

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico

Vanessa Nessner Kavamura

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola**

**Piracicaba
2012**

Vanessa Nessner Kavamura
Bacharel em Ciências Biológicas

Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola**

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Kavamura, Vanessa Nessner

Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico / Vanessa Nessner Kavamura.- - Piracicaba, 2012.
244 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bactérias 2. Caatinga 3. Cactáceas 4. Crescimento vegetal 5. Estresse hídrico
6. Mandacaru 7. Rizosfera 8. Semiárido I. Título

CDD 633.39
K21b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

*Aos meus pais, Teruo e Maria Catarina,
por todo o amor, apoio e incentivo
incondicionais, em todos os
momentos de minha vida.
Eu amo vocês!*

OFEREÇO

*Aos meus queridos avós,
Anton (ota), Anna (oma)
Tsugio (ditian) e Kashiko
(batian), que muito contribuíram
para a minha formação pessoal.
Saudades eternas...
vocês sempre estarão
em meu coração!*

AGRADECIMENTOS

É muito difícil expressar em palavras a gratidão que sinto por todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Entretanto, tentarei fazê-lo da melhor forma possível, listando aqueles que contribuíram imensamente, não somente para a conclusão de alguns anos de estudo, mas também para a minha formação.

À Deus e à Meishu-Sama, pela vida, agradeço humildemente;

À Universidade de São Paulo e à Capes pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao meu orientador, Dr. Itamar Soares de Melo, pela oportunidade, confiança e orientação, muito obrigada!

À Embrapa Meio Ambiente, pela infraestrutura oferecida para realização da pesquisa;

Ao prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pela confiança ao me indicar ao Itamar e pela paciência nos ensinamentos;

Ao pesquisador, Dr. Rodrigo Mendes, pelas correções do trabalho e pelas valiosas dicas;

Ao Dr. Rodrigo Gouvêa Taketani, obrigada pelo auxílio aos assuntos referentes à biologia molecular e também pela amizade!

Ao Dr. Tiago Domingues Zucchi, obrigada pelas questões relacionadas à taxonomia;

Aos amigos de trabalho e de lazer: Luciana Aparecida Ávila (Lu), Mirian Lobo Sáber (Mi), Natália Franco Taketani, Suikina Nobre Santos (Suiki), Wallace Rafael de Souza (Wall), muito obrigada pelas horas de descontração e boas risadas durante as viagens, passeios e comilança !!!

Aos colegas e amigos do LMA com os quais convivo todos os dias e que tornam a ida ao laboratório mais especial: Ana Gabriele Barbosa Castiliani, Andialé Pinto dos Santos, Carlos Eduardo Oliveira da Silva, Cassiano Forner, José Abrahão Haddad Galvão, Leonardo José da Silva (Léo), Lúcio Bertoldo Costa, Michelli de Souza dos Santos, Milena Duarte Lançoni, Rafael Eduardo Silva, Regiane Iost (Figura) e Zayame Velette Pinto. Aos novos colegas: Clederson Ferreira e Lucas Dantas Lopes, obrigada pelas discussões referentes às análises utilizadas.

Aos colegas e amigos do LMA que deixaram saudades: Alexandre Visconti (Tiozinho), Jayme Pieroni Junior, Livia Mendes, Luis Alexandre Sereda (Alê), Maria Augusta de Camargo Ferraz Machado (Guta), Osvaldo Luiz Ferreira Junior e Rachel Temperani Amaral Machado.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa - Meio Ambiente: Anamaria Ferreira Mayer Dentzien, Elke Simoni Dias Vilela (pelas questões relacionadas à química), João Luiz da Silva (pelo grande auxílio nas coletas), Márcia Maria Parma (pelas análises do MIDI e sequenciamento), Rosely dos Santos Nascimento (por todas as dicas), Tatiana Rigamonte Fernandes, meu sincero agradecimento por todo o auxílio e paciência!

Aos funcionários do P10 da Embrapa - Meio Ambiente, muito obrigada pelo auxílio nas atividades de campo, em especial ao Henrique Barros Vieira pelos espaços concedidos aos experimentos e à Célia Batista da Silva de Lima por todo o carinho!

Aos demais funcionários da Embrapa: pesquisadores, analistas, assistentes, pessoal da manutenção, motoristas e pessoal da limpeza, minhas lembranças!

Ao Tomio, por todo o companheirismo em todos os momentos de minha vida, por me aturar nas horas estressantes, por me auxiliar em alguns experimentos, enfim, por tudo, muito obrigada!

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 13 |
| ABSTRACT..... | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 33 |
| 2 OBJETIVOS E QUESTÕES BIOLÓGICAS..... | 35 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 37 |
| 3.1 Região semiárida do nordeste brasileiro: bioma Caatinga..... | 37 |
| 3.2 Micro-organismos..... | 42 |
| 3.2.1 De solo e rizosfera..... | 42 |
| 3.2.2 Extremófilos: ambientes áridos e semiáridos..... | 43 |
| 3.2.3 Ferramentas moleculares de análise..... | 45 |
| 3.2.4 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP)..... | 46 |
| 3.2.4.1 Mecanismos diretos de ação..... | 47 |
| 3.2.4.2 Mecanismos indiretos de ação..... | 51 |
| 3.3 Estresse ambiental..... | 52 |
| 3.3.1 Respostas fisiológicas dos organismos ao estresse..... | 53 |
| 3.3.1.1 Produção de biofilme..... | 53 |
| 3.3.1.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS)..... | 54 |
| 3.3.1.3 Produção de osmólitos intracelulares..... | 55 |
| 3.3.2 Estresse hídrico: tolerância x resistência..... | 55 |
| 3.3.2.1 O papel dos micro-organismos na tolerância vegetal ao estresse hídrico..... | 56 |
| Referências..... | 58 |
| 4 COMUNIDADE BACTERIANA DE SOLO E RIZOSFERA DE <i>CEREUS JAMACARU</i> DURANTE O PERÍODO CHUVOSO E DE SECA..... | 74 |
| Resumo..... | 74 |
| Abstract..... | 75 |
| 4.1 Introdução..... | 76 |
| 4.2 Desenvolvimento..... | 77 |
| 4.2.1 Material e Métodos..... | 77 |
| 4.2.1.1 Área de estudo e coleta das amostras de solo e rizosfera de <i>Cereus jamacaru</i> durante o período chuvoso e de seca..... | 77 |
| 4.2.1.2 Extração de DNA metagenômico de solo e rizosfera..... | 81 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.1.3 Estrutura da comunidade bacteriana por meio da técnica de polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism – T-RFLP</i>)..... | 81 |
| 4.2.1.4 Análise da comunidade bacteriana por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA em larga escala | 84 |
| 4.2.2 Resultados e Discussão | 87 |
| 4.2.2.1 Análise de T-RFLP do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> | 87 |
| 4.2.2.2 Análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA em larga escala..... | 103 |
| Referências..... | 124 |
| 5 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS CACTÁCEAS PARA TOLERÂNCIA À SECA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ZEA MAYS L. | 141 |
| Resumo..... | 141 |
| Abstract..... | 142 |
| 5.1 Introdução | 1423 |
| 5.2 Desenvolvimento | 144 |
| 5.2.1 Material e Métodos | 144 |
| 5.2.1.1 Área de estudo e coleta das amostras de solo e rizosfera de cactáceas durante o período chuvoso e de seca..... | 144 |
| 5.2.1.2 Isolamento de bactérias a partir de amostras de solo e rizosfera de cactáceas durante o período chuvoso e de seca com capacidade de crescer em meio com reduzida atividade de água..... | 146 |
| 5.2.1.3 Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio a partir de amostras de solo e rizosfera de cactáceas durante o período de seca..... | 148 |
| 5.2.1.4 Caracterização das bactérias | 149 |
| 5.2.1.5 Seleção de bactérias com características para tolerância à seca | 152 |
| 5.2.1.6 Seleção de bactérias com características de RPCP..... | 154 |
| 5.2.1.7 Promoção de crescimento de <i>Zea mays L.</i> | 158 |
| 5.2.1.8 Análise estatística..... | 160 |
| 5.2.2 Resultados e Discussão | 160 |
| 5.2.2.1 Isolamento e contagem de unidades formadoras de colônias das amostras de solo e rizosfera de cactáceas durante o período chuvoso e de seca..... | 160 |
| 5.2.2.2 Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio a partir de amostras de solo e rizosfera durante o período de seca..... | 170 |
| 5.2.2.3 Seleção de bactérias com características para tolerância à seca | 173 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.2.4 Seleção de bactérias com características de RPCP..... | 182 |
| 5.2.2.5 Linhagens com características para tolerância à seca e características de RPCP..... | 197 |
| 5.2.2.6 Promoção de crescimento de <i>Zea mays</i> L. por isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água | 204 |
| 5.2.2.7 Promoção de crescimento de <i>Zea mays</i> L. por <i>Bacillus</i> sp. e <i>Azospirillum</i> sp..... | 210 |
| Referências | 215 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 241 |
| Anexo..... | 243 |

RESUMO

Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico

A Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, inserido no clima semiárido nordestino, apresenta xerófitas com alta resistência aos períodos de seca. Estas plantas associam-se a micro-organismos que também se encontram bem adaptados, desenvolvendo mecanismos de proteção celular contra o estresse hídrico, assim como proteção vegetal contra os efeitos negativos da dessecação. O presente estudo buscou compreender as bactérias associadas às cactáceas da Caatinga, analisando a estrutura das comunidades bacterianas de solo e da rizosfera de *Cereus jamacaru* durante a alteração do período chuvoso para o de seca, identificando os grupos dominantes e discutindo algumas funções que possibilitem a manutenção da interação solo-cacto-micro-organismo durante o período de seca. Além disso, buscou selecionar bactérias tolerantes à seca e que fossem capazes de promover crescimento de plantas sob estresse hídrico. Amostras foram coletadas ao longo da Caatinga, em cinco estados: BA, CE, PI, PB e RN totalizando cinco pontos. Com o uso de metodologias independentes de cultivo, foi possível observar que o período de amostragem (chuvoso/seca) foi o principal responsável pela alteração na estrutura das comunidades bacterianas. Os filos Proteobacteria e Bacteroidetes foram abundantes durante o período chuvoso e os filos Actinobacteria e o gênero *Bacillus* abundantes durante o período de seca. Com o uso de metodologias dependentes de cultivo, foram isoladas com bastante frequência linhagens pertencentes ao gênero *Bacillus*, capazes de crescer em meio com reduzida atividade de água e com alguns mecanismos de proteção contra a dessecação, como a produção de exopolissacarídeos e biofilme. Além disso, várias linhagens apresentaram mecanismos de promoção de crescimento de plantas diretos e/ou indiretos, como produção de fitohormônio, disponibilização de P por meio de solubilização, fixação de nitrogênio, redução dos efeitos negativos do estresse causados por etileno, produção de celulase e amônia. Uma linhagem de *Bacillus* sp. foi capaz de promover crescimento de milho sob estresse hídrico, incrementando alguns parâmetros vegetais analisados. São discutidos o uso de consórcio bacteriano entre duas linhagens, além dos mecanismos que os micro-organismos dispõem para tolerar condições ambientais adversas e ainda as funções que estes micro-organismos podem ter na proteção vegetal contra a dessecação.

Palavras-chave: Caatinga; Semiárido; *Cereus jamacaru*; Bactérias; Estresse hídrico; Promoção de crescimento de plantas

ABSTRACT

Cacti-associated bacteria from Caatinga: plant growth promotion under water stress

Caatinga, a Brazilian unique biome, inserted in the semi-arid climate of Brazilian northeast, presents xerophytes with high resistance to drought periods. These plants are found in association with well-adapted microorganisms that have evolved some cellular protection mechanisms against water stress, as well as plant protection against the negative effects of desiccation. This work aimed to study the bacteria associated to some Caatinga cacti, with respect to the structure of bacterial communities of bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* during the modification of rainy season to dry season, identifying the dominant groups and discussing some functions that enable the soil-cactus-microorganism interaction maintenance during drought. Besides, we searched for drought-tolerant bacteria able to promote plant growth under water stress. Samples were collected along the Caatinga biome in five states: BA, CE, PI, PB, and RN in a total of five points. With unculturable techniques, it was possible to observe that the sampling season (rainy/dry) was the main driver for the modification of bacterial communities' structure. Proteobacteria and Bacteroidetes phyla were the most abundant during the rainy season while phylum Actinobacteria and *Bacillus* group were the most abundant during the dry season. With culturable techniques, it was observed a high frequency of strains belonging to genus *Bacillus* that were able to grow in medium at reduced water activity and displaying some mechanisms of desiccation protection such as the production of exopolysaccharides and biofilm. Furthermore, several strains showed mechanisms of direct and/or indirect plant growth promotion, like the production of fitohormone, availability of P through solubilization, nitrogen fixation, reduction of negative effects caused by stress-induced ethylene, production of cellulase and ammonia. One strain of *Bacillus* sp. was able to promote maize growth under water stress, increasing some of the analyzed plant parameters. The use of bacterial consortium between two strains, as well as mechanisms displayed by microorganisms under adverse environmental conditions and their functions in plant protection against desiccation are also discussed.

