

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

JOSÉ PETRÔNIO MENDES JÚNIOR

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
ASSOCIADAS A VIDEIRAS NO VALE DO SÃO FRANCISCO**

RECIFE-PE

2020

José Petrônio Mendes Júnior
Engenheiro Agrônomo

**Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a videiras no
Vale do São Francisco**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciência do Solo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Giselle Gomes
Monteiro Fracetto

Coorientadores:

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Júnior

Dr. Davi José Silva

Recife-PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M538 Mendes, José Petrónio Mendes Júnior
Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a videiras no Vale do São Francisco /
José Petrónio Mendes Júnior Mendes. - 2020.
83 f. : il.
- Orientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto.
Coorientador: Davi Jose Silva.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo, Recife, 2020.
1. RPCP. 2. Rizosfera. 3. Crescimento vegetal. 4. Vitis vinifera L. 5. Xanthomonas campestris pv.
viticola. I. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro, orient. II. Silva, Davi Jose, coorient. III. Título

CDD 631.4

JOSÉ PETRÔNIO MENDES JÚNIOR

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a videiras no Vale do São Francisco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2020

Prof.^a Dr.^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto
Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Ana Dolores Santiago de Freitas
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Felipe José Cury Fracetto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, é preciso reconhecer a dedicação de tempo, confiança e afeto empregados a nós. Ser grato é mais que um estado, trata-se do reconhecimento da nossa inutilidade se isolados. Devemos agradecer a todas as manifestações que nos fizeram evoluir.

À Professora Dr.^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto pela orientação concedida ao longo dos anos, paciência, incentivo e pela amizade.

Aos monges Beneditinos, eterna gratidão pelo empenho na construção da casa onde fui graduado. A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de alcançar o conhecimento herdado.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo fomento prestado para realização da pesquisa.

Aos coorientadores dessa pesquisa, Dr. Davi José Silva, Dr. Felipe José Cury Fracetto e Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Júnior, pela parceria e disposição em colaborar com o andamento da pesquisa.

Aos que compõem o grupo de pesquisa no qual me insiro, amigos de mesma orientação: Felipe Martins, Vitor Lucas, Tiago Santos, Cíntia Gouveia, Lucia Nunez, Stella e Yure. Obrigado pelos momentos compartilhados.

Aos amigos da pós-graduação: Vinícius dos Santos, Abraão Cícero, Adriana Bezerra, Aleksandro Ferreira, Emanuelle Silva, Janyelle lemos, Aglair Cardoso, Juliet Emília, Juscelia da Silva, Leandro Reis, Marilya Sousa, Sueide Karina, Nara Núbia, Luiz Henrique, William Ramos, Isamor Gomes e Artur Silva.

Aos meus pais, Jozinete Alves e Petrônio Mendes, por me concederem a vida, amor, acolhimento e a oportunidade de alcançar a educação que não tiveram. Aos meus avôs e avós, vocês representam o primeiro e mais forte amparo da vida. A minha tia, Lúcia Mendes, por todo esforço realizado. Aos meus irmãos, por seu incondicional amor. A todos aqueles que fizeram ou fazem parte de minha família, obrigado.

A família Fracetto (Felipe, Giselle e Tuxo), a qual considero como parte da minha família, serei eternamente grato por seus ensinamentos, conselhos, confiança, orientação e amizade. Nunca esquecerei de tudo quanto fizeram por mim, vocês são incríveis. Onde quer que a vida me leve, os levarei comigo e contarei que conheci as melhores pessoas que poderia em vida.

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a videiras no Vale do São Francisco

RESUMO

O cultivo de uvas finas de mesa no Vale do São Francisco está entre as atividades agrícolas de maior valor econômico na região, principalmente para o estado de Pernambuco. A produção de uvas finas de mesa na região é baseada no sistema de cultivo convencional. Contudo, o esgotamento de recursos naturais, a estagnação da produtividade ao longo dos anos e a necessidade de atender as demandas de sustentabilidade exigem inovações por parte da agricultura. RPCP possuem mecanismos que podem influenciar o desenvolvimento vegetal e proporcionar melhorias na produtividade agrícola local, sem demandar excessivamente de insumos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de rizobactérias, isoladas a partir da rizosfera de videiras inseridas no Vale do São Francisco, em desempenharem os seguintes mecanismos: solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido indol-acético, formação de biofilme e antibiose direta a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, das quais foram testadas 423 bactérias. Posteriormente, 15 RPCP com os melhores resultados tiveram seu 16S rRNA sequenciado. Foram encontradas 95 rizobactérias capazes de realizar ao menos um dos seis mecanismos avaliados. O maior Índice de Solubilização de fosfato de cálcio foi de 2,09 indicando baixa capacidade de solubilização. Apenas duas rizobactérias possuíam a enzima nitrogenase. A maior produção de AIA verificada foi de 688 uM. Apenas 11,27% das bactérias tiveram resultado positivo para formação de biofilme. Foram verificados percentuais de inibição do crescimento por antibiose de 100% e 88%. As RPCP tiveram como principais gêneros associados: *Pseudomonas* (20%), *Stenotrophomonas* (13%) e *Bacillus* (13%). Portanto, a rizosfera de videiras possui rizobactérias capazes de realizar os mecanismos testados e que são capazes de ser isoladas e manipuladas *in vitro*.

Palavras-chave: RPCP. Rizosfera. Crescimento vegetal. *Vitis vinifera* L. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Plant growth-promoting rhizobacteria associated with vines in the São Francisco Valley

ABSTRACT

The cultivation of fine table grapes in the São Francisco Valley is among the agricultural activities of greatest economic value in the region, mainly for the state of Pernambuco. The production of fine table grapes in the region is based on the conventional cultivation system. However, the depletion of natural resources, the stagnation of productivity over the years and the need to meet the demands of sustainability demand innovations on the part of agriculture. RPCP have mechanisms that can influence plant development and provide improvements in local agricultural productivity, without excessively demanding inputs. In this sense, the present study aimed to evaluate the capacity of rhizobacteria, isolated from the rhizosphere of vines inserted in the São Francisco Valley, to perform the following mechanisms: phosphate solubilization, biological nitrogen fixation, indole-acetic acid production, biofilm formation and direct antibiosis to *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, of which 423 bacteria were tested. Subsequently, 15 RPCP with the best results had their 16S rRNA sequenced. 95 rhizobacteria capable of performing at least one of the six evaluated mechanisms were found. The highest rate of calcium phosphate solubilization was 2.09, indicating low solubilization capacity. Only two rhizobacteria had the enzyme nitrogenase. The highest production of AIA verified was 688 μM . Only 11.27% of the bacteria tested positive for biofilm formation. Percentages of growth inhibition by antibiosis of 100% and 88% were verified. The main associated genera of the RPCPs were: *Pseudomonas* (20%), *Stenotrophomonas* (13%) and *Bacillus* (13%). Therefore, the rhizosphere of vines has rhizobacteria capable of carrying out the tested mechanisms and which are capable of being isolated and manipulated in vitro.

Keywords: PGPR. Rhizosphere. Plant growth. PGPR. *Vitis vinifera* L. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** As nove fronteiras planetárias propostas e o papel da agricultura no impulsionamento do seu status atual22
- Figura 2.** Representação esquemática da colonização bacteriana na rizosfera de plantas superiores, bem como as compartimentações do ambiente rizosférico em ectorizosfera, rizoplanto e endorizosfera.....26
- Figura 3.** Processo de construção e seleção da estrutura microbiana associada à massa de solo geral, ao solo rizosférico e a endorizosfera e as influências dos fatores sobre o microbioma conforme há a aproximação da raiz28
- Figura 4.** Localização dos pontos utilizados para coleta das amostras de solo rizosférico para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano36
- Figura 5.-** Representação esquemática do plano de coleta das amostras de solo utilizadas para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano.37
- Figura 6.** Efeito da diluição seriada do solo rizosférico na ocorrência de UFCs em meio TSA para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano44
- Figura 7.** Estimativa de UFC cultiváveis, em exponencial, relacionadas ao solo rizosférico. Em A, o gráfico em boxplot é referente aos valores obtidos para as áreas de estudo em geral. Em B, o desdobramento dos resultados obtidos por área para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano.....45
- Figura 9.** Agrupamento hierárquico pelo coeficiente de Jaccard em forma de dendrograma circular de acordo com a similaridade de ocorrência dos descritores morfológicos dos isolados bacterianos objetos de estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano51

- Figura 10.** Eficiência da solubilização de fosfato de cálcio pelo índice de solubilização (IS) dos isolados bacterianos que exibiram resultado positivo para esse teste nos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano52
- Figura 11.** Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados bacterianos que exibiram resultado positivo para esse teste nos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano.54
- Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose a 1% com os produtos de PCR da amplificação do gene *nifH* das RPCPs que apresentaram resultado positivo em teste de formação de película em meio JNFB para caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano56
- Figura 14.** Estimativa da síntese de AIA pelas RPCP associadas a rizosfera de videiras, inseridas no VSF58
- Figura 15.** Porção de isolados bacterianos capazes de realizar produção de exopolissacarídeos na forma de biofilme dos isolados bacterianos que exibiram resultado positivo para esse teste nos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano60
- Figura 16.** Expressão da inibição de crescimento microbiano de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* avaliado, em meio de cultura TSA coinoculado com as RPCP isoladas a partir da rizosfera de videiras, para estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a rizosfera de videiras no semiárido pernambucano61
- Figura 17.** Percentual de Inibição de Crescimento (PIC) microbiano de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* avaliado, em meio de cultura TSA coinoculado com RPCP isolados a partir da rizosfera de videiras, para estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a rizosfera de videiras no semiárido pernambucano62
- Figura 18.** Agrupamento de acordo com as especificações das RPCPs quanto a realização de mecanismos de promoção de crescimento de plantas por RPCPs associadas a rizosfera de videiras no Semiárido pernambucano 66

Figura 19. Árvore filogenética (método Neighbor-Joining e Kimura) construída com base em sequencias parciais do gene 16S rRNA de rizobactérias isoladas da rizosfera de videiras do Vale do São Francisco.....71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Coordenadas geográficas dos pontos em que foram coletadas as amostras de solo para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano38
- Tabela 2** Variedades de uva em cultivo por área na data de coleta, anos de cultivo e o manejo de adubação.....38
- Tabela 3.** Índices de diversidade de Shannon e de Espécie Equivalente (S_H) para populações bacterianas cultiváveis em meio TSA obtidos por área de amostragem dos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano50
- Tabela 4** Especificações das RPCPs quanto a realização de mecanismos de promoção de crescimento de plantas por RPCPs associadas a rizosfera de videiras no semiárido pernambucano.....64
- Tabela 5.** Relação de RPCP e espécies relacionadas de acordo com a similaridade genética de sequências do 16S rRNA no genbank do BLAST. As espécies foram relacionadas de acordo com a cobertura do fragmento e seu percentual de identidade68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Hipóteses	20
1.2 Objetivo Geral	20
1.3 Objetivos Específicos	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Tendências Ambientais e a Participação da Indústria Agrícola	21
2.2 O Microbioma de Plantas	24
2.2.1. A formação do microbioma rizosférico	25
2.2.2 O microbioma de <i>Vitis vinífera</i>	29
2.3 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas – Mecanismos diretos e indiretos.....	30
2.3.1 Mecanismos diretos.....	31
2.3.2 Mecanismos indiretos.....	32
2.4 Pesquisas Envolvendo o uso de RPCP associadas à videiras	33
2.5 A Viticultura no Vale do São Francisco	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Descrição do local de coleta e processo de amostragem	36
3.2 Isolamento das colônias bacterianas	38
3.3 Caracterização morfológica e armazenamento	39
3.4 Capacidade de solubilização de fosfatos	39
3.5 Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio	40
3.6 Avaliação da fixação assimbiótica de N ₂	40
3.7 Autenticação da FBN dos isolados responsivos para FBN em tubos.....	41
3.8 Avaliação da capacidade de síntese de Ácido Indol-acético (AIA).....	41
3.9 Avaliação da capacidade de formação de biofilme	41
3.10 Antibiose direta à <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	42
3.11 Extração de DNA das RPCPs	42
3.12 Sequenciamento do 16S rRNA	43
3.13 Estatística dos dados	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44

4.1 Estimativa do número de UFC	44
4.2 Caracterização morfológica dos isolados bacterianos	47
4.3 Capacidade de solubilização de fosfatos	52
4.4 Fixação Biológica de Nitrogênio	55
4.5 Síntese de AIA	57
4.6 Formação de biofilme	59
4.7 Antibiose direta a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	61
4.8 Especificações dos mecanismos por RPCP.....	63
4.9 Análise do sequenciamento do 16S rRNA	67
5. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

A uva está entre as frutas mais consumidas no Brasil e no mundo. Uvas finas de mesa englobam variedades da espécie *Vitis vinifera* L., incluindo híbridos. O termo “uvas finas” se relaciona com sua origem europeia e a sensibilidade aos tratamentos culturais. De modo geral, uvas finas de mesa apresentam cachos visualmente atraentes, sabor doce e são consideradas resistentes ao transporte, manuseio, além de possuírem boa conservação pós-colheita.

Historicamente, a maior região produtora de uvas no Brasil se concentra no sul. Entretanto, o nordeste brasileiro recebeu investimentos que permitiram o desenvolvimento da agricultura. A expansão da tecnologia de irrigação foi um dos principais investimentos que possibilitou essa transformação, principalmente na região do Vale do São Francisco (VSF) - região localizada no entorno do Rio São Francisco. Atualmente, o VSF é o maior produtor de uvas finas de mesa, com destaque para os estados de Pernambuco e Bahia. Estes estados possuem condições edafoclimáticas favoráveis que permitem a colheita de até dois ciclos de produção no período de um ano. Apesar de tais condições favoráveis, agricultores do VSF cada vez mais tentam superar suas produtividades.

Para atingir altas produtividades são empregados tratamentos culturais intensivos. Práticas como a adubação mineral são periodicamente realizadas muitas vezes sem levar em consideração a real necessidade da cultura. O manejo da fertilidade, na grande maioria dos casos, é realizado desconsiderando as atuais condições de fertilidade do solo. Por outro lado, observa-se o contínuo crescimento da população mundial que exigirá maiores esforços da indústria de produção de alimentos. Portanto, percebe-se a necessidade de encontrar alternativas para a produção de alimentos.

Micro-organismos do solo são capazes de desempenhar diversas funções, entre elas a promoção de crescimento de plantas. O uso de micro-organismos promotores de crescimento de plantas (MPCP) tem se mostrado uma alternativa bastante viável por seus efeitos benéficos às culturas. Tais MPCP podem ser fungos, bactérias endofíticas, bactérias de vida livre ou ainda rizobactérias, as quais correspondem ao grupo de bactérias que colonizam a região rizosférica. A rizosfera, por sua vez, compreende a interface entre o solo e a raiz das plantas (até 3 mm de distância) onde ocorrem as interações com micro-organismos de forma dinâmica e

intensa. Este grupo de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) tem maior especificidade associativa devido os exsudados radiculares.

Diversas famílias de plantas com alto valor econômico agregado já foram estudadas e possuem RPCP específicas como é o caso da soja, milho, sorgo e tantas outras. Contudo, nenhuma prospecção foi realizada até o momento para a família Vitaceae no VSF, apesar de sua grande importância econômica principalmente para o nordeste.

A rizosfera de videiras possivelmente constitui um importante microhabitat para RPCP. Dessa forma, o solo rizosférico de videiras seria importante fonte biotecnológica para a prospecção. Procedimentos de caracterização de RPCP foram realizados a fim de avaliar potenciais fontes biológicas que contribuam com a sustentabilidade agrícola. Nesse sentido, a avaliação de mecanismos atrelados a RPCP foram testados. O presente estudo consiste no passo inicial para a produção futura de um bioinoculante para a viticultura.

1.1 Hipóteses

A rizosfera de videiras abriga uma alta diversidade de rizobactérias que possuem diferentes mecanismos de promoção de crescimento de plantas. As RPCP cultiváveis *in vitro* são capazes de expressar mecanismos de promoção de crescimento. As RPCP isoladas podem servir de base para futura produção bioinoculantes a fim de alcançar uma produção agrícola de uva mais sustentável.

1.2 Objetivo Geral

Realizar a prospecção de RPCP a partir da rizosfera de videiras do Vale do São Francisco.

1.3 Objetivos Específicos

1. Isolar rizobactérias cultiváveis;
2. Avaliar a capacidade de rizobactérias realizarem mecanismos de promoção de crescimento de plantas;
3. Selecionar RPCP de acordo com eficiência de seus mecanismos de promoção de crescimento de plantas;
4. Identificar geneticamente tais RPCP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tendências Ambientais e a Participação da Indústria Agrícola

Rockström et al. (2009a), estudaram o sistema terrestre a fim de identificar processos capazes de gerar mudanças ambientais que fossem potencialmente nocivas a humanidade. Esses limiares foram denominados primeiramente de limites planetários. Mais recentemente essa denominação foi reformulada para fronteiras planetárias, mas mantendo seu conceito e aperfeiçoando os processos responsivos. Fronteiras planetárias são pontos críticos/inflexíveis de mudanças induzidas pelo homem no sistema terrestre, ou seja, consistem em limiares operacionais seguros para o desenvolvimento da humanidade (KAHILUOTO, 2019).

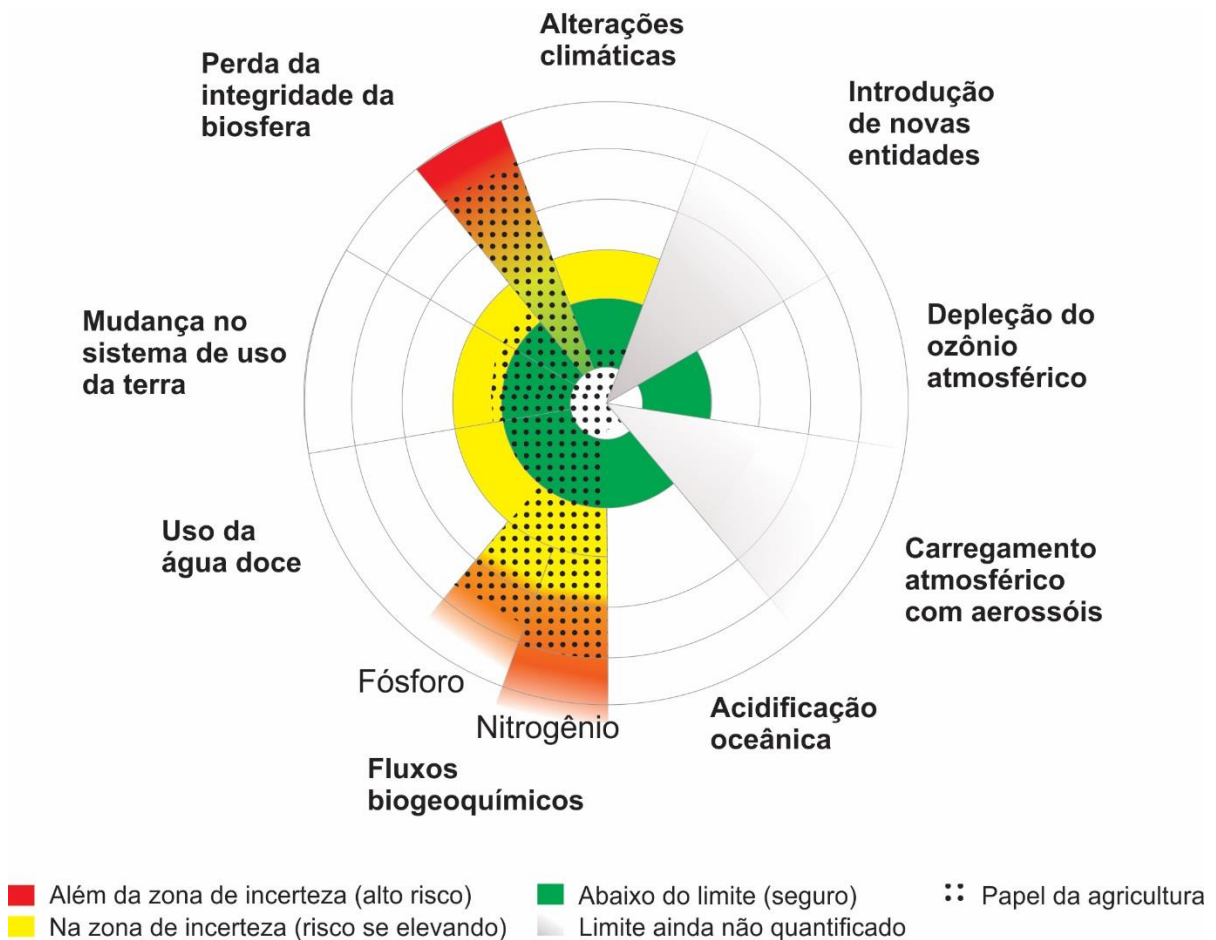
Em sua primeira publicação Rockström et al. (2009b) estabeleceram nove fronteiras planetárias. Atualmente, o número de fronteiras permanece o mesmo, alterando-se apenas alguns dos processos. São eles: a mudança no sistema de uso da terra, o uso da água doce, os fluxos biogeoquímicos, a perda da integridade da biosfera, as alterações climáticas, a acidificação oceânica, a depleção do ozônio atmosférico, o carregamento atmosférico de aerossóis e a introdução de novas entidades (STEFFEN et al., 2015; KAHILUOTO, 2019). A Figura 1 traz a interpretação visual das fronteiras planetárias, o estado atual de cada processo e a participação da agricultura no impulsionamento do risco.

Entre as nove fronteiras planetárias definidas, a humanidade já ultrapassou o limite de segurança de quatro delas, que são: a integridade da biosfera, a mudança de uso da terra, uso da água doce e os fluxos biogeoquímicos. Como principal agente impulsionador para o cruzamento das fronteiras planetárias temos o sistema industrial de produção agrícola. A causa disso é a necessidade de significativa quantidade de recursos para a produção agrícola e, em sua grande maioria, recursos não renováveis. Além disso, o uso de fertilizantes e outros agroquímicos alteram a naturalidade do comportamento dos elementos na biosfera (RAY et al., 2013).

Davis et al. (2016) relataram que até 2050 o setor de produção precisará de alterações capazes de promover maior eficiência no uso dos recursos. Segundo os autores a acessibilidade alimentar impulsionou o papel da agricultura nas alterações ambientais. Por conta disso, promover ganhos de produção para grandes produtores já não será suficiente para atender a demanda alimentar até o meio do século XXI. Os

autores ainda reiteram que as tendências de produção para os próximos anos podem não corresponder às expectativas. Sendo mais sensato, portanto, investir em práticas que otimizem a gestão de recursos na agricultura.

Figura 1. As nove fronteiras planetárias propostas e o papel da agricultura no impulsionamento do seu status atual



Fonte: Acervo pessoal, adaptado de Kahiluoto (2019).

Springmann et al. (2018) advertiram que as tendências do consumo ocidental poderiam desestabilizar funções ecossistêmicas de regulação. No que compete ao setor de produção, os autores relataram a carência de mudanças tecnológicas capazes de promover melhorias no rendimento agrícola, eficiência alimentar e mudanças nas práticas de manejo.

