o *pellet* 400 µL de tampão de lise (20 µL Triton 100X, 100 µL dodecil-sulfato de sódio (SDS) 10%, 20 µL NaCl 5 M, 10 µL Tris-HCl 1 M, 2 µL EDTA 0,5 M, 4,7 µL lisozima (20 mg.mL<sup>-1</sup>), água Milli-Q esterilizada q.s.p 1 mL), além de 0,5 g de microesferas de sílica (0,1 mm). Os microtubos foram agitados em vortex durante 2 minutos e incubados em banho seco a 37 °C durante 1 h para lise celular.

Após a incubação, foram adicionados 500 µL de fenol aos microtubos, homogeneizando por inversão e centrifugando a 17000 g durante 10 minutos. Com o auxílio de uma micropipeta, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado para não haver mistura das fases aquosas e transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 200 µL de TE e 600 µL de uma mistura (24:1) de clorofórmio e álcool isoamílico, centrifugando a seguir a 17000 g durante 10 minutos. Novamente, foi coletado o sobrenadante (~ 500 µL) e transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 0,6 volumes (~ 300 µL) de isopropanol e 0,1 volumes (~ 50 µL) de NaCl 5 M e foram mantidos em freezer a - 20 °C durante 15 minutos. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 17000 g durante 15 minutos para precipitar o DNA genômico. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perturbar o DNA, o qual foi lavado a seguir com 400 µL de etanol 70% e centrifugado a 17000 g durante 5 minutos. O etanol foi cuidadosamente descartado e os microtubos colocados em banho seco a 40 °C e, após a completa evaporação do etanol, os DNAs foram eluídos em 50 µL de água Milli-Q esterilizada.

O DNA obtido foi avaliado quanto a sua integridade e quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose (1,0 % p/v) a 3 volts.cm<sup>-1</sup> em tampão TAE 1X e corado com brometo de etídio (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>), tendo como referência o DNA-λ a 50, 100 e 200 ng.μL<sup>-1</sup>.

### 3.4.2 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rDNA

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada a partir do DNA genômico total extraído das bactérias, utilizando os primers R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e P0F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Heuer et al., 1997). As condições utilizadas para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram: 10% tampão 10X; 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 mM do primer forward; 0,2 mM do primer reverse; 2,5 U de Taq DNA polimerase; 1 μL (≈ 20 ng) de DNA *template*; e água Milli-Q q.s.p 50 μl. A reação de amplificação foi realizada em termociclador com a seguinte programação de ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62,5°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto das reações foi avaliado quanto a sua integridade e tamanho do fragmento em gel de agarose (1,2% p/v), aplicando 5 μL do produto de PCR com 5 μL de tampão de carregamento (*loading buffer* – LB) adicionado de agente intercalante *Sybr green* e utilizando como referência um marcador de peso molecular (DNA *ladder*) de 1 kb (Thermo Scientific™).

Após a confirmação de amplificação dos fragmentos, os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol (PEG 8000). A solução foi preparada por meio da solubilização de 20% de PEG 8000 (p/v) em NaCl 2,5 mM, a 37°C sob agitação. Em um microtubo de 1,5 mL com 50 μL da solução de PEG 8000 foram adicionados 50 μL do produto de PCR, misturando com a micropipeta, e incubando em banho seco a 37 °C durante 15 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 18000 g durante 15 minutos e o sobrenadante foi coletado com micropipeta e descartado. Sobre a fase remanescente, foram feitas duas lavagens seguidas adicionando 125 μL de etanol 80% gelado, incubando à temperatura ambiente durante 1 minuto, centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos e descartando o sobrenadante com cuidado para não perturbar o *pellet* de DNA formado. Após a



segunda lavagem, os microtubos foram colocados em banho seco a 37 °C até a completa evaporação do etanol 80% restante (~ 20 minutos). Os produtos de PCR foram então dissolvidos em 30 µL de água Milli-Q e armazenados em geladeira até o dia seguinte, quando a eficiência da purificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v).

Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados, diluídos (35 ng.µl<sup>-1</sup> por amostra) e foi realizado o sequenciamento Sanger utilizando o primer 1387R (Heuer et al., 1997), e o Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems<sup>™</sup> - Thermo) em um equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems<sup>™</sup>) de acordo com as instruções do fabricante.

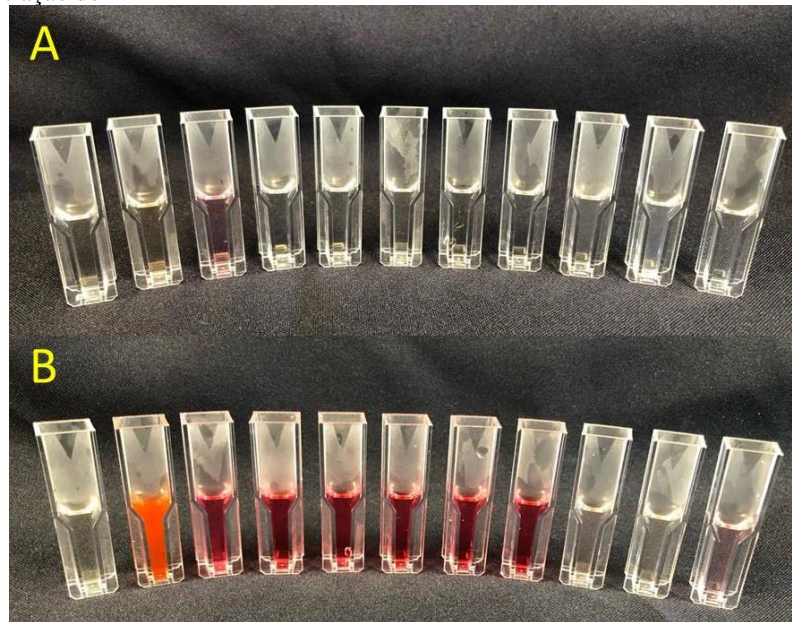
Os contigs foram montados utilizando o Tracy (versão 0.6.1) (Rausch et al., 2020) e comparados ao banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) usando a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990). Todas as linhagens bacterianas utilizadas no estudo tiveram suas sequências submetidas ao GenBank. As linhagens utilizadas nos experimentos em casa de vegetação tiveram o 16S rDNA completamente sequenciado utilizando os primers internos propostos por Thompson et al. (2001).

### **3.5 Avaliação de características associadas à promoção do crescimento de plantas**

#### **3.5.1 Produção de auxinas**

A produção de auxinas foi avaliada colorimetricamente, segundo Bric et al. (1991), utilizando o reagente de Salkovski, composto por cloreto de ferro (FeCl<sub>3</sub>) e ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) (Gordon; Weber, 1951), o qual permite estimar a quantidade de compostos indólicos, como o ácido-indol-3-acético (AIA), produzidos por bactérias em um meio de cultivo. Os sais férricos presentes no reagente de Salkovski promovem a oxidação do AIA presente na amostra, produzindo um tom amarelado em amostras negativas e tons avermelhados com diferentes intensidades em amostras positivas (FIGURA 5).

Figura 5 – Quantificação da produção de ácido indol-3-acético (AIA) por bactérias utilizando o reagente de Salkovski. As amostras são cultivadas em meio LB 10% sem (A) ou com (B) a adição de 5 mM de triptofano, um precursor metabólico do AIA. Amostras positivas apresentam tons avermelhados que variam em intensidade conforme a concentração de AIA



Fonte: O autor (2019).

Primeiramente, as bactérias foram cultivadas em tubos de vidro de 15 mL com 5 mL de meio LB 10%, na presença ou na ausência de L-triptofano (5 mM), incubadas no escuro sob agitação de 150 rpm, a 28°C, durante 72 h. Após esse período, alíquotas de 2 mL do meio de cultivo foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. A seguir, em triplicata, foram transferidas alíquotas de 500  $\mu$ L do sobrenadante para cubetas de acrílico com 1000  $\mu$ L do reagente de Salkovski (1 mL de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M em 49 mL de  $\text{HClO}_4$  35%). Como controle positivo, utilizou-se a linhagem RZ2MS9 de *Bacillus thuringiensis* (Batista et al., 2018).

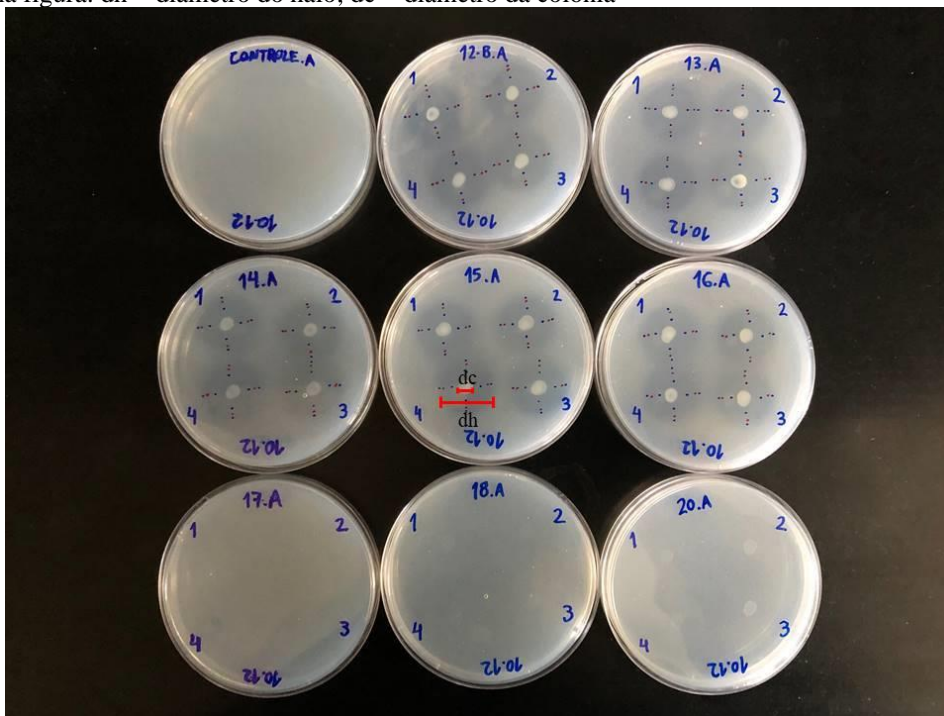
As amostras misturadas ao reagente de Salkovski foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. O desenvolvimento de tons avermelhados nas amostras indicou a produção de AIA. A absorbância das amostras foi lida em um espectrofotômetro com comprimento de onda regulado para 520 nm. Para a quantificação da concentração de AIA em cada amostra, as leituras obtidas foram interpoladas nas equações geradas por meio de curvas padrão construídas a partir de concentrações conhecidas de AIA (0, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em meio LB 10% suplementado com L-triptofano 5 mM.

### 3.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Os pré-inóculos foram preparados em meio LB 100%, diluídos em água Milli-Q esterilizada ( $O.D._{600nm} = 0.1$ , aproximadamente  $1.10^7$  células  $ml^{-1}$ ) e, a seguir, inoculados na forma de gotas de 5  $\mu l$  em placas de Petri contendo meio sólido NBRIP (Nautiyal, 1999) com modificações, composto por 10  $g.L^{-1}$  de glicose, 5  $g.L^{-1}$   $NH_4Cl$ , 1  $g.L^{-1}$  de  $NaCl$ , 1  $g.L^{-1}$  de  $MgSO_4.7H_2O$ , 0,8  $g.L^{-1}$  de  $Ca_3HPO_4$  e 15  $g.L^{-1}$  de ágar, com pH 7,2.

Os isolados foram cultivados em quadruplicata, incubados durante 72 h a 28°C e avaliados a cada 24 h para a formação de halos translúcidos ao redor das colônias, indicando a solubilização do fosfato inorgânico (FIGURA 6). Como controle positivo, foi utilizada a linhagem 33.1 de *Pantoea agglomerans* (Quecine et al., 2012).