Keywords: Caatinga; Semi-arid; *Cereus jamacaru*; Bacteria; Water stress; Plant growth promotion

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 - Mapa político-administrativo mostrando o semiárido brasileiro delimitado pela linha amarela. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007).....37
- Figura 3.2 - Desenho esquemático de uma parte do tecido de uma cactácea, mostrando as flores laterais e as aréolas constituídas por longos espinhos. Fonte: Modificado de Anderson (2001)39
- Figura 3.3 - Fotos de *Cereus jamacaru* encontrado na Caatinga do semiárido nordestino, em período chuvoso (A) e de seca (B). (Fotografias da autora, 2009 e 2010).....40
- Figura 3.4 - Fotos de partes teciduais de *Cereus jamacaru*. A - Tronco verde, cilíndrico e com inúmeros espinhos; B - Fruto imaturo; C- Aréolas; D - Detalhe da aréola, um agrupamento de espinhos centrais e radiais; E - Flores laterais fechadas e noturnas; F - Vista superior do tronco com seis costelas; G - Corte transversal do tronco, evidenciando as seis costelas e a parte interna bem succulenta; H - Detalhes da raiz. (Fotografias da autora, 2009 e 2010).....40
- Figura 3.5 - Fotos de *Pilosocereus gounellei* encontrado com frequência em Caatinga de lajedo no semiárido nordestino (A e B). Observe o formato de candelabro (C e D). (Fotografias da autora, 2010).....41
- Figura 3.6 - Outras cactáceas representadas por: A – Palma (*Opuntia* sp.); B – Rabo-de-raposa (*Arrojadoa rhodantha*); C – Cumbeba (*Tacinga inamoena*); D – Cabeça-de-frade (*Melocactus* sp.)41
- Figura 3.7 - Esquema representando uma bactéria produtora de ACC deaminase responsável por clivar o composto ACC, precursor de etileno e conseqüentemente, reduzir os níveis de etileno, inibindo os efeitos deletérios causados por esse composto. Estresses abióticos, injúria, ataque de patógenos e até mesmo AIA podem induzir a enzima ACC sintase a converter o composto S-adenosilmetionina (AdoMet) em ACC, que por sua vez é convertido a etileno, que por sua vez

- causa vários efeitos negativos às plantas. Fonte: Modificado de Husen et al. (2008)..... 48
- Figura 3.8 - Esquema da mobilização e imobilização de fósforo por bactérias. Fonte: Modificado de Khan et al. (2009) 50
- Figura 4.1 - Mapa do Brasil com destaque para a região semiárida do Nordeste brasileiro, ilustrando os cinco pontos de coleta de solo e rizosfera de mandacaru durante o período chuvoso e de seca..... 77
- Figura 4.2 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 1, para os dois períodos amostrados 89
- Figura 4.3 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 2, para os dois períodos amostrados 90
- Figura 4.4 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 3, para os dois períodos amostrados 91
- Figura 4.5 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 4, para os dois períodos amostrados 92
- Figura 4.6 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 5, para os dois períodos amostrados 93
- Figura 4.7 - Non-metric multidimensional scaling (NMDS) das comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com a endonuclease *HhaI* das amostras estudadas. Variação sazonal (período chuvoso e de seca). A – Comparação entre amostras de solo do período chuvoso (círculo branco) e solo do período de seca (círculo

preto). B – Comparação entre amostras de rizosfera do período chuvoso (quadrado branco) e rizosfera do período de seca (quadrado preto)95

Figura 4.8 - *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) das comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com a endonuclease *HhaI* das amostras estudadas. Variação entre solo e rizosfera. A – Comparação entre amostras de solo do período chuvoso (círculo branco) e rizosfera do período chuvoso (quadrado branco). B – Comparação entre amostras de solo do período de seca (círculo preto) e rizosfera do período de seca (quadrado preto)96

Figura 4.9 - *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) das comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com a endonuclease *HhaI* das amostras estudadas. Variação espacial. Comparação entre amostras de solo e rizosfera do período chuvoso e de seca para os cinco pontos de coleta. Ponto 1 (cruz), ponto 2 (triângulo branco), ponto 3 (xis), ponto 4 (triângulo preto) e ponto 5 (retângulo)96

Figura 4.10 - Riqueza de UTO's detectadas com a técnica de T-RFLP para o grupo *Bacteria* em amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) para os dois períodos, chuvoso (C) e de seca (S), para os cinco pontos amostrados.97

Figura 4.11 - Diagramas de Venn baseados nas UTO's para o grupo *Bacteria* em amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) para os dois períodos, chuvoso (C) e de seca (S), para os cinco pontos amostrados.100

Figura 4.12 - Gráficos de RDA baseado nos perfis de T-RFLP com a enzima *HhaI* obtidos para o grupo *Bacteria* obtidos para os cinco pontos, a partir de amostras de solo durante o período chuvoso (SC) e de seca (SS) (A) e amostras de rizosfera durante o período chuvoso (RZC) e de seca (RZS) (B) juntamente com as variáveis ambientais (setas) e nominais (triângulos virados para cima). Variáveis significativas (pelo teste de permutação de Monte Carlo) encontram-se com *101

Figura 4.13 - Filos com frequência relativa maior que 1% (para a maioria das amostras) para as médias obtidas de amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) durante o período chuvoso (C) e de seca (S). A categoria “outros” inclui dezoito filos com frequência relativa menor que 1%: Armatinonadetes, BRC1, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Fibrobacteres, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospira, Planctomycetes, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermotogae, TM7 e WS3; “NC” inclui sequências não classificadas..... 104

Figura 4.14 - PCA das comunidades bacterianas obtidas para os cinco pontos, a partir de amostras de solo durante o período chuvoso (SC) e de seca (SS) e amostras de rizosfera durante o período chuvoso (RZC) e de seca (RZS) com os seis filos mais representativos: Acidobacteria (Acidobac), Actinobacteria (Actinoba), Bacteroidetes (Bacteroi), Firmicutes (Firmicut), Proteobacteria (Proteoba), Verrucomicrobia (Verrucom). Sequências não classificadas são representadas pela sigla NC e “outros” correspondem aos filos raros 105

Figura 4.15 - RDA das comunidades bacterianas obtidas para os cinco pontos, a partir de amostras de solo durante o período chuvoso (SC) e de seca (SS) (A) e amostras de rizosfera durante o período chuvoso (RZC) e de seca (RZS) (B) com os seis filos mais representativos: Acidobacteria (Acidobac), Actinobacteria (Actinoba), Bacteroidetes (Bacteroi), Firmicutes (Firmicut), Proteobacteria (Proteoba), Verrucomicrobia (Verrucom). Sequências não classificadas são representadas pela sigla NC e “outros” correspondem aos filos raros. As variáveis ambientais encontram-se representadas pelas setas pretas mais largas. Variáveis significativas (pelo teste de permutação de Monte Carlo) encontram-se com *..... 107

Figura 4.16 - Classes do filo Proteobacteria com frequência relativa maior que 1% (para a maioria das amostras) para as médias obtidas de amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) durante o período chuvoso (C) e de seca (S). “NC” inclui sequências não classificadas dentro deste filo..... 109

- Figura 4.17 - RDA das comunidades bacterianas obtidas para os cinco pontos, a partir de amostras de solo (SC) e rizosfera (RZC) durante o período chuvoso (A) e amostras de solo (SS) e rizosfera (RZS) durante o período de seca (B) com os seis filos mais representativos: Acidobacteria (Acidobac), Actinobacteria (Actinoba), Bacteroidetes (Bacteroi), Firmicutes (Firmicut), Proteobacteria (Proteoba), Verrucomicrobia (Verrucom). Sequências não classificadas são representadas pela sigla NC e “outros” correspondem aos filos raros. As variáveis ambientais encontram-se representadas pelas setas pretas mais largas. Variáveis significativas (pelo teste de permutação de Monte Carlo) encontram-se com * 110
- Figura 4.18 - Gráfico mostrando a proporção de sequências (%) de gêneros obtidos por meio da comparação entre amostras de solo durante o período chuvoso (barras pretas), com solo durante o período de seca (barras cinzas), utilizando o software STAMP. Gêneros estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se com * 113
- Figura 4.19 - Gráfico mostrando a proporção de sequências (%) de gêneros obtidos por meio da comparação entre amostras de rizosfera durante o período chuvoso (barras pretas), com rizosfera durante o período de seca (barras cinzas), utilizando o software STAMP. Gêneros estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se com * 114
- Figura 5.1 - Esquema do isolamento realizado..... 147
- Figura 5.2 - Meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb). A – Controle, sem inóculo bacteriano. B – Formação de película característica de fixação de nitrogênio (seta vermelha). A modificação da coloração do meio ocorre devido à alteração do pH 156
- Figura 5.3 - Densidade bacteriana cultivada a partir de amostras de solo dos seis pontos de coleta, obtidos de período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010). As barras indicam o desvio padrão das médias obtidas para três repetições 161

- Figura 5.4 - Densidade bacteriana cultivada a partir de amostras de rizosfera de *Cereus jamacaru* dos seis pontos de coleta, obtidos de período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010). As barras indicam o desvio padrão das médias obtidas para três repetições 162
- Figura 5.5 - Contagem de UFC obtida de isolamento a 40°C após 7 dias, em meio contendo sorbitol com atividade de água correspondente a 0,957 A_w 163
- Figura 5.6 - Placas de Petri mostrando o crescimento bacteriano a 28°C, dos isolados obtidos durante o período chuvoso, em meio TSA (10%) adicionado ou não de sorbitol. Da esquerda para a direita observa-se uma crescente concentração de sorbitol adicionado e decrescente atividade de água, partindo de 0,998 A_w até 0,859 A_w . Crescimento bacteriano é observado apenas até 0,963 A_w 168
- Figura 5.7 - Frequência de isolados obtidos durante o período chuvoso, com capacidade de produção de EPS a 28°C em meio contendo quatro fontes de carbono e dois valores de pH. Produção de EPS (+); ausência de crescimento (s/c); ausência de EPS (-)..... 175
- Figura 5.8 - Resultado do teste qualitativo da produção de EPS. A – Teste em placa, com meio de cultura adicionado de sacarose em pH 7,5, com dezesseis linhagens testadas por placa. As linhagens 346 e 349 apresentam uma aparência bem mucóide, sendo ótimas produtoras de EPS. B – Confirmação da produção de EPS em álcool etílico, onde o EPS é precipitado (tubo da esquerda); a ausência de EPS, com presença apenas de massa celular, torna o meio turvo (tubo da direita) 176
- Figura 5.9 - Frequência de produção de EPS a 28°C, em meio contendo sacarose em pH 7,5, pelos isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B). Produção de EPS (+); ausência de crescimento (s/c); ausência de EPS (-) 177

Figura 5.10 - Frequência de isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B), com capacidade de formação de biofilme em meio TSB (10%), meio TSB (10%) com 0,03M de sorbitol e meio TSB (10%) com 0,30M de sorbitol a 40°C em cultivo estático. A quantidade de biofilme formada foi baseada nos valores de absorbância obtidos, onde: $DO_{560nm} < 0,1$ (-) (ausência de formação); $DO_{560nm} 0,1-0,2$ (+) (baixa formação); $DO_{560nm} 0,2-1,0$ (++) (média formação) e $DO_{560nm} > 1,0$ (+++) (alta formação) de biofilme 180

Figura 5.11 - Formação de biofilme por nove isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água, do período chuvoso a 0,06M e 0,30M de sorbitol. Médias seguidas de letras de mesmo tamanho, porém diferentes, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para três repetições 181

Figura 5.12 - Frequência de isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B) com capacidade de produção de AIA. De acordo com a concentração de AIA detectada, temos: $< 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+) (baixa produção); 3) $1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++) (média produção); 4) $11-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+++) (alta produção); 5) $> 51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++++) (elevada produção) de AIA 183

Figura 5.13 - Produção de AIA por isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para três repetições. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade 184

Figura 5.14 - Produção de AIA por isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período de seca, sendo exibidos somente aqueles cuja produção foi superior a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para três repetições. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade 184

Figura 5.15 - Solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso e de seca. Presença de halo de solubilização pelas linhagens 1.1 XXS 28 (*Pantoea* sp.) e 1.1 XXS 29 (*Enterobacter* sp.) (A e B, respectivamente). Não foi observado halo de solubilização pelos isolados 4.1 RZS 64 (*Bacillus* sp.), 3.3 XXS 27 (*Brevibacillus* sp.) e 4.1 RZS 52 (*Bacillus* sp.) (C, D e E, respectivamente) .. 186

Figura 5.16 - Frequência de isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B) com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP líquido. De acordo com a concentração de P solúvel detectado, temos: $< 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+) (baixa solubilização); $50-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++) (média solubilização); $101-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+++) (alta solubilização); $> 501 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++++) (elevada solubilização) de P-Ca..... 188

Figura 5.17 - Frequência de isolados bacterianos tolerantes à seca, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B) com capacidade de degradar CMC. De acordo com o índice celilolítico (IC) obtido, temos: IC = 0 (-); IC < 2 (+); $2 \leq \text{IC} < 3$ (++); $3 \leq \text{IC} < 4$ (+++); IC ≥ 4 (++++). 194

Figura 5.18 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o Filo Firmicutes, comparando as linhagens obtidas durante o período chuvoso e de seca, selecionadas para o teste de promoção de crescimento de *Zea mays* L., com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído utilizando o programa Mega 5.01, com o método de distância de Neighbor-Joining com o modelo de Jukes-Cantor. Os dados nos ramos são referentes aos valores de bootstrap, para um total de 1000 replicações. A barra indica a distância em nucleotídeos. *Paenibacillus polymyxa* foi utilizado como grupo externo..... 202

Figura 5.19 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o filo Proteobacteria, comparando as linhagens obtidas durante o período chuvoso e de seca, selecionadas para o teste de promoção de crescimento de *Zea mays* L., com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído

utilizando o programa Mega 5.01, com o método de distância de Neighbor-Joining com o modelo de Jukes-Cantor. Os dados nos ramos são referentes aos valores de bootstrap, para um total de 1000 replicações. A barra indica a distância em nucleotídeos. Não foi utilizado nenhum grupo externo.....203

Figura 5.20 - Plantio de *Zea mays* L. sob estresse hídrico (30% da capacidade de campo). Plantas inoculadas com as linhagens 5.2 RZS 52, 1.1 XXS 28 e 6.2 RZS 3 foram protegidas contra os efeitos negativos da dessecação, quando comparadas com plantas sem inóculo bacteriano (T).....208

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1 - Efeitos de micro-organismos inoculados em plantas sob estresse hídrico.....57
- Tabela 4.1 - Pontos da coleta realizada durante o período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010) na Caatinga do Semiárido Nordeste. Os valores de temperatura correspondem ao observado para a coleta durante o período de seca. Valores de temperatura para o período chuvoso não são mostrados..... 78
- Tabela 4.2 - Dados sobre precipitação (mm), temperatura máxima (°C), umidade relativa do ar (%) e insolação (h) obtidos por meio do banco de dados do INMET. Média obtida para um período de trinta e nove dias, incluindo vinte e nove dias antes da data do início da coleta e nove dias após a data do início da coleta. A data de início da coleta para o período chuvoso (C) foi: 28/05/2009 e para o período de seca (S) foi: 10/10/2010..... 78
- Tabela 4.3 - Atributos obtidos a partir da análise química básica de solo para os cinco pontos de coleta na Caatinga do semiárido nordestino durante o período chuvoso e de seca 80
- Tabela 4.4 - Amostras selecionadas para análise, obtidas de solo (S) e rizosfera de *Cereus jamacaru* (RZ), para o período chuvoso (C) e de seca (S), para os cinco pontos de coleta, onde o primeiro número refere-se ao ponto e o segundo número à repetição. Ex.: 1.2 RZS (Ponto 1, repetição 2, rizosfera, período de seca). Para cada amostra foi atribuído um tag (identificação) composto por 5 pares de bases (pb) – *barcode* 85
- Tabela 4.5 - Índice de dissimilaridade SIMPER obtido pela técnica de T-RFLP para amostras de rizosfera do período chuvoso (RZC), rizosfera do período de seca (RZS), solo do período chuvoso (SC) e solo do período de seca (SS) 94
- Tabela 4.6 - Diversidade de filotipos bacterianos estimada por T-RFLP para amostras de solo e rizosfera, durante o período chuvoso e de seca, para os cinco pontos de coleta.

| | |
|--|-----|
| Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em cada coluna. | 98 |
| Tabela 4.7 - Gêneros significativos, encontrados em bibliotecas de amplicons do gene 16S rRNA, exclusivos para o período de seca, tanto em amostras de solo quanto de rizosfera..... | 117 |
| Tabela 5.1 - Pontos da coleta realizada durante o período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010) na Caatinga do semiárido nordestino. Os valores de temperatura correspondem ao observado para a coleta durante o período de seca. Valores de temperatura para o período chuvoso não são mostrados | 145 |
| Tabela 5.2 - Amostras de solo e rizosfera de <i>Cereus jamacaru</i> , <i>Melocactus</i> sp., e <i>Pilosocereus gounellei</i> , coletadas durante o período chuvoso (Maio/2009) e de seca (Outubro/2010) na Caatinga do semiárido nordestino para os seis pontos de coleta. | 146 |
| Tabela 5.3 - Meios de cultura livre de nitrogênio para isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio | 148 |
| Tabela 5.4 - Composição do meio TSB (10%) modificado com sorbitol utilizado para realização do teste de formação de biofilme. | 154 |
| Tabela 5.5 - Identificação por meio de análise de ácidos graxos e sequenciamento do gene 16S rRNA de linhagens bacterianas obtidas da rizosfera de <i>Cereus jamacaru</i> (RZS), <i>Melocactus</i> sp. (CFS) e <i>Pilosocereus gounellei</i> (XXS) e de solo (SS), durante o período de seca. Bactérias foram isoladas em meio TSA (10%) com reduzida atividade de água (0,957 A _w) e temperatura de 40°C..... | 164 |
| Tabela 5.6 - Linhagens bacterianas obtidas da rizosfera de <i>Cereus jamacaru</i> por meio de isolamento em meio TSA (10%) que cresceram em meio com reduzida atividade de água (0,963 A _w) a 28°C..... | 169 |