Estima-se que o sistema de produção alimentar tenha aplicado cerca de 104 Tg de nitrogênio e 18 Tg de fósforo na forma de fertilizantes (HEFFER; GRUÈRE; ROBERTS, 2017). Até 2050 há uma tendência de intensificação desse processo em

até 50% caso não haja mudanças significativas nas formas de produção (SPRINGMANN et al., 2018).

A indústria de fertilizantes não tem apresentado inovações tecnológicas em seu modo de produção, apesar de existir há mais de 150 anos. Em muito, isso se deve a seguridade da taxa de fornecimento de nutrientes mediante aplicação, à relativa praticidade de fabricação e ao desinteresse devido aos argumentos econômicos (CHOJNACKA; MOUSTAKAS; WITEK-KROWIAK, 2020). Entretanto, há uma iminente crise associada a esse setor devido ao esgotamento dos recursos naturais não renováveis que são necessários para a produção de fertilizantes, principalmente fosfatados (SANCHEZ; BUOL, 1975; CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009; YANG et al., 2019). Diante de tais desafios, o setor agrícola necessita de soluções capazes de atendê-lo de forma integrativa.

Pesquisadores têm se esforçado para encontrar alternativas levando em consideração o viés ambiental (ADESEMOYE; TORBERT; KLOEPPER, 2009; BASU; RABARA; NEGI, 2017). Nesse sentido, observando a agricultura orgânica, pesquisadores relacionaram a produção agrícola com a biodiversidade microbiana associada às plantas. Além dos benefícios relacionados à produtividade agrícola, essa agricultura organogênica (aquela que refuta o uso de produtos químicos sinteticamente produzidos) pode melhorar aspectos relativos à biodiversidade do solo, a vida útil agrícola sem prejuízos ecossistêmicos (BHARDWAJ et al., 2014).

Nesse contexto, a descoberta de produtos de base biológica, ou ainda micro-organismos benéficos, são importantes aliados para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Esse processo é conhecido como bioprospecção, em que são criados bioprodutos que podem ter como base micro-organismos vivos, enzimas ou seus metabólitos secundários. Além de poder atender a indústria agrícola, bioprodutos são importantes para os setores farmacêutico e alimentar (MÜLLER; OBERMEIER; BERG, 2016).

Considerando organismos eucarióticos como meta-organismos, micro-organismos constituiriam significativa parte de seus hospedeiros. Assim, o microbioma associado estaria em estreita simbiose com seu meta-organismo. Dessa forma, cada organismo eucariótico possui especificidade de diversidade do seu microbioma. Portanto, compreender o comportamento da diversidade microbiana associada às espécies constitui um importante passo para alcançar bioprodutos com melhores

resultados (REINHOLD-HUREK et al., 2015; MÜLLER; OBERMEIER; BERG, 2016; COMPANT et al., 2019).

2.2 O Microbioma de Plantas

Plantas possuem comunidades microbianas que estão associadas a seus órgãos. A caracterização genotípica dos componentes microbianos nas diferentes partes vegetais (raiz, caule, folhas e frutos) é chamada de microbioma. O perfil microbiano associado às plantas é específico e esse padrão é responsável por prover funções de suporte ao crescimento e sanidade vegetal por interações planta-microbioma (COMPANT et al., 2019).

Estima-se que cada planta seja colonizada por mais de mil espécies diferentes de micro-organismos, sendo a maior parte não cultivável em meio de cultura (LAMBAIS et al., 2005; MÜLLER; OBERMEIER; BERG, 2016). A composição do padrão de comunidades depende de fatores bióticos e abióticos, mas principalmente dos metabólitos secundários e da fisiologia vegetal. Portanto, o desenvolvimento e formação do microbioma das plantas estaria intimamente atrelado à espécie vegetal, sua variedade genética e as condições de cultivo que lhe são aplicadas (PÉREZ-JARAMILLO; MENDES; RAAIJMAKERS, 2016).

O processo de colonização é crucial para o estabelecimento do microbioma e sua funcionalidade (OLDROYD, 2013). Essa etapa de colonização depende de alguns passos. Primeiramente, deve haver o reconhecimento entre a planta hospedeira e as comunidades microbianas. Para isso, as plantas iniciam um processo de comunicação química por transdução de sinais. Em resposta, micro-organismos movimentam-se em direção à planta por quimiotaxia e respondem com outros sinalizadores a fim de serem reconhecidos. Posteriormente, ocorre o processo de aderência a superfície (seja ela filosfera, carposfera, dermosfera ou rizosfera). Caso sejam micro-organismos endofíticos ou patogênicos, ocorre o passo de infecção. Por fim, ocorre a colonização e o crescimento populacional para o estabelecimento das interações (BAIS et al., 2006).

A diversidade do microbioma de plantas pode proporcionar melhorias no crescimento e a sanidade vegetal. Isso se deve à capacidade que os micro-organismos possuem de promover o crescimento das plantas diretamente pelo fornecimento de nutrientes, ou indiretamente mediante atividades antagonistas contra

patógenos (BERG, 2009). Portanto, é necessário reconhecer as potenciais fontes para a biotecnologia e compreender sua diversidade e complexidade de formação.

2.2.1. A formação do microbioma rizosférico

Desde a semente, a planta possui um microbioma associado herdado de sua planta mãe, o microbioma presente na espermosfera. Essas são as primeiras interações que ocorrem entre micro-organismos e plantas, e que são responsáveis pela formação vegetal e sanidade (FLORES, 2015). Após o contato da planta com o solo e seu estabelecimento, a rizosfera é a principal interface micro-organismos-planta, pois o solo é o habitat que reserva a maior diversidade microbiana ambiental (VIGDIS; ØVREÅS; THINGSTAD, 2002).

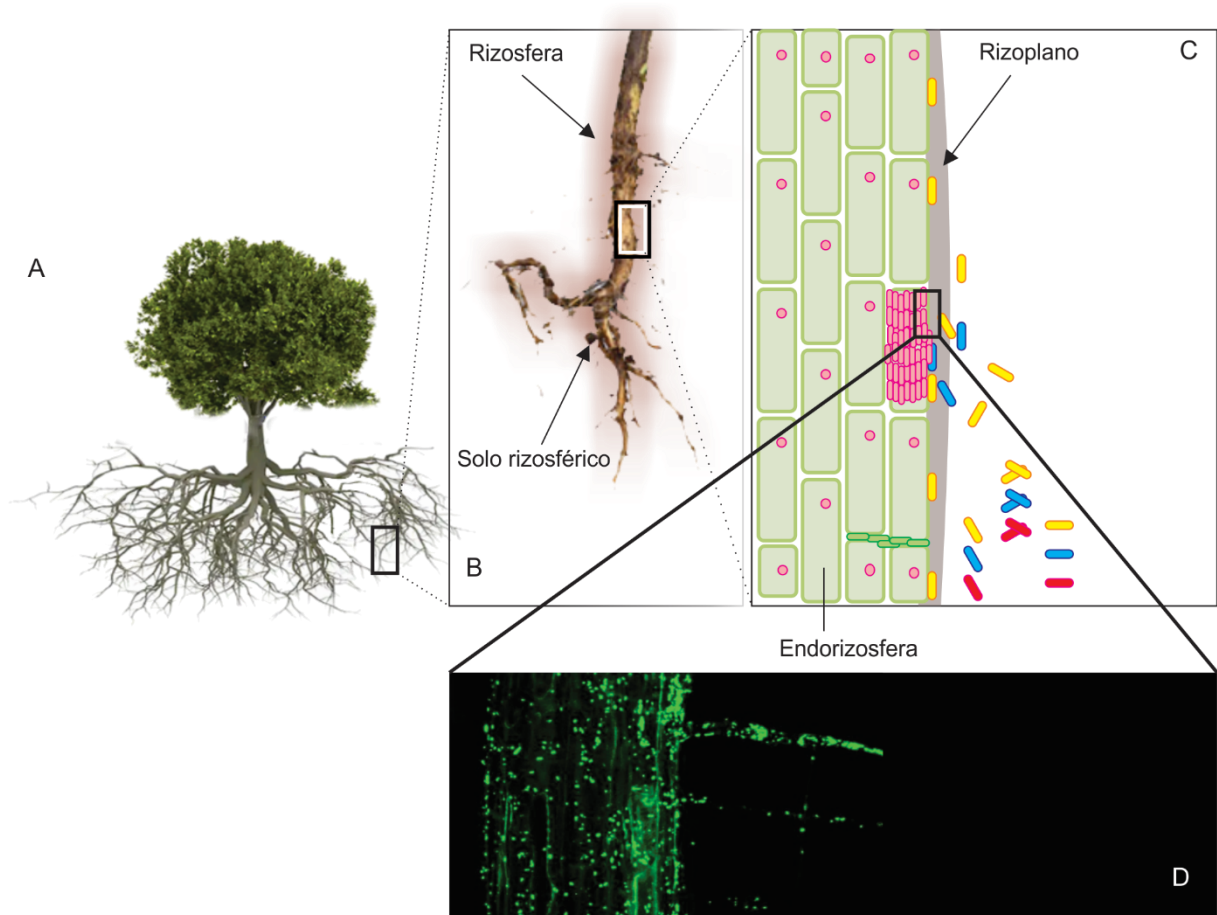
A rizosfera corresponde a região de íntimo contato entre o solo e as raízes das plantas e que é marcada pela intensa atividade metabólica de micro-organismos do solo. Alguns autores definem como sendo a porção de solo aderida às raízes e/ou o solo que dista da superfície da raiz em até 0,5 mm (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015).

A rizosfera pode ser compartimentada em três microhabitats: ectorizosfera, rizoplano e endorizosfera. A porção mais externa da rizosfera é conhecida como ectorizosfera, a qual inclui o rizoplano. Ela corresponde ao solo adjacente às raízes. O rizoplano é a parte em contato entre a superfície da raiz e o solo. A porção mais interna e íntima entre planta-solo-microbioma é chamada de endorizosfera. Essa região inclui os tecidos radiculares (rizoderme e córtex) e os micro-organismos associados a essa porção são denominados endofíticos (BERG et al., 2014).

A rizosfera possui características e propriedades que diferem da massa geral do solo. A exsudação de ácidos e outros compostos orgânicos são responsáveis por promover influências na atividade biológica rizosférica devido à alta taxa de nutrientes que são depositados (PHILLIPS; FINZI; BERNHARDT, 2011). Tais condições favorecem a formação de um nicho ecológico específico que seleciona comunidades de micro-organismos intensamente ativos e eficientes na transformação e transporte de nutrientes e água do solo para as plantas. Assim, a rizosfera abriga a maior complexidade e atividade biológica. Contudo, conforme ocorre a aproximação em direção às raízes se observa maior especificidade de comunidades microbianas em virtude dos fatores edáficos e ambientais (UROZ et al., 2010; FLORES, 2015; PÉREZ-JARAMILLO; MENDES; RAAIJMAKERS, 2016).

A Figura 2 ilustra a rizosfera, suas compartimentações e a forma de colonização do microbioma associado às raízes de plantas superiores.

Figura 2. Representação esquemática da colonização bacteriana na rizosfera de plantas superiores, bem como as compartimentações do ambiente rizosférico em ectorizosfera, rizoplano e endorizosfera



Em A – Representação de uma planta formada e seu sistema radicular exposto indicando a formação de microhabitats; B – Aproximação em direção às raízes, demarcação da rizosfera e indicação do solo rizosférico (aderido às raízes); C – Compartimentações da rizosfera em: endorizosfera, rizoplano e ectorizosfera; D – Exemplo de microscopia em tecido radicular colonizado por inoculação com bactérias geneticamente modificadas com genes fluorescentes. Fonte: Acervo pessoal. Imagem adaptada de Reinhold-Hurek et al. (2015).

O conhecimento acerca da existência de um microbioma associado às plantas é bastante antigo (KLOEPPER et al., 1980). Contudo, a compreensão sobre como as plantas moldam suas comunidades microbianas ainda é incipiente. Isso se deve ao fato de que a maioria dos estudos sobre esse tema envolvem simbioses dualísticas, sejam elas positivas ou negativas como, por exemplo, as interações com patógenos e as associações com rizóbios. Com isso, a compreensão acerca do microbioma e sua modulação pelas plantas é subestimada (REINHOLD-HUREK et al., 2015).

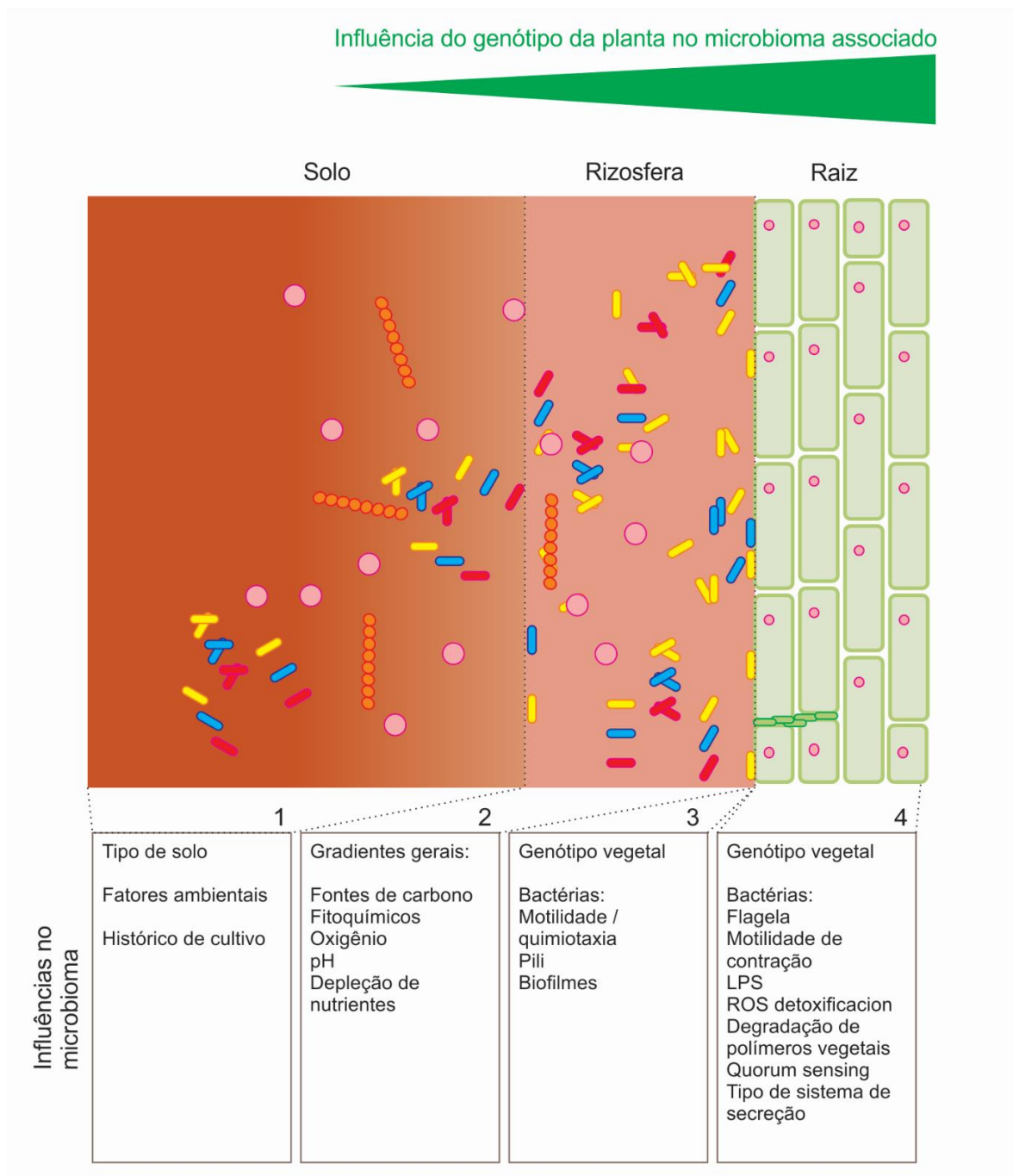
As plantas recrutam seu microbioma a partir da exsudação de mucilagens, ácidos orgânicos, células mortas e hormônios pela raiz. Tais compostos fazem com que o nicho rizosférico se torne altamente rico em carbono e outros nutrientes cuja comunidade microbiana possui alta afinidade (REINHOLD-HUREK et al., 2015). Micro-organismos associados às raízes das plantas são transferidos horizontalmente e selecionados de acordo com as características que o ambiente rizosférico impõe (BAIS et al., 2006). A zona rizosférica geralmente possui pH mais ácido que a massa geral de solo, com isso a disponibilidade de nutrientes nessa porção do solo é modificada. Devido a intensidade da ocorrência de processos na rizosfera os micro-organismos associados a essa região possuem intensa atividade metabólica (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015). Com isso, alguns grupos microbianos estão mais intimamente associados à rizosfera, pois adquiriram vantagens adaptativas evolutivamente como: tolerância ao pH, produção de exopolissacarídeos, pili, formação de biofilme e dependência de fitoexudados (BERG; SMALLA, 2009).

De forma geral, os principais filos do domínio bactéria que compõem a rizosfera de plantas superiores são: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacterias, Bacteroidetes, Verrucomicrobia e Planctomycetes (UROZ et al., 2010). Contudo, a composição, diversidade e abundância das comunidades microbianas do solo irão depender de fatores associados ao ambiente edáfico e a planta (VIGDIS; ØVREÅS; THINGSTAD, 2002; BAIS et al., 2006).

Como já mencionado, o solo é o ambiente que abriga maior diversidade microbiana (VIGDIS; ØVREÅS; THINGSTAD, 2002). Contudo, a composição de nichos relacionados ao solo revela a formação de um gradiente microbiano (Figura 3). Assim, a massa geral do solo consistiria em um reservatório e conforme ocorre a aproximação em direção à raiz, o comportamento da diversidade e atividade microbiana são modulados (BULGARELLI et al., 2013). As comunidades presentes no solo são moduladas de acordo com propriedades e características inerentes ao ambiente edáfico e ao histórico de vegetação. À medida que se encaminha para a raiz (rizosfera), as comunidades microbianas sofrem mais influência da deposição de carbono e outros nutrientes, da saturação de oxigênio e pH. No rizoplano, as comunidades são intimamente relacionadas com o genótipo vegetal e por isso possuem menor complexidade. Por fim, micro-organismos mais específicos se associam a endorizosfera a qual impõe naturalmente restrições para o

estabelecimento de simbioses. Por isso, a diversidade nesse nicho é reduzida (BAIS et al., 2006; BULGARELLI et al., 2013; REINHOLD-HUREK et al., 2015).

Figura 3. Processo de construção e seleção da estrutura microbiana associada à massa de solo geral, ao solo rizosférico e a endorizosfera e as influências dos fatores sobre o microbioma conforme há a aproximação da raiz



Descrição, em: 1 – As comunidades presentes no solo dependem, sobretudo, do tipo de solo, condições ambientais e do histórico de cultivo; 2 – As comunidades microbianas presentes na rizosfera são moldadas pela rizodeposição, as fontes de carbono, a saturação de oxigênio, o pH rizosférico e a perda de elementos; 3 – O rizoplane é a segunda interface de maior seletividade. Nessa região, as comunidades microbianas sofrem maior influência de fatores atrelados ao genótipo vegetal. Assim,

bactérias presentes no rizoplane necessitam de habilidades específicas para se manter nesse nicho, como: formação de biofilme, capacidade de motilidade e responsividade à quimiotaxia; 4 – A endorizosfera abriga a menor complexidade de diversidade microbiana, pois naturalmente a planta seleciona comunidades de micro-organismos que sejam capazes de estabelecer simbiose com o genótipo hospedeiro. Fonte: Acervo pessoal, adaptado de (REINHOLD-HUREK et al., 2015).

2.2.2 O microbioma de *Vitis vinífera*

Zarraonaindia et al. (2015) verificaram o microbioma associado a videiras na porção solo, folhas, flores, bagas e raízes. Seus resultados indicaram que o microbioma da parte aérea de videiras é derivado da composição microbiológica do solo. Cerca de 37% a 42% das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) presente em diferentes porções da parte aérea são compartilhadas a partir do solo. Amplitudes similares de compartilhamentos foram verificadas na UTOs nos compartimentos do solo, de 33% a 48%. Ocorreu a predominância de alguns filos nas amostras de solo e raízes. Proteobacteria compunha 32% do microbioma do solo e 57% do microbioma associado às raízes. O segundo filo que prevaleceu, em termos de abundância, foi Acidobacteria (19% no solo; 10% na raiz). Outros filos também foram associados ao microbioma de videiras, são eles: Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Chloroflexi, Fimicutes, Nitrospirae e outras UTOs não identificadas. Ao avaliar potenciais funcionalidades do microbioma associado ao solo e às raízes, foram encontrados genes relacionados à: aquisição e metabolismo de ferro, dormência e esporulação, metabolismo de potássio, produção de sideróforos e proteção do DNA por esporulação.

Novello et al. (2017) em estudo sobre o microbioma da rizosfera de videiras, caracterizaram dois estados fenológicos (floração e início da frutificação) em dois compartimentos do solo (a massa de solo geral e o solo rizosférico). Os resultados revelaram que a fase fenológica da planta possuía efeito insignificante sobre a diversidade microbiana quando comparado com o efeito rizosfera. Contudo, foram estabelecidas relações entre a abundância de determinados filos presentes do domínio Bacteria e o sistema de cultivo adotado (convencional e manejo integrado de pragas). Em sistemas conservacionistas, Actinobacterias e Proteobacterias possuíam maior expressão devido à maior diversificação de fontes de nutrientes, principalmente carbono orgânico, que favorecem a abundância de micro-organismos oligotróficos K os quais possuem ampla capacidade metabólica. Sistemas não conservacionistas, por sua vez, estimulam o crescimento de populações copiotróficas (estrategistas-r) que se aproveitam da alta disponibilidade de nutrientes advindos de

fertilizantes e pesticidas para sua multiplicação. Assim, a ocorrência de patógenos em áreas de produção de uvas pode ser estimulada mediante a escolha do sistema de cultivo adotado. Nesse sentido, comunidades de bactérias promotoras de crescimento de plantas também podem ser reduzidas em função da escolha do sistema de cultivo.

De acordo com Bona et al (2018), bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* constituiriam os principais produtores de proteínas em solos sob cultivo de uva. Na rizosfera, Actinobacterias seriam responsáveis pela maior expressão de proteínas em conjunto com Proteobacteria. Segundo os autores, micro-organismos benéficos estariam mais ativos que os maléficos, em termos de expressão proteica. Na porção rizosférica, um conjunto de proteínas específico estaria ligado a degradação de lignina, oxidação da amônia, fornecimento de ATP e Coenzima-A e outros. Contudo, as principais proteínas expressas na região rizosférica estavam envolvidas no metabolismo do fósforo e nitrogênio. A massa de solo geral, por sua vez, possuía grupos de proteínas que foram relacionadas com proteínas expressas por patógenos humanos que possuam genes de resistência a antibióticos.