Figura 6 – Placas de petri contendo meio formulado com fosfato inorgânico. A formação de halos translúcidos em torno das colônias indica a capacidade da bactéria em solubilizar fosfato inorgânico. Indicado por retas vermelhas na figura: dh = diâmetro do halo; dc = diâmetro da colônia



Fonte: O autor (2019).

O índice de solubilização de fosfato (ISF) foi avaliado semi-quantitativamente com o auxílio de uma régua milimetrada, por meio da relação entre o diâmetro das colônias (dc) e seus respectivos halos translúcidos (dh), quando formados, sendo o índice de solubilização de P calculado como  $ISP = dh/dc$  (Berraquero et al., 1976). A capacidade de solubilização de

fosfato das bactérias pode ser classificada, de acordo com o ISF, como baixa ( $ISF < 2$ ), média ( $2 < ISF < 3$ ) ou alta ( $ISF > 3$ ) (Silva Filho; Vidor, 2000).

### 3.5.3 Fixação biológica de nitrogênio

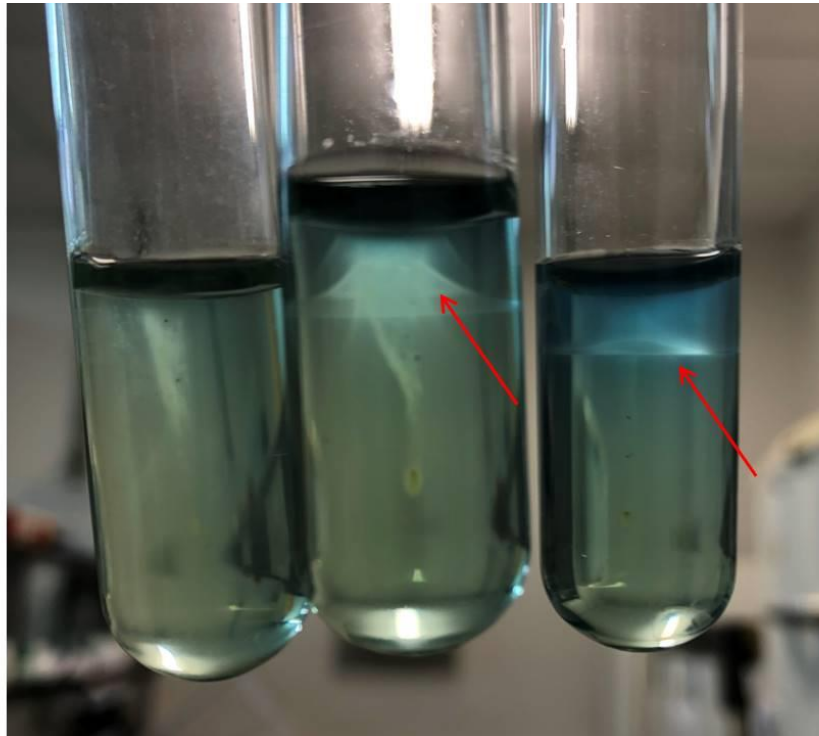
A capacidade das bactérias em fixar nitrogênio atmosférico foi avaliada de maneira qualitativa em meio NFB semi-sólido livre de nitrogênio, o que consiste em uma importante estratégia de avaliação, pois permite que bactérias com diferentes demandas por oxigênio (i.e. aeróbicas ou microaeróbicas) se desenvolvam ao longo de um gradiente de difusão do oxigênio (Döbereiner et al., 1995).

O meio NFB foi preparado de acordo com Baldani et al. (1986), com a seguinte composição: 5 g.L<sup>-1</sup> de ácido málico; 0,5 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g.L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,02 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 4,5 g.L<sup>-1</sup> de KOH; 2 mL.L<sup>-1</sup> de solução de micronutrientes; 2 mL.L<sup>-1</sup> de solução de azul de bromotimol (0,5% em KOH 0,2 M); 4 mL.L<sup>-1</sup> de solução de Fe-EDTA (1,64%); 1 mL.L<sup>-1</sup> de solução de vitaminas; e pH regulado para 6,5. O meio foi distribuído em alíquotas de 4 mL em tubos de vidro de 15 mL com tampa de rosca, e autoclavados a 1 atm durante 15 minutos.

A partir de culturas crescidas em meio LB ágar e utilizando uma alça de platina, as amostras foram inoculadas em triplicata em tubos com meio NFB e, em seguida, incubadas no escuro a 28°C durante 72 h. Como controle positivo foi utilizada a linhagem Ab-V5 de *Azospirillum brasilense* (Hungria et al., 2010). A partir do primeiro inóculo, as amostras foram repicadas em novos tubos de meio NFB e avaliadas após 72 h mais duas vezes. Este processo é feito de forma a assegurar que o crescimento bacteriano não esteja ocorrendo a partir de reservas de nitrogênio das células, assim como assegurar a estabilidade desta característica naquela amostra bacteriana (Baldani et al., 1986; Döbereiner et al., 1995).

Após esse processo, a fixação biológica de nitrogênio pôde ser verificada pela formação de halos de crescimento no meio NFB (FIGURA 7).

Figura 7 – Tubos de vidro contendo meio NFB livre de nitrogênio para avaliação das bactérias. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é confirmada pela formação de um halo de crescimento no meio (indicadas por setas vermelhas)



Fonte: O autor (2020).

### 3.5.4 Produção de sideróforos

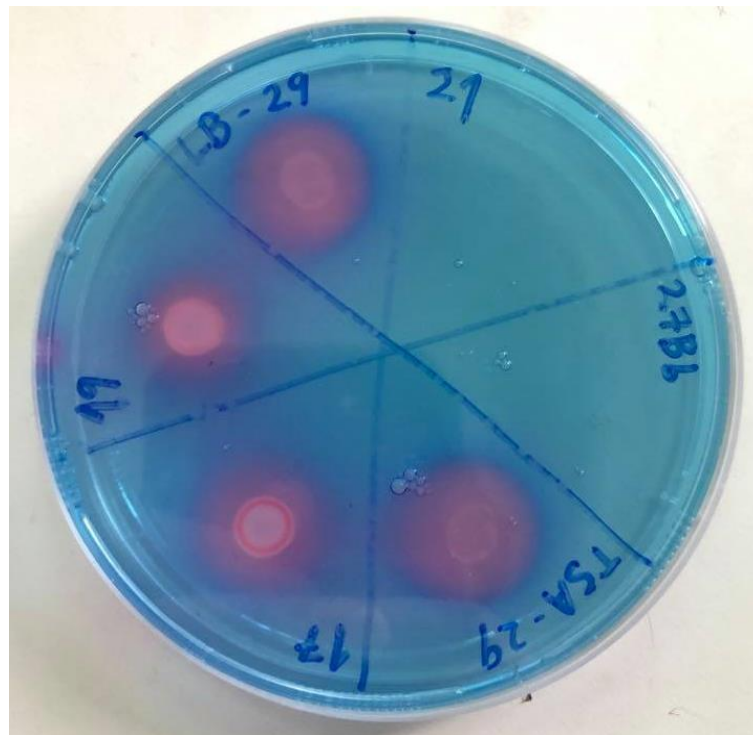
Os pré-inóculos foram preparados em meio LB 100%, diluídos em água Milli-Q esterilizada ( $O.D._{600nm} = 0.1$ , aproximadamente  $1.10^7$  células  $ml^{-1}$ ) e, a seguir, inoculados na forma de gotas de 5  $\mu l$  em placas de Petri contendo o meio cromoazurol-S agar (CAS agar) (Schwyn e Neilands, 1987).

Este meio é feito a partir da mistura de três partes preparadas separadamente (solução corante, meio MM9 e solução suplemento), e todas as vidrarias utilizadas foram previamente imersas em HCl 6 M durante 24 horas para remoção de qualquer traço de ferro. A solução corante foi preparada misturando uma solução de cromoazurol-S (60,5 mg em 50 ml de água destilada ultrapura) com 10 ml de ferro (III) ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  1 mM em HCl 10 mM), esterilizando por autoclavagem a seguir. Foram preparados 100 ml do meio deficiente em ferro (MM9) (Payne, 1994) modificado (Silva-Stenico et al., 2005) ( $KH_2PO_4$  0,3  $g L^{-1}$ , NaCl 0,5  $g L^{-1}$ ,  $NH_4Cl$  1,0  $g L^{-1}$ ), adicionados de 1,2 g de Tris e 18 g de ágar, o pH foi regulado para 5,6 e a solução foi autoclavada. A solução suplemento foi preparada a partir de uma mistura de 50 ml de uma solução de glicose 40% e 9 ml de uma solução CAS-desferrada,

ambas previamente esterilizadas por filtragem em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . A solução CAS-desferrada foi preparada adicionando lentamente 30 ml de uma solução 3% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de 8-hidroxiquinolina em clorofórmio sobre 30 ml de uma solução 10% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de caseína. Por fim, o meio CAS agar foi preparado dentro da câmara de fluxo laminar, misturando-se 240 ml do meio MM9 com 30 ml da solução corante e 30 ml da solução suplemento. O meio foi vertido em placas de petri e armazenado protegido da luz.

Os isolados foram cultivados no meio CAS ágar em quadruplicata, sendo incubados durante 72 h a 28°C e avaliados a cada 24h para a formação de halos alaranjados ou arroxeados ao redor das colônias, indicando o sequestro do ferro quelado ao corante cromoazurol-S (Figura 8). O índice de produção de sideróforos (IPS) foi calculado de forma semi-quantitativa por meio da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.

Figura 8. Avaliação da produção de sideróforos pelos isolados bacterianos da rizosfera da bacaba. O resultado positivo é confirmado por meio da formação de um halo alaranjado ou arroxeadado ao redor das colônias, indicando o sequestro, pelos sideróforos, do ferro (Fe) fortemente quelado ao corante cromoazurol-S (CAS).



Fonte: O autor (2021).

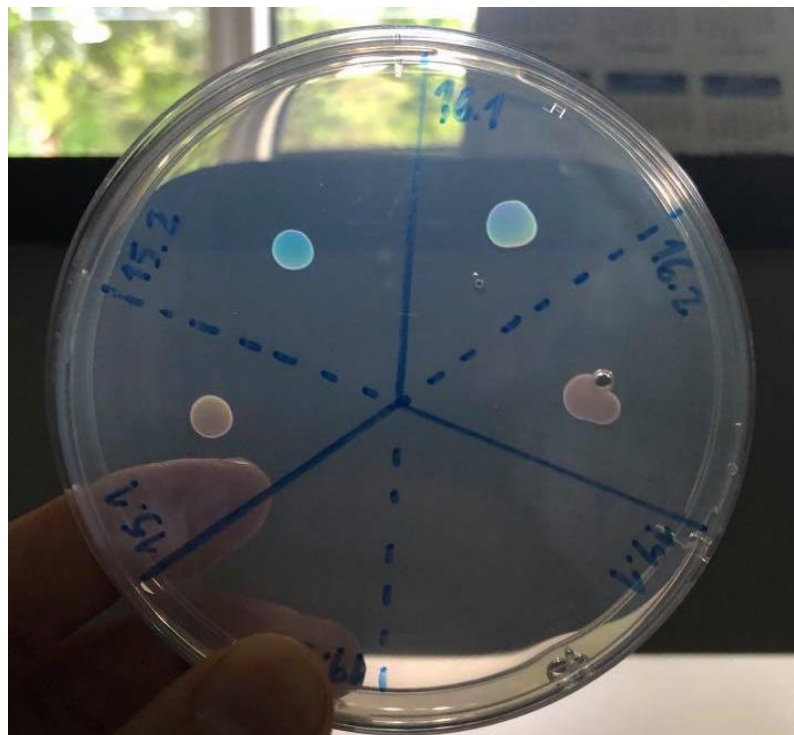
### 3.5.5 Atividade indireta da ACC-deaminase

O pré-inóculo foi diluído ( $O.D._{600nm} = 0,1$  – aproximadamente  $1.10^7$  células  $ml^{-1}$ ) e inoculado na forma de gotas de  $5 \mu l$  em placas de Petri contendo meio de cultivo mínimo M9 com 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de nitrogênio, de forma a poder avaliar a produção de ACC-deaminase pelos isolados.