- Tabela 5.7 - Identificação por meio de análise de ácidos graxos e sequenciamento do gene 16S rRNA de linhagens bacterianas obtidas da rizosfera de *Cereus jamacaru* (RZS) e *Pilosocereus gounellei* (XXS) e de solo (SS), durante o período de seca. As bactérias foram isoladas em meio NFb e JMV. 171
- Tabela 5.8 - Comparação entre os dezesseis isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos durante o período chuvoso. Crescimento dos isolados em meio TSB (10%) sem agitação a 40°C e 28°C e com agitação a 28°C 179
- Tabela 5.9 - Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 15 dias de incubação. Médias obtidas de três repetições 187
- Tabela 5.10 - Índice celulolítico (IC) obtido por meio da degradação do meio CMC por isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso e de seca. Médias obtidas para três repetições seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. 195
- Tabela 5.11 - Isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água obtidos durante o período chuvoso (RZC – rizosfera de *C. jamacaru*) e de seca (RZS – rizosfera de *C. jamacaru*; SS – solo; XXS – rizosfera de *P. gounellei*; CFS – rizosfera de *Melocactus* sp.) com a respectiva identificação e os resultados referentes às características para promoção de crescimento in vitro. Em negrito encontram-se os isolados selecionados para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* L. 198
- Tabela 5.12 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período chuvoso. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito..... 205

- Tabela 5.13 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período de seca. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito. 205
- Tabela 5.14 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período chuvoso. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito. 206
- Tabela 5.15 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período de seca. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito. 207
- Tabela 5.16 - Características das linhagens selecionadas para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* L. 211
- Tabela 5.17 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), por *Bacillus* sp. e *Azospirillum* sp.. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule, peso seco da parte aérea e peso seco radicular. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito. 213
- Tabela 5.18 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo), por *Bacillus* sp. e *Azospirillum* sp.. Valores

médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule, peso seco da parte aérea e peso seco radicular. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito.....214

1 INTRODUÇÃO

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

(Hipócrates)

No semiárido nordestino, a vegetação predominante é a Caatinga, que apresenta plantas com alta resistência aos períodos de seca. Os micro-organismos associados a estas plantas também se encontram bem adaptados às condições impostas pelo clima, desenvolvendo mecanismos de proteção celular contra o estresse hídrico, assim como proteção vegetal contra a dessecação.

A água, solvente universal e imprescindível à manutenção da vida, é um bem comum e essencial para a manutenção do suprimento de alimento e ambiente produtivo de todos os organismos (PIMENTEL et al., 2004), entretanto, dentro de algumas décadas, devido às mudanças climáticas, o setor agrícola poderá sofrer consequências negativas. As zonas áridas tornar-se-ão mais secas, o que inclui o nordeste do Brasil (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), 2011). Em regiões áridas e semiáridas, a falta de água, juntamente com o aumento das áreas em processo de desertificação, reduz a produtividade agrícola (BRASIL, 2004). O aumento da temperatura e a redução substancial das precipitações, em última instância, serão traduzidos em aumento da demanda de água pelas culturas agrícolas. Segundo dados da FAO (2002), cerca de $3,6 \times 10^{15}$ litros de água doce são utilizados para o consumo humano, dos quais 10% para uso doméstico, 21% para as indústrias e 69% são destinados para a agricultura. Para se produzir 1 kg de arroz, são gastos 2300 litros de água; para cereais em geral, em média 1500 litros.kg⁻¹; para frutas cítricas, 1000 litros.kg⁻¹; para milho, 900 litros.kg⁻¹(FAO, 1997). Com este cenário, aumenta-se a preocupação em busca por alternativas para reduzir o consumo de água pelas culturas, promover o crescimento de plantas em solos com baixa precipitação hídrica, como o observado em algumas regiões do nordeste e recuperar áreas em processo de desertificação. Assim, a utilização de micro-organismos tolerantes à seca e que sejam capazes de proteger plantas e promover seu crescimento sob estresse hídrico, poderá ser uma alternativa a esse problema.

Deste modo, pretende-se selecionar bactérias tolerantes à seca e que sejam capazes de promover crescimento de plantas sob estresse hídrico, ou sob uma menor aplicação de água.

Além disso, tendo em vista a importância do bioma Caatinga, que ainda é pouco estudado, pretende-se utilizar métodos independentes de cultivo para estudar a estrutura da comunidade bacteriana em amostras de solo e rizosfera de cactáceas, como o mandacaru (*Cereus jamacaru*) obtido de regiões da Caatinga do semiárido brasileiro, em dois períodos distintos: período chuvoso e de seca. Estas informações serão necessárias para contribuir para o conhecimento e entendimento das funções e manutenção deste bioma.

2 OBJETIVOS E QUESTÕES BIOLÓGICAS

Tendo em vista o cenário descrito anteriormente, este estudo teve o objetivo principal de estudar as bactérias associadas às cactáceas da Caatinga, de modo a contribuir para o conhecimento da diversidade bacteriana não cultivável e cultivável tolerante à seca associada a algumas cactáceas, de modo a obter alguma linhagem bacteriana com possibilidade de várias aplicações:

- Agricultura em áreas com baixa pluviosidade;
- Recuperação de áreas em processo de desertificação;
- Redução do consumo de água para irrigação de culturas.

Para alcançar o objetivo principal, as seguintes questões foram realizadas:

- Quais os principais fatores que delineiam a estrutura das comunidades bacterianas?
- Qual a principal alteração na estrutura da comunidade bacteriana com a mudança do período chuvoso para o período de seca?
- Pela co-evolução e pela extrema adaptação vegetal ao tipo de clima e ambiente, será que as bactérias associadas às cactáceas foram selecionadas para tolerar o estresse hídrico?
- As bactérias isoladas tolerantes à seca possuem mecanismos de proteção contra estresse hídrico?
- As bactérias isoladas tolerantes à seca possuem mecanismos diretos e/ou indiretos relacionados à promoção de crescimento de plantas? Quais os mecanismos dominantes?

- As bactérias tolerantes à seca, com mecanismos de promoção de crescimento de plantas, são capazes de promover crescimento de milho (*Zea mays* L.)?

- As bactérias tolerantes à seca, com mecanismos de promoção de crescimento de plantas, são capazes de promover crescimento de milho (*Zea mays* L.) sob estresse hídrico?

- O uso de consórcio bacteriano é interessante?

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Região semiárida do nordeste brasileiro: bioma Caatinga

A região semiárida brasileira possui inúmeros ambientes, com heterogeneidade de vegetação, clima e condições edáficas. É localizada quase exclusivamente no nordeste do Brasil, englobando uma parte de Minas Gerais. Partindo de 3-17°S a 35-45°W, cobre aproximadamente 8% do território brasileiro, ocupando uma área de aproximadamente 900.000 km² (GIULIETTI et al., 2006) (figura 3.1).



Figura 3.1 - Mapa político-administrativo mostrando o semiárido brasileiro delimitado pela linha amarela
Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007)

De acordo com o índice de aridez (IA), adotado pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (*United Nations Environmental Programme – UNEP* (2007)), que reflete a razão entre precipitação e potencial de evapotranspiração, regiões semiáridas são consideradas com IA de

0,2 a 0,5 e chuva de 200 a 800 mm. Para ter uma ideia, considerando-se os dois extremos, regiões hiper áridas possuem $IA < 0,05$ e precipitação < 200 mm, enquanto regiões úmidas possuem $IA > 1$ e precipitação > 2000 mm.

O clima faz parte de um dos sistemas mais complexos do mundo, devido não apenas à extensão da área, mas também ao sistema de ventos provenientes do Nordeste e Sudeste, criando uma instabilidade nos padrões de chuva que são concentrados em alguns meses do ano. Há grande variação na precipitação anual para a zona semiárida e costeira, fluando de 300 a 2000 mm, respectivamente. Essas condições particulares são as responsáveis pela grande diversidade de tipos vegetacionais que caracterizam o semiárido (GIULIETTI et al., 2006).

A Caatinga, palavra derivada do tupi (“Kaa” = Mata, Floresta; “Tinga” = Branca), representa um bioma singular de 735.000 km² e constitui um tipo de vegetação característico do semiárido. O estrato arbóreo é relativamente baixo (até 5 m de altura), não apresenta um dossel contínuo, as árvores e os arbustos têm caule fino, espinhoso e são decíduos na época seca. Com relação à pluviosidade, a vegetação predominante em áreas menos secas de Caatinga é denominada de vegetação hipoxerófila e em áreas onde a seca é acentuada, de Caatinga hiperxerófila (SÁ, RICHÉ e FOTIUS, 2003). Algumas famílias botânicas encontram-se bem representadas como as cactáceas, leguminosas e as euforbiáceas (QUEIROZ, 2006).

A família Cactaceae contém representantes que se encontram distribuídos em regiões áridas e quentes, sendo mais notáveis no sudoeste dos Estados Unidos e México, leste brasileiro e nos Andes Sul-Americanos (BARTHLOTT; HUNT, 1993). Entre as cactáceas, é possível observar características evolutivas incomuns, como as modificações nas estruturas vegetativas - perda ou redução das folhas; o córtex e a medula são transformados em um tecido próprio para o armazenamento de água; os ramos laterais são transformados em agrupamentos de espinhos centrais e radiais denominados aréolas (figura 3.2). Eles podem ter o tronco cilíndrico ou colunar, ramificado ou sem ramificações, segmentado ou não segmentado e alguns ainda podem ser globosos com a forma de uma esfera (ANDERSON, 2001). Existem quatro subfamílias. A subfamília Cactoideae, encontra-se dividida em nove tribos. A tribo Cereeae possui representantes distribuídos na América do Sul, com grande representatividade no Brasil, sendo o Nordeste o centro da diversidade (TAYLOR, 1997). Podem ser encontrados na forma arbórea ou arbustiva, com troncos não segmentados, alongados ou globosos, estriados e com muitos espinhos. As flores nascem lateralmente e podem ser noturnas ou diurnas e os frutos são bem carnudos e podem ser deiscentes ou

indeiscentes (ANDERSON, 2001). Há cinquenta e oito espécies registradas para a Caatinga, sendo quarenta e duas endêmicas. Algumas espécies representantes desta tribo são: *Cereus jamacaru*, conhecido como mandacaru; *Pilosocereus gounellei*, o xique-xique e *Melocactus* sp., o cabeça-de-frade (TAYLOR; ZAPPI, 2002).

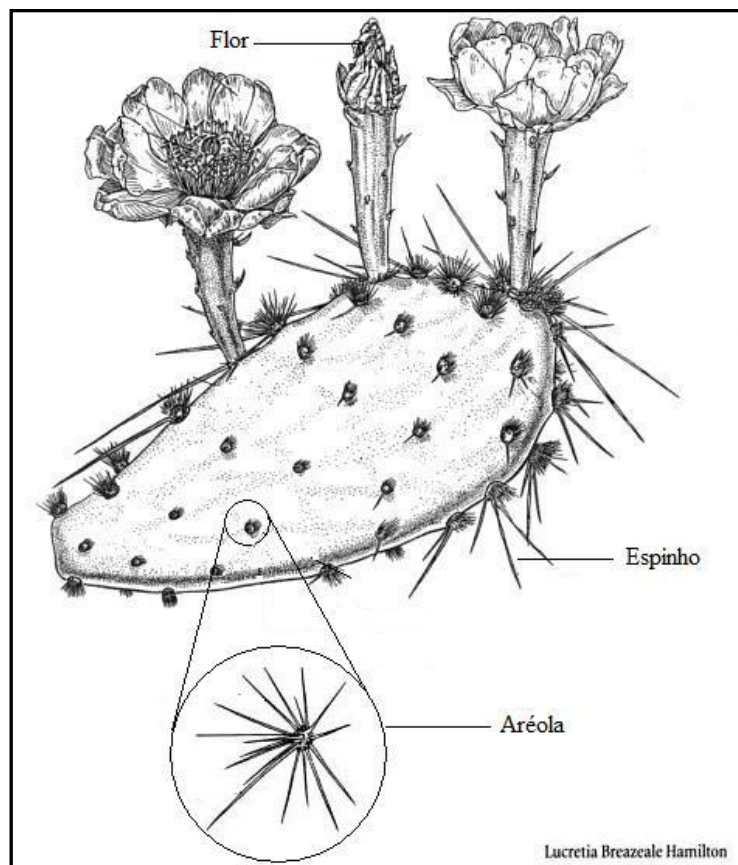


Figura 3.2 - Desenho esquemático de uma parte do tecido de uma cactácea, mostrando as flores laterais e as aréolas constituídas por longos espinhos
 Fonte: Modificado de Anderson (2001)

De acordo com Anderson (2001), *Cereus jamacaru* é amplamente distribuído pelo nordeste brasileiro. Possui porte arbóreo, com inúmeros galhos (figura 3.3). O tronco é cilíndrico e possui de quatro a seis costelas chanfradas, dois a quatro espinhos centrais com 8 a 20 cm de comprimento e cinco a sete espinhos radiais de 1,5 cm de comprimento. As flores são grandes e brancas e os frutos avermelhados (figura 3.4).

A espécie *Pilosocereus gounellei*, possui ampla distribuição na Caatinga e é comumente encontrada em afloramentos rochosos e solos pedregosos, mais especificamente na Caatinga de lajedo (TAYLOR; ZAPPI, 2004) (figura 3.5). É uma espécie colunar na forma de candelabro, não apresenta cefálio, uma estrutura formada por agrupamento de flores que formam uma zona reprodutiva. A altura pode variar de estatura baixa, até pequenas árvores de 3 a 4 m de altura (GORELICK, 2009).