Sabendo das possibilidades, mecanismos e existência dos micro-organismos promotores de crescimento de plantas, pesquisadores desenvolveram a rizoengenharia. A rizoengenharia é responsável por realizar o acesso às comunidades de micro-organismos rizosféricos, avaliar quanto aos seus mecanismos de promoção de crescimento e desenvolver vias para sua utilização como bioinoculantes. Seu objetivo é favorecer a população de rizobactérias que promovam o crescimento de plantas por estratégias que podem ser desde o ajuste de nutrientes à inoculação de isolados modificados geneticamente. Para tanto é necessário, primeiramente, conhecer os mecanismos de promoção de crescimento de plantas que são desempenhados pelas comunidades de micro-organismos do solo, em especial rizobactérias (ARSLAN et al., 2017). Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal fazem parte da comunicação química entre microbioma-planta e podem ser divididos em diretos e indiretos (HALDAR; SENGUPTA, 2016).

2.3 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas – Mecanismos diretos e indiretos

2.3.1 Mecanismos diretos

Os mecanismos diretos das RPCP são aqueles que influenciam diretamente no seu desenvolvimento e crescimento e que estão ligados ao fornecimento de nutrientes. Entre os mecanismos diretos os principais são: a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a solubilização de fosfatos (SF) e a produção de fitormônios (PF) (KLOEPPER; SCHROTH, 1981; BHARDWAJ et al., 2014).

Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) - Consiste na conversão do dinitrogênio gasoso presente na atmosfera para amônia por procariotos que têm a enzima nitrogenase. A nitrogenase é complexo enzimático composto por duas subunidades: 1 – ferro-proteína: responsável pela transferência de elétrons; 2 – ferro-molibdênio-proteína que promove a redução do N_2 . Nenhuma planta é capaz de realizar o processo de conversão e/ou fixação do nitrogênio e usá-lo diretamente para seu crescimento (GUPTA et al., 2015; VICENTE; DEAN, 2017). A FBN pode ser realizada por Rizobactérias Fixadoras de Nitrogênio (RFN) as quais podem fornecer nitrogênio por meio de associação simbiótica ou não simbiótica (BHARDWAJ et al., 2014). A forma simbiótica exibe a estrutura de nódulos radiculares em espécies de planta da família *Fabaceae*, as quais abrigam as comunidades de bactérias fixadoras no interior do tecido radicular. A forma não simbiótica é realizada por diazotróficos de vida livre e estabelecem relações com espécies de plantas de distintas famílias (DILWOTH, 1974; OLDROYD, 2013).

Solubilização de Fosfatos - Rizobactérias Solubilizadoras de Fosfato (RSF) são capazes de tornar formas fosfáticas ligadas à grupamentos metálicos em formas disponíveis, e assim o P disponibilizado pode ser assimiladas por plantas. A principal via é a solubilização de fosfatos durante a degradação de substratos por meio da exsudação de ácidos orgânicos. A redução do pH do meio atua como um agente quelante dos elementos que acompanham o íon fosfato. O processo é mediado por duas enzimas: a glicose-desidrogenase e a ácido-glucônico desidrogenase. A glicose é oxidada a ácido glucônico, pela glicose desidrogenase, e posteriormente a enzima ácido-glucônico desidrogenase oxida o ácido glucônico a ácido 2-cetoglucônico. Isso faz com que o pH entorno da colônia seja reduzido e os prótons de H^+ extruídos solubilizem os íons fosfatados (CHAGAS et al., 2010). Estima-se que apenas uma pequena porção de RPCP sejam capazes de realizar esse mecanismo. Aproximadamente, cerca de 20% das bactérias do solo solubilizariam fosfatos de forma eficiente (SOLANKI; KUNDU; NEHRA, 2018).. Esses mecanismos podem

liberar o fósforo adsorvido aos sítios por meio de troca de ligantes solubilizando o P junto a outros elementos como K/Ca/Fe/Al.

Produção de Fitormônios - Algumas rizobactérias produzem fitormônios como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno alterando a expressão hormonal da planta. Desse modo, a produção de fitormônios pode promover a proliferação celular, alteração na conformação estrutural da planta, aumento da produção de raízes secundárias, supressão de doenças entre outras expressões (HALDAR; SENGUPTA, 2016; JHA; PANWAR; JHA, 2018).

2.3.2 Mecanismos indiretos

Os mecanismos indiretos dizem respeito a ação que as rizobactérias exercem como biocontroladores de agentes fitopatogênicos. Enquadram-se como mecanismos indiretos que promovem o crescimento de plantas: a antibiose, resistência sistêmica induzida e a produção de exopolissacarídeos e biofilme (GUPTA et al., 2015).

Antibiose - Consiste na inibição do crescimento de outros micro-organismos por meio da produção de substâncias antibióticas. Este é um dos mecanismos mais estudados, principalmente pela indústria farmacêutica, para promoção do biocontrole. Além de antibióticos algumas rizobactérias produzem cianeto de hidrogênio (HCN) que reduz a densidade populacional de fitopatógenos (BASU; RABARA; NEGI, 2017).

Produção de Sideróforos - Sideróforos são substâncias de baixo peso molecular capazes de quelar o ferro existente no solo e transporta-lo para o interior de célula bacteriana. Este mecanismo é tido por alguns pesquisadores como uma estratégia de desenvolvimento e especialização na assimilação do ferro, pois no solo seu estado molecular não se encontra em uma forma prontamente assimilável. Apesar de ser abundante, o ferro é encontrado predominantemente em sua forma férrica (3+) que é pouco solúvel, logo pouco assimilável. Dessa forma, rizobactérias produtoras de sideróforos cooperam como crescimento de plantas limitando o ferro para outros micro-organismos fitopatogênicos. Contudo, é possível que plantas utilizem o ferro quelado com sideróforos por receptores presentes na superfície da célula bacteriana. Após a entrada no citoplasma o ferro é então liberado na forma de ferro ferroso (KLOEPPER et al., 1980; KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2018).

Resistência Sistêmica Induzida (RSI) - Uma das formas de ativar o mecanismo de defesa de plantas é por meio de agentes externos que antecedam a infecção, conhecidos como indutores de resistência sistêmica. Fatores bióticos e

abióticos podem promover tal efeito. Nesse contexto, o biocontrole por meio de rizobactérias do solo é uma importante ferramenta no controle de doenças. As rizobactérias que incitam tal mecanismo nas plantas envolvem a sinalização de hormônios como ácido jasmônico e etileno estimulando assim a resposta do sistema de defesa vegetal (ADREES et al., 2019).

Formação de biofilme – Algumas RPCPs podem produzir polissacarídeos. Essas substâncias podem ser intracelular, estruturais ou extracelulares. Tal mecanismo é importante, pois está intimamente atrelado à formação de biofilme. Biofilmes podem ser formados em diversas superfícies e são o resultado da intração de bactérias. RPCPs produtoras de biofilme podem auxiliar as plantas em processos como: solubilização de nutrientes, absorção de água e nutrientes, proteção contra agentes fitopatogênicos, resistência a estresses ambientais e proteção contra dessecação (TEWARI; ARORA, 2014).

2.4 Pesquisas Envolvendo o uso de RPCP associadas à videiras

Barka; Nowak e Clement (2006) testaram um isolado bacteriano *Burkholderia phytofirmans*, promotora de crescimento de plantas, em plântulas de *Vitis vinífera* L. Os autores verificaram que *B. phytofirmans* era capaz de colonizar tecidos internos de videiras e assim reduzir a susceptibilidade ao congelamento. A inoculação com *B. phytofirmans* reduziu a atividade da enzima amilase sob condições de congelamento devido ao aumento do acúmulo de prolina nos tecidos vegetais. A prolina é uma molécula orgânica capaz de desempenhar múltiplas funções em processos de estresse ambiental. Desta forma, demonstrou-se que RPCPs podem influenciar significativamente a resistência de videiras ao congelamento. Apesar da condição de congelamento não serem características do Vale do São Francisco, o estudo demonstra a importância das RPCP na resistência a condições climáticas extremas. Nesse sentido, RPCPs que sejam capazes de aumentar a tolerância ao congelamento/frio podem auxiliar no prolongamento do tempo de armazenamento pós-colheita das uvas.

Já se demonstrou que RPCP podem contribuir com a redução do acúmulo de metaloides em tecidos vegetais. Funes Pinter et al. (2018), avaliando o efeito da inoculação com *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens* em condições controladas de contaminação com AsIII verificaram melhorias no

crescimento vegetal, como: aumento da produção de frutos, redução do efeito de toxicidade, aumento de biomassa, aumento de atividade de enzimas antioxidantes e a redução do acúmulo do metal nos tecidos. Tais resultados são de grande importância uma vez que o arsênico está atrelado a insumos agrícolas (herbicidas, inseticidas, estimulantes de crescimento para plantas e outros). A mitigação da concentração de AsIII e outros metais/metaloídes pelo uso de RPCP, demonstra a possibilidade de inclusão de rizobactérias decompositoras de xenobióticos em técnicas de remediação.

Andreolli et al. (2016), avaliaram a diversidade de isolados bacterianos endofíticos capazes de promover o crescimento de videiras, bem como a ocorrência de mecanismos atrelados à promoção de crescimento. Seus resultados demonstraram que a atividade da enzima ACC-desaminase por bactérias associadas à videira é de baixa ocorrência. Solubilizadores de fosfatos, por sua vez, possuíam maior expressividade, mas 50% dos isolados pertenciam ao gênero *Pantoea*. Além desses mecanismos, a síntese de AIA, a produção de sideróforos e atividades antimicóticas foram constatadas. Dessa forma, demonstrou-se a necessidade de estudos envolvendo técnicas de microbiologia clássica (cultivo *in vitro*) a fim de fornecer ideias de bioprodutos que sejam economicamente aplicáveis a agricultura e que auxiliem no desenvolvimento sustentável.

Embora existam estudos sobre a rizosfera de videiras e sua estrutura de comunidades, ainda são escassos os trabalhos de rizoengenharia, que compreendam o isolamento e possibilidade de uso de RPCP como bioinoculantes para a uva. A grande maioria dos trabalhos se concentram em estudos de fertilidade, fertirrigação e irrigação, pois visam apenas melhores rendimentos sem levar em consideração a sustentabilidade produtiva e a longevidade agrícola (SILVA; SILVA; BASSOI, 2016; ANDRADE et al., 2017; PICCIN et al., 2017; SERRANO et al., 2017). Portanto, é necessário entender as relações existentes na rizosfera de videiras e suas potenciais aplicações biotecnológicas para a agricultura. Tal necessidade é ainda mais importante quando vinculada à problemáticas como as de regiões produtoras de uva no Vale do São Francisco.

2.5 A Viticultura no Vale do São Francisco

O Vale do São Francisco (VSF) é a região localizada em torno do Rio São Francisco a qual inclui os estados de Pernambuco de Bahia. O VSF é um polo de produção e exportação de uvas finas de mesa. A região possui condições climáticas que provocam aceleração nos processos fisiológicos da planta permitindo a colheita de até dois ciclos e meio no período de um ano. Atualmente, o VSF é responsável por cerca de 90% a 99% das uvas finas de mesa exportadas pelo Brasil (ARATA; HAUSCHILD; SCKOKAI, 2017). Apesar das condições ambientais dessa região já proverem vantagem de mercado, produtores do VSF estão em constante busca por maiores produtividades.

A fim de atingir altas produtividades agricultores fazem uso de uma grande quantidade de agroquímicos (defensivos, fertilizantes e herbicidas). Esse sistema de cultivo causa alterações em características físico-químicas a fim de alcançar uma melhor fertilidade do solo e com isso prover melhorias na produtividade. (FREITAS et al., 2011; PRESTON et al., 2017). Contudo, outros fatores são negligenciados e acarretam sérios problemas.

Além de onerosa, a produção de fertilizantes minerais e agroquímicos envolve, na maioria dos casos, o uso de recursos não renováveis. Além disso, o processo de fabricação e aplicação apresenta riscos à saúde humana, bem como gera grandes passivos ambientais, como por exemplo: defeitos congênitos em neonatos e os resíduos da produção de fertilizantes fosfatados (SILVA et al., 2011; ATTALLAH et al., 2019). Portanto, desenvolver alternativas que otimizem o uso de recursos atendendo a demanda alimentar, econômica e de sustentabilidade é um grande desafio (GUPTA et al., 2015).

Visando reduzir a tendência do aumento do consumo de fertilizantes e a pegada ecológica, pesquisadores têm se esforçado para encontrar alternativas para produção agrícola. Entre tais alternativas, a utilização de micro-organismos que são capazes de promover o crescimento vegetal se demonstra bastante eficaz (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 2015). Contudo, até o momento, trabalhos relacionados a prospecção de RPCPs em videiras na região do VSF são inéditos.

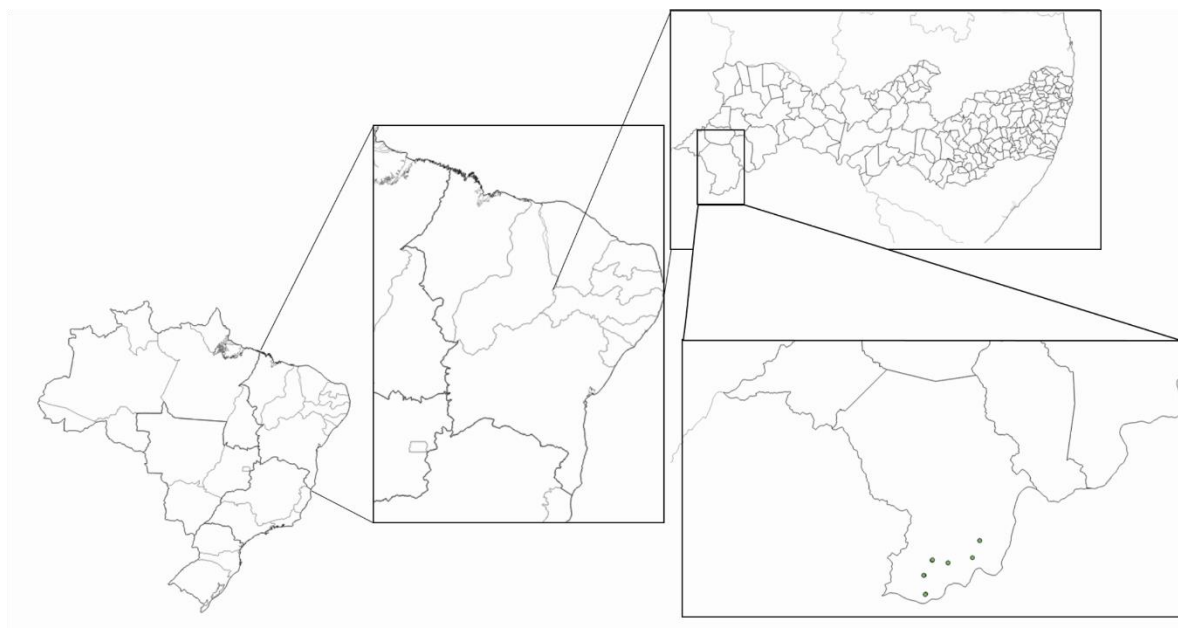
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Descrição do local de coleta e processo de amostragem

As áreas de produção de uvas de mesa se localizam no Perímetro Irrigado Senador Nilo Coelho, na região do Vale do São Francisco em Petrolina PE (Figura 4). O clima é quente, semiárido, classificado como BSw_h' pela classificação de Köppen, com precipitação pluvial média de 578 mm ano⁻¹ concentrada entre os meses de novembro a abril, temperatura média anual de 26,5° C e umidade relativa do ar de 61%.

O solo foi coletado em 2017 para uma pesquisa em paralelo ao presente estudo (FREITAS, 2019). Foram coletadas aproximadamente 200g de solo aderido às raízes de videiras, considerado como solo rizosférico, com auxílio de espátula esterilizada com álcool 70%. As amostras foram coletadas em triplicata, tipo composta, por área e colocadas em sacos plásticos. Posteriormente, foram acondicionadas em cooler com gelo até chegaram ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram congeladas.

Figura 4. Localização dos pontos utilizados para coleta das amostras de solo rizosférico para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano



A coleta foi realizada no início, centro e fim das parcelas de coleta de cada fazenda, onde cada ponto foi coletado em triplicata na rizosfera de uma mesma planta. A distribuição de coleta foi realizada em forma triangular sobre a área de produção a ser coletada (Figura 5). As coordenadas estão expressas na Tabela 1. Informações adicionais sobre as áreas de cultivo estão descritas na Tabela 2.

Figura 5.- Representação esquemática do plano de coleta das amostras de solo utilizadas para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano.

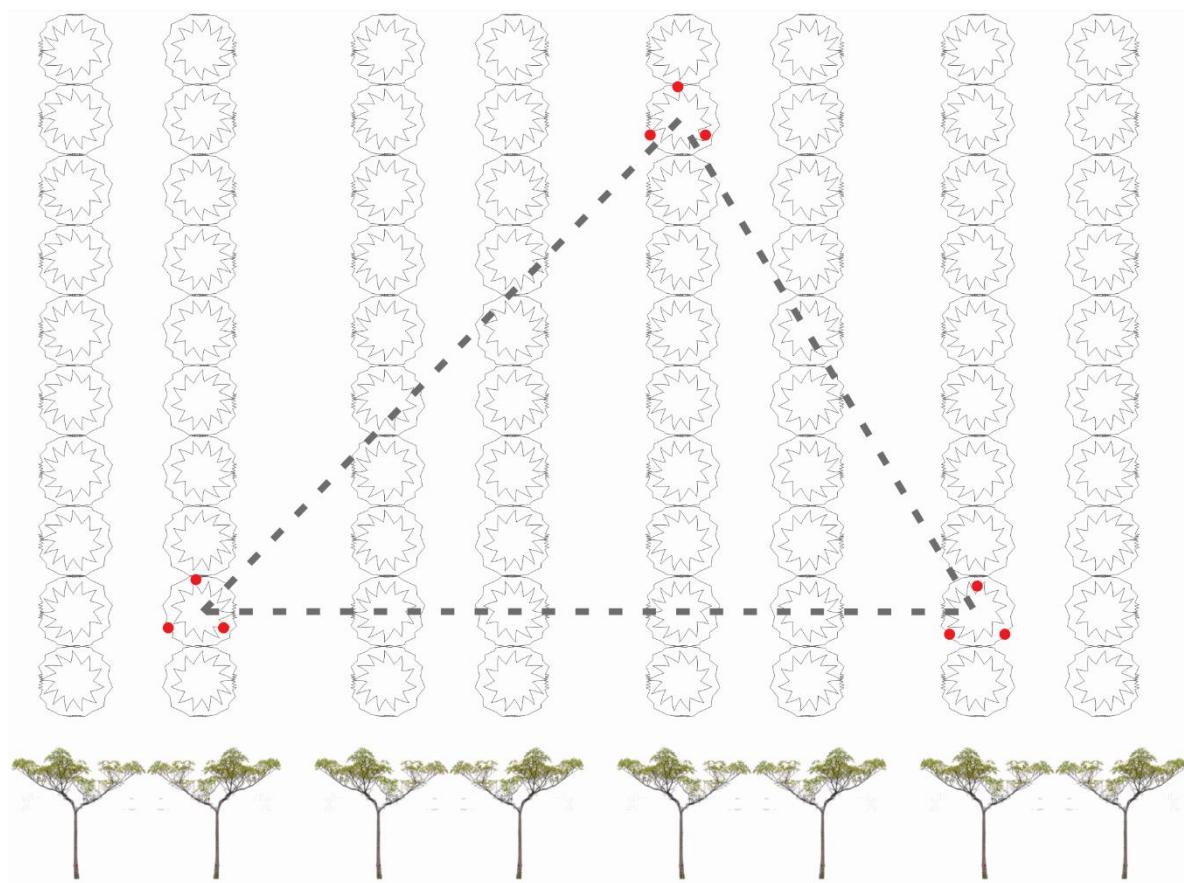


Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos em que foram coletadas as amostras de solo para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano

Ponto de Coleta	Coordenadas
Ponto 1	9°18'52.25"S; 40°26'38.58"O
Ponto 2	9°19'22.58"S; 40°35'29.76"O
Ponto 3	9°20'1.70"S; 40°32'0.93"O
Ponto 4	9°22'42.14"S; 40°37'21.61"O
Ponto 5	9°15'5.07"S; 40°25'4.31"O
Ponto 6	9°26'56.19"S; 40°36'59.25"O

Tabela 2 Variedades de uva em cultivo por área na data de coleta, anos de cultivo e o manejo de adubação.

Áreas	Variedades de Uva	Anos de Cultivo	Adubação
1	Arra-15	11	Armiogan; Aminoplus; Nitrato de Ca e K; Sulfato de Ca e Mg
2	Itália Moscat	14	Armiogan; Aminoplus; Nitrato de Ca; Uréia; Sulfato de Ca, K e de amônio
3	Vitória	13	Armiogan; Aminoplus; Nitrato de Ca, Mg e K; Esterco; MAP; Sulfato de Ca, K e de amônio.
4	Crimson	16	Nitrato de Ca e K; Cloreto de K; Sulfato de K, Mg, Cu, Zn e de Fe
5	Iris	15	Armiogan, Aminoplus; Nitrato de Ca, K e Mg; Sulfato de Mg e K; MAP.
6	Arra-15	14	Armiogan, Aminoplus; Nitrato de Ca; MAP; Sulfato de Mg e K; Cloreto de K, Algen; KSC Mix

3.2 Isolamento das colônias bacterianas

Foram pesados 10g de cada amostra de solo, previamente preparadas, adicionadas junto a 90 mL de solução de NaCl 0,85% esterilizada e agitadas em mesa agitadora horizontal durante 30 minutos a 150 RPM. Após esse procedimento, foram realizadas diluições seriadas de 10 vezes da suspensão de cada amostra pipetando 1 mL da suspensão para 9 mL de solução de NaCl 0,85% previamente esterilizada, sendo a diluição final de 10^{-5} .

Para a etapa de plaqueamento 0,1 mL de cada diluição seriada foi adicionada sobre o meio de cultura TSA (Tryptona 15g; extrato de soja 5g; Cloreto de Sódio 5g; Agar 15g) e homogeneizada na superfície (GOULD et al., 1985). O processo foi

executado em triplicata para cada diluição. As placas incubadas em estufa bacteriológica de crescimento a 28° C por um período de 72h, sendo verificadas a cada 24h para acompanhamento do tempo de crescimento das colônias. A determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi realizada a partir da diluição mais viável (entre 20 e 200 colônias por placa). Posteriormente, foram realizados procedimentos para a obtenção de colônias bacterianas puras.

O isolamento das colônias foi realizado a partir da placa utilizada para contagem de UFC e uma diluição acima em meio de cultura TSA (Tryptona 15g; extrato de soja 5g; Cloreto de Sódio 5g; Agar 15g). A fim de assegurar o isolamento de colônias puras foi realizado o estriamento em T e após o período de crescimento verificada a ocorrência de morfotipos distintos (KING; WARD; RANEY, 1954; COMPANT et al., 2005).

3.3 Caracterização morfológica e armazenamento

Após o período de incubação, as colônias foram caracterizadas quanto aos descritores morfofisiológicos da cultura: velocidade de crescimento (24h rápida; 48h intermediária, entre 48 e 72h fastidiosa; >72h lenta), tamanho (<1 mm; entre 2 e 1 mm; >2 mm), forma (circular, irregular, rizoide, filamentosa, puntiforme e fusiforme), aparência (homogênea ou heterogênea), cor (branca, amarela, creme e rosa), transparência (transparente, translúcida e opaca), superfície (lisa ou rugosa), elevação da colônia (plana, côncava, convexa, cristada, papilada e crateriforme), produção de muco (seca, escassa, moderada e abundantes) e consistência do muco (seco, floculoso, butírico, viscoso). Também foi realizada a determinação do grupo Gram aplicando a técnica do KOH (BUCK, 1982). Posteriormente, as colônias foram analisadas quanto capacidade de realização dos mecanismos de promoção de crescimento.