O meio utilizado foi composto por 100 ml de uma solução 5X do meio M9 (3,3 g  $Na_2HPO_4$ , 1,5 g  $KH_2PO_4$  e 0,25 g NaCl), 1 ml de uma solução estoque de  $MgSO_4$  1 M, 50  $\mu L$  de uma solução estoque de  $CaCl_2$  1 M, 50 ml de uma solução de glicose 10%, 350 ml de uma solução de ágar 2% e 5 ml de uma solução de ACC 3 mM (Glick et al., 1995). Todas as soluções foram autoclavadas, exceto a solução de ACC, a qual foi esterilizada por filtração em membrana  $0,22 \mu m$ .

A atividade da ACC-deaminase nos isolados foi avaliada de maneira indireta, após 72 h de incubação a  $28^\circ C$ , sendo o resultado positivo confirmado pelo crescimento das colônias no meio (Figura 9).

Figura 9. Avaliação indireta da atividade da enzima ACC-deaminase nos isolados bacterianos da rizosfera da bacaba. O resultado positivo é confirmado pelo crescimento da colônia no meio contendo ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como única fonte de nitrogênio.



Fonte: O autor (2021).

### 3.6 Experimentos em casa de vegetação

Para avaliar a capacidade dos isolados em promover o crescimento de plantas, foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação, um com milho (cultivar DKB 390 – Bayer) e outro com soja (cultivar TMG 7067 – Tropical Melhoramento Genético). Os tratamentos utilizados foram os isolados de *Klebsiella sp.* (SR-1, SR-15, e SR-76) e de *Pantoea sp.* (SR-98). Como controles positivos foram utilizadas a linhagem 33.1 de *Pantoea agglomerans* (*P. aggl.* 33.1) (Quecine et al., 2012) e a linhagem RZ2MS9 de *Bacillus thuringiensis* (*Bt* RZ2MS9). Como controle negativo foi utilizada a mesma solução salina (NaCl 0,85%) utilizada para ressuspender as células nos outros tratamentos. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento.

Para cada tratamento foram inoculadas 30 sementes de soja ou milho a partir da imersão em 30 ml de solução salina (NaCl 0,85%) contendo aproximadamente  $1.10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ , as quais foram ressuspensas nesta concentração após centrifugação do pré-inóculo feito em meio LB. A seguir, os tratamentos foram colocados em *shaker* sob agitação a 150 rpm e 28 °C durante 30 minutos para bacterização das sementes.

Na casa de vegetação, para cada tratamento, foram plantadas duas sementes em cada um dos 10 copos plásticos (550 ml) contendo um solo de cerrado (Araraquara-SP) caracterizado por seu baixo pH e elevado teor de  $\text{Al}^{3+}$ . Três dias após a emergência (DAE) foi feito o desbaste, mantendo somente uma planta por copo. As plantas foram cultivadas durante 36 dias, com reinoculações semanais dos isolados (5 mL contendo  $1.10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) diretamente no solo (Figura 10), a fim de aumentar as chances dos isolados se estabelecerem junto ao sistema radicular das plantas.



Figura 10. Reinoculação dos isolados bacterianos diretamente no solo. O procedimento foi realizado semanalmente, durante todo o experimento, a partir de cultivos em meio LB diluídos em solução salina. Para cada planta a reinoculação foi feita a partir de 5 mL de solução NaCl 0,85% com  $1.10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ .



Fonte: O autor (2021).

Os experimentos foram conduzidos em uma casa de vegetação na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo (ESALQ – USP) (Piracicaba, SP), durante o inverno (de junho a julho de 2021), com médias de temperatura de 17,1 °C e umidade relativa do ar de 64,7% (USP, 2022).

Ao final dos experimentos, as plantas foram removidas dos copos. O solo rizosférico foi coletado para análises químicas e, a seguir, as raízes foram cuidadosamente lavadas em água corrente a fim de remover todo o solo aderido (Figura 11).

Figura 11. Detalhe do procedimento de lavagem das raízes de soja coletadas ao término dos experimentos. As plantas foram avaliadas quanto a altura da parte aérea, e massa seca de raízes e parte aérea.



Fonte: O autor (2021).

Após a lavagem das raízes foi medida a altura da parte aérea (cm) das plantas. A seguir, a parte aérea foi separada das raízes, sendo ambas armazenadas em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada a 60 °C até atingirem massa constante. Os solos de cada tratamento foram enviados para análise para avaliar quaisquer alterações em sua composição química em decorrência das interações planta-bactéria.

### **3.7 Análise estatística dos dados experimentais**

Os dados experimentais obtidos foram organizados em planilhas e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Scott-Knott ao nível de significância de 5%, utilizando para isso o programa R Studio (R Core Team, 2021).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Análise do solo do local de isolamento**

Os solos amazônicos são predominantemente ácidos com uma média de pH  $4,4 \pm 0,49$ , elevado teor de  $Al^{3+}$  (média de  $1,91 \text{ cmolc.dm}^{-3}$ ) e são deficientes em P, K, Ca e Mg (Moreira;

Fageria, 2009). Nesta região, os solos em seu estado natural apresentam maior acidez e maior teor de  $Al^{3+}$  (Lima et al., 2009; Mantovanelli et al., 2015). Estes resultados justificam a escolha pelo local de coleta deste trabalho, que também encontrou suporte nos resultados obtidos na análise química do solo do local de coleta (TABELA 1).

Tabela 1 – Análise química do solo do local de coleta das amostras, uma área de floresta pristina dentro da Fazenda Experimental da UFAM (FAEXP-UFAM) (Manaus, AM)

	Amostra		
	0-20 cm	20-40 cm	Solo rizosférico (SR)
pH (CaCl <sub>2</sub> )	3,9	4,1	3,8
H+Al (SMP) (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	4,7	3,4	6,4
P (Mehlich-1) (mg.dm <sup>-3</sup> )	1	1	2
K (Mehlich-1) (mg.dm <sup>-3</sup> )	8	4	8
Al (KCl) (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	1,1	0,8	1
Ca (KCl) (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	0,05	0	0,1
Mg (KCl) (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	0	0	0
M.O. (colorimetria) (dag.kg <sup>-1</sup> )	1,3	0,8	2,8
t (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	1,17	0,81	1,15
T (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	4,77	3,41	6,55
SB (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	0,07	0,01	0,15
V (%)	1,48	0,3	2,23
m (%)	93,98	98,73	87,25

Fonte: O autor (2019).

Nota: H+Al = acidez potencial; M.O. = Matéria Orgânica; t = Capacidade de troca de cátions efetiva; T = Capacidade de troca de cátions a pH 7,0; SB = Soma de Bases; V = Saturação por bases; m = Saturação por alumínio.

As amostras de solo coletadas apresentaram concentrações de Al entre 0,8 e 1,1 cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>, com uma média de 0,97 cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup> (aproximadamente 100 ppm), além de níveis elevados de acidez (pH) e saturação por alumínio (m) (TABELA 1).

A acidez (pH) e o H+Al (SMP) do solo rizosférico (SR) foram maiores em relação às amostras de solo coletadas no solo adjacente nas profundidades de 0-20 cm e 20-40 cm, porém o SR apresentou menor saturação por Al (m). Além disso, nutrientes importantes, como P e Ca, apresentaram maior concentração no SR, o que pode estar relacionado aos mecanismos de solubilização de fosfato descritos anteriormente (item 2.3.2).

Estas observações podem ser o resultado de um maior teor de matéria orgânica (M.O.) na rizosfera, seja pela presença dos exudatos radiculares ou, também, da atividade microbiana neste ambiente (Andreote et al., 2014). Como consequência, existe maior abundância de moléculas capazes de imobilizar o  $Al^{3+}$ , reduzindo a disponibilidade deste elemento tóxico e ao mesmo tempo tornando mais disponíveis nutrientes como P e Ca (Kochian et al., 2015; McNear, 2013; Shameer; Prasad, 2018; Wang et al., 2016a).

Segundo Cronan e Grigal (1995), a razão molar entre as concentrações de Ca e Al no solo pode ser utilizada como indicativo do potencial estresse por Al em áreas de floresta, sendo que proporções de  $\text{Ca/Al} \leq 1,0$  indicam um risco de 50% para o crescimento normal da vegetação, enquanto razões entre  $0,0 < \text{Ca/Al} < 0,1$  indicam um risco potencial para o crescimento normal da vegetação de 99%, o que foi o caso no presente estudo (TABELA 1).

É notório que atributos como pH e teor de  $\text{Al}^{3+}$  exercem um impacto significativo sobre a diversidade microbológica do solo, gerando uma considerável pressão seletiva, especialmente em regiões tropicais como a Amazônia (Jesus et al., 2009). Desta forma, é pertinente supor que nestes solos há uma maior probabilidade de encontrar bactérias que possuam mecanismos de tolerância a estes estresses (Konishi et al., 1994; Mora et al., 2017), as quais poderiam ser exploradas como uma alternativa mais sustentável em relação ao uso dos corretivos de solo convencionais.

#### **4.2 Isolamento e purificação das bactérias**

Com base em características visuais das colônias, foram isoladas 207 bactérias, sendo 105 a partir do solo rizosférico (SR), 79 dos fragmentos de raízes (FR) e 23 das raízes maceradas (RM). A maior parte dos isolados foi obtida a partir das placas contendo inóculos diluídos entre  $1.10^{-3}$  e  $1.10^{-6}$ , pois naqueles com maior densidade celular não foi possível realizar uma clara distinção visual das características individuais das colônias. As placas de isolamento tiveram as colônias distintas recuperadas até o sétimo dia após a inoculação, sendo descartadas após este período.

Nas placas de meio LB ágar semeadas com a água utilizada na última lavagem das raízes não houve crescimento de bactérias, confirmando a eficiência dos procedimentos de desinfecção superficial dos tecidos. Como forma de otimizar as análises subsequentes, as bactérias isoladas não foram identificadas imediatamente, optando-se por identificar somente aquelas que apresentassem elevada tolerância à acidez (pH 4,0) e ao  $\text{Al}^{3+}$  (400 ppm) em meio de cultivo, conforme descrito no item 4.3.

### 4.3 Tolerância à acidez e ao Al<sup>3+</sup>

Para os ensaios de tolerância à acidez e ao Al<sup>3+</sup>, foram utilizados como base os resultados das análises químicas dos solos no local de coleta, nos quais o pH médio foi próximo de 4,0 e concentração média de 100 ppm de Al (TABELA 1, item 4.1). Assim, como forma de elevar a pressão seletiva e restringir as análises subsequentes apenas para as bactérias mais tolerantes, utilizou-se o meio LB 100% suplementado com 14,82 mM de Al (equivalente a 400 ppm, ou quatro vezes o valor encontrado no solo do local de isolamento) e pH regulado para 4,0.

Somente 31 isolados (15% das amostras) apresentaram crescimento após serem cultivados no meio de cultivo ácido contendo Al. A maioria (68%) das bactérias que testaram positivo nesse ensaio foram isoladas a partir do solo rizosférico (SR), o que pode ser explicado pelo fato de que, nesse ambiente, estão muito mais expostas à acidez e ao Al<sup>3+</sup> em comparação com as bactérias endofíticas (RM e FR), as quais se beneficiam da proteção e homeostase dos tecidos vegetais (McNear, 2013). No ambiente rizosférico, as bactérias precisam lidar com a acidez gerada pelas plantas, as quais exudam prótons como ácidos orgânicos e íons H<sup>+</sup> para balancear as cargas retiradas do solo durante o processo de absorção de nutrientes (Msimbira; Smith, 2020), o que também pode explicar a maior tolerância à acidez observada entre os isolados rizosféricos em comparação aos endofíticos.