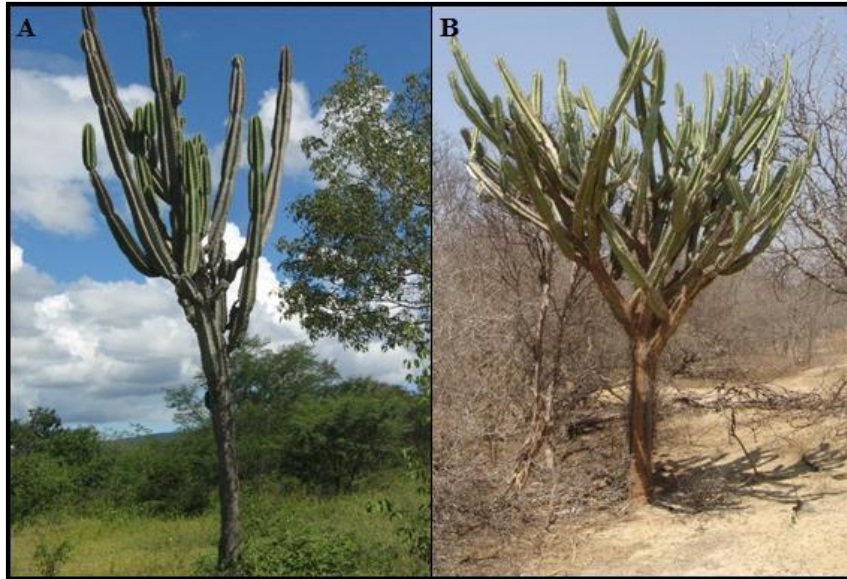


Figura 3.3 - Fotos de *Cereus jamacaru* encontrado na Caatinga do semiárido nordestino, em período chuvoso (A) e de seca (B). (Fotografias da autora, 2009 e 2010)

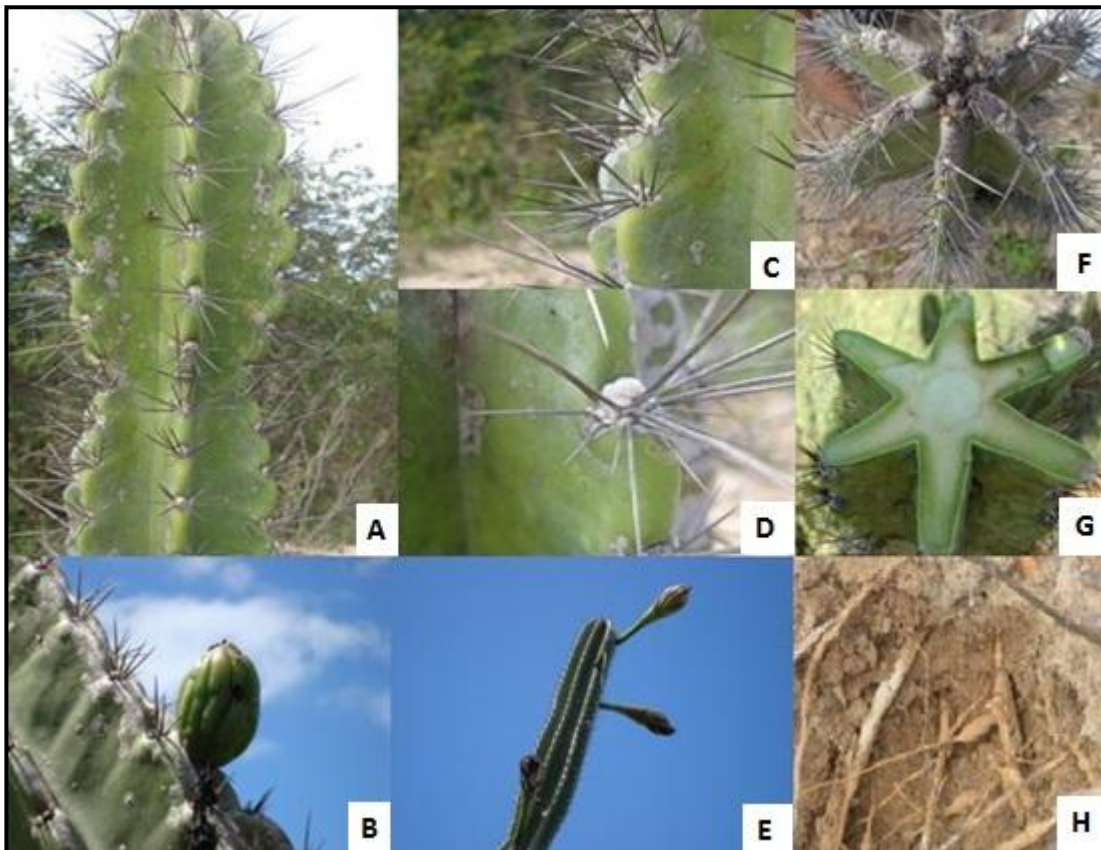


Figura 3.4 - Fotos de partes teciduais de *Cereus jamacaru*. A - Tronco verde, cilíndrico e com inúmeros espinhos; B - Fruto imaturo; C- Aréolas; D - Detalhe da aréola, um agrupamento de espinhos centrais e radiais; E - Flores laterais fechadas e noturnas; F - Vista superior do tronco com seis costelas; G - Corte transversal do tronco, evidenciando as seis costelas e a parte interna bem succulenta; H - Detalhes da raiz. (Fotografias da autora, 2009 e 2010)



Figura 3.5 - Fotos de *Pilosocereus gounellei* encontrado com frequência em Caatinga de lajedo no semiárido nordestino (A e B). Observe o formato de candelabro (C e D). Fotografias da autora (2010)

Também são encontradas várias outras espécies de cactáceas como o cabeça-de-frade, a palma, o rabo-de-raposa, a tacinga, entre outras (figura 3.6). O cabeça-de-frade possui caule globoso na forma de cone e pode chegar até 22 cm de altura. Possui dez arestas, com aréolas de espinhos dispostos em grupos de cinco a sete; as flores são vermelhas e o fruto é uma baga de coloração rosada (Barbosa, 1998).



Figura 3.6 - Outras cactáceas representadas por: A - Palma (*Opuntia* sp.); B - Rabo-de-raposa (*Arrojadoa rhodantha*); C - Cumbeba (*Tacinga inamoena*); D - Cabeça-de-frade (*Melocactus* sp.)

A Caatinga é a vegetação mais degradada no semiárido, com menos de 1% de sua área protegida em reservas (GIULIETTI et al., 2006). Nos últimos anos, ações antrópicas

degradadoras têm intensificado os processos de erosão e déficit hídrico do solo, contribuindo para o aumento do processo de desertificação (TRIGUEIRO; OLIVEIRA; BEZERRA, 2009).

A desertificação, segundo Dregne (1976) pode ser definida como um processo que ocorre devido à ação antrópica e à seca, culminando no empobrecimento de ecossistemas áridos, semiáridos e subúmidos secos, podendo reduzir a produtividade vegetal, acelerar a degradação do solo e aumentar o risco para a ocupação humana. Entretanto, também pode ser definida como um evento em que, devido a vários processos de mudanças, são criadas condições similares com as encontradas em um deserto (GLANTZ; ORLOVSKY, 1983). Qualquer que seja a definição correta, no Brasil, fatores naturais e induzidos pela ação do homem têm levado à desertificação cerca de 30 a 60% da região semiárida do Nordeste (BRASIL, 2004; OLIVEIRA, 2000).

Os impactos da desertificação podem ser ambientais, ocasionando a redução da biodiversidade, recursos hídricos e produtividade agrícola; sociais, podendo levar à migração de pessoas para as cidades e impactos econômicos, com perda de milhões de reais para o Brasil (LACERDA; LACERDA, 2004). Vários projetos vêm sendo desenvolvidos tanto pelo governo federal quanto pelos governos dos estados do Nordeste na tentativa de gerar planos de ação. O estado de Pernambuco, por exemplo, adotou a Política Estadual para o Controle da Desertificação, visando o desenvolvimento sustentável das áreas sujeitas à seca e à desertificação, com várias sugestões de contribuições (BRASIL, 2004). Entretanto, todos estes planos de ação requerem a conscientização e a participação de vários setores, sendo que a pesquisa científica tem muito a contribuir nesta área, com o desenvolvimento de novas tecnologias. Uma tecnologia relativamente barata é o uso de micro-organismos em conjunto com plantas para recuperação destas áreas. Requena et al. (1997) descobriram um consórcio bem vantajoso entre duas micorrizas arbusculares (*Glomus coronatum*, nativo e *Glomus intraradices*, exótico), duas espécies nativas de *Rhizobium* e duas espécies de bactérias capazes de promover o crescimento de plantas, sendo uma nativa e uma exótica, na rizosfera de *Anthyllis cytisoides* (Fabaceae) para a revegetação de ambientes semiáridos.

3.2 Micro-organismos

3.2.1 de Solo e Rizosfera

Os micro-organismos desempenham funções ecológicas importantes como a ciclagem de nutrientes e a manutenção da saúde do ecossistema (MARSCHNER; CROWLEY; YANG,

2004). Podem facilitar a absorção de nutrientes pelas plantas (GYANESHWAR et al., 2002; TINKER, 1984); auxiliar processos como a fixação de nitrogênio atmosférico (STEWART, 1969; VITOUSEK et al., 2002); alterar a disponibilidade e a toxicidade de metais às plantas (BURD et al., 2000); promover o crescimento de plantas (GLICK, 1995). Os micro-organismos podem ocorrer em associação com partículas minerais e matéria orgânica, e ainda, na rizosfera de plantas (FOSTER, 1988). Em termos quantitativos, os micro-organismos existentes no solo podem variar com a profundidade deste, sendo que a densidade microbiana torna-se reduzida à medida que a profundidade do solo torna-se maior (ALEXANDER, 1977). Kuske et al. (2002) realizaram uma contagem de bactérias em solo árido, observando que na camada mais superficial (0 a 10 cm) a contagem foi significativamente maior que na profundidade de 20 a 30 cm.

A rizosfera foi definida no início do século XX, por Hiltner, como o volume de solo que recebe influência das raízes das plantas (HILTNER, 1904) e desde então este termo veio sendo cada vez mais investigado, sendo constituído por três unidades interagindo entre si: a planta, o solo e os micro-organismos (LYNCH, 1990). É uma área densamente colonizada por raízes que devem competir por água, espaço e nutrientes com as raízes de plantas vizinhas, além de ter de competir com os micro-organismos presentes no solo (RYAN; DELHAIZE, 2001). Possui intensa atividade microbiana devido à secreção de compostos denominados de exsudatos, pelas raízes, como íons, enzimas, mucilagem e diversos outros metabólitos (BAIS et al., 2006). A composição da estrutura microbiana da rizosfera pode ser influenciada por inúmeros fatores como a quantidade e o tipo de exsudatos radiculares, a espécie e a idade da planta, as condições do solo e as condições impostas pelo ambiente, sendo o efeito da planta altamente seletivo (ROVIRA, 1965; MARSCHNER; CROWLEY; YANG, 2004).

3.2.2 Extremófilos: Ambientes Áridos e Semiáridos

O termo “extremófilos” foi primeiramente citado por MacElroy em 1974 de modo a definir organismos com habilidade de ultrapassar condições que do ponto de vista humano são consideradas extremas, embora do ponto de vista dos organismos, estas condições sejam normais. A maioria dos organismos extremófilos são micro-organismos. Há várias definições de acordo com a fisiologia de cada grupo. Assim sendo, há aqueles que crescem em ambientes com pH elevado (alcalifílicos); os que crescem entre materiais rochosos (endolíticos); halofílicos (para aqueles que crescem em altas concentrações salinas); há os que dependem de poucos nutrientes para seu crescimento (oligotróficos); com relação à temperatura, há aqueles

em que a temperatura ideal de crescimento é menor ou igual a 15°C (psicrofílicos) ou maior ou igual a 80°C (hipertermofílicos); metalotolerantes - para aqueles que toleram altos níveis de metais pesados; os micro-organismos que conseguem crescer em ambientes com baixa atividade de água são considerados xerofílicos ou xerotolerantes (HORIKOSHI, 2007). Micro-organismos xerotolerantes são aqueles capazes de crescer em condições com baixa atividade de água, entretanto, não necessariamente requerem esta baixa atividade de água para crescimento. Já os micro-organismos xerofílicos, são aqueles que necessitam de baixa atividade de água para seu crescimento (GRANT, 2004). Em se tratando deste último grupo, os fungos são bem estudados, devido à maior xerotolerância quando comparados com as bactérias (MANZONI et al., 2012).

Há ainda poucos estudos relacionando os micro-organismos existentes em locais áridos e semiáridos, assim como micro-organismos associados a plantas deste ambiente, mas vem crescendo o interesse por este tema nos últimos anos. Os trabalhos que buscam a diversidade destes ambientes, focam principalmente no uso de técnicas moleculares, como bibliotecas de clones do gene 16S rRNA e mais recentemente o uso de técnicas de sequenciamento em larga escala. Chanal et al. (2006) estudando um deserto ao sul da Tunísia por meio da análise de bibliotecas de clones, encontraram representantes do domínio *Bacteria*, com predominância dos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria. Por meio da mesma técnica, Bachar et al. (2010) avaliaram a diversidade bacteriana de solos obtidos de clima árido, semiárido e mediterrâneo, observando que o filo Acidobacteria foi significativamente mais abundante no solo obtido de clima semiárido; já a proporção dos filos Cyanobacteria, Thermomicrobia e Verrucomicrobia aumentou com a aridez. Neilson et al. (2012), utilizando a técnica de pirosequenciamento, observaram uma alta abundância dos filos Actinobacteria e Chloroflexi e baixos níveis de Acidobacteria e Proteobacteria em solos áridos do deserto do Atacama. São poucos os relatos que realizam isolamento, mas este pode ser interessante na busca de micro-organismos alvo para descoberta de novas enzimas, metabólitos, entre outros. Ao analisar amostras de solo do deserto de Atacama, Lester et al. (2007) isolaram e identificaram bactérias pertencentes às espécies: *Rhodopseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Mesorhizobium* sp., *Asticcacaulis* sp., *Bradirhizobium* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Burkholderia* spp. Com relação às actinobactérias, foram isolados membros pertencentes aos gêneros *Amycolatopsis*, *Lechevalieria* e *Streptomyces* (OKORO et al., 2009). No deserto ao sul do Egito, El-Zayat et al. (2008) descreveram a micoflora isolada de *Hyoscyamus muticus* – meimendro egípcio, uma planta medicinal da família Solanaceae encontrada neste ambiente. O gênero mais comum foi o *Aspergillus*, representado por

dezessete espécies, seguido de *Penicillium*, com onze espécies e outros gêneros com menor representatividade, como *Acremonium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Geotrichum*, entre outros. Gothwal et al. (2008) isolaram várias bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a duas espécies de plantas *Calligonum polygonoides*, um arbusto da família Polygonaceae e *Lasiurus indicus*, uma gramínea da família Poaceae, ambos de uma zona árida na Índia. Em outro trabalho, Puente et al. (2009) isolaram bactérias endofíticas do cacto *Pachycereus pringlei* a partir de várias amostras, como extrato de sementes, polpa das frutas e até mesmo de sementes obtidas do guano de morcegos frugívoros. Os grupos dominantes pertencem aos gêneros *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp..

3.2.3 Ferramentas Moleculares de Análise

Os micro-organismos podem ser estudados por metodologias dependentes ou independentes de cultivo. Os métodos dependentes de cultivo são conhecidos por sua seletividade e não representam a real diversidade existente (AMANN et al., 1995). Portanto, devido a essas limitações, torna-se necessária a utilização complementar de ferramentas moleculares de identificação. Para obtenção de dados sobre os micro-organismos não-cultiváveis, há várias técnicas que podem ser utilizadas para determinação da diversidade microbiana tanto para ambientes aquáticos quanto terrestres. Os métodos podem ser baseados na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), por exemplo. Dentre estas técnicas encontram-se: a) DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*); b) TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*); c) RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); d) ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*); e) T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*); f) RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*); g) Caracterização por microssatélites (KIRK et al., 2004). Além disso, a disponibilidade de um grande número de sequências da região do gene 16S ribossomal (16S rRNA) depositadas em um banco de dados, por exemplo, o RDP (*Ribosomal Database Project*), tem permitido que essa informação molecular seja amplamente utilizada para o agrupamento filogenético. A associação entre a estrutura da comunidade com sua atividade e funcionalidade nos sistemas ambientais constitui o foco central de estudo na essência da ecologia microbiana.