3.4 Capacidade de solubilização de fosfatos

As bactérias foram transferidas para o meio GEL (10g de glicose, 2g de extrato de levedura, 5mL de azul de bromotimol e 15g de agar) e enriquecido com CaHPO₄. O processo de enriquecimento do meio com CaHPO₄ se deu pela reação da solução de K₂HPO₄ 0,57 M com CaCl₂ 0,90 M junto ao meio GEL. O princípio do método baseia-se na formação de um meio turvo, no qual as bactérias serão inoculadas.

Aquelas capazes de solubilizar esse fosfato de cálcio produzem a formação de um halo translúcido ao redor da sua colônia. A partir da formação do halo de cada isolado foi determinado o Índice de Solubilização (IS) que é dado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, ver Equação 1 (CATTELAN, 1999).

Para a verificação da capacidade de solubilização de fosfato de alumínio, os isolados foram inoculados em meio GEL enriquecido com o precipitado de fosfato de alumínio. Para tanto, uma solução de $\text{Al}_3\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi adicionada ao meio ainda sob estado fundente formando o Al_3PO_4 (SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Posteriormente, foram calculados os índices de solubilização de fosfato de alumínio assim como para o fosfato de cálcio (Equação 1).

Equação 1. Índice de solubilização de fosfato.

$$IS = \frac{\text{\textit{Ø do halo de solubilização}}}{\text{\textit{Ø da colônia bacteriana}}}$$

3.5 Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio

Para a quantificação da solubilização de fosfato de cálcio se utilizou o meio líquido NBRIP. O procedimento analítico seguiu a metodologia proposta por (BARTON, 1948; RIBEIRO; CARDOSO, 2012). Uma alíquota de 100 μL da suspensão de células dos isolados, previamente crescidos em meio TSB, foram inoculados em meio NBRIP líquido e mantidos sob agitação constante por 96h. A cada 24h foram coletadas alíquotas e congeladas até a quantificação. Para esta etapa foram utilizados 4 mL de solução vanadomolibdica e 1 mL de cada um dos sobrenadantes alíquotados. A leitura foi realizada no comprimento de 420 nm.

3.6 Avaliação da fixação assimbiótica de N_2

A seleção inicial de bactérias diazotróficas foi realizada a partir do meio JNFB. Cada isolado bacteriano foi transferido para um tubo de penicilina contendo 5 mL do meio JNFB (5g de ácido málico; 0,6g de K_2HPO_4 ; 1,8g de KH_2PO_4 ; 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g NaCl ; 0,02g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2mL de micronutrientes; 2mL de azul de bromotimol; 4mL de FeEDTA (1,64%); 1mL de solução de vitaminas; 4,5g de KOH ; 1,8g de agar) e incubado a 30°C por um período de 10 dias. O procedimento foi

repetido 3 vezes para o mesmo meio a fim de assegurar que as bactérias não estariam usando reservas de N celular, verificando assim sua estabilidade de fixação (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995; CATTELAN, 1999).

3.7 Autenticação da FBN dos isolados responsivos para FBN em tubos

Após a avaliação da formação de película no meio JNFB em tubos de penicilina, foi realizado um passo de autenticação para os isolados que exibiram resultado positivo previamente. Para tanto, um passo de PCR com primers universais (PolF e PolR) para amplificação do fragmento de gene codificante para a nitrogenase (*nifH*) foi empregado conforme a metodologia descrita por Poly; Monrozier; Bally, (2001). Apenas os isolados que apresentaram resultado positivo para os dois testes de FBN foram caracterizados como diazotróficos.

3.8 Avaliação da capacidade de síntese de Ácido Indol-acético (AIA)

Para a verificação da produção de AIA, as bactérias isoladas foram cultivadas em meio LB (10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 5g de cloreto de sódio) enriquecido com 5mM de L-triptofano ($1,021\text{g L}^{-1}$), o precursor do AIA. As bactérias foram incubadas com 1mL de meio LB em eppendorfs de 2mL a 28° C por 24h. Após o tempo de crescimento, foram centrifugadas a 9500g por 2 minutos. Uma alíquota de 100 μL da suspensão do meio foram transferidas para microplacas de 96 poços e adicionados 100 μL da solução de Salkowski (a solução de Salkowski consiste na diluição de 1 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M) em 49 mL de HClO_4 35%) e incubada à temperatura ambiente. A confirmação da produção de AIA se deu pela presença da coloração alaranjada. Os isolados foram testados em triplicata e tiveram sua produção estimada por meio de leitura em fotocolorímetro com comprimento de onda de 530 nm (BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, 1991). Para tanto, foi construída uma curva com concentrações definidas do hormônio sintético e os valores de leitura das amostras foram interpolados com a equação criada.

3.9 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Para a verificação da formação de biofilme os isolados foram submetidos ao crescimento em meio líquido. Posteriormente, a densidade ótica foi ajustada para 0,1

(540 nm). Após a calibração, 5 µL da suspensão de células de cada isolado foram inoculados em triplicata em 195 µL de meio YM em placas de 96 poços. Em seguida, cada isolado foi submetido ao seu tempo de crescimento necessário sem agitação a 30°C. Após o tempo de crescimento, o conteúdo das placas foi descartado, lavado com água destilada por três vezes e submetidos a secagem por 20 minutos. Após a secagem, 100 µL de violeta genciana (0,25%) foram adicionados por cinco minutos. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas por três vezes e em seguida adicionados 200 µL de uma solução álcool-acetona (80:20). A formação de biofilme foi marcada como positiva para isolados que apresentaram a formação de coloração roxo-azulada (SILVA, 2019).

3.10 Antibiose direta à *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Em placas de petri de 60mm x 15mm contendo meio TSA foram co-inoculados junto à *X. campestris* pv. *viticola* os isolados que apresentaram respostas positivas para ao menos um dos dos mecanismos anteriormente testados. A disposição na placa procedeu da inoculação em placa cheia com o isolado teste ao fundo e após a secagem da superfície 5µL da suspensão de células do fitopatógeno foram pontualmente aplicados em triplicata. Posteriormente, as placas foram incubadas a uma temperatura controlada de 30°C por um período de 72h. Em seguida, foi verificado a formação de halo de inibição de crescimento e calculado o Percentual de Inibição do Crescimento (PIC) por meio da Equação 2.

Equação 2. Equação utilizada para estimar o percentual de inibição de crescimento microbiano. Descrição: *KR* – diâmetro da colônia (mm) do ponto de inoculação, em placas controle, até a margem das placas; *R1* – diâmetro do crescimento do patógeno do ponto de inoculação até a margem da colônia nas placas na direção do antagonista.

$$PIC (\%) = \frac{[(KR - R1)]}{KR} \times 100$$

3.11 Extração de DNA das RPCPs

As RPCP que apresentaram a capacidade de realizar ao menos um dos mecanismos testados, tiveram seu DNA extraído. Para a extração do DNA das RPCP

foi usado o método de lise com etanol alcalino quente. Aos tubos com 100 μ L da suspensão de células de cada RPCP foi adicionado 455 μ L solução de extração composta por: 240mM de NaOH, 2,7mM de EDTA e 74% de etanol. Em seguida, os tubos foram agitados suavemente, aquecidos a 80°C por 10 minutos e centrifugados a 16.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao tubo 100 μ L de solução tampão contendo 0,1mM de EDTA e 50mM de TRIS-HCl pH 8,0 (VINGATARAMIN; FROST, 2015).

3.12 Sequenciamento do 16S rRNA

As 15 RPCPs que apresentaram melhores resultados de acordo com os testes por mecanismos foram submetidas ao processo de sequenciamento do gene 16S rRNA. Para isso, as bactérias tiveram seu gene 16S rRNA amplificado usando os oligonucleotídeos universais 27F (5'- AGRGTTTGATYMTGGCTCAG -3') e 1492R (5' GGYTACCTTGTTACGACTT 3'). As reações foram feitas com 25 ng do DNA bacteriano, 10 pmol de cada *primer*, 10 mM de dNTP's, 5 μ L de 10xTaq *buffer* e 1,5 U de Taq DNA polimerase. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94° C por 10 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 45 segundos, 53° C por 145 segundos e 72° C por 2 minutos; um passo de extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi verificado quanto a sua qualidade por meio de eletroforese gel de agarose (1%) a 110 V por 40 minutos. O Gel foi visualizado por meio de transiluminador UV-BOX (SANDHYA et al., 2010).

Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório da Macrogen (Macrogen, Inc. South Korea) para sequenciamento. Os dados das sequências foram comparados no banco de dados NCBI. A relação das sequências verificada por alinhamento local usando a ferramenta BLAST. As sequências foram agrupadas de acordo com a proximidade filogenética dos isolados no programa MEGA.

3.13 Estatística dos dados

Para os resultados obtidos a partir da descrição fenotípica dos isolados, os dados foram performados na forma de matriz binária. Posteriormente, os isolados foram agrupados pelo método de Jaccard em um dendrograma e estimados os índices

de diversidade para as parcelas amostrais. Para esta etapa se utilizou o programa PAST.

Os índices de UFC, solubilização de fosfato de cálcio, quantificação de solubilização de fosfato de cálcio, síntese de AIA e percentual de inibição de crescimento tiveram suas médias submetidas ao teste de Tukey a 5% no *software* Sisvar.

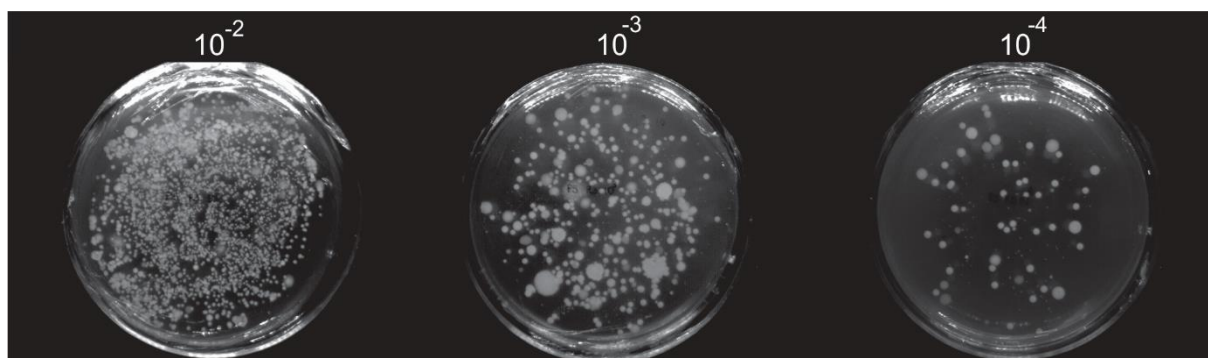
Os mecanismos de formação de biofilme e fixação biológica de nitrogênio foram descritos na forma de dados nominais devido à ausência de ferramental para a quantificação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estimativa do número de UFC

O crescimento de colônias bacterianas sofreu redução acentuada conforme as diluições foram empregadas. Placas com diluições acima de 10^{-5} revelaram baixa abundância de micro-organismos cultiváveis (Figura 6). Portanto, para efeito de cálculo e homogeneidade de tratamento foram utilizadas as contagens das diluições 10^{-4} para estimar a abundância de UFC.

Figura 6. Efeito da diluição seriada do solo rizosférico na ocorrência de UFCs em meio TSA para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano

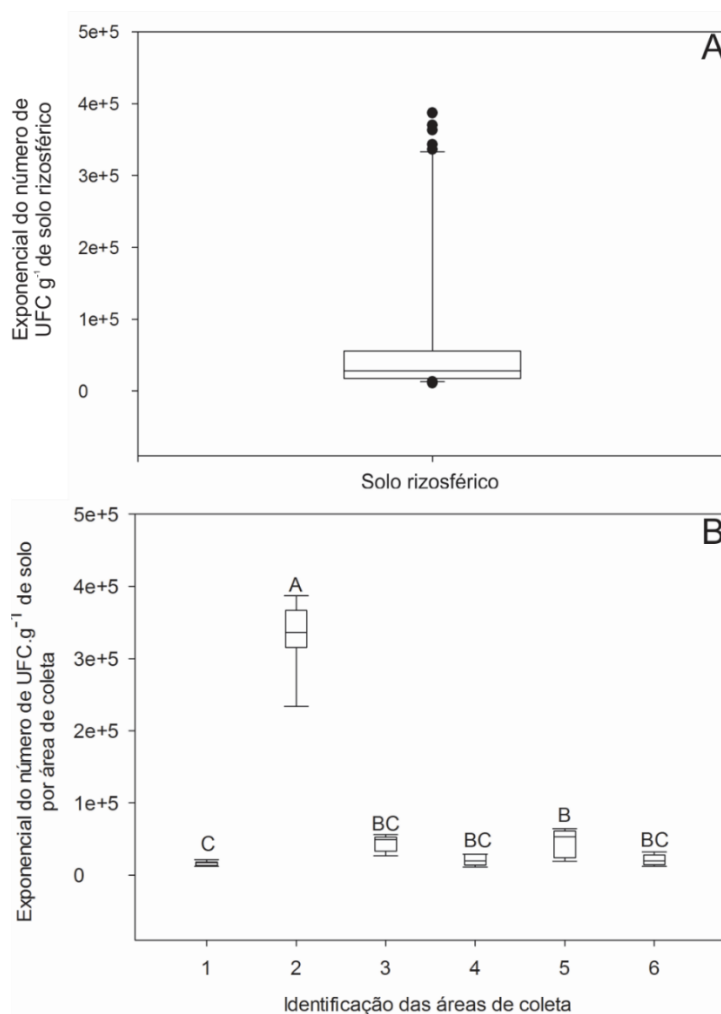


De forma geral, a abundância de bactérias cultiváveis em meio de cultura a partir do solo rizosférico de videiras foi baixa. O valor médio de UFC das amostras foi de $8,00 \times 10^4$, sendo o valor máximo de UFC entre as amostras de $3,87 \times 10^5$ e o

mínimo de $1,12 \times 10^4$ (Figura 7). As expressões de baixa e alta abundância de UFC estiveram relacionadas com áreas específicas.

Em ordem crescente, a área 1 mostrou os menores valores de UFC. A média foi de $1,64 \times 10^4$, com mínima de $1,24 \times 10^4$ e máxima de $2,10 \times 10^4$. Os maiores valores de UFC estiveram relacionados a área 2. A média foi de $3,33 \times 10^5$, com mínima de $2,34 \times 10^5$ e máxima de $3,87 \times 10^5$. Contudo, apesar da distância exponencial entre os valores encontrados para a abundância de UFC, estes resultados ainda são considerados abaixo da expressividade normal que seria entre 10^{-6} e 10^{-7} (VIEIRA; NAHAS, 2000).

Figura 7. Estimativa de UFC cultiváveis, em exponencial, relacionadas ao solo rizosférico. Em A, o gráfico em boxplot é referente aos valores obtidos para as áreas de estudo em geral. Em B, o desdobramento dos resultados obtidos por área para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano.



As letras maiúsculas distintas presentes na área do gráfico inferior representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (0,05).

As áreas 1, 3, 4 e 5 possuem classificação textural areia franca, enquanto as áreas 2 e 6 são franco arenosas. O pH do solo entre as áreas não tem diferença significativa, bem como os teores de matéria orgânica, P, Ca, Mg, Na, K e acidez potencial ($H^+ + Al^{3+}$). Contudo, foram observados elevados valores de P-disponível para todas áreas o que foi apontado como principal percussor para mudanças ambientais na região (FREITAS, 2019). Portanto, mediante análise de solo não há motivos aparentes para tal comportamento de flutuação entre as médias de números de UFC por área em virtude da homogeneidade de atributos químicos e físicos.

Sabe-se que o crescimento microbiano *in vitro* é restringido por fatores essenciais que não podem ser fornecidos por meio cultura, ou ainda, pela necessidade de um hospedeiro como no caso de biotróficos obrigatórios. Estima-se que apenas 1% ou menos dos micro-organismos presentes no solo sejam cultiváveis (LAMBAIS et al., 2005). Contudo, baixas estimativas de UFC podem ser o reflexo da imposição de pressões ambientais sobre as comunidades (LIU et al., 2010).

Orr et al. (2015) relatam que as comunidades microbianas do solo podem ser moldadas tanto estruturalmente quanto em termos de abundância. Os principais fatores relacionados a alteração do comportamento microbiano do solo seriam: o pH do solo, o sistema de cultivo adotado, o tempo de cultivo e o manejo da fertilidade. O fator de maior implicação sobre as comunidades microbianas do solo seria o pH. Contudo, esse fator é dependente de outras variáveis. O manejo da fertilidade em áreas de cultivo convencional é responsável por significativas reduções no pH do solo (HALDAR; SENGUPTA, 2016). Portanto, a estrutura de comunidades funcionais pode ter sido afetada pelos consecutivos anos de cultivo convencional.

É possível que a conversão de áreas nativas do semiárido de Pernambuco para áreas de viticultura tenha promovido a redução da ocorrência de UFC cultiváveis. Isso pode estar relacionado com o longo tempo de imposição de condições de cultivo intensivo, bem como com o manejo da fertilidade. Nesse sentido, as alterações promovidas pela viticultura no VSF transcenderiam alterações na fertilidade natural do solo, como proposto por Preston et al. (2017), refletindo na redução da ocorrência de comunidades de micro-organismos cultiváveis.

Tais alterações nas comunidades microbianas são graduais e, por isso, dificilmente são notadas. Algumas pesquisas relatam que mudanças no comportamento microbiano podem ser verificadas a partir do 3 ano de cultivo (LIU et al., 2010; GEISSELER; SCOW, 2014; ORR et al., 2015). Todas as áreas de produção

de uva de onde foram coletadas as amostras de solo possuíam mais de 10 anos de cultivo estabelecido. Possivelmente, o estabelecimento da viticultura desencadeou o processo de perda de biodiversidade microbiana. Com isso, funções ecológicas exercidas por grupos de micro-organismos específicos teriam sua expressividade suprimida devido à pressão ambiental acentuada pelos anos de cultivo convencional intensivo.

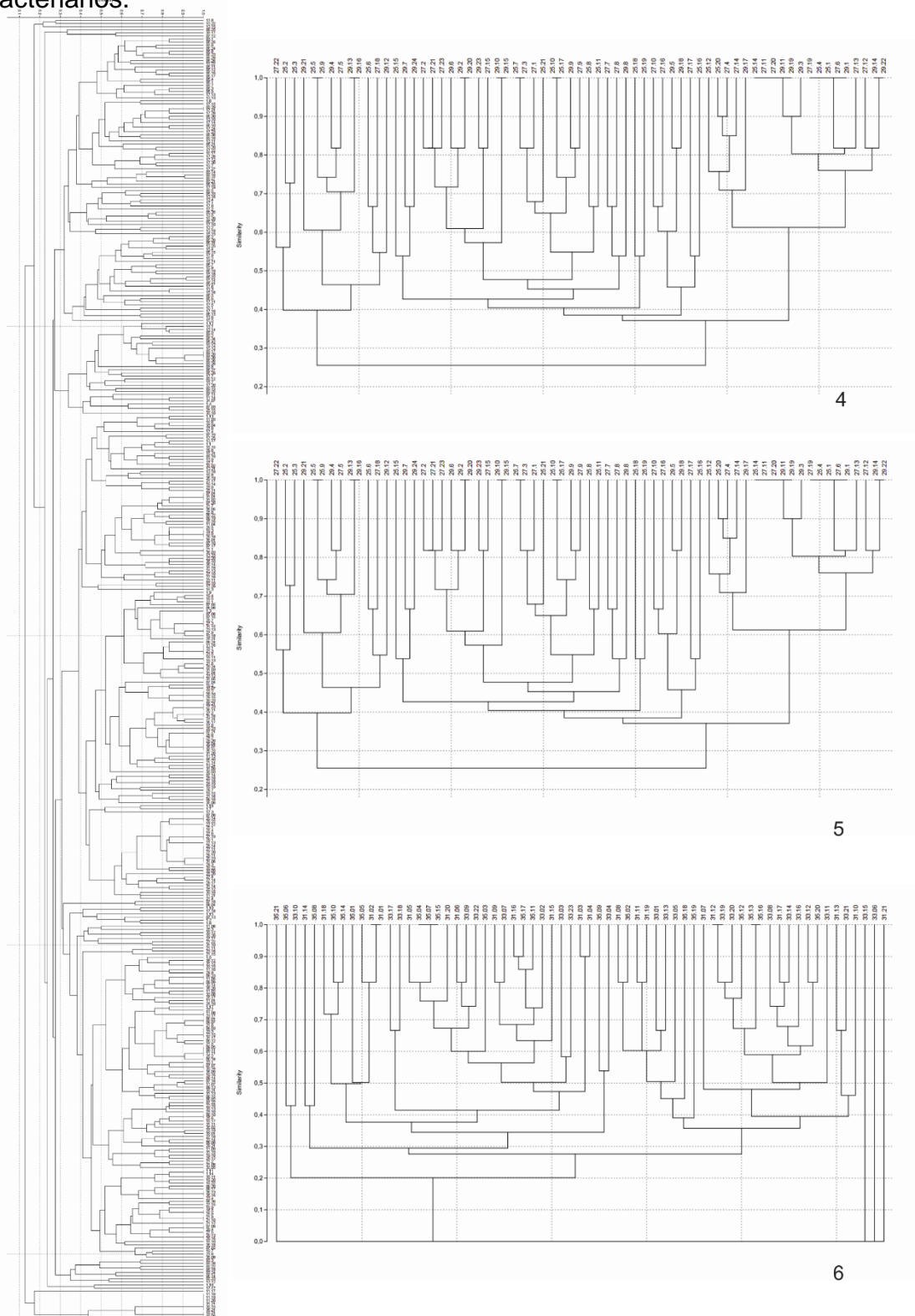
4.2 Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

A partir do cultivo da suspensão de solo em solução salina no meio TSA foi realizado isolamento de onde foram obtidos 423 morfotipos bacterianos. Após o procedimento de caracterização fenotípica, os isolados foram agrupados pelo coeficiente de Jaccard mediante as similaridades apresentadas. Como resultado, verificou-se a formação de 353 grupos fenotipicamente distintos a 100% de similaridade (Figuras 9a e 9b).

Figura 9a. Agrupamento hierárquico pelo coeficiente de Jaccard em forma de dendrograma de acordo com a similaridade de ocorrência dos descritores morfológicos dos isolados bacterianos objetos de estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano. Na lateral esquerda, a árvore hierárquica com todos os isolados. Na parte central-direta, a fragmentação do agrupamento de acordo com as áreas de estudo enumeradas abaixo de cada dendrograma e os seus respectivos isolados bacterianos.



Figura 9b. Agrupamento hierárquico pelo coeficiente de Jaccard em forma de dendrograma de acordo com a similaridade de ocorrência dos descritores morfológicos, previamente ordenados em matriz de dados simples, dos isolados bacterianos para os estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano. Na lateral esquerda, a árvore hierárquica com todos os isolados. Na parte central-direita, a fragmentação do agrupamento de acordo com as áreas de estudo enumeradas abaixo de cada dendrograma e seus respectivos isolados bacterianos.