De maneira semelhante, Mora et al. (2017) isolaram bactérias a partir da rizosfera de uma planta crescendo em um solo ácido com elevada concentração de Al e identificaram isolados dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* capazes de crescer em meio de cultivo com pH 4,8 contendo 10 mM de Al. Konishi et al. (1994) obtiveram, a partir de um solo ácido, um isolado de *Flavobacterium* sp. que manteve o crescimento em meio de cultivo com pH 3,5 e 2000 ppm de Al, promovendo aumento do pH do meio ao longo do tempo. Em um outro exemplo, Farh et al. (2017) obtiveram, a partir da rizosfera de plantas de ginseng crescendo em um solo rico em Al, linhagens de *Pseudomonas* spp. e *Burkholderia* sp. capazes de mitigar o estresse por alumínio em arábido, demonstrando ainda algumas características associadas à promoção do crescimento de plantas como produção de sideróforos, auxinas e solubilização de fosfato.

Nos resultados obtidos por Zhang et al. (2020a), foi demonstrado que na rizosfera de uma determinada espécie de planta exposta a uma condição mais severa de estresse por Al houve maior frequência de alguns gêneros bacterianos associados à promoção do crescimento vegetal, como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia*. Dessa forma, conclui-se que, de fato, em situações de estresse por Al associado à acidez, a planta tende a recrutar em sua rizosfera grupos de microrganismos que produzam efeitos benéficos ao seu desenvolvimento, o que se comprovou, em seguida, ao avaliar os isolados obtidos a partir da rizosfera da bacaba quanto à algumas características associadas à promoção do crescimento de plantas (TABELA 2, Item 4.4).

#### **4.4 Identificação por meio do gene 16S rDNA e avaliação de características associadas à promoção do crescimento de plantas**

Todas as 31 rizobactérias isoladas que apresentaram tolerância ao  $Al^{3+}$  em meio ácido foram identificadas via sequenciamento do gene 16S rDNA. As sequências obtidas foram depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), gerando um número de acesso para cada um dos isolados. Além disso, estes isolados foram avaliados quanto ao seu potencial como promotores do crescimento de plantas por meio dos ensaios de produção de ácido indol-3-acético (AIA), índice de solubilização de fosfato (ISF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de sideróforos (PS) e atividade indireta da enzima ACC-deaminase (ACC) (TABELA 2).

Tabela 2 – Identificação dos isolados e características associadas a promoção do crescimento de plantas nos isolados bacterianos obtidos a partir do solo rizosférico (SR) e dos fragmentos de raízes (FR) de bacaba. ISF = índice de solubilização de fosfato (adimensional); AIA = Produção de ácido indol-3-acético ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ACC = produção de ACC-deaminase (positivo [+] ou negativo [-]); PS = produção de sideróforos (positivo [+] ou negativo [-]); FBN = fixação biológica de nitrogênio (positivo [+] ou negativo [-]). Os isolados marcados com ‘\*’ após seu código foram selecionados para uso como bioinoculantes nos ensaios em casa de vegetação. Médias seguidas por letras distintas nas colunas indicam diferença estatística significativa segundo o teste de Scott-Knott ( $\alpha = 5\%$ ).

Isolado	N° acesso NCBI	Maior similaridade no NCBI	ISF	AIA ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	ACC	PS	FBN
SR-1*	ON784344	<i>Klebsiella aerogenes</i> NBRC 13534	4,3 <sup>a</sup>	70,0 <sup>d</sup>	+	+	+
SR-9	MZ734082	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	2,7 <sup>e</sup>	197,0 <sup>b</sup>	+	+	+
SR-10	MZ734079	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	2,4 <sup>f</sup>	306,7 <sup>a</sup>	+	+	+
SR-12	MZ734083	<i>Escherichia marmotae</i> HT073016	2,1 <sup>f</sup>	316,0 <sup>a</sup>	+	-	-
SR-13	MZ735959	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	2,1 <sup>g</sup>	307,3 <sup>a</sup>	+	-	+
SR-14	MZ735962	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	2,2 <sup>f</sup>	315,0 <sup>a</sup>	+	-	+
SR-15*	ON784345	<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 10006	3,5 <sup>d</sup>	89,3 <sup>c</sup>	+	+	+
SR-31	MZ735960	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	2,2 <sup>f</sup>	316,0 <sup>a</sup>	+	+	+
SR-32	MZ735970	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	2,1 <sup>g</sup>	311,3 <sup>a</sup>	+	+	+
SR-34	MZ736068	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	1,0 <sup>h</sup>	12,3 <sup>e</sup>	-	-	-
SR-41	MZ736069	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	2,1 <sup>g</sup>	101,7 <sup>c</sup>	+	+	+
SR-44a	MZ736070	<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531	2,3 <sup>f</sup>	47,3 <sup>d</sup>	+	+	+
SR-44b	MZ740069	<i>Kluyvera cryocrescens</i> 12993	3,8 <sup>c</sup>	55,7 <sup>d</sup>	+	+	+
SR-54	MZ739464	<i>Kluyvera cryocrescens</i> 12993	3,5 <sup>d</sup>	54,0 <sup>d</sup>	+	+	+
SR-59	MZ740068	<i>Kluyvera cryocrescens</i> 12993	3,6 <sup>d</sup>	50,3 <sup>d</sup>	+	+	+
SR-61	MZ739464	<i>Kluyvera cryocrescens</i> 12993	3,7 <sup>c</sup>	52,7 <sup>d</sup>	+	+	+
SR-76*	ON784347	<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 10006	3,9 <sup>b</sup>	42,0 <sup>d</sup>	+	+	+
SR-93a	MZ736419	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	1,0 <sup>h</sup>	24,0 <sup>e</sup>	+	-	+
SR-93b	MZ736510	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	1,0 <sup>h</sup>	7,7 <sup>e</sup>	-	-	-
SR-95	MZ736420	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	1,0 <sup>h</sup>	5,7 <sup>e</sup>	-	-	+
SR-98*	ON784348	<i>Pantoea cypripedii</i> DSM 3873	4,4 <sup>a</sup>	198,0 <sup>b</sup>	+	+	+
FR-6	ON784350	<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 10006	1,0 <sup>h</sup>	5,0 <sup>e</sup>	+	+	-
FR-9	MZ736594	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	1,0 <sup>h</sup>	2,7 <sup>e</sup>	+	-	+
FR-11	ON784349	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Rhinoscleromatis</i> R-70	1,0 <sup>h</sup>	6,3 <sup>e</sup>	+	+	-
FR-14	MZ736599	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	1,0 <sup>h</sup>	7,0 <sup>e</sup>	-	-	+
FR-46	MZ736605	<i>Paenibacillus chibensis</i> JCM 9905	1,0 <sup>h</sup>	5,0 <sup>e</sup>	-	-	-
FR-48	MZ736607	<i>Paenibacillus chibensis</i> JCM 9905	1,0 <sup>h</sup>	10,3 <sup>e</sup>	-	-	-
FR-58	MZ736723	<i>Paenibacillus chibensis</i> JCM 9905	1,0 <sup>h</sup>	2,3 <sup>e</sup>	-	-	-
FR-69	MZ736722	<i>Paraburkholderia quartelaensis</i> CNPSO 3008	1,0 <sup>h</sup>	2,7 <sup>e</sup>	-	-	+
FR-70	MZ736860	<i>Paenibacillus albilobatus</i> h2	1,0 <sup>h</sup>	14,7 <sup>e</sup>	-	-	-
FR-72	-	Similaridade não encontrada	1,0 <sup>h</sup>	18,3 <sup>e</sup>	-	-	+

Fonte: O autor (2020).

Em geral, a comparação entre sequências do gene 16S rDNA permite diferenciar organismos de maneira eficiente até o nível de gênero na maioria dos filos bacterianos. Porém, ao nível de espécie, essa análise se torna limitada, havendo relatos na literatura de diferentes espécies bacterianas com sequências do gene 16S rDNA quase idênticas (Martens et al., 2008). Portanto, não há um consenso sobre a porcentagem de similaridade necessária para distinguir duas ou mais sequências ao nível de espécie, podendo haver diferenças quanto ao valor ideal para cada gênero bacteriano (Clarridge; Jill, 2004; Martens et al., 2008).

Alguns autores afirmam que valores de similaridade de 95,0% e 98,7% são suficientes para distinguir isolados bacterianos ao nível de gênero e espécie, respectivamente. Entretanto, esses valores foram estabelecidos a partir de um número limitado de espécies bacterianas, já tendo sido demonstrado que não condizem com a realidade em diversos gêneros (Beye et al., 2018; Rossi-Tamisier et al., 2015). Caso haja a necessidade de identificação dos isolados ao nível de espécie com maior segurança, é recomendável realizar o sequenciamento do genoma bacteriano completo. Assim, apesar do banco de dados do NCBI indicar sequências depositadas com maior probabilidade de serem a mesma espécie do microrganismo, aqui, será considerada a identificação até o nível de gênero somente.

Ao isolar rizobactérias podem ser obtidas RPCPs promissoras, mas que pertencem, porém, a gêneros associados a patógenos oportunistas para humanos como, por exemplo, *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp. ou *Klebsiella* spp. (Mendes et al., 2013; Santos et al., 2019). Entretanto, estas RPCPs podem não apresentar as mesmas características de linhagens patogênicas daquela espécie, como hiper mucoviscosidade ou genes de virulência (Clarridge; Jill, 2004; Mendes et al., 2013; Mukherjee et al., 2020), podendo ser utilizadas como bioinoculantes de maneira segura, como é o caso para diversas produtos biológicos disponíveis atualmente no mercado.

Além disso, há casos em que espécies pertencentes a gêneros tidos como patogênicos são separadas em um novo gênero por apresentarem características genéticas distintas não detectadas anteriormente, como no caso do gênero *Paraburkholderia*, originado do gênero *Burkholderia* (Sawana et al., 2014). Espécies do gênero *Enterobacter* podem ser encontradas associadas a cinco diferentes gêneros. Segundo Clarridge & Jill (2004), *Enterobacter* e *Citrobacter* são exemplos de gêneros polifiléticos e, como forma de tentar corrigir parcialmente este problema, algumas espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Enterobacter* foram transferidas para o gênero *Pantoea*. Assim, no contexto do presente



estudo, caso o potencial dos isolados seja confirmado em repetidos estudos em casa de vegetação, pode ser interessante a realização de outras análises moleculares a fim de classificar sua filogenia de forma mais assertiva e gerar maior segurança no seu uso como bioinoculantes (Mendes et al., 2013; Santos et al., 2019).

A presença de diferentes gêneros bacterianos é um fator vital para o solo, pois as atividades biológicas desempenhadas por estes microrganismos estão diretamente relacionadas à ciclagem de nutrientes e produção vegetal sustentável (Ahemad; Kibret, 2014). Após o crescimento em meio seletivo, o grupo de microrganismos ficou restrito a apenas oito gêneros (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Pantoea*, *Raoultella* e *Kluyvera*). Entretanto, é importante ressaltar que a real diversidade de gêneros provavelmente é maior considerando todos os isolados obtidos, sendo esse número restrito possivelmente em decorrência do processo de seleção realizado em meio de cultivo ácido com elevada concentração de  $Al^{3+}$ .

Mecanismos relacionados a promoção do crescimento de plantas são frequentemente observados em bactérias isoladas a partir da rizosfera, o que reforça a tese de que a planta promove ativamente a seleção por microrganismos que atuam de maneira benéfica sobre seu desenvolvimento (Luvizotto et al., 2010).