A técnica de T-RFLP cuja sigla em inglês significa “Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição” foi originalmente desenvolvida para a rápida identificação de mycobacteria (AVANISS-AGHAJANI et al., 1996) e mais tarde provou ser uma poderosa ferramenta para acessar a diversidade de comunidades bacterianas complexas,

além de ser um modo rápido de comparar a estrutura e a diversidade de comunidades de diferentes ecossistemas (LIU et al., 1997).

Nos últimos anos, novas técnicas foram desenvolvidas para caracterização da diversidade microbiana. Com elas, inúmeros equipamentos também foram aprimorados para o sequenciamento em larga escala (GLENN, 2011), que aumenta a resolução com que as complexas comunidades microbianas são estudadas, pois é possível sequenciar milhares de sequências ao mesmo tempo. É uma ferramenta que tem se mostrado útil para o estudo de comunidades microbianas diversas, como as comunidades encontradas em solos, humanos, ambientes marinhos e contaminados, por meio da análise do gene 16S rRNA (GILBERT et al., 2012; NACKE et al., 2011; WU et al., 2010; XU et al., 2012). Para tanto, são utilizados oligonucleotídeos iniciadores para regiões-alvo hipervariáveis do gene 16S rRNA com códigos de barras (*barcodes*). Essas regiões, embora curtas, contêm informação suficiente para serem utilizadas em banco de dados (CARDENAS; TIEDJE, 2008).

3.2.4 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP)

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (do inglês: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR)) foram primeiramente definidas por Kloepper e Schroth (1978) para definir um grupo de bactérias rizosféricas que atuavam no biocontrole, causando a supressão de doenças por substâncias inibidoras de patógenos ou pelo aumento da resistência vegetal. Entretanto, devido ao aumento no número de estudos realizados neste campo, apareceram controvérsias com relação ao nome dado a este grupo de bactérias. Bashan e Holguin (1998) propuseram dois novos termos que pareciam abranger todos os benefícios que as bactérias têm a oferecer às plantas de acordo com o papel desempenhado. São eles: bactérias biocontroladoras promotoras de crescimento de plantas (do inglês: *Biocontrol-Plant Growth-Promoting Bacteria* (biocontrol-PGPB)) e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) (do inglês: *Plant Growth-Promoting Bacteria* (PGPB)), pois segundo os autores, o termo RPCP deixava de englobar as bactérias com interações não-rizosféricas, além de ser um termo muito geral e inespecífico. Cassán et al. (2009) introduziram um novo termo: *Plant Stress Homeostasis-Regulating Rhizobacteria* (PSHR), que seriam bactérias reguladoras de estresse em plantas. Então, as RPCPs podem ser divididas em três grupos funcionais: BPCPs, BPCPs biocontroladoras e PSHR, que podem promover o crescimento vegetal sob condições abióticas de estresse (SGROY et al., 2009).

Qualquer definição que seja adotada, essas bactérias promovem o crescimento de plantas de duas maneiras: fitoestimulação e/ou biofertilização (KUMAR; PRAKASH; JOHRI, 2011). Para isto, possuem vários mecanismos que podem ser diretos e/ou indiretos (GLICK, 1995; SARAF et al., 2011). Entre os mecanismos diretos, ou seja, aqueles afetam diretamente o metabolismo da planta, é possível citar: produção de fitohormônios como ácido indol acético (AIA), giberelina, citocinina e etileno; solubilização de fosfatos; fixação de nitrogênio atmosférico; produção de sideróforos. Dentre os mecanismos indiretos, que necessitam da participação de processos metabólicos defensivos da planta, transmitindo o sinal dos micro-organismos para as plantas, é possível citar antibiose pela produção de cianeto de hidrogênio (HCN), amônia (NH₃) e outros voláteis; competição; parasitismo com a produção de enzimas quitinases, glucanases e celulases; indução de resistência (PODILE; KISHORE, 2007) e ainda redução da fitotoxidez por metais pesados (BURD et al., 2000). Deste modo, essas bactérias podem ser usadas em inóculos para biofertilização, fitoestimulação e biocontrole (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001) com aplicações na agricultura, horticultura, florestas e recuperação ambiental (LUCY et al., 2004).

3.2.4.1 Mecanismos diretos de ação

3.2.4.1.1 Produção de fitohormônios

3.2.4.1.1.1 AIA

A principal auxina nas plantas é o ácido indol-3-acético, hormônio vegetal que regula vários processos celulares e de desenvolvimento dos vegetais (KENDE; ZEEVAART, 1997). Este hormônio também pode ser produzido por bactérias presentes no solo, que o fazem de modo a estabelecer um elo de comunicação com a planta hospedeira, podendo ser usado também nas interações que desenvolvem patogenicidade, pela modificação de sua morfologia e de seu desenvolvimento (BIANCO et al., 2006). A produção deste hormônio por micro-organismos pode ser interessante no sentido de auxiliar a planta em seu desenvolvimento, quando as condições para isso encontram-se desfavoráveis. Algumas bactérias são conhecidas por produzirem AIA, estimulando a proliferação das raízes por meio do aumento da absorção de nutrientes pelas plantas (LAMBRECHT et al., 2000). Shoebitz et al. (2009) isolaram uma linhagem de *Enterobacter ludwigii* (BNM 0357) que deve atuar como uma RPCP, mostrando habilidade em melhorar o desenvolvimento radicular de *Lolium perenne* (azevém-perene). A produção de AIA varia de acordo com os gêneros bacterianos. Ahmad et al. (2008)

observaram maior produção de AIA por isolados de *Pseudomonas* sp., seguido por espécies de *Bacillus* e *Azotobacter*. Também foram encontrados relatos sobre a produção de AIA por *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Paenibacillus* sp. (ERTURK et al., 2010; FARINA et al., 2012; MONTAÑEZ et al., 2012; SELVAKUMAR et al., 2008).

3.2.4.1.1.2 Etileno

O etileno é uma molécula orgânica com função biológica e que pode atuar como um regulador de crescimento vegetal, quando em baixas concentrações. Necessário ao desenvolvimento normal de plantas, sua produção pode ser aumentada em condições de estresse (GLICK, 2005) que pode levar a inibição do crescimento radicular (JACKSON, 1991). Há algumas RPCPs que possuem a habilidade de clivar o composto 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), precursor imediato de etileno pela atividade da enzima ACC deaminase, reduzindo os níveis de etileno (GLICK, 1995) (figura 3.7), consequentemente reduzindo os efeitos negativos às plantas.

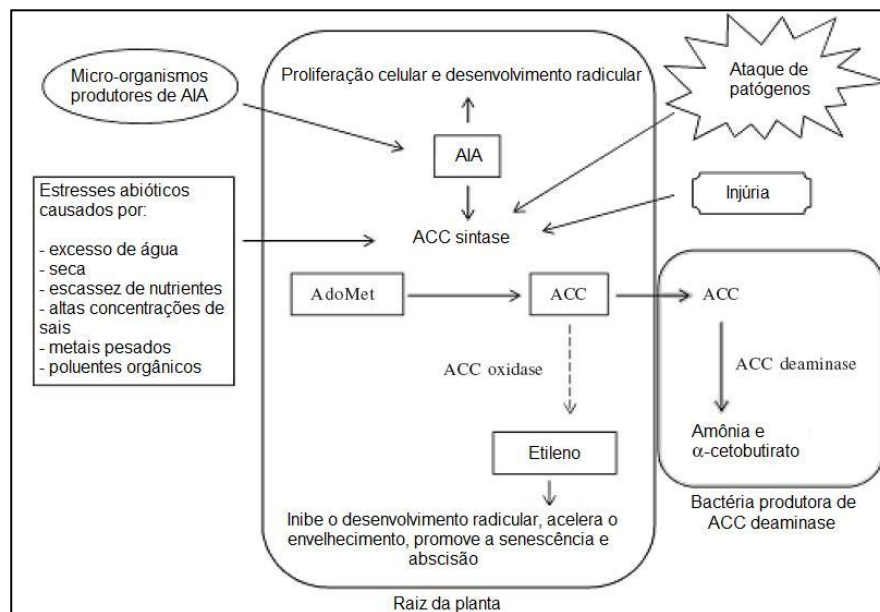


Figura 3.7 - Esquema representando uma bactéria produtora de ACC deaminase responsável por clivar o composto ACC, precursor de etileno e consequentemente, reduzir os níveis de etileno, inibindo os efeitos deletérios causados por esse composto. Estresses abióticos, injúria, ataque de patógenos e até mesmo AIA podem induzir a enzima ACC sintase a converter o composto S-adenosilmetionina (AdoMet) em ACC, que por sua vez é convertido a etileno, que por sua vez causa vários efeitos negativos às plantas

Fonte: Modificado de Husen et al. (2008)

Jacobson et al. (1994) purificaram parcialmente e caracterizaram a enzima ACC deaminase de *Pseudomonas putida* capaz de clivar ACC em amônia e α -cetobutirato (MAYAK et al., 1999). Esta enzima tem sua forma nativa constituída de três cadeias proteicas

de massa molecular equivalente a 105 kDa e uma subunidade de 35 kDa. Tem ação citoplasmática e é induzida por baixos níveis de ACC com temperatura ideal correspondente a 30°C e valor de pH de 8,5. Shah et al. (1998) na tentativa de entender como a enzima atua, clonaram e caracterizaram os genes para esta enzima e observaram que ao transformarem linhagens de *Pseudomonas* incapazes de atuar como RPCPs, elas ganhavam a habilidade de promover alongamento radicular. Shaharoon et al. (2006) isolaram bactérias da rizosfera de milho em meio contendo ACC como única fonte de nitrogênio e realizaram teste de promoção de crescimento de milho sob condições axênicas, observando uma correlação positiva entre a produção de ACC deaminase e o alongamento radicular. Com este estudo concluíram que a seleção de bactérias pela presença da enzima ACC deaminase é uma ferramenta eficiente na escolha de RPCPs podendo ser utilizadas como biofertilizantes para aumentar o crescimento vegetal.

3.2.4.1.2 Solubilização de fosfatos

O fósforo é um nutriente amplamente distribuído no solo, entretanto, por ser altamente reativo com outros elementos, combina-se facilmente a Fe e Al em solos ácidos e Ca em solos calcários (LINDSAY et al., 1989), estando indisponível à absorção pelas plantas. Tanto alguns fungos quanto algumas bactérias são capazes de solubilizar os compostos contendo fósforo pela produção de diversos ácidos orgânicos. Entre eles, podemos citar os ácidos acético, cítrico, glucônico, isobutírico, málico, oxálico, succínico, entre outros (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007). Esses ácidos orgânicos podem dissolver o fosfato por meio de trocas aniônicas ou então podem se combinar ao Fe e Al associados ao fosfato (OMAR, 1998). Eles atuam por meio da redução do pH ou competição por fosfato com sítios de adsorção no solo (NAHAS, 1996). Após solubilização, o fósforo torna-se então biodisponível (figura 3.8). Yi et al. (2008) sugeriram que a produção de exopolissacarídeos com habilidade de ligação ao cálcio também deve ser um fator importante na dissolução de fosfato tricálcico, atuando em conjunto com os ácidos orgânicos.

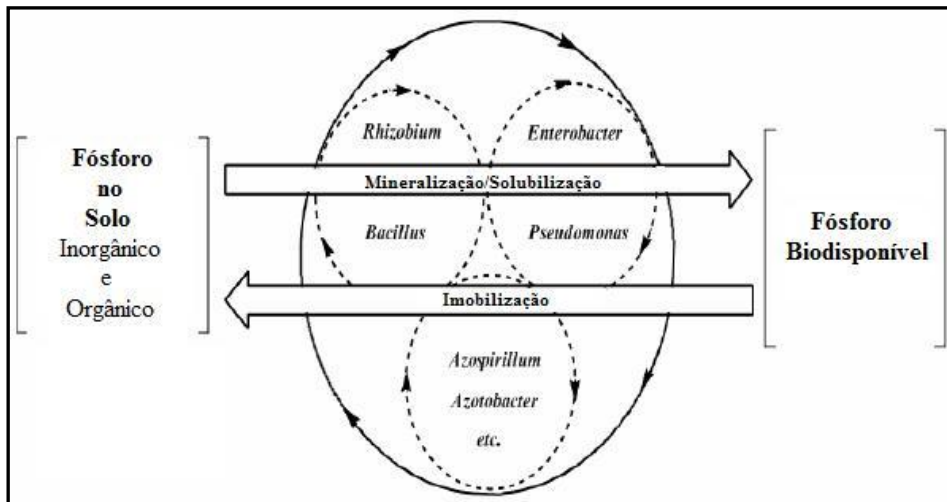


Figura 3.8 - Esquema da mobilização e imobilização de fósforo por bactérias
 Fonte: Modificado de Khan et al. (2009)

São várias as espécies de bactérias com capacidade de solubilização de fosfato, entre elas podemos citar *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Enterobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Mesorhizobium* sp., *Microbacterium laevaniformans* (AHMAD et al., 2008; JORQUERA et al., 2008; MALBOOBI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

3.2.4.1.3 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico ocorre de acordo com uma reação, onde uma molécula de nitrogênio é convertida pela enzima nitrogenase, em duas moléculas de amônia que podem ser facilmente utilizadas pelas plantas (BHATTACHARJEE et al., 2008).

Em sistemas naturais, há os micro-organismos simbióticos de leguminosas como os rizóbios; não-leguminosas como as bactérias do gênero *Frankia*; cianobactérias associadas a pteridófitas aquáticas do gênero *Azolla*; bactérias endofíticas associadas a cereais e também há aqueles de vida livre como algumas cianobactérias, bactérias heterotróficas e autotróficas (HERRIDGE et al., 2008). Park et al. (2005) ao realizarem isolamento da rizosfera de sete diferentes plantas da Coréia, identificaram três espécies com alta atividade da nitrogenase: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus fusiformis*, *Pseudomonas fluorescens*. Outros micro-organismos diazotróficos são: *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium tumefaciens* (YIM et al., 2009); *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Ochrobactrum*, *Lysinibacillus*, *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Herbaspirillum*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas* e *Azorhizobium* (ISLAM et al., 2010); *Vibrio* sp. com pigmentação avermelhada (RAMESHKUMAR; NAIR, 2009).

A genética da fixação de nitrogênio é um tanto complexa, sendo necessários vários genes *nif* (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*) para a síntese da nitrogenase (FRANCHE et al., 2009).