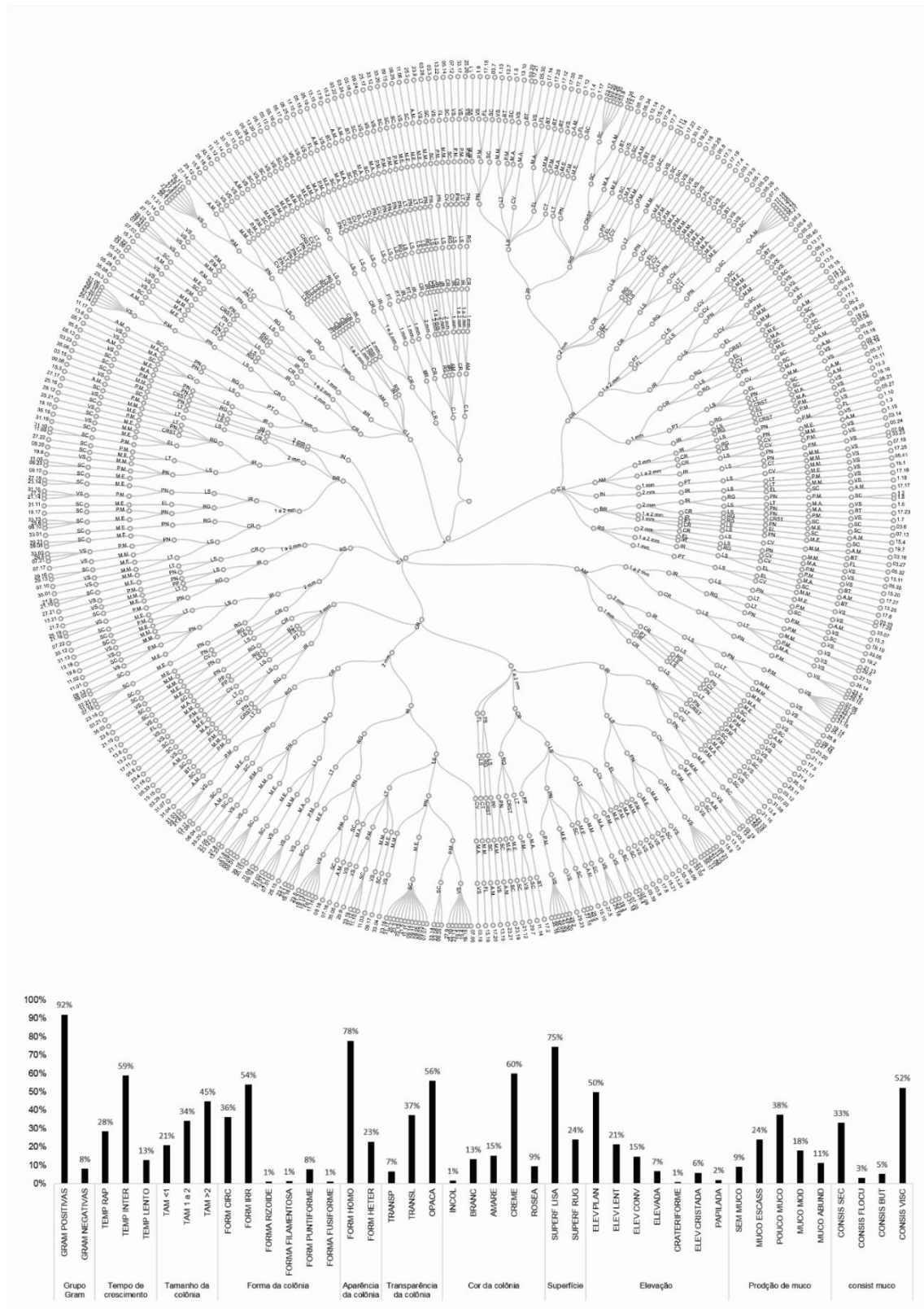
Apesar das baixas abundâncias de UFC cultiváveis que foram encontradas, o índice de Shannon (H') revelou alta diversidade por área. Valores de H' acima de 3,5 inferem diversidade elevada. Os resultados obtidos variaram entre 4,03 e 4,41, para as áreas 4 e 1, respectivamente. Os valores para Espécie Equivalente também foram calculados com base no valor de H' obtido (Tabela 3). O valor de $S_{H'}$ representa o número esperado de indivíduos por espécie em condições de equidade máxima.

Tabela 3. Índices de diversidade de Shannon e de Espécie Equivalente ($S_{H'}$) para populações bacterianas cultiváveis em meio TSA obtidos por área de amostragem dos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano

Área	1	2	3	4	5	6
H'	4,419459	4,034696	4,317488	4,033331	4,196181	4,123921
$S_{H'}$	83,05134	56,52573	74,99999	56,44863	66,43214	61,80109

Os percentuais de ocorrência dos descritores morfológicos estudados foram estimados (Figura 8). Bactérias do grupo gram-positivas foram predominantes (92%). Com relação ao tempo de crescimento dos isolados, a maioria foi classificada como rápida a intermediária, 28% e 59% respectivamente, sendo apenas 13% de crescimento lento. Apesar de variável, o tamanho das colônias foi predominantemente maior que 2 mm (45%). Quanto a forma das colônias: 54% possuíam forma irregular; 36% forma circular; 8% eram puntiformes e 1% das formas eram rizoides, filamentosas ou fusiformes. Apenas 23% dos isolados possuíam colônias heterogêneas. Quanto a coloração, a maioria dos isolados era opaca (56%) e de cor creme (60%). 75% possuíam superfície lisa e alguma forma de elevação da colônia, sendo 50% plana, 21% em forma de lente e 15% convexa. A produção de muco foi de escassa a pouca (24% a 38%) e quando existente seca (33%) ou viscoso (52%).

Figura 8. Agrupamento hierárquico pelo coeficiente de Jaccard em forma de dendrograma circular de acordo com a similaridade de ocorrência dos descritores morfológicos dos isolados bacterianos objetos de estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano

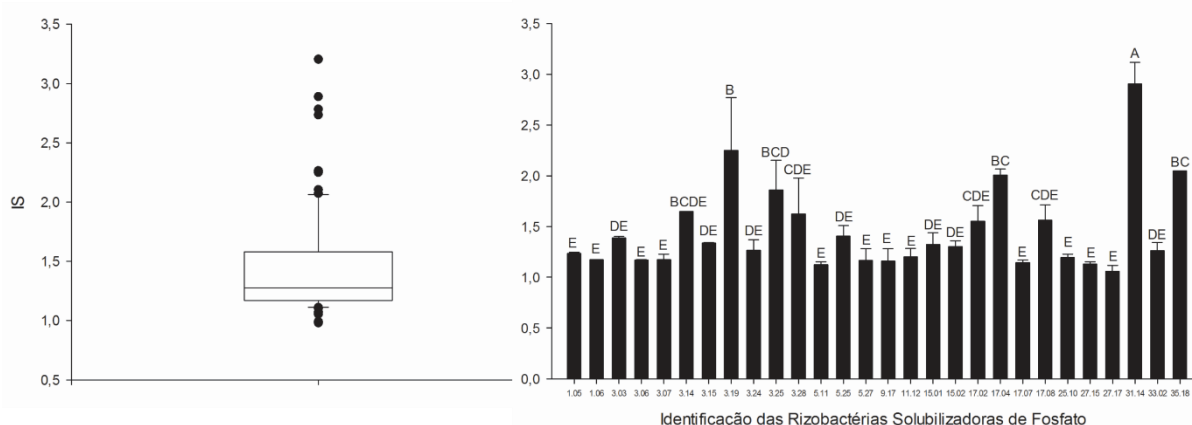


4.3 Capacidade de solubilização de fosfatos

A avaliação da capacidade de solubilização de fosfato revelou um baixo índice de RPCPs capazes de realizar tal mecanismo. Apenas 29 de 423 isolados apresentaram a formação halo de solubilização em placas contendo meio de cultura, um percentual de 6,85% de ocorrência. Entre as RPCPs solubilizadoras de fosfato, 93% apresentaram baixo índice de solubilização e apenas 6,89% apresentaram índice intermediário.

Entre os índices de solubilização passíveis de avaliação, 75% das RPCPs apresentavam IS entre 1,15 e 1,55 (Figura 10). Apesar do restrito número de RPCP capazes de solubilizar de fosfato, alguns isolados apresentaram capacidade acima da média do grupo. Os isolados 31.14, 3.19, 35.18, 17.04 e 3.25 foram os cinco mais eficientes de acordo com a estimativa do IS.

Figura 9. Eficiência da solubilização de fosfato de cálcio pelo índice de solubilização (IS) dos isolados bacterianos que exibiram resultado positivo para esse teste nos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano



As letras maiúsculas distintas presentes na área do gráfico inferior representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (0,05).

Adotando-se o critério de eficiência de solubilização proposto (HARA; OLIVEIRA, 2004), apenas os isolados 31.14 e 3.19 seriam de média solubilização ($2 < IS < 4$). Os demais isolados possuem baixa solubilização ($IS < 2$). Não houve nenhum isolado com alta capacidade de solubilização ($IS > 4$). Os isolados são de solubilização tardia (formação de halo após o 7º dia de inoculação), com exceção do isolado 3.24 que é precoce e possui formação de halo expressiva ao quarto dia. Contudo, o isolado

3.24 apresenta baixo IS. As demais bactérias isoladas foram marcadas como não solubilizadoras aparentes.

Rizobactérias Solubilizadoras de Fosfato (RSF) são capazes de solubilizar o fosfato ligado a outros grupos funcionais por meio da extrusão de ácidos orgânicos. A redução do pH do meio atua como um agente quelante dos elementos que acompanham o íon fosfato. O processo é mediado por duas enzimas: a glicose desidrogenase e a ácido glucônico desidrogenase. A glicose é oxidada a ácido glucônico, pela glicose desidrogenase, e posteriormente a enzima ácido glucônico desidrogenase oxida o ácido glucônico a ácido 2-cetoglucônico. Isso faz com que o pH entorno da colônia seja reduzido e os prótons de H^+ liberados solubilizem os íons fosfatados (CHAGAS et al., 2010). Estima-se que apenas uma pequena porção de RPCP sejam capazes de realizar esse mecanismo. Aproximadamente apenas 20% das bactérias do solo solubilizariam fosfatos de forma eficiente (SOLANKI; KUNDU; NEHRA, 2018).

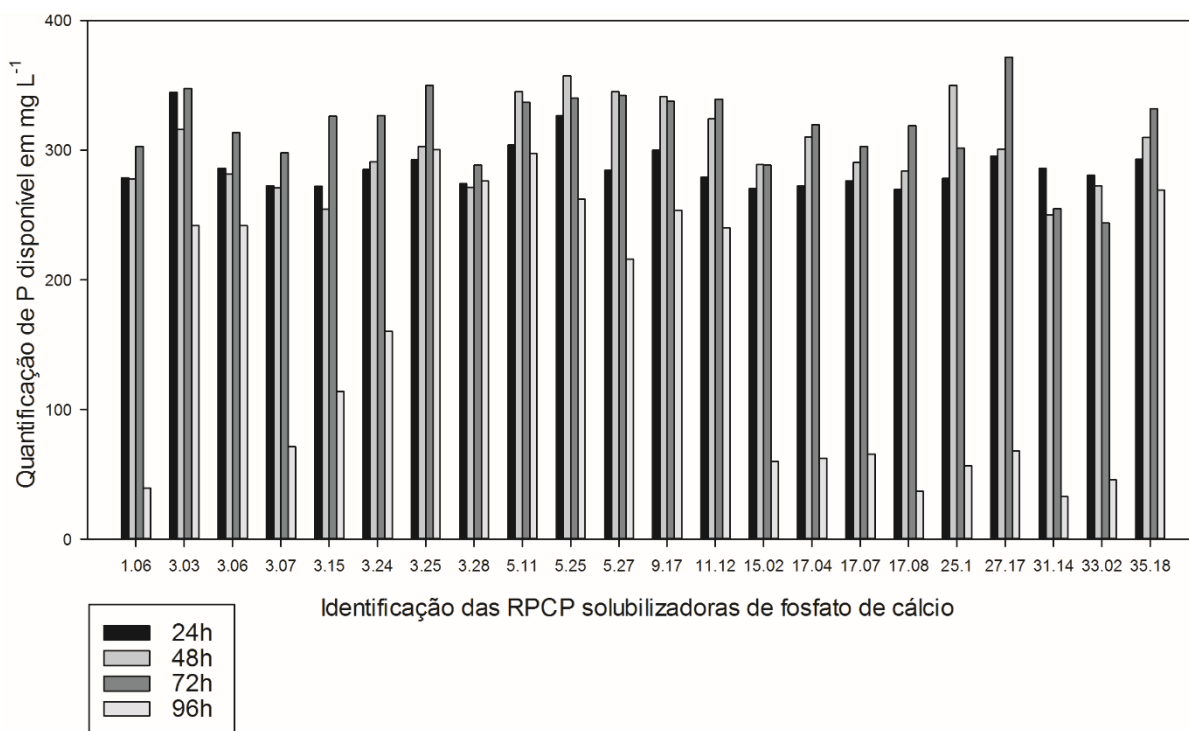
Áreas de produção agrícola estáveis e ricas em nutrientes, como vitícolas, induzem mudanças no genoma bacteriano. Tais condições ambientais provocam a redução do genoma, por perda de genes, ocasionando a emergência populacional de linhagens auxotróficas. A perda de genes pode ocorrer em virtude de duas situações: (1) suficiência do metabólito no ambiente para o crescimento microbiano ou (2) a necessidade específica microbiana pelo metabólito. Evolutivamente, a perda genes é considerada como um processo benéfico, pois favorece condicionamento focal em funções específicas (D'SOUZA et al., 2014). Tais fatos justificam a baixa ocorrência de Solubilizadores de fosfatos em áreas de viticultura no VSF. Devido ao estabelecimento do cultivo de uvas, as condições de disponibilidade de nutrientes naturais foram alteradas e o nível de P disponível atualmente é elevado (FREITAS, 2019).

As RPCP indicadas como RSF foram submetidas a quantificação da solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP líquido. Apesar de distintos IS, a quantificação revelou um padrão similar de solubilização entre os isolados. Além disso, a quantificação permitiu a visualização do comportamento da curva de solubilização entre os isolados. Após a inoculação, até 72h depois, ocorre o pico de disponibilidade do fósforo antes ligado ao cálcio. Após as 72h os isolados apresentam redução na disponibilidade.

O gráfico do comportamento da capacidade solubilização mostrou comportamento similar à curva de crescimento bacteriano. Durante as primeiras 24h os isolados crescem e se multiplicam até 72h. Com isso, ocorre o aumento da disponibilidade de P nessa faixa de tempo. Após 96h de incubação o nível de P decai significativamente. Isso indica que a fase de crescimento é concomitante com a solubilização e que o P disponibilizado pode ser utilizado por essas bactérias para sua multiplicação. Após as 96h, decaindo a concentração de P, ocorre a redução populacional e, possivelmente, a liberação de compostos potencialmente tóxicos.

Apesar das variações graficamente visíveis, não foram verificadas diferenças significativas entre a quantidade de fósforo disponibilizado pelas rizobactérias. Apenas entre o tempo de incubação e o fósforo liberado após as 72h. A capacidade de solubilização de fosfato avaliada por quantificação de P disponível em meio consta na Figura 11.

Figura 10. Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados bacterianos que exibiram resultado positivo para esse teste nos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano.



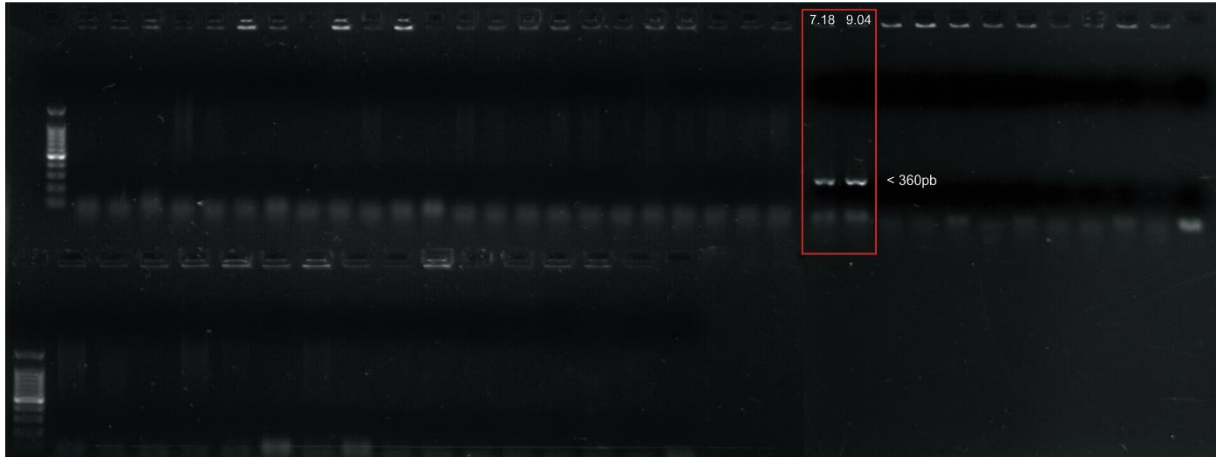
Os ensaios de solubilização de fosfato também foram realizados para solubilização de fosfato de alumínio. Teoricamente a enzima responsável pela quebra da ligação do grupamento fosfato com outros cátions seria a mesma, a glicose-desidrogenase e a ácido-glucônico desidrogenase. Contudo, os ensaios realizados em laboratório verificaram a inexistência da formação de halo de solubilização em meio de cultura. Tais resultados já foram observados em outros estudos (DE ARAÚJO, 2019). Possivelmente, isso seria um indicativo de que a enzima responsável por solubilizar fosfato de cálcio seja ineficiente na solubilização de fosfato de alumínio. Isso pode estar atrelado a ligação trivalente que o alumínio pode realizar com grupamento fosfato e sua estabilidade química. Assim apesar da capacidade de extrusão ácida, nem todos os tipos de elementos ligados ao fosfato são capazes de ser solubilizados por bactérias.

4.4 Fixação Biológica de Nitrogênio

O indicativo da capacidade de realizar FBN foi observado em 53 isolados, dentre os 423 (12,52%). Apesar de não ser um método acurado, a formação de película é um indicativo da realização da FBN. Isso é devido ao mecanismo de proteção do sítio enzimático de conversão, a nitrogenase. Por se tratar de um sítio reducional, uma das formas de proteção é a concentração celular e o deslocamento da colônia para a porção central no meio de cultura formando uma película (DILWOTH, 1974).

Os isolados que apresentaram resultado positivo para fixação biológica de nitrogênio foram submetidos à amplificação do fragmento genético responsável pela codificação para enzima nitrogenase, o gene *nifH*, para autenticação. Após o procedimento verificou-se que apenas dois isolados possuíam o gene *nifH*, 7.18 e 9.04. Com isso, o percentual de bactérias capazes de realizar a FBN foi reduzido de 12,52% para 0,47% (Figura 12).

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1% com os produtos de PCR da amplificação do gene *nifH* das RPCPs que apresentaram resultado positivo em teste de formação de película em meio JNFB para caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano



O baixo percentual de RPCP (0,47%) capazes de realizar FBN pode ser atribuído a forte pressão de seleção realizada por anos de adição de N mineral, pois altas concentrações de N inibem a FBN (ELKOCA; KANTAR; SAHIN, 2007). O procedimento de adubação mineral é bastante comum na viticultura, pois para a indução de formação das gemas de brotação após o período de pousio é preciso o estímulo nitrogenado. Ao longo do cultivo outras etapas de adubação mineral são realizadas de forma fracionada. Isso faz com que as perdas por processos como a desnitrificação sejam reduzidas e, conseqüentemente, o nitrogênio aplicado seja utilizado pela planta de forma mais eficiente pelas plantas (YU; ZHAO; JIA, 2016).

Contudo, o longo tempo de aplicação nitrogenada por diferentes fontes e de forma recorrente conduz a perda funcional da fixação biológica do nitrogênio. Com isso, bactérias podem ter perdido a capacidade de expressão genética, ou ainda o gene, responsável por esse fenômeno em função da supressão causada por adições de N mineral por diferentes fontes e outros agroquímicos (PEREG et al., 2018).

Outro fator que pode influenciar diretamente na ocorrência de comunidades microbianas é a aplicação de pesticidas. Cultivos convencionais geralmente empregam altas taxas de aplicação de pesticidas para controlar populações de indivíduos patogênicos. Sistemas de cultivo convencional de longa duração podem provocar a seleção de micro-organismos resistentes. Tais condições atreladas a alta taxa de aplicação de fertilizantes podem desencadear o favorecimento de

comunidades alheias a FBN, porém resistentes. Com isso, mutações genéticas podem ser geradas suprimindo alguns genes, como os que codificam para FBN por exemplo, e favorecendo aquisição de novos genes principalmente relacionados a quebra de moléculas de pesticidas (WOŁEJKO et al., 2020).

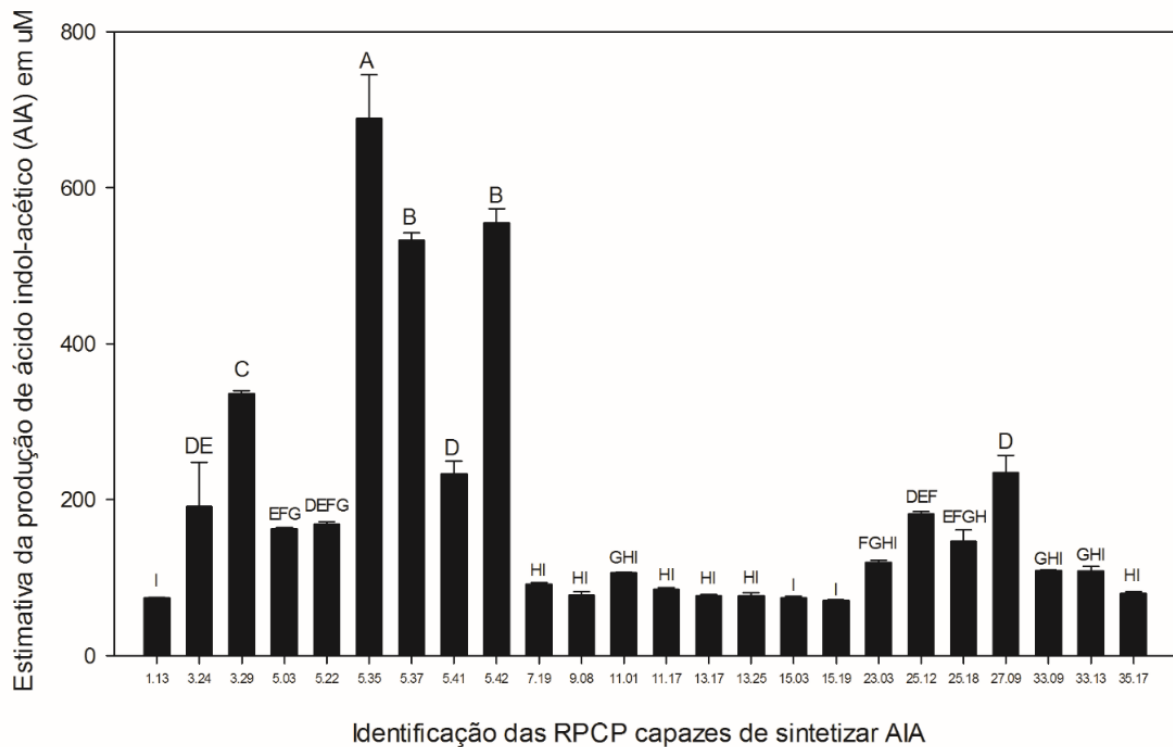
Como já mencionado, cultivos de longo período podem conduzir a mudanças nas comunidades microbianas do solo (KERTÉSZ; NAGY; BALÁZS, 2019). Tais mudanças podem ocorrer desde o nível estrutural, quantitativo, ou ainda no âmbito funcional (GEISSELER; SCOW, 2014). A perda de funções ecológicas do solo está relacionada com perda de biodiversidade (TORSVIK; ØVREÅS, 2002; MARÍN et al., 2017). Assim, mudanças no uso da terra nas áreas do Vale do São Francisco podem ter provocado perda de grupos funcionais de bactérias fixadoras de nitrogênio cultiváveis em virtude da alta taxa de aplicação de fertilizantes e pesticidas.