Em relação aos ensaios de avaliação da capacidade de solubilizar fontes inorgânicas de fósforo, os resultados positivos (ISF > 1,0) foram observados em 17 dos isolados, todos provenientes do solo rizosférico (SR), sendo que os ISFs considerados altos (> 3,0) ocorreram somente em isolados pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Kluyvera* e *Pantoea*. As rizobactérias isoladas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Paraburkholderia* não foram capazes de solubilizar P, dentre elas todas as 10 endofíticas (FR) e 4 do solo rizosférico (SR).

A solubilização de P por rizobactérias é um dos mecanismos mais importantes para as plantas, sendo uma característica frequente em bactérias presentes na superfície externa das raízes e no solo rizosférico (Sukweenadhi et al., 2015; Sylvester-Bradley et al., 1982). Há casos, inclusive, em que a maior eficiência do uso de P em determinados cultivares de milho foi associada ao maior potencial daquele genótipo em recrutar microrganismos solubilizadores (Oliveira et al., 2009). Outro ponto interessante para o manejo de leguminosas, como a soja e o feijão, é que algumas bactérias solubilizadoras de P promovem

maior eficiência na associação com bactérias noduladoras, as quais são extremamente importantes para a obtenção de nitrogênio nessas culturas (Arif et al., 2017).

Todos os 31 isolados produziram AIA na presença do precursor triptofano, com concentrações no meio de cultivo variando entre 2,4 e 315,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Na ausência do triptofano (dados não mostrados), 24 dos isolados produziram AIA e a concentração média foi de 2,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Destes 24, apenas 15 produziram quantidades maiores ou iguais a 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A maior produção de AIA na ausência do triptofano foi a do isolado *Klebsiella* sp. SR-9 (25,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esse resultado indica que estes isolados bacterianos produzem o AIA preferencialmente por vias dependentes do triptofano. Portanto, optou-se por considerar somente os resultados obtidos na presença desse precursor para avaliá-los.

Em média, os isolados com maior produção de AIA foram aqueles pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Pantoea*. Houve uma grande diferença entre as médias de produção de AIA das bactérias isoladas a partir do solo rizosférico (SR, 137,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e das endofíticas (FR, 7,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A prevalência da produção de AIA na presença do triptofano e a diferença notável entre a quantidade produzida por bactérias endofíticas (FR) e do solo rizosférico (SR) podem ter relação com a disponibilidade de triptofano proveniente dos exsudatos radiculares na rizosfera, o que favoreceria as bactérias que utilizam este aminoácido como precursor hormonal (Glick, 2014). Alguns autores citam a produção de AIA como uma característica comum observada em bactérias rizosféricas devido à sua função de sinalização, o que torna este fator importante para o estabelecimento do microrganismo junto à planta (Luvizotto et al., 2010; Shameer; Prasad, 2018).

Bactérias que produzem o AIA têm sido utilizadas em diversos estudos e sua eficiência como promotoras do crescimento de plantas, principalmente por meio do melhor enraizamento, reiteradamente comprovada (Batista et al., 2018;). O maior acúmulo de biomassa de raízes é um fator primordial para a sobrevivência da planta em situações de estresse hídrico ou nutricional, sendo assim, o uso de BPCPs que possam estimular o desenvolvimento radicular são uma estratégia promissora para todas as culturas agrícolas (Zhang et al, 2020b).

O balanço hormonal adequado é essencial para o pleno desenvolvimento da planta, sendo que situações de estresse podem prejudicar esse equilíbrio. Um dos principais hormônios associados à sinalização de estresse em plantas é o etileno, que tem como precursor o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC). Apesar de seus efeitos

benéficos, quando em excesso, o AIA pode induzir a produção excessiva de ACC, consequentemente gerando maior quantidade de etileno, prejudicando o crescimento da planta por direcionar parte de seu metabolismo para responder a um possível estresse (Glick, 2014). Assim, bactérias que produzem a enzima ACC-deaminase podem atuar como um dreno para o excesso de ACC, compensando o desbalanço hormonal e garantindo somente os efeitos benéficos de um fornecimento extra de AIA para a planta (Glick, 2014).

Outra importante contribuição das bactérias produtoras do AIA e da enzima ACC-deaminase é a potencialização que produzem na fixação de nitrogênio em plantas leguminosas por meio do estímulo a formação de nódulos, aumento da sobrevivência das bactérias noduladoras e redução da senescência de nódulos (Alemneh et al., 2020).

Das 21 bactérias avaliadas, incluindo isolados endofíticos e rizosféricos, foram capazes de crescer em meio de cultivo contendo ACC como única fonte de nitrogênio, indicando, de forma indireta, a produção da enzima ACC-deaminase. Em geral, as bactérias que apresentaram baixa produção de AIA testaram negativo no ensaio da ACC-deaminase, o que incluiu isolados dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Paraburkholderia* (TABELA 2).

Houve evidências da capacidade de fixar nitrogênio (FBN) em 21 dos isolados, dentre os quais 19 foram provenientes do solo rizosférico (SR) e apenas dois endofíticos (FR). Dentre as rizobactérias isoladas a partir do solo, somente dois não apresentaram capacidade de FBN (*Escherichia* sp. SR-12 e *Bacillus* sp. SR-34). De maneira semelhante, no trabalho de Rilling et al. (2018), foi reportada uma quantidade significativamente maior de bactérias diazotróficas na rizosfera em relação à endosfera de cultivares de trigo cultivadas em um solo ácido. Esta proporção é comum, visto que a maioria dos microrganismos diazotróficos são de vida livre ou associativos, ou seja, não-simbióticos como aqueles que formam nódulos em leguminosas, por exemplo (Cassetari et al., 2016).

A produção de sideróforos por rizobactérias é um importante fator que contribui para o desenvolvimento vegetal por meio do fornecimento de íons de Fe para a planta e, indiretamente, pela redução da população de microrganismos patogênicos, que são suprimidos pela indisponibilidade de Fe quelado aos sideróforos (Gu et al., 2020). Um segundo papel desempenhado pelos sideróforos bacterianos, e que ainda é pouco explorado, é a redução do estresse ocasionado por metais, incluindo o  $Al^{3+}$  (Schalk et al., 2011; Hu e Boyer, 1996). Desta forma, entende-se que a produção de sideróforos seja um importante mecanismo a ser

considerado, considerando o objetivo de promover o crescimento de plantas e reduzir o estresse por  $Al^{3+}$  em solos ácidos.

#### 4.5 Seleção dos isolados bacterianos mais promissores nos ensaios in vitro

Conforme estabelecido inicialmente, a capacidade de tolerar ambientes ácidos e com altas concentrações de  $Al^{3+}$  foi o primeiro critério de seleção para os isolados obtidos a partir da rizosfera da bacaba. O segundo critério eleito foi a capacidade de solubilização de fosfato a partir de fontes inorgânicas (ISF), devido a sua possível relação com a redução do teor de  $Al^{3+}$  e aumento no teor de P disponível no solo. Os demais ensaios (AIA, FBN, ACC e PS) foram utilizados como critérios adicionais, tendo o mesmo peso entre si para a seleção dos isolados.

A partir do segundo critério de seleção ( $ISF > 1,0$ ), todos os isolados endofíticos obtidos dos fragmentos de raízes (FR) da bacaba, além de quatro dos isolados do solo rizosférico (SR-34, SR-93a, SR-93b e SR-95), foram descartados como possíveis candidatos aos ensaios em casa de vegetação, devido à sua incapacidade em solubilizar P. Além disso, 10 dos isolados apresentaram baixa produção de AIA e foram incapazes de produzir ACC-deaminase (*Bacillus* sp. SR-34, SR-93b, SR-95, FR-14, *Paenibacillus* sp. FR-46, FR-48, FR-58, FR-70, *Paraburkholderia* sp. FR-69, e FR-72) (TABELA 2, Item 4.4), o que os tornou menos interessantes no contexto deste estudo.

Somando-se os ensaios realizados, 14 dos isolados (45% de todos os tolerantes à acidez e ao  $Al^{3+}$ ) apresentaram simultaneamente todos os mecanismos avaliados, sendo selecionados dentre estes, portanto, quatro bactérias que apresentaram elevado ISF (*Klebsiella* sp. SR-1, *Klebsiella* sp. SR-15, *Klebsiella* sp. SR-76 e *Pantoea* sp. SR-98) (TABELA 2, Item 4.4).

É interessante ressaltar que existem relatos de bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella* com grande potencial para uso na agricultura, apresentando diversas das características avaliadas no presente estudo, como solubilização de fosfato, produção de auxinas, produção de sideróforos, fixação de nitrogênio, atividade de ACC-deaminase, além de tolerância a metais pesados e redução de sua disponibilidade no solo (Mukherjee et al., 2020). Além disso, é sabido que bactérias pertencentes a gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*,

apresentam grande potencial para colonizar a superfície radicular, competir com a microbiota local e promover o crescimento de plantas (Di Benedetto et al., 2017).

Dentre os isolados obtidos que apresentaram tolerância à acidez e ao  $Al^{3+}$ , aqueles pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* foram os menos promissores pois, com exceção de três (SR-93a, SR-93b e SR-95), a maioria não apresentou capacidade de solubilizar P (ISP = 1,0) ou fixar nitrogênio (FBN [-]), além de terem produzido baixas concentrações de AIA (TABELA 2, item 4.5). Contrário ao que foi observado, na literatura existem diversos exemplos de linhagens rizosféricas de *Bacillus* spp. apresentando múltiplas características promotoras de crescimento de plantas, incluindo os mecanismos ensaiados no presente estudo (Batista et al., 2018; de Sousa et al., 2020; Saeid et al., 2018).

Além destes, o isolado de *Paraburkholderia* sp. (FR-69) e o isolado não identificado (FR-72) foram os únicos endofíticos que apresentaram capacidade de FBN, além de produzir AIA, ainda que em pequenas concentrações (TABELA 2, item 4.5). Assim, estes dois isolados potencialmente podem auxiliar no crescimento de plantas, considerando ainda que linhagens de *Paraburkholderia* sp. já são utilizadas atualmente em plantas cultivadas (Santos et al., 2019).

É interessante lembrar que, na rizosfera, as plantas realizam o recrutamento de microrganismos por meio dos exsudatos radiculares de acordo com suas necessidades nutricionais e fisiológicas (Yang et al., 2012), assim, nesse ambiente é comum observar menor diversidade de gêneros, porém uma maior riqueza de funções relacionadas à promoção de crescimento vegetal (Ramagnoli; Andreote, 2016). De fato, a comunidade bacteriana rizosférica é mais versátil na transformação, mobilização e solubilização de nutrientes, comparado aos solos adjacentes, fora da influência dos exsudatos radiculares (Ahemad; Kibret, 2014).

Além disso, já foi demonstrado por Emami et al. (2019) que a inoculação de plantas com RPCPs com múltiplos mecanismos é mais eficiente do que a inoculação com múltiplas RPCPs com mecanismos isolados. Estes autores observaram que as plantas inoculadas simultaneamente com rizobactérias endofíticas e rizosféricas apresentaram maior crescimento em comparação àquelas inoculadas com os mesmos microrganismos separadamente.