3.2.4.2 Mecanismos indiretos de ação

3.2.4.2.1 Antibiose pela produção de compostos voláteis – amônia, cianeto de hidrogênio

A produção de compostos voláteis é realizada por vários micro-organismos e pode servir como um meio de comunicação intra e interespecífico, atuando também a nível celular ou como promotor e inibidor de crescimento (KAI et al., 2009). Há vários tipos de compostos voláteis já identificados como os orgânicos: trimetilamina, 3-metil-2-pentanona, dimetil dissulfeto, pirazina metil, 2,5-dimetil-pirazina, benzaldeído (XU et al., 2004), tetracloroetileno, α -pineno, β -pineno, D-limoneno, cariofileno, furfural, naftaleno (LEFF; FIERER, 2008) e os inorgânicos como NH_3 (HOWELL et al., 1988) e o HCN (BLUMER; HAAS, 2000; VOISARD et al., 1989). Em se tratando de inibição de crescimento, Minerdi et al. (2009) demonstraram que pequenas moléculas de compostos orgânicos voláteis emitidas por uma variedade antagonística de *Fusarium oxysporum* influencia negativamente o crescimento micelial de *F. oxysporum* patogênico, além de suprimir a expressão gênica de genes de virulência em *F. oxysporum lactucae*. Algumas espécies do gênero *Stenotrophomonas* podem produzir compostos orgânicos voláteis que inibem o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* (KAI et al., 2007). Zou et al. (2007) estudando a produção de voláteis por bactérias, descobriram que mais de 32% dos isolados de amostras de solo foram capazes de produzi-las com potencial de inibição de germinação de esporos e crescimento micelial de dois fungos nematicidas *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia*. As bactérias foram identificadas como *Bacillus pumilus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sporosarcina ginsengisoli*, *Arthrobacter nitroguajacolicus* e *Staphylococcus cohnii*.

No caso da amônia, além de promover crescimento de modo indireto como sugerido por Wani, Khan e Zaidi (2007) que observaram aumento no crescimento de gramíneas inoculadas com linhagens de *Bradyrhizobium* produtoras de AIA, sideróforos e HCN ou amônia, também pode participar na via enzimática para assimilação de NH_4^+ (amônio) pelas plantas. Sood, Chanda e Singh (2002) observaram que a suplementação de amônia aumentou

significativamente a atividade da enzima glutamina sintetase que juntamente com a enzima glutamato sintase participam da via primária de assimilação de NH_4^+ por plantas. Em estudo realizado por Banerjee et al. (2010), detectaram a produção de amônia em *Arthrobacter* sp. e *Bacillus* sp.

Com relação à HCN, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* isoladas da rizosfera de trigo e canola foram capazes de produzir HCN *in vitro* (ABBAS-ZADEH et al., 2010), assim como *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus* sp. (ALI et al. 2010), *Flavobacterium* spp. (SOLTANI et al., 2010), *Pseudomonas* spp. (SURESH et al., 2010), *Serratia nematodiphila* (DASTAGER et al., 2011), *Klebsiella* sp. (AHEMAD; KHAN, 2011), *Enterobacter asburiae* (AHEMAD; KHAN, 2010). Para espécies de *Bacillus* sp. foi encontrado apenas um relato (BANERJEE et al., 2010). O gene *hcnBC* envolvido na síntese de HCN sintetase é imprescindível para a produção de HCN (SVERCEL et al., 2007).

3.2.4.2.2 Parasitismo pela produção de celulase

As enzimas extracelulares além de serem importantes na degradação de compostos complexos e macromoléculas e essenciais ao ciclo do carbono nos solos (ALLISON; JASTROW, 2006), podem ser auxiliar na habilidade saprofítica competitiva de certas linhagens em competirem e colonizarem a rizosfera de plantas (AHMAD; BAKER, 1987), além disso, também podem ser produzidas de modo a controlar alguns fitopatógenos que possuem parede celular composta de celulose (HARDHAM, 2007; SINDHU; DADARWAL, 2001). Downer, Menge e Pond (2001) mostram que em experimentos com folhas de eucalipto, altas concentrações de enzimas com capacidade de degradar componentes celulares de *Phytophthora* impediram o desenvolvimento de doenças radiculares e que o fungo não foi capaz de colonizar este ambiente.

3.3 Estresse ambiental

Segundo Jones e Jones (1989) estresse é uma força ou uma condição adversa que inibe o funcionamento de um sistema biológico. Há estresses do tipo bióticos como patógenos, insetos, roedores e os fatores abióticos como o frio, o calor, a salinidade, a seca, o excesso de água, a radiação, os poluentes, o vento e a perda de nutrientes do solo (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Estes fatores podem influenciar negativamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas, além de afetar a produtividade vegetal. Entretanto, a ocorrência de vários tipos de

estresse ambientais simultaneamente, ao invés de casos isolados, muitas vezes são os responsáveis por perdas na agricultura, por exemplo, (MITTLER, 2006). Desta forma, Ciaís et al. (2005) relataram que a redução da produtividade na Europa em 2003 pode ter ocorrido devido ao intenso calor durante o verão e a um déficit na precipitação hídrica.

3.3.1 Respostas Fisiológicas dos Organismos ao Estresse

Segundo Lichtenthaler (1996), os organismos de modo geral passam por quatro fases de reação ao estresse: 1 – reações de sinalização: os processos catabólicos são mais intensos do que os de biossíntese; 2 – os processos de adaptação e recuperação são ativados; 3 – fase de exaustão: a intensidade do estresse ultrapassa a capacidade do organismo de sustentar o estresse, podem ocorrer danos crônicos levando à morte; 4 – quando o impacto do estresse cessa, as funções fisiológicas do organismo podem retornar como um todo ou parcialmente.

As plantas respondem ao estresse, mais especificamente ao hídrico, por processos de sinalização envolvendo o ácido abscísico (AAB), que ocasionará o fechamento estomático, reduzindo a perda de água pela planta (SCHROEDER; KWAK; ALLEN, 2001) e também há indícios de outros agentes indutores como alguns compostos voláteis produzidos por micro-organismos que induzem a tolerância à seca, mediante a dependência da via de sinalização do ácido salicílico (AS) (CHO et al. 2008). Os micro-organismos assim como as plantas também são capazes de sobreviver a várias condições de estresse pela formação de biofilme, exopolissacarídeos, pigmentação, osmólitos intracelulares, entre outros (CHAVES et al., 2002; CORONADO et al., 1996; MONIER; LINDOW, 2003).

3.3.1.1 Produção de biofilme

O biofilme é definido como uma matriz com populações microbianas aderentes umas as outras e/ou a superfícies e interfaces, sendo a matriz composta por carboidratos extracelulares, proteína e até mesmo DNA (BRANDA et al., 2005; COSTERTON et al., 1995), que além de auxiliar no suporte contra as forças físicas, também ajuda na sobrevivência a várias condições de estresse, como resistência a antibióticos e agentes estressantes antimicrobianos (PARSEK; FUQUA, 2004), proteção contra as respostas de defesa das plantas no caso de fitopatógenos (WALKER et al., 2004), proteção contra a dessecação e outros tipos de estresses ambientais (DANHORN; FUQUA, 2007; MONIER; LINDOW, 2003). Também pode auxiliar a colonização dos fitopatógenos vasculares, bloqueando a passagem de nutrientes para as

plantas (NEWMAN et al., 2003). A formação de biofilme é desencadeada por condições externas desfavoráveis que modificam a expressão de vários genes. O biofilme formado, por sua vez, altera o microambiente dos seus habitantes que levam à alteração da expressão gênica e à maturação do biofilme e assim por diante (JEFFERSON, 2004).

3.3.1.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Os exopolissacarídeos são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004), acumulando-se na superfície das células (CORONADO et al., 1996) e seu uso vem sendo associado a um mecanismo de adaptação de rizóbios a uma grande variedade de condições estressantes ambientais como solos salinos, variações de temperatura e estresse hídrico. Possibilitam a degradação de alguns compostos, auxiliam os fitopatógenos na colonização, virulência e sobrevivência na planta hospedeira (ROPER et al., 2007), proteção a estresses ambientais (CORONADO et al. 1996). Iwabuchi et al. (2000) descobriram uma bactéria *Rhodococcus rodochrous* capaz de produzir um EPS contendo D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-ácido glucurônico e lipídeos que permitem sua tolerância à fração aromática de óleo bruto. Com base nisso, adicionaram esse EPS em água do mar contendo nutrientes e fração aromática de óleo bruto, obtendo uma promoção de crescimento de bactérias nativas, além de aumento na degradação da fração aromática do petróleo pelas bactérias (IWABUCHI et al., 2002). A produção de biofilme também é imprescindível na ação das RPCPs (Seneviratne et al., 2011). Chang et al. (2007) sugeriram que uma linhagem de *Pseudomonas putida* deve produzir um EPS denominado de alginato que influencia o desenvolvimento de biofilme e as propriedades físico-químicas de EPS em resposta a condições limitantes de água. Estas respostas devem facilitar a manutenção de um microambiente hidratado, protegendo os micro-organismos contra a desidratação. Bactérias mutantes sem o gene para produção de alginato apresentaram sensibilidade ao calor, paraquat e peróxido de hidrogênio (KEITH; BENDER, 1999). Philippis et al. (1998) descobriram várias cianobactérias de ambientes salinos do gênero *Cyanothece* capazes de produzir diversos exopolissacarídeos. No caso da cianobactéria terrestre *Nostoc commune*, a produção de EPS mostrou ser crucial para a tolerância ao estresse durante a desidratação, congelamento e descongelamento (TAMARU et al., 2005).

A produção de EPS pelos micro-organismos pode auxiliar na sobrevivência da planta a determinados tipos de estresse ambientais, quando inoculadas com micro-organismos de interesse. Há um fator AlgU (AlgT) que controla a produção de EPS, sendo importante na

adaptação de *Pseudomonas fluorescens* em condições de seca e hiperosmolaridade (SCHNIDER-KEEL et al., 2001). Ashraf et al. (2004) ao inocularem plântulas de trigo com bactérias capazes de produzir EPS, observaram uma redução na absorção de sódio, aliviando o estresse salino e ainda promovendo o crescimento da planta.

3.3.1.3 Produção de osmólitos intracelulares

Alguns micro-organismos são capazes de crescer em ambientes com altas concentrações salinas de dois modos: as arqueias utilizam solutos inorgânicos como íons de cloreto e potássio como uma forma de balanço osmótico; já as eubactérias acumulam pequenas moléculas orgânicas que são denominadas de osmólitos ou extremólitos, no caso de organismos extremófilos e balanceiam a concentração salina do ambiente (LENTZEN; SCHWARZ, 2006). De qualquer forma, atuam de modo a aumentar a pressão osmótica citoplasmática, evitando a perda de água para o meio e também na estabilização de proteínas e membranas (McNEIL et al., 1999). O extremólito ectoína atua na estabilização proteica contra alta temperatura, congelamento e desidratação (LIPPERT; GALINSKI, 1992). Há outros extremólitos como hidroxiectoína, manosilglicerato e DGP com as mais diversas funções (LENTZEN; SCHWARZ, 2006).

Os osmólitos podem ser açúcares como sorbitol, mio-inositol, trealose; aminoácidos como glicina, taurina, prolina; metilaminas como as betaínas (YANCEY, 2000). Esses osmólitos também podem ser acumulados em caso de resposta à dessecação. McIntyre et al. (2007) concluíram que a trealose acumulada intracelularmente além de proteger as células de *Rhizobium leguminosarum* contra a dessecação também protege contra o estresse durante a nodulação. *Azospirillum brasilense* portando um plasmídeo com gene responsável pela biossíntese de trealose foi capaz de crescer em concentrações salinas elevadas e acumular trealose (RODRÍGUEZ-SALAZAR et al., 2009).

Essas substâncias podem ser usadas para aplicações exógenas. Leslie et al. (1995) observaram que durante a desidratação, a aplicação de trealose e sucrose protegeram a estrutura proteica de *E. coli* e *B. thuringiensis* durante o processo. A aplicação de trealose também melhorou a tolerância de milho ao estresse hídrico pela super regulação de atributos de relações hídricas, fotossintéticos e de mecanismos de defesa (ALI; ASHRAF, 2011).

3.3.2 Estresse Hídrico: Tolerância X Resistência

A limitação de quaisquer dos fatores necessários para a fotossíntese vegetal como dióxido de carbono, água e luminosidade, pode interferir nas taxas de fotossíntese. A falta de água é um fator limitante ao crescimento e desenvolvimento vegetal (KRAMER, 1969), sendo que perdas na produção agrícola pela seca são consideráveis (ASHRAF, 2010).

As plantas possuem inúmeras estratégias para lidar com a seca, o que envolve uma mistura de estratégias de tolerância e de se evitar o estresse (CHAVES et al., 2002). O termo resistência à seca foi definido por Levitt (1972) como um meio de evitar a desidratação e/ou tolerar a desidratação. Para a fitopatologia, RESISTÊNCIA é a característica da planta de restringir, suprimir ou retardar o desenvolvimento da doença (FRY, 1982) e TOLERÂNCIA é a característica das plantas em suportarem a doença sem perda de produtividade (CALDWELL et al., 1958). Desta forma, acredita-se que do mesmo modo para as plantas, a tolerância é a palavra mais adequada em se tratando de estresse hídrico, onde a planta é capaz de suportar uma deficiência hídrica, sem que haja perda na sua produtividade. A busca por plantas tolerantes à seca tem aumentado, gerando inúmeras patentes e as técnicas são baseadas no melhoramento de plantas pelo método convencional ou na engenharia genética e transgenia, com inserção de genes de micro-organismos em plantas de modo a possibilitar o crescimento vegetal em ambientes propensos à seca (ASHRAF, 2010; SOMVANSHI, 2009).

No caso dos micro-organismos, a tolerância à dessecação, também conhecida como anidrobiose, é considerada como uma fase em que o metabolismo celular é suspenso, induzido pela remoção de água da célula, entretanto, a célula continua viável (POTTS, 2001).

3.3.2.1 O papel dos micro-organismos na tolerância vegetal ao estresse hídrico

A proteção de plantas contra os estresses ambientais pode ser adquirida inoculando-se micro-organismos capazes de promover crescimento em condições de estresse ou então pode ser de forma gênica, por meio da inserção de genes de resistência ao estresse em plantas. Alami et al. (2000) estudaram o efeito de uma rizobactéria produtora de EPS na promoção de crescimento sob estresse hídrico e condições normais de umidade de *Helianthus annuus* (girassol). A inoculação da linhagem modificou a estrutura do solo ao redor do sistema radicular, agindo contra o efeito negativo da falta de água no crescimento (tabela 3.1). Ruiz-Lozano et al. (1995) estudaram sete espécies de fungos do gênero *Glomus* quanto à habilidade de aumentar a tolerância de *Lactuca sativa* (alface) à seca. Esta habilidade foi relacionada com as taxas de transpiração, níveis de condutância foliar e conteúdos de prolina, nitrogênio e fósforo. A espécie *Glomus deserticola* teve o menor nível de redução de crescimento (9%).

Similarmente, Marulanda et al. (2006) inocularam *Glomus intraradices* e *Bacillus thuringiensis* em *Retama sphaerocarpa* (piorno-amarelo), observando um aumento no crescimento radicular em 201%, além de aumento da absorção de água. Plantas de *Medicago sativa* (alfafa-verdadeira) foram submetidas à seca e foi realizada uma análise do envolvimento do metabolismo do carbono e estresse oxidativo no declínio da atividade da enzima nitrogenase. Em uma seca intensa, a atividade da nitrogenase foi inibida em 82% (NAYA et al., 2007). Como já mencionado anteriormente, a inoculação de plantas com bactérias com atividade da enzima ACC deaminase pode reduzir o estresse induzido pela produção de etileno, uma vez que o ACC é precursor deste hormônio (SALEEM et al., 2007). Arshad, Shaharoon e Mahmood (2008) inocularam duas linhagens de RPCPs produtoras da enzima ACC deaminase em ervilha submetidas ao estresse hídrico. Observaram que as linhagens reduziram significativamente os efeitos impostos pela seca com relação ao crescimento e produtividade. Rodríguez-Salazar et al. (2009) inocularam *Azospirillum brasilense* geneticamente modificado e capaz de acumular trealose sob altas concentrações salinas em plantas de milho, observando que 85% das plantas de milho inoculadas sobreviveram ao estresse hídrico, além de que tiveram sua biomassa aumentada em 73%. A inoculação de plantas de tomate com *Achromobacter piechaudii* resultou em contínuo crescimento vegetal durante estresse hídrico (MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004).