4.5 Síntese de AIA

Análise da síntese de AIA revelou que apenas 5,7% dos isolados eram capazes de realizar este mecanismo. A média de produção entre os isolados foi de 190,96 μM . A RPCP com menor capacidade de síntese de AIA teve produção estimada de 70,78 μM . Entre os isolados que mais produziram AIA estão: 5.35, 5.42, 5.37 e 3.29. A RPCP 5.35 teve uma estimativa de produção de 688,78 μM ; a 5.42 com 554,50 μM , 5.37 com 532,40 μM e a 3.29 com 335,95 μM . A capacidade de síntese de AIA por esses isolados é alta, até mesmo para os isolados com menores valores (Figuras 13 e 14).

Para a construção da curva de calibração foi utilizado AIA sintético comercial. A equação foi construída a partir da regressão linear calculada entre o cruzamento de leituras em absorbância e a concentração de AIA sintético comercial. O valor do R^2 de 0,9991 indica que o modelo de regressão é adequado para aplicação.

Figura 12. Estimativa da síntese de AIA pelas RPCP associadas a rizosfera de videiras, inseridas no VSF



A equação construída a partir da regressão linear calculada entre o cruzamento de leituras em absorbância e a concentração de AIA sintético comercial foi utilizada para interpolar os valores de absorbância dos isolados. As letras em maiúsculo no topo de cada barra do gráfico indicam a diferença estatística entre a capacidade de síntese de AIA entre os isolados pelo teste de Tukey (0,05).

Andreolli et al. (2016) também analisaram a produção de AIA de isolados bacterianos associados a rizosfera de videiras. Em seus estudos, os pesquisadores também relatam a ocorrência de comunidades bacterianas com alta capacidade de síntese de AIA. Entre os gêneros de RPCP produtoras de AIA associadas a rizosfera de videiras estavam: *Rhizobium*, *Pseudoxanthomonas* e *Brevundimonas*. Contudo, os maiores índices de produção do fitormônio foram atribuídos ao gênero *Rhizobium* (mais de 20 µg ml⁻¹). As estimativas de síntese de AIA pelo presente estudo foram significativamente maiores que a desses autores. Apenas o isolado 5.35 seria capaz de sintetizar 60 vezes mais AIA que o melhor resultado dos autores (1206 µg ml⁻¹).

Hormônios vegetais são agrupados em cinco classes: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e etileno. As auxinas são consideradas hormônios essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Elas são responsáveis pelo processo de ciclo celular e alongação de células da raiz e de meristemas apicais. Além disso, auxinas estão relacionadas com o processo de desenvolvimento dos

sistemas vasculares dos vegetais (BASU; RABARA; NEGI, 2017). Apesar da baixa ocorrência de bactérias sintetizadoras desse hormônio, é possível que a rizosfera de videiras abrigue outros grupos de micro-organismos sintetizadores de AIA, contudo não cultiváveis.

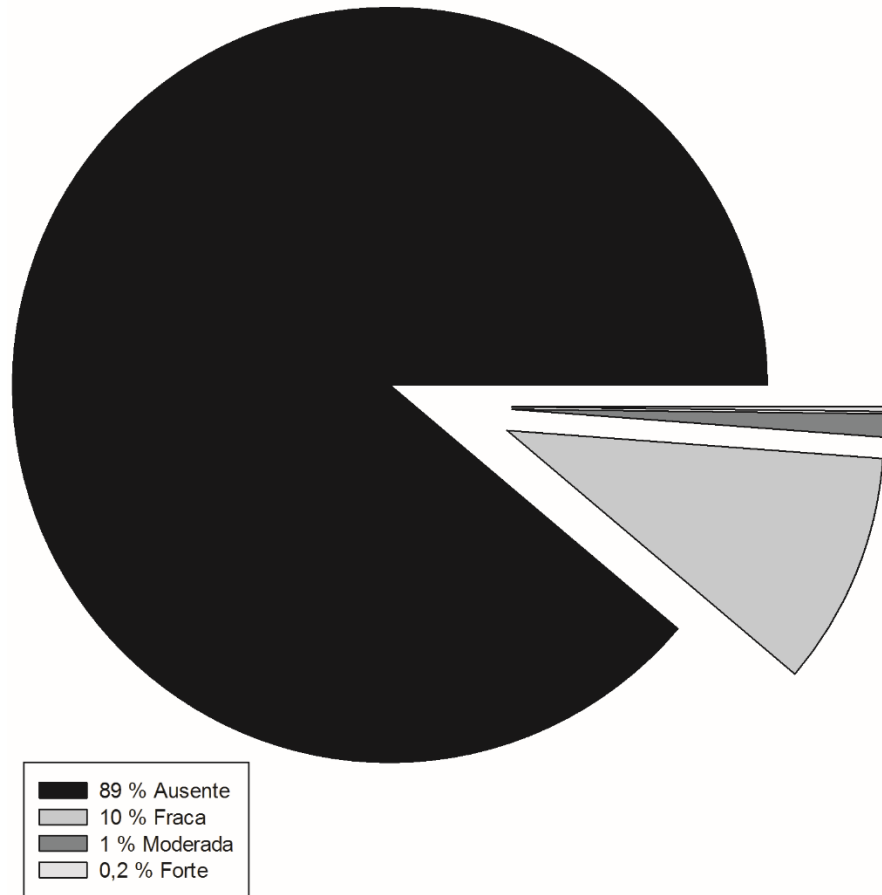
A alta produção de auxina (AIA) encontrada se relaciona com a seletividade imposta pelo sistema radicular. O cultivo de videiras necessita de estímulos hormonais elevados durante todo ciclo para que haja a formação de folhas, flores e frutos dentro da janela de tempo esperada. Corso et al (2016) analisaram a expressão de genes relacionados a produção de auxinas em videiras e verificaram expressões diferenciais por parte vegetal, bem como acumulação de AIA em partições da videira. Os autores relatam ainda que a modulação da expressão para AIA pelo vegetal está relacionada com a fase de maturação dos frutos. Nesse sentido, RPCPs sintetizadoras de AIA são capazes modular a capacidade de maturação de frutos em videiras mediante indução hormonal.

4.6 Formação de biofilme

A capacidade de produção exopolissacarídeos sob forma de biofilme também foi avaliada. O percentual de ocorrência foi de 11,27% entre 423 isolados avaliados (Figura 15). Entre os isolados que foram capazes de realizar esse mecanismo, apenas 2,2% apresentaram forte expressão visual da capacidade de formação de biofilme. As bactérias com maior expressividade para formação de biofilme foram: 5.05, 5.06 e 5.37. A quantificação da produção de biofilme não pode ser estimada devido a falta de instrumentação adequada para seu cumprimento.

A capacidade de formação de biofilme é um mecanismo indireto de promoção de crescimento de plantas. Tal mecanismo está associado à produção de exopolissacarídeos por bactérias. Essa substância além de conferir proteção a micro-organismos contra dessecação também protege os tecidos vegetais, bem como atua durante o processo de revestimento do tecido radicular para colonização por outros grupos de promotores de crescimento. Além disso, a produção de exopolissacarídeos também auxilia na proteção vegetal contra estresses ambientais como a salinidade (HALDAR; SENGUPTA, 2016).

Figura 13. Porção de isolados bacterianos capazes de realizar produção de exopolissacarídeos na forma de biofilme dos isolados bacterianos que exibiram resultado positivo para esse teste nos estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas a partir da rizosfera de videiras no semiárido pernambucano



A formação de biofilme também pode estar ligada a expressões gênicas em resposta a flutuações da densidade populacional. Com isso, é possível que bactérias formadoras de biofilme sejam capazes de realizar *quorum sensing* (QS). Tal via de comunicação química entre bactérias é prevista em processos biológicos como: simbiose, competição, produção de antibióticos e motilidade em resposta ambiental. Nesse sentido as substâncias liberadas pelas bactérias para ocorrência de QS pode provocar respostas nas plantas. Embora não se saiba, a produção de biofilme por estas RPCPs pode ter outras funções biológicas interligadas capazes de promover o crescimento de plantas (MILLER; BASSLER, 2001).

4.7 Antibiose direta a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

A avaliação do mecanismo de antibiose direta à bactéria *X. campestris* pv. *viticola* foi realizada para as RPCPs capazes de realizar ao menos um dos mecanismos anteriormente testados. Apenas 17 isolados bacterianos foram capazes de promover ação antibiose direta em meio de cultura.

Alguns isolados apresentaram baixo Percentual de Inibição de Crescimento (PIC). A bactéria 13.13 apresentou o menor PIC (10,8%). A segunda menor capacidade de antibiose foi do isolado 13.12 (39,2%). Os melhores PIC foram verificados nos isolados 3.20 e 3.17, com 100% e 88,1% de inibição do crescimento de *X. campestris* pv. *viticola*. Contudo, o isolado 3.20 mostrou um comportamento de crescimento incomum. Os demais isolados apresentaram valores intermediários de antibiose entre 49,6% e 55,7% (Figuras 16 e 17).

Figura 14. Expressão da inibição de crescimento microbiano de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* avaliado, em meio de cultura TSA coinoculado com as RPCP isoladas a partir da rizosfera de videiras, para estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a rizosfera de videiras no semiárido pernambucano

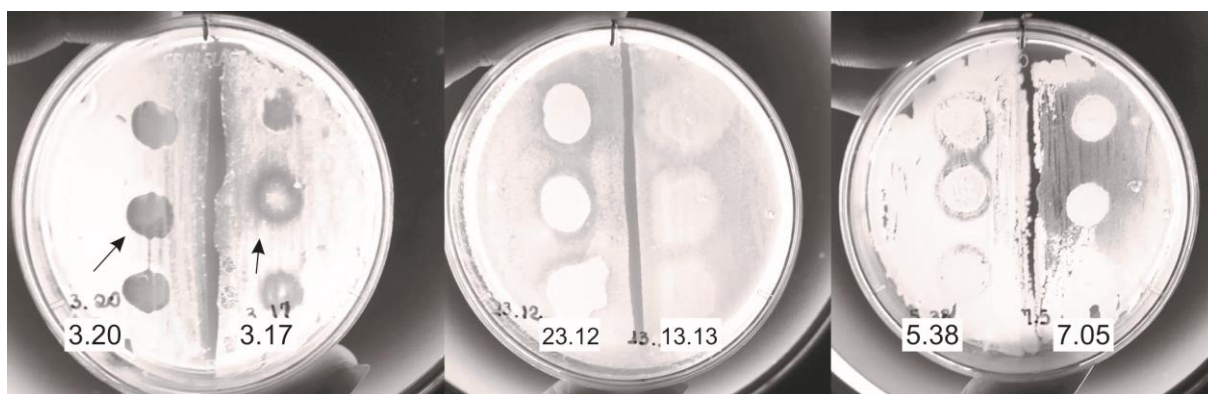
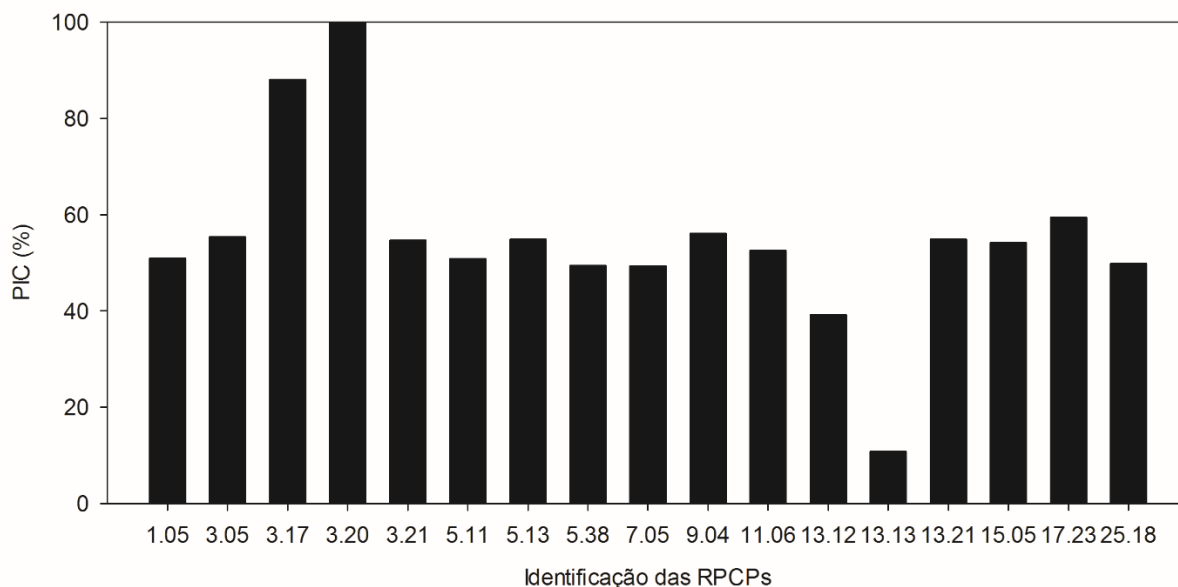


Figura 15. Percentual de Inibição de Crescimento (PIC) microbiano de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* avaliado, em meio de cultura TSA coinoculado com RPCP isolados a partir da rizosfera de videiras, para estudos de caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a rizosfera de videiras no semiárido pernambucano



Diante dos resultados encontrados, é possível dizer que a rizosfera de videiras é capaz de abrigar comunidades microbianas produtoras de substâncias antibióticas. Isolados com baixos Percentuais de Inibição do Crescimento microbiano podem ter a sua sobrevivência associada as relações de neutralismo, baixa competitividade por nutrientes ou ainda baixa produção de substâncias antibióticas na coexistência com o patógeno. Elevados percentuais de inibição do crescimento refletem vantagens competitivas por nutrientes ou ainda elevada capacidade de liberação de substâncias antagonistas ao crescimento do patógeno. Com isso, é possível dizer que os isolados 3.20 e 3.17 se configuram como potenciais produtores de substâncias antibióticas à *X. campestris* pv. *viticola*.

O cancro bacteriano da videira é considerado como uma das doenças de maior impacto na viticultura. Atualmente, na região do Vale do São Francisco ela é considerada praga quarentenária A2. Infecções *X. campestris* pv. *viticola* podem comprometer rapidamente áreas de produção, pois se trata de uma doença sistêmica e de fácil disseminação o que dificulta seu controle (LIMA et al., 2017). *Xanthomonas* e suas subespécies possuem enzimas especializadas na inativação do sistema de defesa vegetal como a tirosina fosfatase e outras que regulam para degradação celular (KAY; BONAS, 2009).

Atualmente, o manejo da doença pode ser realizado por tratamentos culturais, uso de variedades tolerantes ou controle químico por aplicação de bactericidas. Encontrar alternativas biológicas capazes de promover a supressão da doença é um passo necessário para o desenvolvimento da viticultura. Apesar de incipientes dados com relação a antibiose promovida por esses isolados, a atividade antagonista promovida por algumas RPCP do presente estudo sugerem potencial de produtores de antibióticos associados à rizosfera de videiras. Nesse sentido, é importante desenvolver trabalhos mais aprofundados com relação a atividades de biocontrole de fitopatógenos.

4.8 Especificações dos mecanismos por RPCP

As especificações quanto a realização de mecanismos pelos isolados bacterianos estão dispostas na Tabela 4. O agrupamento hierárquico de acordo com a realização dos mecanismos de promoção de crescimento pelas RPCP pode ser verificado na Figura 18.

Tabela 4 Especificações das RPCPs quanto a realização de mecanismos de promoção de crescimento de plantas por RPCPs associadas a rizosfera de videiras no semiárido pernambucano

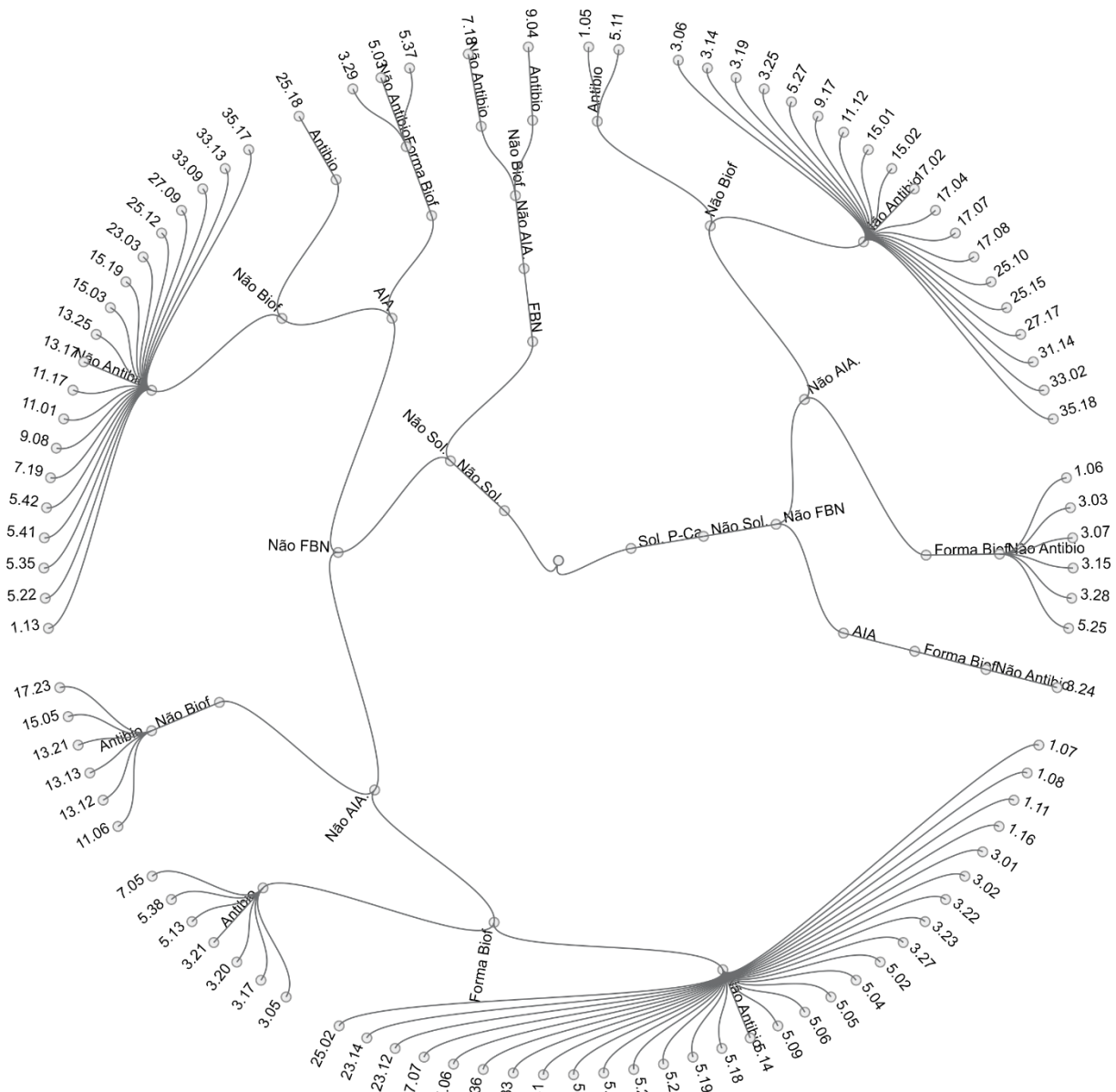
(Continua)

ID RPCP	Mecanismos Diretos			Mecanismos Indiretos		
	Sol. P-Ca (IS)	Sol. P-Al	FBN	AIA (μM)	Biofilme	Antibiose (PIC - %)
1.05	1,235 \pm 0,012 E	-	-	-	-	50,95
1.06	1,174 \pm 0,001 E	-	-	-	+	-
1.07	-	-	-	-	+	-
1.08	-	-	-	-	+	-
1.11	-	-	-	-	+	-
1.13	-	-	-	74,017 \pm 0,673 I	-	-
1.16	-	-	-	-	+	-
3.01	-	-	-	-	+	-
3.02	-	-	-	-	+	-
3.03	1,388 \pm 0,013 DE	-	-	-	+	-
3.05	-	-	-	-	+	55,41
3.06	1,171 \pm 0,001 E	-	-	-	-	-
3.07	1,175 \pm 0,052 E	-	-	-	+	-
3.14	1,651 \pm 0,001 BCDE	-	-	-	-	-
3.15	1,336 \pm 0,006 DE	-	-	-	+	-
3.17	-	-	-	-	+	88,12
3.19	2,251 \pm 0,521 B	-	-	-	-	-
3.20	-	-	-	-	+	100
3.21	-	-	-	-	+	54,74
3.22	-	-	-	-	+	-
3.23	-	-	-	-	+	-
3.24	1,266 \pm 0,103 DE	-	-	191,701 \pm 56,357 DE	+	-
3.25	1,859 \pm 0,295 BCDE	-	-	-	-	-
3.27	-	-	-	-	+	-
3.28	1,624 \pm 0,353 CDE	-	-	-	+	-
3.29	-	-	-	335,957 \pm 3,751 C	+	-
5.02	-	-	-	-	+	-
5.03	-	-	-	162,581 \pm 1,89 EFG	+	-
5.04	-	-	-	-	+	-
5.05	-	-	-	-	+++	-
5.06	-	-	-	-	++	-
5.09	-	-	-	-	++	-
5.11	1,125 \pm 0,025 E	-	-	-	-	50,86
5.13	-	-	-	-	+	54,88
5.14	-	-	-	-	+	-
5.18	-	-	-	-	+	-
5.19	-	-	-	-	+	-
5.20	-	-	-	-	+	-
5.21	-	-	-	-	+	-
5.22	-	-	-	168,316 \pm 3,561 DEFG	-	-
5.24	-	-	-	-	+	-
5.25	1,859 \pm 0,295 BCDE	-	-	-	+	-
5.27	1,165 \pm 0,114 E	-	-	-	-	-
5.28	-	-	-	-	+	-
5.31	-	-	-	-	+	-
5.33	-	-	-	-	+	-

Tabela 1. Especificações das RPCPs quanto a realização de mecanismos de promoção de crescimento de plantas por RPCPs associadas a rizosfera de videiras no semiárido pernambucano