De maneira semelhante, na região amazônica, Batista et al. (2018) isolaram 96 bactérias a partir da rizosfera do guaraná (*Paullinia cupana*), dos quais 13 isolados

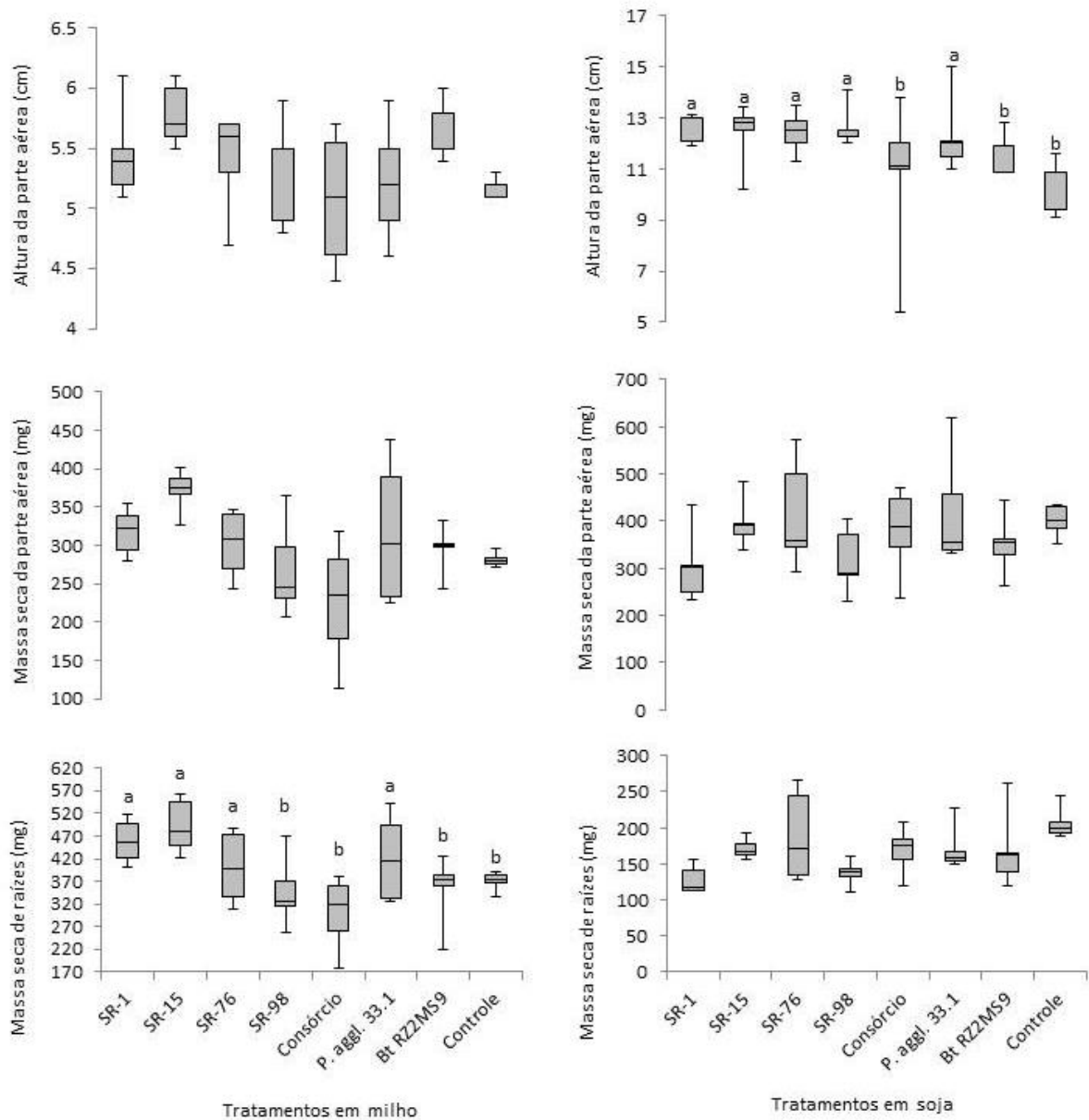
(equivalente a 13,5% do total obtido no estudo) apresentaram múltiplos mecanismos associados a promoção do crescimento de plantas, como FBN, produção de AIA, solubilização de Pi e produção de sideróforos. Quecine et al. (2012) demonstraram que uma linhagem de *Pantoea* sp. foi capaz de colonizar eficientemente plantas de cana-de-açúcar, atribuindo esta observação à sua capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfato.

#### **4.6 Desempenho dos isolados selecionados como bioinoculantes**

Conforme descrito anteriormente, os isolados obtidos a partir da rizosfera da bacaba que apresentaram os resultados mais promissores nos ensaios *in vitro* foram selecionados como potenciais bioinoculantes, sendo aplicados em ensaios em casa de vegetação com soja e milho, ou seja, uma leguminosa e uma gramínea.

Os efeitos das bactérias sobre as culturas variaram de acordo com a espécie vegetal e o parâmetro avaliado (Figura 12).

Figura 12. Resultado das análises estatísticas dos dados biométricos coletados a partir das plantas de milho e soja inoculadas com os isolados bacterianos obtidos da rizosfera da bacaba (SR-1, SR-15, SR-76 e SR-98) e dos controles positivos *Pantoea agglomerans* 33.1 (*P. aggl.* 33.1) (Quecine et al., 2012) e *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 (*Bt* RZ2MS9) (Batista et al., 2018). As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ( $\alpha = 5\%$ ).



Fonte: O autor (2022).

No caso do milho, a análise de variância (ANOVA) dos dados indicou diferença significativa somente para a massa seca de raízes, sendo que o teste de médias realizado (Scott-Knott a 5% de significância) apontou que os isolados SR-1, SR-15, SR-76 e o controle positivo (*P. agglomerans* 33.1) promoveram maior acúmulo em comparação ao tratamento não-inoculado (Controle), ao isolado SR-98, ao outro controle positivo (*Bt* RZ2MS9) e ao

consórcio entre os isolados da bacaba (SR-1, SR-15, SR-76 e SR-98). É interessante salientar que, mesmo não tendo sido estatisticamente significativas, as diferenças entre os tratamentos seguiram essa mesma tendência para os parâmetros de altura e massa seca da parte aérea no milho.

Já na soja, os parâmetros de massa seca de raízes e de parte aérea apresentaram tendências semelhantes, onde nenhum dos dois indicou diferença significativa entre os tratamentos, porém ambos apontaram para uma possível influência negativa dos inóculos, com médias geralmente menores em comparação ao controle negativo. Em contrapartida, para o parâmetro da altura de parte aérea, observou-se diferença significativa entre os tratamentos, sendo que tanto o controle positivo (*P. agglomerans* 33.1) quanto os isolados da bacaba (SR-1, SR-15, SR-76 e SR-98) produziram plantas mais altas em comparação ao controle negativo (não-inoculado), ao *Bt* RZ2MS9 e ao consórcio entre os isolados da bacaba.

É interessante verificar que ocorreram similaridades nos resultados obtidos para as duas culturas, sendo que os resultados superiores ao controle negativo estiveram associados aos isolados SR-1, SR-15, SR-76 e ao controle positivo (*P. agglomerans* 33.1). Da mesma forma, tanto na soja quanto no milho, o *Bt* RZ2MS9 e o consórcio dos isolados da bacaba apresentaram resultados inferiores, mas que não indicaram efeitos negativos sobre as plantas, haja vista sua equivalência estatística aos controles não-inoculados.

Em relação ao *Bt* RZ2MS9, o qual apresentou resultados extremamente promissores nos estudos realizados por Batista et al. (2018), a ausência de promoção de crescimento talvez possa ser explicada por fatores como o meio de cultivo, o método de inoculação, o substrato utilizado ou mesmo as variedades de soja e milho avaliadas, visto que todos estes fatores afetariam a produção de metabólitos, assim como o estabelecimento e a sobrevivência da bactéria junto às plantas. Já para os resultados observados em ambas as culturas para o tratamento onde foi aplicado um consórcio entre os isolados da bacaba, pode ter ocorrido uma interação negativa entre as bactérias, a qual não foi prevista devido à ausência de ensaios de co-cultivo *in vitro*.

Conforme citado anteriormente, os solos dos tratamentos foram coletados para avaliação de parâmetros químicos e verificação de possíveis alterações em decorrência da interação planta-bactéria com o milho (Tabela 3) ou com a soja (Tabela 4).



Tabela 3. Caracterização química dos solos cultivados com plantas de milho (cultivar DKB 390 – Bayer) inoculadas com bactérias obtidas da rizosfera da bacaba e controles positivos *Pantoea agglomerans* 33.1 (*P. aggl.* 33.1) (Quecine et al., 2012) e *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 (*Bt* RZ2MS9) (Batista et al., 2018). O tratamento “Controle” não foi inoculado com bactérias, recebendo somente um volume de solução salina (NaCl 0,85%) equivalente aos tratamentos inoculados.

	SR-1	SR-15	SR-76	SR-98	Consórcio	<i>P. aggl.</i> 33.1	<i>Bt</i> RZ2MS9	Controle
pH (CaCl <sub>2</sub> )	4,6	4,7	4,6	4,6	4,7	4,6	4,5	4,5
H + Al SMP (mmolc dm <sup>-3</sup> )	34,0	32,1	31,8	31,1	30,8	31,1	33,1	34,9
P (mg dm <sup>-3</sup> )	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0
K (mmolc dm <sup>-3</sup> )	0,50	0,37	0,42	0,41	0,65	0,40	0,38	0,35
Al KCl 1M (mmolc dm <sup>-3</sup> )	4,3	1,0	2,8	3,8	2,3	3,3	3,8	5,0
Ca KCl 1M (mmolc dm <sup>-3</sup> )	13,0	14,9	12,4	12,9	13,8	13,5	12,0	12,3
Mg KCl 1M (mmolc dm <sup>-3</sup> )	2,5	2,1	2,1	2,4	2,2	2,1	2,1	2,2
M.O. (g dm <sup>-3</sup> )	19,0	18,4	18,7	17,5	16,3	15,1	16,0	17,8
CTC (mmolc dm <sup>-3</sup> )	50,0	49,5	46,7	46,8	47,5	47,1	47,6	49,8
SB (mmolc dm <sup>-3</sup> )	16,0	17,4	14,9	15,7	16,7	16,0	14,5	14,9
V (%)	33	35	32	34	35	34	30	30
m (%)	21	5	16	19	12	17	21	25

Fonte: O autor (2019).

Nota: H+Al = acidez potencial; M.O. = Matéria Orgânica; t = Capacidade de troca de cátions efetiva; T = Capacidade de troca de cátions a pH 7,0; SB = Soma de Bases; V = Saturação por bases; m = Saturação por alumínio.

Tabela 4. Caracterização química dos solos cultivados com plantas de soja (cultivar TMG 7067 – Tropical Melhoramento Genético) inoculadas com bactérias obtidas da rizosfera da bacaba e controles positivos *Pantoea agglomerans* 33.1 (*P. aggl.* 33.1) (Quecine et al., 2012) e *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 (*Bt* RZ2MS9) (Batista et al., 2018). O tratamento “Controle” não foi inoculado com bactérias, recebendo somente um volume de solução salina (NaCl 0,85%) equivalente aos tratamentos inoculados.