Tabela 3.1- Efeitos de micro-organismos inoculados em plantas sob estresse hídrico

| Micro-organismo | Planta | Efeito | Referência |
|--|---|--|------------------------------------|
| Bactéria produtora de EPS | Girassol (<i>Helianthus annuus</i>) | Modificação da estrutura do solo | Alami et al. (2000) |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | Ervilha (<i>Pisum sativum</i>) | Aumento do crescimento e produtividade | Arshad, Shaharoon e Mahmood (2008) |
| <i>Glomus deserticola</i> | Alface (<i>Lactuca sativa</i>) | Apenas 9% de redução de crescimento | Ruiz-Lozano et al. (1995) |
| <i>Glomus intraradices</i> e <i>Bacillus thuringiensis</i> | Piorno-amarelo (<i>Retama sphaerocarpa</i>) | Aumento do crescimento radicular e aumento da absorção de água | Marulanda et al. (2006) |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | Milho (<i>Zea mays</i>) | 85% de sobrevivência ao estresse hídrico e aumento da biomassa | Rodríguez-Salazar et al. (2009) |
| <i>Achromobacter piechaudii</i> | Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) | Contínuo crescimento vegetal | Mayak; Tirosh; Glick, 2004). |

Referências

ABBAS-ZADEH, P.; SALEH-RASTIN, N.; ASADI-RAHMANI, H.; KHAVAZI, K.; SOLTANI, A.; SHOARY-NEJATI, A.R.; MIRANSARI, M. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warsaw, v. 32, p. 281-288, 2010.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. **EurAsian Journal of BioSciences**, Konak-Izmir, v. 4, p. 88-95, 2010.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Effects of insecticides on plant-growth-promoting activities of phosphate solubilizing rhizobacterium *Klebsiella* sp. strain PS19. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 100, p. 51-56, 2011.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Pavia, v. 163, p. 173-181, 2008.

AHMAD, J.S.; BAKER, R. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. **Ecology and Epidemiology**, Saint Paul, v. 77, n. 2, p. 358-362, 1987.

ALAMI, Y.; ACHOUAK, W.; MAROL, C.; HEULIN, T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3393-3398, 2000.

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed.. New York: John Wiley, 1977. 467p.

ALI, B.; SABRI, A.N.; HASNAIN, S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 1379-1384, 2010.

ALI, Q.; ASHRAF, M. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Oxford, v. 197, n. 4, p. 258-271, 2011.

ALLISON, S.D.; JASTROW, J.D. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 38, p. 3245-3256, 2006.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHEIDLER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Oregon: Timber Press, 2001. 776p.

ANDRADE, C.T.S. **Um estudo etnobotânico da conexão homem/Cactaceae no semi-árido baiano**. 2002. 73p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2002.

ARSHAD, M.; SHAHAROONA, B.; MAHMOOD, T. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). **Pedosphere**, Nanjing, v. 18, n. 5, p. 611-620, 2008.

ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; BERGE, O.; MAHMOOD, T. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 157-162, 2004.

ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, p. 169-183, 2010.

AVANISS-AGHAJANI, E.; JONES, K.; HOLTZMAN, A.; ARONSON, T.; GLOVER, N.; BOIAN, M.; FROMAN, S.; BRUNK, C.F. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 1, p. 98-102, 1996.

BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M.I.M.; SKLARZ, M.Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E. D.; GILLOR, O. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 453-461, 2010.

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**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BANERJEE, S.; PALIT, R.; SENGUPTA, C.; STANDING, D. Stress induced solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. **Australian Journal of Crop Science**, New South Wales, v. 4, n. 6, p. 378-383, 2010.

BARBOSA, H.P. **Tabela de composição de alimentos do estado da Paraíba**: Setor agropecuário. João Pessoa: UTPB/FAPEP, 1998. 165p.

BARTHLOTT, W.; HUNT, D.R. Cactaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. v. 2, p. 161-197.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, n. 8/9, p. 1225-1228, 1998.

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

BIANCO, C.; IMPERLINI, E.; CALOGERO, R.; SENATORE, B.; AMORESANO, A.; CARPENTIERI, A.; PUCCI, P.; DEFEZ, R. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 185, p. 373-382, 2006.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant-growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343-350, 2001.

BLUMER, C.; HAAS, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 173, p. 170-177, 2000.

BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 20-26, 2005.

BRASIL. **Programa de ação nacional de combate à desertificação e mitigação dos efeitos da seca Pan-Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. 220p.

BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 3, p. 237-245, 2000.

CALDWELL, R.; COMPTON, L.; PATTERSON, F. Tolerance to cereal leaf rusts. **Science**, Washington, v. 128, p. 714-715, 1958.

CARDENAS, E.; TIEDJE, J.M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, p. 544-549, 2008.

CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, Mountrouge, v. 45, p. 12-19, 2009.

CHANAL, A.; CHAPON, V.; BENZERARA, K.; CHRISTEN, R.; ACHOUAK, W.; BARRAS, F.; HEULIN, T. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 514-525, 2006.

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

CHAVES, M.M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO, C.P.P.; OSÓRIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the Field. Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 907-916, 2002.

CHO, S.M.; KANG, B.R.; HAN, S.H.; ANDRESON, A.J.; PARK, J.-Y.; LEE, Y.-H.; CHO, B.H.; YANG, K.-Y.; RYU, C.-M.; KIM, Y.C. 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 8, p. 1067-1075, 2008.

CIAIS, P.; REICHSTEIN, M.; VIOVY, N.; GRANIER, A.; OGÉE, J.; ALLARD, V.; AUBINET, M.; BUCHMANN, N.; BERNHOFER, C.; CARRARA, A.; CHEVALIER, F.; NOBLET, N.; FRIEND, A.D.; FRIEDLINGSTEIN, P.; GRÜNWARD, T.; HEINESCH, B.; KERONEN, P.; KNOHL, A.; KRINNER, G.; LOUSTAU, D.; MANCA, G.; MATTEUCCI, G.; MIGLIETTA, F.; OURCIVAL, J.M.; PAPALE, D.; PILEGAARD, K.; RAMBAL, S.; SEUFERT, G.; SOUSSANA, J.F.; SANZ, M.J.; SCHULZE, E.D.; VESALA, T.; VALENTINI, R. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. **Nature**, London, v. 437, p. 529-533, 2005.

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

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

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

DASTAGER, S.G.; DEEPA, C.K.; PANDEY, A. Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Pepper nigrum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, p. 259-265, 2011.

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

DREGNE, H.E. Desertification: Symptoms of a crisis. In: PAYLORE, P.; HANEY, R. (Ed.). **Desertification: process, problems, perspectives**. Tucson: University of Arizona Press, 1976. p. 11-24.

EL-ZAYAT, S.A.; NASSAR, M.S.M.; EL-HISSY, F.T.; ABDEL-MOTAAL, F.F.; ITO, S.-I. Mycoflora associated with *Hyoscyamus muticus* growing under an extremely arid desert environment (Aswan region, Egypt). **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 48, p. 82-92, 2008.

ERTURK, Y.; ERCISLI, S.; HAZNEDAR, A.; CAKMAKCI, R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. **Biological Research**, Santiago de Chile, v. 91, p. 91-98, 2010.

FAO. **Climate change, water and food security**. FAO Water Reports, Rome, v. 36, 2011. 174p.

FAO. Crops and drops – making the best use of water for agriculture. **Natural Resources Management and Environment Department**, Rome 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/005/Y3918E/y3918e00.htm#TopOfPage>>. Acesso em: 07 jul. 2011.

FAO. **Irrigation potential in Africa - a basin approach**. FAO, Rome, 1997. 177p. (Land and Water Bulletin, 4).

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B.; LISBOA, B.B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 55, p. 44-52, 2012.

FOSTER, R.C. Microenvironments of soil microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, n. 3, p. 189-203, 1988.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 35-59, 2009.

FRY, W.E. **Principles of Plant Disease Management**. New York: Academic Press, 1982. 378p.

GILBERT, J.A.; STEELE, J.A.; CAPORASO, J.G.; STEINBRÜCK, L.; REEDER, J.; TEMPERTON, B.; HUSE, S.; McHARDY, A.C.; KNIGHT, R.; JOINT, I.; SOMERFIELD, P.; FUHRMAN, J.A.; FIELD, D. Defining seasonal marine microbial community dynamics. **The ISME Journal**, New York, v. 6, p. 298-308, 2012.

- GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A. To set the scene. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. p. 11-15.
- GLANTZ, M.H.; ORLOVSKY, N.S. Desertification: A review of the concept. **Desertification Control Bulletin**, Nairobi, v. 9, p. 15-22, 1983.
- GLENN, T.C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 759-769, 2011.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.
- GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 1-7, 2005.
- GORELICK, R. *Brasilicereus*, *Cipocereus*, and *Pilosocereus* in Eastern Brazil. **Cactus and Succulent Journal**, Pasadena, v. 81, n. 3, p. 126-137, 2009.
- GOTHWAL, R.K.; NIGAM, V.K.; MOHAN, M.K.; SASMAL, D.; GHOSHI, P. Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. **Applied Ecology and Environmental Research**, Budapest, v. 6, n. 2, p. 101-109, 2008.
- GRANT, W.D. Life at low water activity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences**, London, v. 359, p. 1249-1267, 2004.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HARDHAM, A.R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2007.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, The Hague, v. 311, p. 1-18, 2008.
- HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft**, Berlin, v. 98, p. 59-78, 1904.
- HORIKOSHI, K. Foreword. In: GERDAY, C.; GLANSDORFF, N. (Ed.). **Physiology and biochemistry of extremophiles**. Washington: ASM Press, 2007. p.11-13.

HOWELL, C.R.; BEIER, R.C.; STIPANOVIC, R.D. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* damping-off by the bacterium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 8, p. 1075-1078, 1988.

HUSEN, E.; WAHYUDI, A.; SUWANTO, A.; RASWATI, R. Prospective use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacteria for plant growth promotion and defense against biotic and abiotic stresses in peat-soil-agriculture. **Microbiology**, Reading, v. 2, n. 3, p. 107-111, 2008.

IBGE. **Mapa político-administrativo do semiárido brasileiro (2007)**. Disponível em: <ftp://geofp.ibge.gov.br/Organizacao/Semi_Arido/Semi_Arido_Brasileiro.pdf>. Acesso em: 21 set. 2011.

ISLAM, R.; TRIVEDI, P.; MADHAIYAN, M.; SESHADRI, S.; LEE, G.; YANG, J.; KIM, Y.; KIM, M.; HAN, G.; CHAUHAN, P.S.; SA, T. Isolation, enumeration, and characterization of diazotrophic bacteria from paddy soil sample under long-term fertilizer management experiment. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 261-269, 2010.

IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; ANZAI, H.; NAKAJIMA, M.; HARAYAMA, S. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5073-5077, 2000.

IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; URAI, M.; ITOH, C.; ANZAI, H.; NAKAJIMA, M.; HARAYAMA, S. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2337-2343, 2002.

JACKSON, M.B. Ethylene in root growth and development. In: MATOO, A.K.; SUTTLE, J.C. (Ed.). **The Plant Hormone Ethylene**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 159-181.

JACOBSON, C.B.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Partial purification and characterization of ACC deaminase from the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p. 1019-1025, 1994.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, p. 163-173, 2004.

JONES, H.G.; JONES, M.B. Introduction: some terminology and common mechanisms. In: JONES, H.G.; FLOWERS, T.J.; JONES, M.B. (Ed.). **Plants under stress**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p. 1-10.

JORQUERA, M.A.; HERNÁNDEZ, M.T.; RENGEL, Z.; MARSCHNER, P.; MORA, M.L. isolation of culturable phosphobacteria with both phytate mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 1025-1034, 2008.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 187, p. 351-360, 2007.

KAI, M.; HAUSTEIN, MOLINA, F.; PETRI, A.; SCHOLZ, B.; PIECHULLA, B. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, p. 1001-1012, 2009.

KEITH, L.M.W.; BENDER, C.L. AlgT (S22) controls alginate production and tolerance to environmental stress in *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 7176-7184, 1999.

KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.D. The five "classical" plant hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1197-1210, 1997.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4, 1978, Anegrs. **Proceedings...Anegrs**: INRA, 1978. p. 879-882.

KHAN, A.A.; JILANI, G.; AKHTAR, M.S.; NAQVI, S.M.S.; RASHEED, M. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Science**, Ipswich, v. 1, n. 1, p. 48-58, 2009.

KRAMER, P.J. **Plant and soil water relationships**: a modern synthesis. New York: McGraw Hill Book, 1969. 482p.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: MAHESHWARI, D.K.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy**: Crop Systems. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. Cap. 2, p. 37-59.

KUSKE, C.R.; TICKNOR, L.O.; MILLER, M.E.; DUNBAR, J.M.; DAVIS, J.A.; BARNS, S.M.; BELNAP, J. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and in the interspaces in an arid grassland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1854-1863, 2002.

LACERDA, M.A.; LACERDA, R.D. Planos de combate a desertificação no nordeste brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2004.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

LEFF, J.W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 1629-1636, 2008.

LENTZEN, G.; SCHWARZ, T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, p. 623-634, 2006.

LESLIE, S.B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, 1995.

LESTER, E.D.; SATOMI, M.; PONCE, A. Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 704-708, 2007.

LEVITT, J. 'Responses of plants to environmental stresses.' New York: Academic Press, 1972. 697p.

LICHTENTHALER, H.K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 148, p. 4-14, 1996.

LINDSAY, W.L.; VLEK, P.L.G.; CHIEN, S.H. Phosphate minerals. In: DIXON, J.B.; WEED, S.B. **Soil environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p. 1089-1130.

LIPPERT, K.; GALINSKI, E.A. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 37, p. 61-65, 1992.

LIU, W.-T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

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

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

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

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, The Hague, v. 261, n. 1/2, p. 199-208, 2004.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: na overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 444, p. 139-158, 2005.

MALBOOBI, M.A.; OWLIA, P.; BEHBAHANI, M.; SAROKHANI, E.; MORADI, S.; YAKHCHALI, B.; DELJOU, A.; HERAVI, M. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1471-1477, 2009.

MANZONI, S.; SCHIMEL, J.P.; PORPORATO, A. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. **Ecology**, New York, v. 93, n. 4, p. 930-938, 2012.

MARULANDA, A.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 670-678, 2006.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 18, p. 49-53, 1999.

_____. Plant growth-promotin of bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, Limerick, v. 166, p. 525-530, 2004.

McINTYRE, H.J.; DAVIES, H.; HORE, T.A.; MILLER, S.H.; DUFOUR, J.-P.; RONSON, C.W. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 12, p. 3984-3992, 2007.

McNEIL, S.D.; NUCCIO, M.L.; HANSON, A.D. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 120, p. 945-949, 1999.

MINERDI, D.; BOSSI, S.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 844-854, 2009.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2006.

MONIER, J.-M.; LINDOW, S.E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promote aggregate formation on leaf surfaces. **PNAS**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15077-15982, 2003.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A.R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 21-28, 2012.