							(Conclusão)
5.35	-	-	-	688,786 ± 56,157	A	-	-
5.36	-	-	-	-		+	-
5.37	-	-	-	532,402 ± 9,599	B	++	-
5.38	-	-	-	-		+	49,43
5.41	-	-	-	233,521 ± 15,723	D	-	-
5.42	-	-	-	554,496 ± 18,584	B	-	-
7.05	-	-	-	-		+	49,38
7.06	-	-	-	-		+	-
7.07	-	-	-	-		+	-
7.18	-	-	+	-		-	-
7.19	-	-	-	91,838 ± 1,759	HI	-	-
9.04	-	-	+	-		-	56,07
9.08	-	-	-	77,915 ± 4,002	HI	-	-
9.17	1,158 ± 0,122	E	-	-		-	-
11.01	-	-	-	106,282 ± 1,076	GHI	-	-
11.06	-	-	-	-		-	52,58
11.12	1,203 ± 0,082	E	-	-		-	-
11.17	-	-	-	84,983 ± 2,514	HI	-	-
13.12	-	-	-	-		-	39,21
13.13	-	-	-	-		-	10,75
13.17	-	-	-	77,171 ± 1,245	HI	-	-
13.21	-	-	-	-		-	54,89
13.25	-	-	-	77,325 ± 3,293	HI	-	-
15.01	1,324 ± 0,115	DE	-	-		-	-
15.02	1,302 ± 0,057	DE	-	-		-	-
15.03	-	-	-	74,342 ± 1,947	I	-	-
15.05	-	-	-	-		-	54,14
15.19	-	-	-	70,786 ± 1,129	I	-	-
17.02	1,553 ± 0,154	CDE	-	-		-	-
17.04	2,008 ± 0,058	BC	-	-		-	-
17.07	1,146 ± 0,023	E	-	-		-	-
17.08	1,563 ± 0,151	CDE	-	-		-	-
17.23	-	-	-	-		-	59,43
23.03	-	-	-	119,385 ± 3,118	FGHI	-	-
23.12	-	-	-	-		+	-
23.14	-	-	-	-		+	-
25.02	-	-	-	-		+	-
25.10	1,194 ± 0,035	E	-	-		-	-
25.12	-	-	-	182,256 ± 2,273	DEF	-	-
25.15	1,131 ± 0,023	E	-	-		-	-
25.18	-	-	-	146,726 ± 14,563	EFGH	-	49,79
27.09	-	-	-	234,795 ± 21,475	D	-	-
27.17	1,059 ± 0,059	E	-	-		-	-
31.14	2,908 ± 0,211	A	-	-		-	-
33.02	1,261 ± 0,079	DE	-	-		-	-
33.09	-	-	-	109,248 ± 0,807	GHI	-	-
33.13	-	-	-	108,248 ± 6,313	GHI	-	-
35.17	-	-	-	80,12 ± 2,001	HI	-	-
35.18	2,051 ± 0,001	BC	-	-		-	-

Figura 16. Agrupamento de acordo com as especificações das RPCPs quanto a realização de mecanismos de promoção de crescimento de plantas por RPCPs associadas a rizosfera de videiras no Semiárido pernambucano



Na avaliação, verificou-se que existem isolados bacterianos com resultados mais promissores para realização de mecanismos específicos. Assim, poucos isolados apresentaram a capacidade de realização de mais de um mecanismo por vez. Tal fato não exclui a ocorrência da multiplicidade de mecanismos por alguns isolados, indicando que RPCP associadas a rizosfera de videiras possuem maior especificidade na realização de mecanismos do que multiplicidade.

De acordo com tais resultados, foram selecionados os 15 isolados bacterianos mais promissores na realização de mecanismos levando em consideração: a solubilização de fosfato de cálcio, solubilização de fosfato de alumínio, a realização de fixação biológica de nitrogênio, a produção de fitormônio (AIA), a formação de biofilme e a capacidade de promoção de antibiose a *X. campestris* pv. *viticola*.

Diante dos aspectos considerados, os isolados bacterianos que obtiveram melhores resultados foram: 1.05, 3.17, 3.19, 3.24, 3.29, 5.35, 5.37, 5.38, 5.41, 5.42, 13.12, 17.04, 27.09, 31.14 e 35.18.

4.9 Análise do sequenciamento do 16S rRNA

O sequenciamento genético do gene 16S rRNA das RPCPs selecionadas revelou uma diversidade genética acentuada entre os gêneros e espécies. Entre os gêneros predominantes ocorreram: *Pseudomonas* (20%), *Stenotrophomonas* (13,33%), *Bacillus* (13,33%). Outros gêneros também foram associados com as RPCP selecionadas como: *Pseudoxanthomonas*, *Clostridium*, *Leclercia*, *Lysinibacillus*, *Kosakonia*, *Lueinomonas* e *Comamonas*. Ademais, a RPCP de identificação 3.19 não obteve similaridade com nenhuma das sequências genéticas disponíveis no banco de dados do BLAST (Tabela 5). Para efeitos de agrupamento e análise hierárquicas a RPCP de número 3.19 foi incluída na formação do cluster com *outgroups* de *E. coli* e *Pantoea dispersa*. Tais *outgroups* foram selecionados pois *E. coli* constitui um modelo genético de bactéria conhecido e bem definido, enquanto *Pantoea dispersa* já fora relacionada com a rizosfera de videiras.

Tabela 5. Relação de RPCP e espécies relacionadas de acordo com a similaridade genética de sequências do 16S rRNA no genbank do BLAST. As espécies foram relacionadas de acordo com a cobertura do fragmento e seu percentual de identidade

ID RPCP	Similaridade no BLASTn	Query Cover	Percent. Indt	Acess
1.05	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	41%	96,38%	NR 119220.1
3.17	<i>Bacillus velezensis</i>	62%	97,82%	NR_075005.2
3.19	sem registro de similaridade	-	-	-
3.24	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	81%	97,33%	NR 116793.1
3.29	<i>Pseudoxanthomonas jiangsuensis</i>	71%	88,32%	NR 132712.1
5.35	<i>Pseudomonas entomophila</i>	54%	90,66%	NR 102854.1
5.37	<i>Clostridium hydrogeniformans</i>	96%	93,91%	NR 115712.1
5.38	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	69%	97,69%	NR 104933.1
5.41	<i>Pseudomonas soli</i>	96%	94,41%	NR 134794.1
5.42	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	98%	94,33%	NR 116172.1
13.12	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	99%	85,03%	NR 118146.1
17.04	<i>Bacillus cereus</i>	74%	89,00%	NR_074540.1
27.09	<i>Kosakonia oryzendophytica</i>	97%	84,62%	NR 125586.1
31.14	<i>Luteimonas arsenica</i>	98%	87,12%	NR 149301.1
35.18	<i>Comamonas phosphati</i>	98%	83,13%	NR 147778.1

Com exceção da RPCP 3.19 que não mostrou similaridade com nenhuma sequência genética presente no BLAST, todas as demais exibiram similaridade com alguma bactéria previamente descrita. A RPCP de identificação 1.05 obteve 96,38% de identidade com *Stenotrophomonas maltophilia*, apesar de ter cobertura de apenas 41%, o erro relacionado foi de zero. Com 97,82% de identidade, a RPCP de número 3.17 foi relacionada com *Bacillus velezensis*. A RPCP 3.24 obteve 97,33% de identidade com *Stenotrophomonas pavanii* (query cover de 81%). *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* foi relacionada com o isolado 3.29 com 88,32% de identidade e 71% de cobertura. O isolado 5.35 teve 90,66% de similaridade com *Pseudomonas entomophila* (cobertura de 54%). *Clostridium hydrogeniformans* teve 93,91% de similaridade com o isolado 5.37. Com 97,69% de identidade, o isolado 5.38 foi associado com *Leclercia adecarboxylata*. *Pseudomonas soli* e *P. taiwanensis* foram associados com os isolados 5.41 e 5.42 com percentuais de identidade de 94,41% e 94,33%, respectivamente. Com 99% de cobertura e 85,03% de identidade, a RPCP 13.12 foi relacionada com *Lysinibacillus mangiferihumi*. O isolado 17.04 teve 89% de identificação com *Bacillus cereus*. A rizobactéria 27.09 teve 84,62% de similaridade com *Kosakonia oryzendophytica*. *Luteimonas arsenica* teve 98% de cobertura e

87,12% de identidade com a RPCP 31.14. *Comamonas phosphati* teve 98% de cobertura e 83,13% de identidade com a RPCP 35.18.

O alinhamento dos nucleotídeos possibilitou a formação de grupos hierárquicos de acordo com o emparelhamento das bases (Figura 19). Em ordem de similaridade decrescente, foi possível a formação de quatro grandes grupos polifiléticos associados a espécies bacterianas com sequências do 16S rRNA disponíveis no *Genbank*. O primeiro grande grupo formado contém as RPCP 3.17, 17.04, 13.12, 5.37 e 35.18. Tais RPCP foram associadas a distintos gêneros e espécies de bactérias. Os isolados 3.17, 17.04 e 13.12 foram pareados com o gênero *Bacillus* e *Lysinbacillus*. As espécies combinadas com esse clado foram: *B. velezensis*, *B. cereus* e *Lysinbacillus mangiferihumi*. A RPCP 5.37 foi agrupada com *Clostridium hydorniformans*, enquanto o isolado 35.18 com *Comamonas phosphati* (100% de associação pelo teste de *bootstrap*).

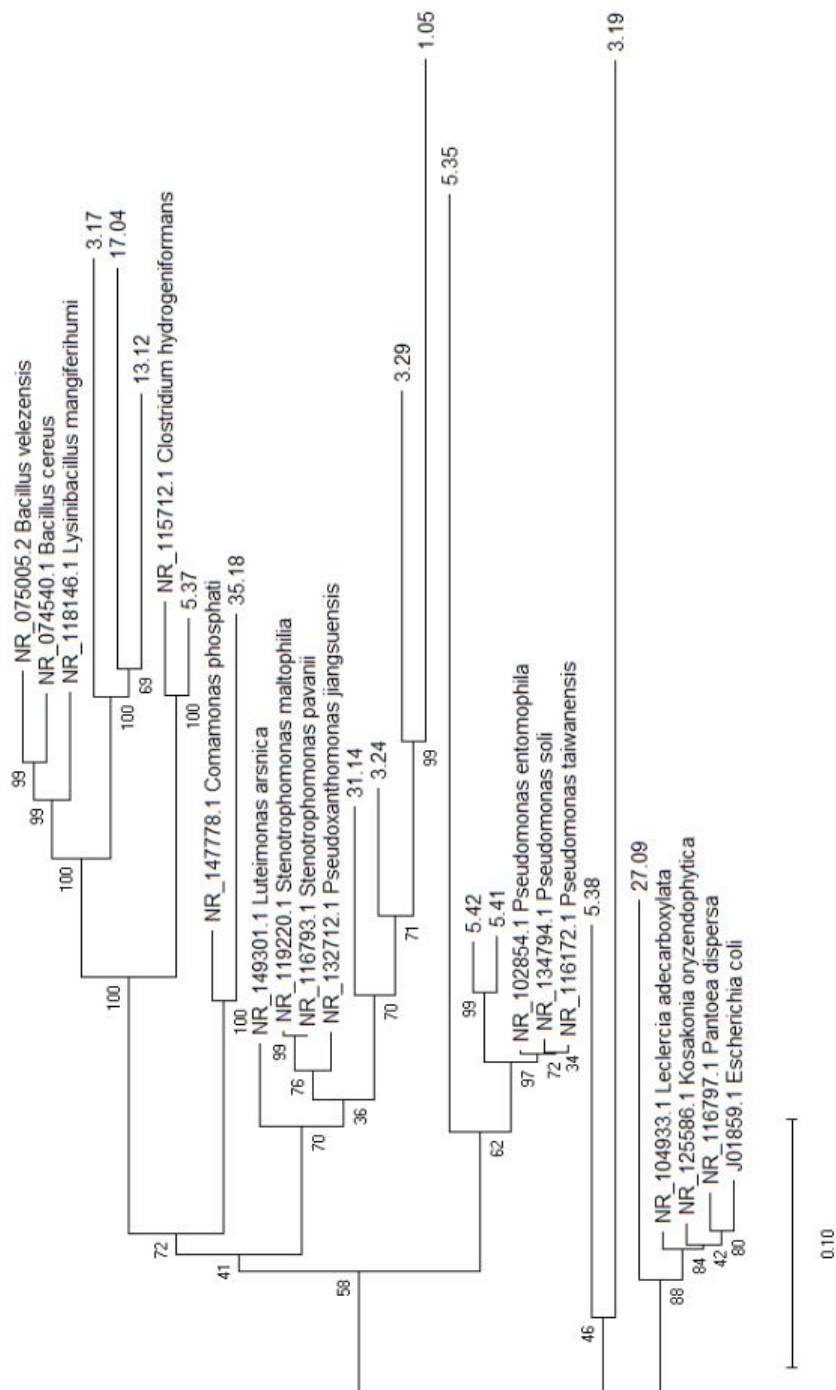
O segundo grupo formado compreende a organização das RPCP 31.14, 3.24, 3.29 e 1.05. Tais rizobactérias foram pareadas com um grupo adjacente constituído de quatro espécies bacterianas: *Luteimonas arsnica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. pavanii* e *Pseudoxanthomonas jiangsuensis*. Embora constituam um clado único, não houve expressão de comportamentos monofilético entre as RPCP isoladas e espécies identificadas como similares do *Genbank*. As sequências entre as espécies identificadas e RPCP isoladas compartilham até 70% de nucleotídeos de acordo com o teste de *bootstrap*.

As RPCP de número 5.35, 5.42 e 5.41 foram relacionadas as espécies *Pseudomonas entomophila*, *P. soli* e *P. taiwanensis*. Tais espécies compartilham até 97% de similaridade de seus nucleotídeos com os isolados 5.42 e 5.41. Tal grupo foi associado ao isolado 5.35 com 62% de compartilhamento genético dos nucleotídeos presentes do 16S rRNA.

As RPCP 5.38 e 3.19 não foram relacionadas a nenhuma das espécies indicadas de acordo com a cobertura e/ou percentual de identidade, bem como nenhuma das demais inclusas na análise. Tal fato é devido a baixa relação de cobertura pelo isolado 5.38 com seu indivíduo mais próximo (*Leclercia adecarboxylata*, 69%) e do isolado 3.19 não ser associado com nenhuma espécie. Contudo, as sequências revelaram que 46% dos nucleotídeos presentes em 5.38 e 3.19 possuem similaridade.

A RPCP 27.09 exibiu a formação monofilética. Um *outgroup* composto por *Escherichia coli*, *Pantoea dispersa*, *Kosakonia oryzendophytica* e *Leclercia adecarboxylata* foi associado a sua matriz genética do 16S rRNA. A análise do teste de *bootstrap* revelou a ocorrência de 88% de compartilhamento entre a RPCP e as espécies constituintes do *outgroup*, sendo mais próxima filogeneticamente a *Leclercia adecarboxylata*.

Figura 17. Árvore filogenética (método Neighbor-Joining e Kimura) construída com base em sequencias parciais do gene 16S rRNA de rizobactérias isoladas da rizosfera de videiras do Vale do São Francisco.



O primeiro grande grupo, de maior similaridade genética com as RPCP isoladas, contém espécies relacionadas ao gênero *Bacillus*. As RPCP 3.17, 17.04 e 13.12 foram relacionadas com as espécies: *Bacillus velezensis*, *Bacillus cereus* e *Lysinibacillus mangiferihumi*. *B. cereus* é uma espécie bacteriana com alta similaridade genética com *B. thuringiensis*, o que indica a ocorrência de uma possível evolução. Um grupo paralelo pertencente a outro gênero também aparece relacionado a *Bacillus*, *Lysinibacillus*. Tais gêneros, e espécies contidas, possuem capacidade de realização de mecanismos ligados a solubilização de fosfatos por liberação de ácidos produzidos por diversos complexos enzimáticos relacionados a hidrólise do amido (LIU et al., 2014). Além disso, há relatos da promoção de crescimento de plantas por *Bacillus velezensis* devido a produção de sideróforos (MATES; PONTES; HALFELD-VIEIRA, 2019), bem como na atenuação da ocorrência de patógenos em silagens (WAMBACQ et al., 2018).

O segundo grande grupo filogenético associado as RPCP possui relações com *Stenotrophomonas maltophilia*, uma bactéria que ocorre em diversos ambientes, inclusive extremos, e possui afinidade associativa com plantas. Essa espécie de bactéria é responsável por cumprir funções ecossistêmicas nos ciclos biogeoquímicos do enxofre e nitrogênio (AN; BERG, 2018). O isolamento de *S. maltophilia* já foi verificado em outros estudos de caracterização de RPCP associadas a espécies vegetais diferentes de *Vitis* sp. Os resultados revelam que *S. maltophilia* possui capacidade antagônica à outros micro-organismos e vírus servindo de agente de controle biológico (ISLAM et al., 2016; LI et al., 2016). A capacidade antagônica associada a *S. maltophilia* explica o PIC de 50,95% para *X. campestris* pv. *viticola* pela RPCP 1.05. Apesar do percentual de cobertura e identidade genético, de acordo com o sequenciamento, estarem abaixo da suficiência para a relação direta com a espécie é possível que processos de recombinação genética sejam responsáveis pela distância associativa com as RPCP. Análises filogenéticas revelaram que a emergência de grupos dos gêneros *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas* e *Luteimonas* derivam do gênero *Xanthomonas* que durante o processo evolutivo sofreu processos de perda e ganho de genes (RODRIGUEZ-R et al., 2012).

O penúltimo grupo associado as RPCP incluiu bactérias do gênero *Pseudomonas*. As espécies *P. entomophila*, *P. soli* e *P. taiwanensis* foram relacionadas as RPCP de identificação 5.41, 5.42 e 5.35. Tais RPCP obtiveram elevados índices de capacidade de promoção do crescimento mediante a produção

de fitormônios do grupo auxina. Em um estudo realizado na Índia, pesquisadores encontraram várias espécies de RPCP do gênero *Pseudomonas* associadas a diferentes culturas. Avaliando a capacidade dos isolados promoverem o crescimento de plantas foi verificado que tais cepas possuíam propriedades relacionadas a produção de fitormônios de grupos variados como auxinas, giberelinas e citocininas. Além disso, em condições de estresse ambiental (restrição hídrica), a capacidade de realização de mecanismos foi potencializada indicando a viabilidade do uso dessas espécies como promotores de crescimento vegetal (SANDHYA et al., 2010).

Um último grupamento contendo duas RPCP (3.19 e 5.38) obteve baixa afinidade com as espécies relacionadas no *Genbank*. Alguns fatores podem estar associados a formação desse grupo como, por exemplo, o baixo percentual de cobertura em virtude do fragmento disponível no *Genbank* ser de tamanho maior ou menor que sequência alinhada; a ocorrência de *gaps* no processo de alinhamento de identidades; a necessidade de exclusão de bases durante o processo de construção da árvore filogenética, ou ainda, a possibilidade de ocorrência de uma espécie bacteriana ainda não catalogada.

A cepa 27.09 foi agrupada junto a espécies do *outgroup*. Sua maior afinidade genética foi relacionada a espécie *Leclercia adecarboxylata*. A capacidade de solubilização de fosfatos e promoção do crescimento vegetal por *Leclercia adecarboxylata* já foi relatada (NAVEED et al., 2014). Contudo, o baixo percentual de identidade (97,69%) e a baixa cobertura das sequências (69%) não permitem relações diretas entre o isolado 27.09 e a espécie indicada.

Diante das observações das RPCP obtidas, é possível afirmar que existem espécies bacterianas com promissoras capacidades de desempenhar mecanismos promotores do crescimento vegetal. As RPCP avaliadas pelo sequenciamento genético do 16S rRNA demonstraram relação com espécies bacterianas já documentadas por sua capacidade de promoção de crescimento. Entretanto, não existem relatos associados à ocorrência de tais espécies em videira. O sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu visualizar as afinidades dos grupos taxonômicos das RPCP. Porém, algumas lacunas permanecem abertas em virtude de possíveis Transferências Horizontais de Genes (THG), deleções ou aquisições que causaram modificações na matriz genética de rizobactérias advindas da rizosfera de videiras.

A utilização do RNA ribossômico para estudos de filogenia, em grande parte dos casos, se configura como excelente marcador universal. Genes ribossomais, como o 16S rRNA presente em procariotos, são: onipresentes, tem função indispensável para síntese de proteínas e estão ligados a evolução/conservação das espécies. Tais características os tornam excelentes marcadores universais para análises filogenéticas. Entretanto, podem ocorrer variações na sequência de estruturas secundárias presentes nos ribossomos e assim a resolução filogenética ser insuficiente (WASHBURNE et al., 2018).

Um método alternativo comumente usado é a abordagem de Análise de Sequências em Multilocus (MLSA). Esse método consiste no estudo da composição das bases presente em genes *housekeeping* (genes constitutivos). Genes constitutivos são responsáveis pela codificação de proteínas relacionadas a funções conservadas (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Em geral, a escolha dos genes deve levar em consideração sua singularidade no genoma e a ocorrência generalizada. Os principais genes estudados em MLSA são: os codificantes para DNA girasse (*gyr*); a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*); recombinase A (*recA*); a subunidade β da ATP sintase F0F1 (*atpD*) e chaperonina GroEL (*groEL*) (RONG; HUANG, 2014).

Nesse sentido, estudar a filogenia de genes constitutivos (*housekeeping*) codificantes para diferentes proteínas e que estejam presentes de forma geral em procariotos, podem fornecer maiores informações acerca das RPCP avaliadas. Assim, a abordagem de MLSA seria capaz de proporcionar melhores resultados quanto a filogenia dos isolados do que apenas a análise baseada no 16S rRNA.

5. CONCLUSÕES

A rizosfera de videiras abriga comunidades de RPCP capazes de ser cultivadas em meio de cultura. Contudo, a abundância RPCP manipuláveis *in vitro* associadas a videiras é baixa.

A especificidade de realização de mecanismos é sobressalente à capacidade de multiplicidade de mecanismos por RPCP associadas a videiras.

Estudos de prospecção de micro-organismos promotores de crescimento vegetal requerem grande dedicação e elevado número de amostras para obtenção de resultados promissores.

O presente trabalho serve como indicativo de potencialidade do uso RPPC como alternativa sustentável para a viticultura no VSF. As RPCP isoladas pelo presente estudo podem servir de base para futura produção bioinoculantes.

Trabalhos subsequentes acerca de RPCP manipuláveis *in vitro* associadas a videiras devem ser realizados a fim de verificar o efeito a nível de planta em condições de casa de vegetação e campo.

REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. **Microbial Ecology**, Auburn, v. 58, n. 4, p. 921–929, 2009. Disponível em: <10.1007/s00248-009-9531-y>.
- ADREES, H.; HAIDER, M. S.; ANJUM, T.; AKRAM, W. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. **Crop Protection**, Kidlington, v. 115, p. 75–83, 2019. Disponível em: <10.1016/j.cropro.2018.09.011>.
- AN, S.; BERG, G. *Stenotrophomonas maltophilia*. **Trends in Microbiology**, Kidlington, v. 26, n. 7, p. 637–638, 2018. Disponível em: <10.1016/j.tim.2018.04.006>.
- ANDRADE, V. P. M. de; SILVA, J. A. B. da; SOUSA, J. S. C. de; OLIVEIRA, F. F.; SIMÕES, W. L. Physiological characteristics of grapevine under irrigation and fertilization management1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 47, n. 4, p. 390–398, 2017. Disponível em: <10.1590/1983-40632017v4748640>.
- ANDREOLLI, M.; LAMPIS, S.; ZAPPAROLI, G.; ANGELINI, E.; VALLINI, G. Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research**, Munich, v. 183, p. 42–52, 2016a. Disponível em: <10.1016/j.micres.2015.11.009>.
- ARATA, L.; HAUSCHILD, S.; SCKOKAI, P. Economic and social impact of grape growing in Northeastern Brazil. **Bio-based and Applied Economics**, Florenza, v. 6, n. 3, p. 279–293, 2017. Disponível em: <10.13128/BAE-20774>.
- ARSLAN, M.; IMRAN, A.; KHAN, Q. M.; AFZAL, M. Plant–bacteria partnerships for the remediation of persistent organic pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 24, n. 5, p. 4322–4336, 2017. Disponível em: <10.1007/s11356-015-4935-3>.
- ATTALLAH, M. F.; METWALLY, S. S.; MOUSSA, S. I.; SOLIMAN, M. A. Environmental impact assessment of phosphate fertilizers and phosphogypsum waste: Elemental and radiological effects. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 789–797, 2019. Disponível em: <10.1016/j.microc.2019.02.001>.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. . Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. **Journal of soil science and plant nutrition**, Temuco, v. 25, n. 2, p. 372–396, 2015. Disponível em: <10.4067/S0718-95162015005000035>.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, New York, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006. Disponível em: <10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.

BARKA, E. A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C. Enhancement of Chilling Resistance of Inoculated Grapevine Plantlets with a Plant Growth-Promoting *Rhizobacterium*, *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 11, p. 7246–7252, 2006. Disponível em: <10.1128/AEM.01047-06>.

BARTON, C. J. Photometric Analysis of Phosphate Rock. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 20, n. 11, p. 1068–1073, 1948. Disponível em: <10.1021/ac60023a024>.

BASU, S.; RABARA, R.; NEGI, S. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, Amsterdam, v. 12, p. 43–49, 2017. Disponível em: <10.1016/j.plgene.2017.07.004>.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2009. Disponível em: <10.1007/s00253-009-2092-7>.

BERG, G.; GRUBE, M.; SCHLOTTER, M.; SMALLA, K. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, 2014. Disponível em: <10.3389/fmicb.2014.00148>.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 1–13, 2009. Disponível em: <10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>.

BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, London, v. 13, n. 1, p. 66, 2014. Disponível em: <10.1186/1475-2859-13-66>.

BONA, E.; MASSA, N.; NOVELLO, G.; BOATTI, L.; CESARO, P.; TODESCHINI, V.; MAGNELLI, V.; MANFREDI, M.; MARENGO, E.; MIGNONE, F.; BERTA, G.; LINGUA, G.; GAMALERO, E. Metaproteomic characterization of *the Vitis vinifera* rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 95, n. 1, 2019. Disponível em: <10.1093/femsec/fiy204>.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 57, n. 2, p. 535–8, fev. 1991.

BUCK, J. D. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 992–993, 1982.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013. Disponível em: <10.1146/annurev-arplant-050312-120106>.

CATTELAN, A. J. **Métodos Qualitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999.

CHAGAS, A. F.; DE OLIVEIRA, L. A.; DE OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum - Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359–366, 2010. Disponível em: <10.4025/actasciagron.v32i2.3185>.

CHOJNACKA, K.; MOUSTAKAS, K.; WITEK-KROWIAK, A. Bio-based fertilizers: A practical approach towards circular economy. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 295, p. 122223, 2020. Disponível em: <10.1016/j.biortech.2019.122223>.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1685–93, 2005. Disponível em: <10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, Amsterdam, v. 19, p. 29–37, 2019. Disponível em: <10.1016/j.jare.2019.03.004>.

CORDELL, D.; DRANGERT, J.-O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, Kidlington, v. 19, n. 2, p. 292–305, 2009. Disponível em: <10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>.

CORSO, M.; VANNOZZI, A.; ZILIOFFO, F.; ZOUINE, M.; MAZA, E.; NICOLATO, T.; VITULO, N.; MEGGIO, F.; VALLE, G.; BOUZAYEN, M.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S.; LUCCHIN, M.; BONGHI, C. Grapevine Rootstocks Differentially Affect the Rate of Ripening and Modulate Auxin-Related Genes in Cabernet Sauvignon Berries. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 2016, 2016. Disponível em: <10.3389/fpls.2016.00069>.

D'SOUZA, G.; WASCHINA, S.; PANDE, S.; BOHL, K.; KALETA, C.; KOST, C. Less is more: selective advantages can explain the prevalent loss of biosynthetic genes in bacteria. **Evolution**, Hoboken, v. 68, n. 9, p. 2559–2570, 2014. Disponível em: <10.1111/evo.12468>.

DAVIS, K. F.; GEPHART, J. A.; EMERY, K. A.; LEACH, A. M.; GALLOWAY, J. N.; D'ODORICO, P. Meeting future food demand with current agricultural resources. **Global Environmental Change**, Kidlington, v. 39, p. 125–132, 2016. Disponível em: <10.1016/j.gloenvcha.2016.05.004>.

DE ARAÚJO, V. L. V. P. **Prospecção de bactérias promotoras de crescimento de plantas de uma lagoa temporária do semiárido tropical**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

DILWOTH, M. J. Dinitrogen fixation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 81–114, 1974. Disponível em: <10.1146/annurev.pp.25.060174.000501>.

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

ELKOCA, E.; KANTAR, F.; SAHIN, F. Influence of Nitrogen Fixing and Phosphorus Solubilizing Bacteria on the Nodulation, Plant Growth, and Yield of Chickpea. **Journal of Plant Nutrition**, London, v. 31, n. 1, p. 157–171, 2007. Disponível em: <10.1080/01904160701742097>.

FLORES, S. W. S. **Composição e funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão selvagem e cultivado**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2015.

FREITAS, E. de M. **Fósforo e metais pesados em solos sob cultivo de videiras e sua relação com os atributos microbiológicos do solo**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

FREITAS, N. de O.; YANO-MELO, A. M.; SILVA, F. S. B. da; MELO, N. F. de; MAIA, L. C. Soil biochemistry and microbial activity in vineyards under conventional and organic management at Northeast Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 223–229, 2011. Disponível em: <10.1590/S0103-90162011000200013>.

FUNES PINTER, M. I.; SALOMON, M. V.; BERLI, F.; GIL, R.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. Plant growth promoting rhizobacteria alleviate stress by AsIII in grapevine. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 267, p. 100–108, 2018. Disponível em: <10.1016/j.agee.2018.08.015>.

GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 75, p. 54–63, 2014. Disponível em: <10.1016/j.soilbio.2014.03.023>.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015. Disponível em: <10.1016/j.syapm.2015.03.007>.

GOULD, W. D.; HAGEDORN, C.; BARDINELLI, T. R.; ZABLOTOWICZ, R. M. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1985.

GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K.; SINGH, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, Singapore, v. 7, n. 2, p. 96–102, 2015. Disponível em: <10.4172/1948-5948.1000188>.

HALDAR, S.; SENGUPTA, S. **Microbial Ecology at Rhizosphere: Bioengineering and Future Prospective**. Singapore: Springer Singapore, 2016.

HARA, F. A. D. S.; OLIVEIRA, L. A. De. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343–357, 2004. Disponível em: <10.1590/S0044-59672004000300002>.

HEFFER, P.; GRUÈRE, A.; ROBERTS, T. Assessment of fertilizer use by crop at the global level. **International Fertilizer Association and International Plant Nutrition Institute**, p. 0–19, 2017.

ISLAM, S.; AKANDA, A. M.; PROVA, A.; ISLAM, M. T.; HOSSAIN, M. M. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1360, 2016. Disponível em: <10.3389/fmicb.2015.01360>.

JHA, P.; PANWAR, J.; JHA, P. N. Mechanistic insights on plant root colonization by bacterial endophytes: a symbiotic relationship for sustainable agriculture. **Environmental Sustainability**, Singapore, v. 1, n. 1, p. 25–38, 2018. Disponível em: <10.1007/s42398-018-0011-5>.

KAHILUOTO, H. The Concept of Planetary Boundaries. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, Netherlands, p. 56–60, 2019. Disponível em: <10.1016/B978-0-08-100596-5.22127-6>.

KAY, S.; BONAS, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 12, n. 1, p. 37–43, 2009. Disponível em: <10.1016/j.mib.2008.12.006>.

KERTÉSZ, Á.; NAGY, L. A.; BALÁZS, B. Effect of land use change on ecosystem services in Lake Balaton Catchment. **Land Use Policy**, Amsterdam, v. 80, p. 430–438, 2019. Disponível em: <10.1016/j.landusepol.2018.04.005>.

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. **Microbiological Research**, Jena, v. 212–213, p. 103–111, nov. 2018. Disponível em: <10.1016/j.micres.2017.10.012>.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Translational Research**, v. 44, n. 2, p. 301–307, 1954.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, London, v. 286, n. 5776, p. 885–886, 1980. Disponível em: <10.1038/286885a0>.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Relationship of in vitro Antibiosis of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Plant Growth and the Displacement of Root Microflora. **Phytopathology**, St Paul, v. 71, n. 10, p. 1020, 1981. Disponível em: <10.1094/Phyto-71-1020>.

KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 83, p. 184–199, 2015. Disponível em: <10.1016/j.soilbio.2015.01.025>.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. de C.; BARETTA-MALUCHE, C. R.; BULL, R. de C. Diversidade Microbiana Nos Solos : definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 4, n. 4, p. 43–84, 2005.

LI, H.; HUANG, W.; XU, L.; ZHOU, X.; LIU, H.; CHENG, Z. *Stenotrophomonas maltophilia* HW2 enhanced cucumber resistance against cucumber green mottle mosaic virus. **Journal of Plant Biology**, Heidelberg, v. 59, n. 5, p. 488–495, 2016. Disponível em: <10.1007/s12374-016-0246-6>.

LIMA, M. A. G.; PEIXOTO, A. N. A. R.; BORGES, I. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA, M. A. G.; CAVALCANTI, L. S. Induction of resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in grapevine plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 39, 2017.

LIU, B.; LIU, G.-H.; HU, G.-P.; CETIN, S.; LIN, N.-Q.; TANG, J.-Y.; TANG, W.-Q.; LIN, Y.-Z. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 105, n. 3, p. 501–510, 2014. Disponível em: <10.1007/s10482-013-0102-3>.

LIU, E.; YAN, C.; MEI, X.; HE, W.; BING, S. H.; DING, L.; LIU, Q.; LIU, S.; FAN, T. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 158, n. 3–4, p. 173–180, 2010. Disponível em: <10.1016/j.geoderma.2010.04.029>.

MARÍN, C.; GODOY, R.; VALENZUELA, E.; SCHLOTTER, M.; WUBET, T.; BOY, J.; GSCHWENDTNER, S. Functional land-use change effects on soil fungal communities in Chilean temperate rainforests. **Journal of soil science and plant nutrition**, Temuco, v. 17, n. 4, p. 985–1002, 2017. Disponível em: <10.4067/S0718-95162017000400011>.

MATES, A. de P. K.; PONTES, N. de C.; HALFELD-VIEIRA, B. de A. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. **Biological Control**, San Diego, v. 137, 2019. Disponível em: <10.1016/j.biocontrol.2019.104013>.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 165–199, 2001. Disponível em: <10.1146/annurev.micro.55.1.165>.

MÜLLER, C. A.; OBERMEIER, M. M.; BERG, G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 235, p. 171–180, 2016. Disponível em: <10.1016/j.jbiotec.2016.03.033>.

NAVEED, M.; AHMED, I.; KHALID, N.; MUMTAZ, A. S. Bioinformatics based structural characterization of glucose dehydrogenase (*gdh*) gene and growth promoting activity of *Leclercia* sp. QAU-66. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 603–611, 2014. Disponível em: <10.1590/S1517-83822014000200031>.

NOVELLO, G.; GAMALERO, E.; BONA, E.; BOATTI, L.; MIGNONE, F.; MASSA, N.; CESARO, P.; LINGUA, G.; BERTA, G. The Rhizosphere Bacterial Microbiota of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir in an Integrated Pest Management Vineyard. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1528, 2017. Disponível em: <10.3389/fmicb.2017.01528>.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2013. Disponível em: <10.1038/nrmicro2990>.

ORR, C. H.; STEWART, C. J.; LEIFERT, C.; COOPER, J. M.; CUMMINGS, S. P. Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 119, n. 1, p. 208–214, 2015. Disponível em: <10.1111/jam.12822>.

PEREG, L.; MORUGÁN-CORONADO, A.; MCMILLAN, M.; GARCÍA-ORENES, F. Restoration of nitrogen cycling community in grapevine soil by a decade of organic fertilization. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 179, n. 2, p. 11–19, 2018. Disponível em: <10.1016/j.still.2018.01.007>.

PÉREZ-JARAMILLO, J. E.; MENDES, R.; RAAIJMAKERS, J. M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 90, n. 6, p. 635–644, 2016. Disponível em: <10.1007/s11103-015-0337-7>.

PHILLIPS, R. P.; FINZI, A. C.; BERNHARDT, E. S. Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO₂ fumigation. **Ecology Letters**, Hoboken, v. 14, n. 2, p. 187–194, 2011. Disponível em: <10.1111/j.1461-0248.2010.01570.x>.

PICCIN, R.; COUTO, R.; JÚNIOR, R.; BELLINASSO, S.; GATIBONI, L. C. Phosphorus forms in leaves and their relationships with must composition and yield in grapevines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 1, p. 319–327, 2017. Disponível em: <10.1590/s0100-204x2017000500005>.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 95–103, 2001. Disponível em: <10.1016/S0923-2508(00)01172-4>.

PRESTON, W.; WILLIAMS, C.; JACQUES, Y.; BEZERRA, A.; SILVA, D. J.; FERREIRA, H. A. Soil fertility changes in vineyards of a semiarid region in Brazil. **Journal of soil science and plant nutrition**, Temuco, v. 17, n. 3, p. 672–685, 2017. Disponível em: <10.4067/S0718-95162017000300010>.

RAY, D. K.; MUELLER, N. D.; WEST, P. C.; FOLEY, J. A. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66428, 2013. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0066428>.

REINHOLD-HUREK, B.; BÜNGER, W.; BURBANO, C. S.; SABALE, M.; HUREK, T. Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 403–424, 2015. Disponível em: <10.1146/annurev-phyto-082712-102342>.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological Research**, Jena, v. 167, n. 2, p. 69–78, 2012. Disponível em: <10.1016/j.micres.2011.03.003>.

ROCKSTRÖM, J.; STEFFEN, W.; NOONE, K.; LAMBIN, E.; LENTON, T. M.; SCHEFFER, M.; FOLKE, C.; SCHELLNHUBER, H. J.; WIT, C. A. De; HUGHES, T.; LEEUW, S. Van Der; RODHE, H.; SNYDER, P. K.; COSTANZA, R.; SVEDIN, U.; FALKENMARK, M.; KARLBERG, L.; CORELL, R. W.; FABRY, V. J.; HANSEN, J.; WALKER, B.; LIVERMAN, D.; RICHARDSON, K.; CRUTZEN, P.; FOLEY, J. Planetary Boundaries : Exploring the Safe Operating Space for Humanity. **Ecology and Society**, Washington, v. 14, n. 2, p. 32, 2009a.

ROCKSTRÖM, J.; STEFFEN, W.; NOONE, K.; PERSSON, A.; CHAPLIN III, F. S.; LAMBIN, E.; LENTON, T. M.; SCHEFFER, M.; FOLKE, C.; SCHELLNHUBER, H. J.; NYKVIST, B.; WIT, C. A. De; HUGHES, T.; LEEUW, S. Van Der; RODHE, H.; SORLIN, S.; SNYDER, P. K.; COSTANZA, R.; SVEDIN, U.; FALKENMARK, M.; KARLBERG, L.; CORELL, R. W.; FABRY, V. J.; HANSEN, J.; WALKER, B.; LIVERMAN, D.; RICHARDSON, K.; CRUTZEN, P.; FOLEY, J. A. A safe operating space for humanity. **Nature**, London, v. 461, n. 7263, p. 472–475, 2009b. Disponível em: <10.1038/461472a>.

RODRIGUEZ-R, L. M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; SALAZAR, C.; RESTREPO, S.; BERNAL, A. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 43, 2012.

RONG, X.; HUANG, Y. Chapter 11 - Multi-locus Sequence Analysis: Taking Prokaryotic Systematics to the Next Level. In: GOODFELLOW, M.; SUTCLIFFE, I.; CHUN, J. B. T.-M. IN M. (Ed.). **New Approaches to Prokaryotic Systematics**. San Diego: Academic Press, 2014. San Diego, 41p. 221–251.

SANCHEZ, P. A.; BUOL, S. W. Soils of the Tropics and the World Food Crisis. **Science**, Washington, v. 188, n. 4188, p. 598 LP – 603, 1975. Disponível em: <10.1126/science.188.4188.598>.

SANDHYA, V.; ALI, S. Z.; VENKATESWARLU, B.; REDDY, G.; GROVER, M. Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. **Archives of Microbiology**, New York, v. 192, n. 10, p. 867–876, 2010. Disponível em: <10.1007/s00203-010-0613-5>.

SERRANO, J.; SILVA, J. M. da; SHAHIDIAN, S.; SILVA, L. L.; SOUSA, A.; BAPTISTA, F. Differential vineyard fertilizer management based on nutrient,s spatio-temporal variability. **Journal of soil science and plant nutrition**, Temuco, v. 17, n. ahead, p. 0–0, 2017. Disponível em: <10.4067/S0718-95162017005000004>.

SILVA, A. F. da. **Populações de alfa e beta rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do semiárido tropical**. 2019. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, A. O. da; SILVA, D. J.; BASSOI, L. H. Nitrate and potassium concentration in fertigated soil cultivated with wine vines. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 3, p. 305–316, 2016. Disponível em: <10.1590/1413-70542016403042215>.

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

SILVA, S. R. G. e; MARTINS, J. L.; SEIXAS, S.; SILVA, D. C. G. da; LEMOS, S. P. P.; LEMOS, P. V. B. Defeitos congênitos e exposição a agrotóxicos no Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, p. 20–26, 2011. Disponível em: <10.1590/S0100-72032011000100003>.

SOLANKI, M.; KUNDU, B. S.; NEHRA, K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. **Annals of Agrarian Science**, Tbilisi, v. 16, n. 4, p. 458–463, 2018. Disponível em: <10.1016/j.aasci.2018.05.007>.

SPRINGMANN, M.; CLARK, M.; MASON-D’CROZ, D.; WIEBE, K.; BODIRSKY, B. L.; LASSALETTA, L.; DE VRIES, W.; VERMEULEN, S. J.; HERRERO, M.; CARLSON, K. M.; JONELL, M.; TROELL, M.; DECLERCK, F.; GORDON, L. J.; ZURAYK, R.; SCARBOROUGH, P.; RAYNER, M.; LOKEN, B.; FANZO, J.; GODFRAY, H. C. J.; TILMAN, D.; ROCKSTRÖM, J.; WILLETT, W. Options for keeping the food system within environmental limits. **Nature**, London, v. 562, n. 7728, p. 519–525, 2018. Disponível em: <10.1038/s41586-018-0594-0>.

STEFFEN, W.; RICHARDSON, K.; ROCKSTROM, J.; CORNELL, S. E.; FETZER, I.; BENNETT, E. M.; BIGGS, R.; CARPENTER, S. R.; DE VRIES, W.; DE WIT, C. A.; FOLKE, C.; GERTEN, D.; HEINKE, J.; MACE, G. M.; PERSSON, L. M.; RAMANATHAN, V.; REYERS, B.; SORLIN, S. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. **Science**, Washington, v. 347, n. 6223, p. 736-1259855–10, 2015. Disponível em: <10.1126/science.1259855>.

TEWARI, S.; ARORA, N. K. Multifunctional Exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* PF23 Involved in Plant Growth Stimulation, Biocontrol and Stress Amelioration in Sunflower Under Saline Conditions. **Current Microbiology**, New York, v. 69, n. 4, p. 484–494, 2014. Disponível em: <10.1007/s00284-014-0612-x>.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002. Disponível em: <10.1016/S1369-5274(02)00324-7>.

UROZ, S.; BUÉE, M.; MURAT, C.; FREY-KLETT, P.; MARTIN, F. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 2, n. 2, p. 281–288, 2010. Disponível em: <10.1111/j.1758-2229.2009.00117.x>.

- VICENTE, E. J.; DEAN, D. R. Keeping the nitrogen-fixation dream alive. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 114, n. 12, p. 3009–3011, 21 mar. 2017. Disponível em: <10.1073/pnas.1701560114>.
- VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 539–545, 2000. Disponível em: <10.1590/S0103-90162000000300026>.
- VIGDIS, T.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. **Science**, Washington, v. 296, n. 5570, p. 1064–1066, 2002. Disponível em: <10.1126/science.1071698>.
- VINGATARAMIN, L.; FROST, E. H. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. **BioTechniques**, New York, v. 58, n. 3, p. 120–125, 2015. Disponível em: <10.2144/000114263>.
- WAMBACQ, E.; AUDENAERT, K.; HÖFTE, M.; DE SAEGER, S.; HAESAERT, G. *Bacillus velezensis* as antagonist towards *Penicillium roqueforti* s.l. in silage: in vitro and in vivo evaluation. **Journal of applied microbiology**, Hoboken, v. 125, n. 4, p. 986, 2018. Disponível em: <10.1111/jam.13944>.
- WASHBURNE, A. D.; MORTON, J. T.; SANDERS, J.; MCDONALD, D.; ZHU, Q.; OLIVERIO, A. M.; KNIGHT, R. Methods for phylogenetic analysis of microbiome. **Nature Microbiology**, London, v. 3, n. 6, p. 652–661, 2018. Disponível em: <10.1038/s41564-018-0156-0>.
- WOŁEJKO, E.; JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A.; WYDRO, U.; BUTAREWICZ, A.; ŁOZOWICKA, B. Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides – A review. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 147, p. 103356, 2020. Disponível em: <10.1016/j.apsoil.2019.09.006>.
- YANG, H.; LIU, Y.; LIU, J.; MENG, J.; HU, X.; TAO, S. Improving the Imbalanced Global Supply Chain of Phosphorus Fertilizers. **Earth's Future**, Washington, v. 7, n. 6, p. 638–651, 2019. Disponível em: <10.1029/2018EF001005>.
- YU, Y.; ZHAO, C.; JIA, H. Ability of split urea applications to reduce nitrous oxide emissions: A laboratory incubation experiment. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 100, p. 75–80, 2016. Disponível em: <10.1016/j.apsoil.2015.12.009>.
- ZARRAONAINDIA, I.; OWENS, S. M.; WEISENHORN, P.; WEST, K.; HAMPTON-MARCELL, J.; LAX, S.; BOKULICH, N. A.; MILLS, D. A.; MARTIN, G.; TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; GILBERT, J. A. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. **mBio**, Washington, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2015. Disponível em: <10.1128/mBio.02527-14>.