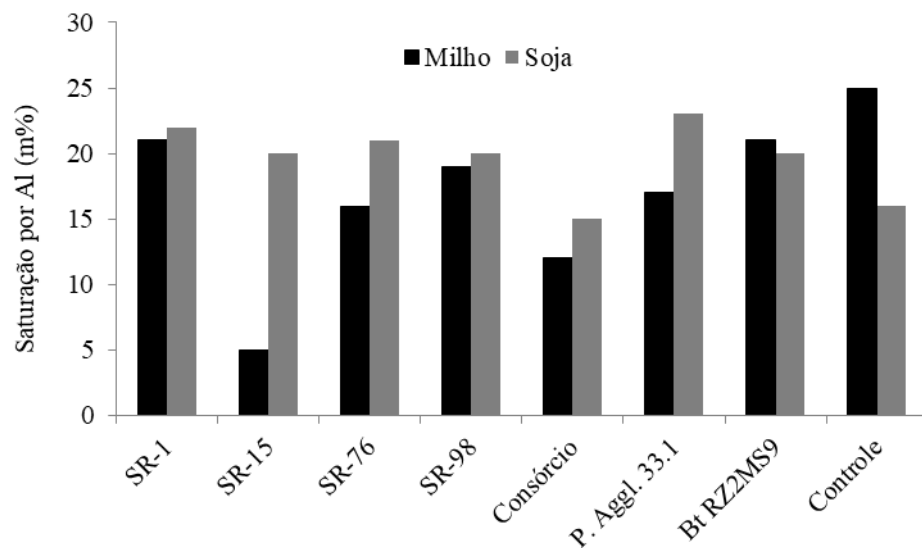
	SR-1	SR-15	SR-76	SR-98	Consórcio	<i>P. aggl.</i> 33.1	<i>Bt</i> RZ2MS9	Controle
pH (CaCl <sub>2</sub> )	4,6	4,6	4,6	4,6	4,7	4,5	4,6	4,7
H + Al SMP (mmolc dm <sup>-3</sup> )	33,0	33,8	35,7	33,8	31,1	34,2	32,4	31,8
P (mg dm <sup>-3</sup> )	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0	<7,0
K (mmolc dm <sup>-3</sup> )	0,60	0,55	0,55	0,63	0,59	0,50	0,59	0,58
Al KCl 1M (mmolc dm <sup>-3</sup> )	4,0	4,0	4,5	4,0	3,0	4,5	4,0	3,5
Ca KCl 1M (mmolc dm <sup>-3</sup> )	12,0	12,9	13,7	13,3	14,5	12,7	13,5	15,2
Mg KCl 1M (mmolc dm <sup>-3</sup> )	2,1	2,3	2,4	2,2	2,4	2,1	2,3	2,5
M.O. (g dm <sup>-3</sup> )	17,0	21,6	20,5	18,4	18,4	19,0	20,2	18,7
CTC (mmolc dm <sup>-3</sup> )	48,0	49,6	52,4	49,9	48,6	49,5	48,8	50,1
SB (mmolc dm <sup>-3</sup> )	15,0	15,8	16,7	16,1	17,5	15,3	16,4	18,3
V (%)	31	32	32	32	36	31	34	37
m (%)	22	20	21	20	15	23	20	16

Fonte: O autor (2019).

Nota: H+Al = acidez potencial; M.O. = Matéria Orgânica; t = Capacidade de troca de cátions efetiva; T = Capacidade de troca de cátions a pH 7,0; SB = Soma de Bases; V = Saturação por bases; m = Saturação por alumínio.

Primeiramente, vale ressaltar que as análises químicas foram realizadas a partir de amostras compostas feitas por meio da homogeneização dos solos das repetições contidas em cada tratamento. Sendo assim, não foi possível conduzir uma análise estatística para comparação das médias. Apesar disso, conforme observado pelos resultados obtidos para cada tratamento, alguns efeitos interessantes parecem ter ocorrido a partir da interação planta-bactéria, conforme destacado a seguir (Figura 13).

Figura 13. Saturação por Al (m%) média dos solos dos tratamentos feitos a partir da combinação entre plantas de milho (cultivar DKB 390 – Bayer) ou soja (cultivar TMG 7067 – Tropical Melhoramento Genético) inoculadas com bactérias obtidas da rizosfera da bacaba e dos controles positivos *Pantoea agglomerans* 33.1 (*P. aggl.* 33.1) (Quecine et al., 2012) e *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 (*Bt* RZ2MS9) (Batista et al., 2018).



Em todos os tratamentos avaliados a saturação por Al (m%) sofreu alguma variação em comparação ao tratamento controle (não-inoculado). No experimento com soja houve uma tendência de aumento médio de 31% na saturação por Al nos tratamentos que receberam inóculos bacterianos, exceto pelo consórcio entre os isolados da bacaba (redução de 6%). No experimento realizado com milho, por outro lado, os resultados foram bastante distintos, com os tratamentos inoculados gerando uma redução média de 37% na saturação por Al em comparação ao controle, com destaque para o isolado de *Klebsiella* sp. SR-15, o qual reduziu esse indicador em 80%.

Estas observações reforçam a importância de avaliar o desempenho de linhagens bacterianas em combinação com diferentes culturas, visto que os resultados podem variar de maneira significativa entre as espécies vegetais. Fatores como genótipo, estado nutricional, estresses bióticos e abióticos, entre outros, influenciam no estabelecimento do microrganismo

junto à planta, assim como nos metabólitos que serão produzidos por ambos a partir da interação planta-bactéria (Santos et al., 2018).

## 5 CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo a investigar as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) associados à rizosfera da bacaba (*Oenocarpus bacaba* MART.), uma palmeira nativa da Amazônia que apresenta potencial econômico. Os resultados obtidos indicaram que alguns dos isolados bacterianos, em especial *Klebsiella* sp. SR-15, são BPCPs promissoras, capazes de estimular o crescimento radicular em milho e a altura de plantas em soja, com um possível efeito sobre a redução da saturação por Al no solo rizosférico de milho. A redução da disponibilidade do Al e a promoção do crescimento de raízes do milho, possivelmente estão associados à capacidade das bactérias em solubilizar fósforo, produzir sideróforos e regular o crescimento radicular por meio da síntese de auxinas e redução do acúmulo do etileno, supostamente ocorrida por meio da ação da enzima ACC-deaminase.

## REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, p. 1-20, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- ALEMNEH, A.A.; ZHOU, Y.; RYDER, M.H.; DENTON, M.D. Mechanisms in plant growth-promoting rhizobacteria that enhance legume-rhizobial symbioses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p. 1133-1156, 2020. <https://doi.org/10.1111/jam.14754>.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).
- ANDREOTE, F.D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 528-539, 2014. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>.
- ARAÚJO, F.R.; LOPES, M.A. Diversity of use and local knowledge of palms (Arecaceae) in eastern Amazonia. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, p. 487–501, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0195-9>.
- ARIF, M.S.; RIAZ, M.; SHAHZAD, S.M.; YASMEEN, T.; ALI, S.; AKHTAR, M.J. Phosphorus-mobilizing rhizobacterial strain *Bacillus cereus* GS6 improves symbiotic efficiency of soybean on an aridisol amended with phosphorus-enriched compost. **Pedosphere**, v.27(6), p.1049-1061, 2017. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60366-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60366-7).
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Isolamento de micro-organismos endofíticos. In: ARAÚJO et al. (eds). **Micro-organismos endofíticos: Aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém, Pará: UFOPA, 2014. 257 p.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-86>.
- BATISTA, B.D.; LACAVA, P.T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N.S.; BONATELLI, M.L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E.W.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M.C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v.206, p.33-42, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.
- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, p. 399-406, 1976.
- BEYE, M.; FAHSI, N.; RAOULT, D.; FOURNIER, P-E. Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. **New Microbes and New Infections**, v. 22, p. 24-29, 2018. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.nmni.2017.12.009>.

BIANCO, C.; IMPERLINI, E.; CALOGERO, R.; SENATORE, B.; AMORESANO, A.; CARPENTIERI, A.; PUCCI, P.; DEFEZ, R. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. **Archives of Microbiology**, v. 185, p. 373-382, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0103-y>.

BILAL, S.; SHAHZAD, R.; KHAN, A.L.; KANG, S.; IMRAN, Q.M.; AL-HARRASI, A.; YUN, B.; LEE, I. Endophytic microbial consortia of phytohormones-producing fungus *Paecilomyces formosus* LHL10 and bacteria *Sphingomonas* sp. LK11 to *Glycine max* L. regulates physio-hormonal changes to attenuate aluminum and zinc stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 1273 p, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01273>.

BINI, D.; LOPEZ, M.V. Transformações microbianas do fósforo. In: Cardoso, E.J.B.N.; Andreote, F.D. **Microbiologia do Solo**. 2ª ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 149-167. Disponível em: [https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia\\_solo.pdf](https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf).

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, v. 108, p. 53-65, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02370099>.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E.; SILVERSTONET, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 535-538, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182744/pdf/aem00055-0213.pdf>.

CASSETARI, A.S.; GOMEZ, S.P.M.; SILVA, M.C.P. Fixação biológica de nitrogênio associativa e de vida livre. In: Cardoso, E.J.B.N.; Andreote, F.D. **Microbiologia do Solo**. 2ª ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 133-149. Disponível em: [https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia\\_solo.pdf](https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf).

CLARRIDGE, I.I.I.; JILL, E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 840-862, 2004. <https://dx.doi.org/10.1128%2FCMR.17.4.840-862.2004>.

DANISH, S.; ZAFAR-UL-HYE, M. ; MOHSIN, F.; HUSSAIN, M. ACC-deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria and biochar mitigate adverse effects of drought stress on maize growth. **PLoS One**, v.15, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230615>.

DHAWI, F.; DATTA, R.; RAMAKRISHNA, W. Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.97, p.390-399, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.028>.

DI BENEDETTO, N.A.; CORBO, M.R.; CAMPANIELLO, D.; CATALDI, M.P.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M.; FLAGELLA, Z. The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. **AIMS Microbiology**, v.3(3), p. 413-434, 2017. <https://doi.org/10.3934%2Fmicrobiol.2017.3.413>.

DIAS, A.C.F. Transformações do nitrogênio do solo. In: Cardoso, E.J.B.N.; Andreote, F.D. **Microbiologia do Solo**. 2ª ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 99-110. Disponível em: [https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia\\_solo.pdf](https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf).

DINIZ, F.V.; LIMA, Y.M.M.; da PAZ, F.S.; da SILVA, A.L.D.; SANTOS, G.S.; CARVALHO, C.M. Atividade enzimática de fungos endofíticos da bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Biota Amazônia**, v.10, p.7-11, 2020. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v10n3p7-11>.

DÖBEREINER, J.; *Azotobacter* em solos ácidos. **Boletim do Instituto Estadual de Experimentação Agrícola**, n. 11, p. 1-36, 1953. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148087/1/Azobacter-em-solos-acidos-R002.pdf>.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI, 60p, 1995. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98370/1/Como-isolar-e-identificar-bacterias.pdf>.

EMAMI, S.; ALIKHANI, H.A.; POURBABAEI, A.A.; ETESAMI, H.; SARMADIAN, F.; MOTESSHAREZADEH, B. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 19804–19813, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05284-x>

ENEBE, M.C.; BABALOLA, O.O. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 7821-7835, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9214-z>.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p.225-246, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>.

FARH, M.E-A.; KIM, Y-J.; SUKWEENADHI, J.; SINGH, P.; YANG, D-C. Aluminium resistant, plant growth-promoting bacteria induce overexpression of Aluminium stress related genes in *Arabidopsis thaliana* and increase the ginseng tolerance against Aluminium stress. **Microbiological Research**, v.200, p.45-52, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.004>.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985. doi:10.2307/2408678.

FERREIRA, M. das G.R. Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2005. Folder. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24783/1/folder-bacaca.pdf>. Acesso em 29 de maio de 2020.

FINCO, F.D.B.A.; KLOSS, L.; GRAEVE, L. Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) phenolic extract induces apoptosis in the MCF-7 breast cancer cells line via the mitochondria-dependent pathway. **Nutrition and Food Science Journal**, v. 5, p. 5-15, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.11.001>.

FU, S.F.; WEI, J.Y.; CHEN, H.W.; LIU, Y.Y.; LU, H.Y.; CHOU, J.Y. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. **Plant Signaling and Behavior**, v. 10, e1048052, 2015. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>.

GLICK, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, v. 169, p. 30-39, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.

GLICK, B.R.; KARATUROVIĆ, D.M.; NEWELL, P.C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology* 41(6):. doi: 10.1139/m95-070.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimations of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951. <https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.26.1.192>.

GROVER, S.P.; BUTTERLY, C.R.; WANG, X. *et al.* The short-term effects of liming on organic carbon mineralisation in two acidic soils as affected by different rates and application depths of lime. **Biology and Fertility of Soils**, v. 53, p. 431–443, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1196-y>.

GU, S.; YANG, T.; SHAO, Z.; WANG, T.; CAO, K.; JOUSSET, A.; FRIMAN, V-P.; MALLON, C.; MEI, X.; WEI, Z.; XU, Y.; SHEN, Q.; POMMIER, T. Siderophore-mediated interactions determine the disease suppressiveness of microbial consortia. **mSystems**, v. 5(3): e00811-19, 2020. <https://doi.org/10.1128%2FmSystems.00811-19>.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAWKES, C.V.; DeANGELIS, K.M.; FIRESTONE, M.K. Chapter 1 - Root interactions with soil microbial communities and processes. In: CARDON, Z.G.; WHITBECK, J.L. (eds.). **The Rhizosphere**. Elsevier, New York. 2007. 212 p. <https://doi.org/10.1016/B978-012088775-0/50003-3>.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168621/pdf/633233.pdf>.

HILLIS, D.M.; BULL, J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, v. 42, p. 182-192, 1993. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>.

HILTNER, L. Über nevere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Beurchsichtigung der Grundung und Broche. **Arbeiten des deutschen landwirtschaftliches geschäfts**, Berlin, v. 98, p. 59–78, 1904.

HU, X.; BOYER, G.L. Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62(11), p. 4044-4048, 1996. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4044-4048.1996>.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, p.1004-1011, 2009. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.47>.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N. (ed.). **Mammalian Protein Metabolism**, pp. 21-132, Academic Press, New York. 1969.

KIM, O-S.; CHO, Y-J.; LEE, K.; YOON, S-H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S-C.; JEON, Y.S.; LEE, J-H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p.716-721, 2012. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; LIU, J.; MAGALHAES, J.V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 576-598, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822>.

KONISHI, S.; SOUTA, I.; TAKAHASHI, J.; OHMOTO, M.; KANEKO, S. Isolation and characteristics of acid- and aluminum-tolerant bacterium. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 1960-1963, 1994. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1960>.

KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 18, p. 152-163, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>.

KRAVCHENKO, L.V.; AZAROVA, T.S.; MAKAROVA, N.M.; TIKHONOVICH, I.A. 2004. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. *Microbiology* 73(2): 195-198.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing, p.115-175. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. John Wiley & Sons, New York. 1991.

LAUVAI, J.; SCHUMACHER, M.; FINCO, F.D.B.A.; GRAEVE, L. Bacaba phenolic extract attenuates adipogenesis by down-regulating PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 cells. **Nutrition and Food Science Journal**, v. 9, p. 8-14, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2017.09.001>.

LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the western Amazon region as indicated by nodulation of siratro (*Macropitilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v.319, p.127-145, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9855-2>.

LÜTHEN, H. What can we learn from old Auxinology. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 702-707, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9527-4>.



- LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1829-1836, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0364-0>.
- MAHONEY, A.K.; YIN, C.; HULBERT, S.H. Community structure, species variation, and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of different winter wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-14, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00132>.
- MANTOVANELLI, B.C.; da SILVA, D.A.P.; CAMPOS, M.C.C.; GOMES, R.P.; SOARES, M.D.R.; dos SANTOS, L.A.C. Avaliação dos atributos do solo sob diferentes usos na região de Humaitá, Amazonas. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 58, p. 122-130, 2015. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.1822>.
- MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; VOS, P.D.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 200-214, 2008. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65392-0>.
- MCNEAR, D. H., Jr. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. **Nature Education Knowledge**, 4(3):1, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617/>.
- MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v.37, p.634-663, 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>.
- MORA, M.L.; DEMANET, R.; ACUÑA, J.J.; VISCARDI, S.; JORQUERA, M.; RENGEL, Z.; DURÁN, P. Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure. **Applied Soil Ecology**, v.115, p.19-26, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.013>.
- MOREIRA, A.; FAGERIA, N.K. Soil chemical attributes of Amazonas state, Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.40, p.2912-2925, 2009. <http://dx.doi.org/10.1080/00103620903175371>.
- MSIMBIRA, L.A.; SMITH, D.L. The roles of plant growth promoting microbes in enhancing plant tolerance to acidity and alkalinity stresses. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v.4, artigo 106, 14p, 2020. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00106>.
- MUKHERJEE, T.; BANIK, A.; MUKHOPADHYAY, S.K. Plant growth-promoting traits of a thermophilic strain of the *Klebsiella* group with its effect on rice plant growth. **Current Microbiology**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02032-0>.
- NASCIMENTO, F.X.; ROSSI, M.J.; SOARES, C.R.F.S.; McCONKEY, B.J.; GLICK, B.R. New Insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Phylogeny,

Evolution and Ecological Significance. **PLOS One**, v. 9(6), e99168, 2014.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099168>.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.

NEVES, L.T.B.C.; CAMPOS, D.C.S.; MENDES, J.K.S.; URNHANI, C.O.; ARAÚJO, K.G.M. Quality of fruits manually processed of açaí (*Euterpe oleracea* MART.) and bacaba (*Oenocarpus bacaba* MART.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 729-738, 2015.  
<https://doi.org/10.1590/0100-2945-148/14>.

NOGUEIRA, A.K.M.; de SANTANA, A.C. Análise de sazonalidade de preços de varejo de açaí, cupuaçu e bacaba no estado do Pará. **Revista de Estudos Sociais**, v. 11, p. 7-22, 2009.  
 Disponível em: <http://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/res/article/view/232/221>.

ODELADE, K.A.; BABALOLA, O.O. Bacteria, fungi and archaea domains rhizospheric soil and their effects in enhancing agricultural productivity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 3873, 2019.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph16203873>.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; SCOTTI, M.R.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782-1787, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>.

OZAWA, T.; IMAI, Y.; SUKIMAN, H.I.; KARSONO, H.; ARIANI, D.; SAONO, S. Low pH and aluminum tolerance of *Bradyrhizobium* strains isolated from acid soils in Indonesia. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.45, p.987-992, 1999.  
<https://doi.org/10.1080/00380768.1999.10414349>.

PAYNE, S.M. Detection, isolation and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 329-344, 1994. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1).

QUECINE, M.C.; ARAÚJO, W.L.; ROSSETO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7511-7518, 2012.  
<https://doi.org/10.1128/aem.00836-12>.

R CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

RAMAGNOLI, E.M.; ANDREOTE, F.D. Rizosfera. In: Cardoso, E.J.B.N.; Andreote, F.D. **Microbiologia do Solo**. 2ª ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 47-61. Disponível em: [https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia\\_solo.pdf](https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf).

- RAUSCH, T.; FRITZ, M.H.; UNTERGASSER, A.; BENES, V. Tracy: basecalling, alignment, assembly and deconvolution of sanger chromatogram trace files. **BMC Genomics**, v.21, p. 230, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6635-8>.
- RILLING, J.I.; ACUÑA, J.J.; SADOWSKY, M.J.; JORQUERA, M.A. Putative nitrogen-fixing bacteria associated with the rhizosphere and root endosphere of wheat plants grown in an andisol from southern Chile. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, article 2710, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02710>.
- ROSSI-TAMISIER, M.; BENAMAR, S.; RAOULT, D.; FOURNIER, P-E. Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 1929-1934, 2015. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.000161>.
- SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANIEK, J. Phosphorus solubilisation by *Bacillus* species. **Molecules**, v. 23, n. 2897, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- SANTOS, A.A.; da SILVEIRA, J.A.G.; GUILHERME, E.A.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A.C.; FIGUEIREDO, M.V.B. Changes induced by co-inoculation in nitrogen-carbon metabolism in cowpea under salinity stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49(4), p. 685-694, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.007>.
- SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 205, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.
- SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R.S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 429, 2014. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>.
- SCHALK, I.J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v. 13(11), p. 2844-2854, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x>.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- SHAMEER, S.; PRASAD, T.N.V.K.V. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, v. 84, p. 603-615, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>.

SILVA, S. Aluminium toxicity targets in plants. **Journal of Botany**, v. 2012, 8 p, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/219462>.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, p. 311-319, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000200008>.

SILVA-STENICO, M.E.; PACHECO, F.T.H.; RODRIGUES, J.L.M.; CARRILHO, E.; TSAI, S.M. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. **Microbiological Research**, v.160, p.429-436, 2005.

SINGH, R.P.; PANDEY, D.M.; JHA, P.N.; MA, Y. ACC deaminase producing rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-4 enhance abiotic stress tolerance in wheat plant. **PLOS One**, v. 17(5), e0267127, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267127>.

SINGH, S.; TRIPATHI, D.K.; SINGH, S.; SHARMA, S.; DUBEY, N.K.; CHAUHAN, D.K.; VACULÍK, M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v.137, p.177-193, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.005>.

de SOUSA, S.M.; de OLIVEIRA, C.A.; ANDRADE, D.L.; CARVALHO, C.G.; RIBEIRO, V.P.; PASTINA, M.M.; MARRIEL, I.E.; LANA, U.G.P.; GOMES, E.A. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. **Journal of Plant Growth Regulation**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, p. 401-419, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.

SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P.B.; MEYER, J.; VARGAS, L.K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, v.366, p.585-603, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1430-1>.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 001438, 2011. <https://dx.doi.org/10.1101%2Fcsheperspect.a001438>.

SUKWEENADHI, J.; KIM, Y.J.; CHOI, E.S.; KOH, S.C.; LEE, S.W.; KIM, Y.J.; YANG, D.C. *Paenibacillus yonginensis* DCY84<sup>T</sup> induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought, and salt stress. **Microbiological Research**, v. 172, p. 7-15, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.007>.

SUN, P.; TIAN, Q.Y.; CHEN, J.; ZHANG, W.H. Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 347-356, 2010. <https://dx.doi.org/10.1093%2Fjxb%2Ferp306>.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; La TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p. 15-22, 1982. <https://doi.org/10.1590/1809-43921982121015>.

THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SWINGS, J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. **Systematic and Applied Microbiology**, v.24, p.520–538, 2001. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00067>.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World population prospects 2019: Highlights. Disponível em: [https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf).

USP, L.-E.-. Posto Meteorológico “Professor Jesus Marden dos Santos” ESALQ - USP. Disponível em: <<http://www.leb.esalq.usp.br/posto/index.html>>. Acesso em: 01 de maio de 2022.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202005000100011>.

WANG, P.; YU, W.; ZHANG, J.; RENGEL, Z.; XU, J.; HAN, Q.; CHEN, L.; LI, K.; YU, Y.; CHEN, Q. Auxin enhances aluminium-induced citrate exudation through upregulation of *GmMATE* and activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in soybean roots. **Annals of Botany**, v. 118, p. 933-940, 2016a. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw133>.

WANG, Q.; NIAN, F.; ZHAO, L.; LI, F.; YANG, H.; YANG, Y. Exogenous indole-3-acetic acid could reduce the accumulation of aluminum in root apex of wheat (*Triticum aestivum* L.) under Al stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, p. 534-543, 2013. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000042>.

WANG, S.; REN, X.; HUANG, B.; WANG, G.; ZHOU, P.; AN, Y. Aluminium-induced reduction of plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) is mediated by interrupting auxin transport and accumulation in roots. **Scientific Reports**, v. 6, n. 30079, 2016b. <https://doi.org/10.1038/srep30079>.

YANG, T.; DING, Y.; ZHU, Y.; LI, Y.; WANG, X.; YANG, R.; LU, G.; QI, J.; YANG, Y. Rhizosphere bacteria induced by aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybeans in acid soil. **Plant and Soil Environment**, v.58, p.262-267, 2012. <https://doi.org/10.17221/652/2011-PSE>.

YOON, S. H.; HA, S. M.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 1613-1617, 2017. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.

ZHANG, S.; JIANG, Q.; LIU, X.; LIU, L.; DING, W. Plant growth promoting rhizobacteria alleviate aluminum toxicity and ginger bacterial wilt in acidic continuous cropping soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, artigo 569512, p. 1-9, 2020a. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569512>.

ZHANG, Y.; LI, Y.; HASSAN, M.J.; LI, Z.; PENG, Y. Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover via activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes. **BMC Plant Biology**, v. 20, 150, 2020b. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02354-y>.