NACKE, H.; THÜRMER, A.; WOLLHERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHÖNING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2011.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganism isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 18-23, 1996.

NAYA, L.; LADRERA, R.; RAMOS, J.; GONZÁLEZ, E.M.; ARRESE-IGOR, C.; MINCHIN, F.R.; BECANA, M. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 144, p. 1104-1114, 2007.

NEILSON, J.W.; QAUDE, J.; ORTIZ, M.; NELSON, W.M.; LEGATZKI, A.; TIAN, F.; LACOMB, M.; BETANCOURT, J.L.; WING, R.A.; SODERLUND, C.A.; MAIER, R.M. Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Extremophiles**, Tokyo, v. 16, n. 3, p. 553-566, 2012.

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

OKORO, C.K.; BROWN, R.; JONES, A.L.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 95, p. 121-133, 2009.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; SCOTTI, M.R.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

OLIVEIRA, M. de. O Nordeste no mapa mundi da desertificação. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 18-20, 2000.

OMAR, S.A. The role of rock phosphate solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, p. 211-219, 1998.

PARK, M.; KIM, C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, Pavia, v. 160, p. 127-133, 2005.

PARSEK, M.R.; FUQUA, C. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 14, p. 4427-4440, 2004.

PHILIPPIS, R.; MARGHERI, M.C.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 3, p. 1130-1132, 1998.

PIMENTEL, D.; BERGER, B.; FILIBERTO, D.; NEWTON, M.; WOLFE, B.; KARABINAKIS, E.; CLARK, S.; POON, E.; ABBETT, E.; NANDAGOPAL, S. Water resources: Agricultural and Environmental Issues. **BioScience**, Washington, v. 54, n. 10, p. 909-918, 2004.

PODILE, A.R.; KISHORE, A.K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.). **Plant-Associated Bacteria**. Netherlands: Springer-Verlag, 2007. Pt 2, p. 195-230.

POTTS, M. Desiccation tolerance: a simple process? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 11, p. 553-559, 2001.

PUENTE, M.E.; LI, C.Y., BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, p. 389-401, 2009.

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

RAMESHKUMAR, N.; NAIR, S. Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 67, p. 455-467, 2009.

REQUENA, B.Y.N.; JIMENEZ, I.; TORO, M. Interactions between plant-growth- promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. **New Phytologist**, Cambridge, v. 136, p. 667-677, 1997.

RODRÍGUEZ-SALAZAR, J.; SUÁREZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; ITURRIAGA, G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 296, p. 52-59, 2009.

ROPER, M.C.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M.; KIRKPATRICK, B.C. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7252-7258, 2007.

ROVIRA, A.D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 19, p. 241-266, 1965.

RUIZ-LOZANO, J.M.; AZCON, R.; GOMEZ, M. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 456-460, 1995.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 527-560, 2001.

SÁ, I.B.; RICHE, G.R.; FOTIUS, G.A. As paisagens e o processo de degradação do semi-árido nordestino. In: SILVA, J.M.C.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (Ed.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. Pt I, p. 17-36.

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 34, p. 635-648, 2007.

SARAF, M.; RAJKUMAR, S.; SAHA, T. Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems. In: Maheshwari, D.K.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Systems**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. Cap. 13, p. 361-385.

SCHNIDER-KEEL, U.; LEJBØLLE, K.B.; BAEHLER, E.; HAAS, D.; KEEL, C. The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5683-5693, 2001.

SCHROEDER, J.I.; KWAK, J.M.; ALLEN, G.J. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. **Nature**, London, v. 410, p. 327-330, 2001.

SELVAKUMAR, G.; MOHAN, M.; KUNDU, S.; GUPTA, A.D.; JOSHI, P.; NAZIM, S.; GUPTA, H.S. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). **Letters in Applied Microbiology**, Washington, v. 46, p. 171-175, 2008.

SENEVIRATNE, G.; WEERASEKARA, M.L.M.A.W.; SENEVIRATNE, K.A.C.N.; ZAVAHIR, J.S.; KECSKÉS, M.L.; KENNEDY, I.R. Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. **Microbiology Monographs**, New York, v. 18, p. 81-95, 2011.

SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; PAPA, M.F.; LAGARES, A.; LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 371-381, 2009.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 155-159, 2006.

SHAH, S.; LI, J.; MOFFATT, B.A.; GLICK, B.R. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 833-843, 1998.

SHOEBITZ, M.; RIBAUDO, C.M.; PARDO, M.A.; CANTORE, M.L.; CIAMPI, L.; CURÁ, J.A. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 1768-1774, 2009.

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

SOLTANI, A.-A.; KHAVAZI, K.; ASADI-RAHMANI, H. OMIDVARI, M.; DAHAJI, P.A.; MIRHOSEYNI, H. Plant growth promoting characteristics in some *Flavobacterium* spp. isolated from soils of Iran. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 106-115, 2010.

SOMVANSHI, V.S. Patenting drought tolerance in organisms. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences**, Sharjah, v. 3, p. 16-25, 2009.

SOOD, C.R.; CHANDA, S.V.; SINGH, Y. Effect of different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase and glutamate synthase activities of radish cotyledons. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 28, n. 3/4, p. 46-56, 2002.

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

STEWART, W.D.P. Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 172, n. 1029, p. 367-388, 1969.

SURESH, A.; PALLAVI, P.; SRINIVAS, P.; KUMAR, V.P.; CHANDRA, S.J.; REDDY, S.R. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. **African Journal of Microbiology**, Nairobi, v. 4, n. 14, p. 1491-1494, 2010.

SVERCEL, M.; DUFFY, B.; DÉFAGO, G. PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnAB* in *Pseudomonas* spp. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 209-213, 2007.

TAMARU, Y.; TAKANI, Y.; YOSHIDA, T.; SAKAMOTO, T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7327-7333, 2005.

TAYLOR, N.P. Cactaceae. In: OLDFIELD, S. (Ed.). **Cactus and succulent plants: Status survey and conservation action plan**. Cambridge: IUCN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group, 1997. cap. 1, p. 17-20.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D.C. Distribuição das espécies de Cactaceae na caatinga. In: SAMPAIO, E.V.C.B.; GIULIETTI, A.M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L. (Ed.). **Vegetação & flora da Caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2002. cap.10, p. 123-125.

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

TINKER, P.B. The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 76, n. 1/3, p. 77-91, 1984.

TRIGUEIRO, E.R.C.; OLIVEIRA, V.P.V.; BEZERRA, C.L.F. Indicadores biofísicos e a dinâmica da degradação / desertificação no bioma Caatinga: estudo de caso no município de Tauá, Ceará. **Revista Eletrônica do Prodepa**, Fortaleza, v. 3, n. 1, p. 62-82, 2009.

UNEP. **Global Environment Outlook: Environment for development (GEO - 4)**. Section B State-and-Trends of the Environment: 1987–2007. chap. 3 – Land. 2007. 572p.

VITOUSEK, P.M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C.B.; GRIMM, N.B.; HOWARTH, R.W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E.B.; SPRENT, J.I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 57/58, p. 1-45, 2002.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 8, n. 2, p. 351-358, 1989.

WALKER TS, BAIS HP, DEZIEL E, SCHWEIZER HP, RAHME LG, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, p. 320-331, 2004.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 70, p. 36-45, 2007.

WU, G. D.; LEWIS, J. D.; HOFFMANN, C.; CHEN, Y.-Y.; KNIGHT, R.; BITTINGER, K.; HWANG, J.; CHEN, J.; BERKOWSKY, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F. D. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. **BMC Microbiology**, London, v. 10, p. 206-220, 2010.

XU, C.K.; MO, M.H.; ZHANG, L.M.; Zhang, K.Q. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1997-2004, 2004.

XU, M.; CHEN, X.; QIU, M.; ZENG, X.; XU, J.; DENG, D.; SUN, G.; LI, X.; GUO, J. Bar-coded pyrosequencing reveals the responses of PBDE-degrading microbial communities to electron donor amendments. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2012.

YANCEY, P.H. Water stress, osmolytes and proteins. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v. 41, p. 699-709, 2001.

YI, E.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 1059-1065, 2008.

YIM, W.-J.; POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; PALANIAPPAN, P.; SIDDIKKEE, M.A.; SA, T. Characterization of plant-growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 47, n. 2, p. 147-155, 2009.

ZOU, C.-S.; MO, M.-H.; GU, Y.-Q.; ZHOU, J.-P.; ZHANG, K.-Q. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 2371-2379, 2007.

4 ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE SOLO E RIZOSFERA DE *CEREUS JAMACARU* DURANTE O PERÍODO CHUVOSO E DE SECA

Resumo

Na Caatinga é possível observar dois períodos bem definidos, período chuvoso e de seca. Apesar de a flora ser razoavelmente bem documentada, as comunidades bacterianas presentes no solo e associadas às cactáceas têm sido negligenciadas. Estas comunidades devem ter papel fundamental na função e manutenção desse ecossistema. Como sugerido em outros estudos, hipotetizamos que a disponibilidade de água delinea as comunidades rizosféricas, resultando em padrões diferentes durante o período chuvoso e de seca. Desta forma, estudamos a estrutura bacteriana de solo e rizosfera de uma espécie de cactácea, *Cereus jamacaru*, por meio da técnica de T-RFLP e sequenciamento do gene 16S rRNA em larga escala. Teste de ANOSIM com os dados obtidos por meio da análise de T-RFLP confirmou que a estrutura das comunidades microbianas apresentou uma variação sazonal ($R = 0,626$, $p < 0,001$) e não foi observada variação espacial. Amostras de solo e rizosfera correlacionaram-se com o período de amostragem, conteúdo de matéria orgânica e boro. Das 590.043 sequências obtidas por meio do sequenciamento em larga escala, 49,7% foram atribuídas a vinte e quatro filos, sendo apenas seis com frequência relativa maior que 1%. Análise de PCA indicou que amostras obtidas durante o período chuvoso correlacionaram-se com o filo Proteobacteria, enquanto amostras obtidas durante o período de seca correlacionaram-se com os filos Actinobacteria e Acidobacteria. O programa STAMP, que avaliou os grupos relevantes, também indicou o filo Proteobacteria além do filo Bacteroidetes como os mais significativos durante o período chuvoso e o filo Actinobacteria e o gênero *Bacillus* mais significativos durante o período de seca. Além da diferenciação das comunidades pelo período, as comunidades de solo foram influenciadas pelo teor de P e as comunidades de rizosfera de *Cereus jamacaru* foram influenciadas pelo teor de umidade relativa do ambiente. Cinquenta e um gêneros foram obtidos de solo e rizosfera durante o período de chuva e treze durante o período de seca, sendo dez gêneros comuns entre amostras de solo e rizosfera neste período. Estes incluem: *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Candidatus Koribacter*, *Geodermatophilus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Pseudonocardia*, *Rhodopseudomonas* e *Streptomyces* que podem possuir vários mecanismos de tolerância às condições extremas que podem ser encontradas na Caatinga. A maior proporção de gêneros encontrados exclusivamente no período de seca pode indicar a função ecológica que os micro-organismos podem desempenhar, concedendo certo grau de tolerância às plantas contra o estresse hídrico ou ainda auxiliando no seu desenvolvimento por meio de mecanismos de promoção de crescimento. As alterações nas comunidades microbianas observadas podem ser devido às diferentes habilidades dos micro-organismos nativos em resistir e se adaptar às alterações ambientais.

Palavras-chave: *Cereus jamacaru*; Comunidades bacterianas; T-RFLP; Sequenciamento em larga escala; Gene 16S rRNA; Variação sazonal

Abstract

In the Caatinga biome it is possible to observe two distinct seasons: rainy season and dry season. Although the flora is reasonably well documented, soil bacterial communities and rhizosphere communities associated to cacti have been neglected. These communities should play a critical role in the function and maintenance of this ecosystem. As suggested in other studies, we hypothesized that the availability of water shapes the rhizosphere communities, resulting in different patterns during the rainy and dry seasons. Thus, we studied the structure of bulk soil and rhizosphere bacterial communities of a cactus, *Cereus jamacaru* through the T-RFLP technique and sequencing of the 16S rRNA in a large scale. ANOSIM test with data obtained by T-RFLP analysis confirmed that the structure of microbial communities showed a seasonal variation ($R = 0.626$, $p < 0.001$) and there was no spatial variation. Soil and rhizosphere samples both correlated with the sampling season, contents of organic matter and boron. Of the 590,043 sequences obtained by sequencing in large scale, 49.7% were assigned to twenty-four phyla, being six with relative frequency greater than 1%. PCA analysis indicated that samples obtained during the rainy season correlated with the phylum Proteobacteria, while samples obtained during the dry period correlated with the phyla Actinobacteria and Acidobacteria. The STAMP program, which assessed the relevant groups, also indicated the phylum Proteobacteria as well as Bacteroidetes as the most significant ones during the rainy season and the phylum Actinobacteria and *Bacillus* more significant during the dry season. Besides the differentiation of communities based on the season, soil communities were also influenced by P content of *Cereus jamacaru* rhizosphere communities were influenced by the content of the environmental relative humidity. Fifty-one genera were obtained from soil and rhizosphere during the rainy season and thirteen during the dry season, with ten genera common in soil and rhizosphere samples during this period. These include: *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Candidatus Koribacter*, *Geodermatophilus*, *Mycobacterium*, *Nocardioideis*, *Pseudonocardia*, *Rhodopseudomonas* and *Streptomyces* which may display multiple mechanisms of tolerance to extreme conditions found in the Caatinga biome. The highest proportion of genera found exclusively in the dry season may indicate the ecological function that microorganisms can play in providing some degree of tolerance to plants against water stress or assisting in their development through mechanisms of growth promotion. Changes in microbial communities can be due to the different abilities of native microorganisms to resist and adapt to environmental changes.

Keywords: *Cereus jamacaru*; Bacterial communities; T-RFLP; Large scale sequencing; 16S rRNA gene; Seasonal variation

4.1 Introdução

“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte.”

(Mahatma Gandhi)

O clima semiárido do Nordeste brasileiro é determinado pelo índice pluviométrico, índice de aridez e risco de seca (BRASIL, 2005). Há dois períodos do ano bem definidos: período chuvoso e período de seca. O clima predominante é seco e quente, há dois períodos bem definidos, chuvoso e de seca, podendo as chuvas ser concentradas em dezembro e janeiro; em março e abril ou em maio e junho (ARAÚJO FILHO; CRISPIM, 2002). A seca é um fenômeno complexo e natural que afeta várias partes do mundo e provoca impactos sociais, econômicos e ambientais. É resultado de precipitações abaixo da normal climatológica, dependendo do clima de uma determinada região em um determinado momento, além de fenômenos climáticos de grande escala (MACEDO et al., 2010).

Inserido neste clima, a Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, ainda é pouco explorada. É constituída por árvores e arbustos altamente adaptados ao clima a que são expostos, como os representantes da família Cactaceae. Estas plantas, consideradas xerófitas, desenvolveram mecanismos adaptativos como tecidos suculentos para estoque de água, espinhos longos para reduzir a perda de água e ainda auxiliar na proteção contra a herbivoria e frutos avermelhados para atração de pássaros dispersores de sementes (GORELICK, 2009). A espécie *Cereus jamacaru*, conhecida como mandacaru, encontra-se bem distribuída (ANDERSON, 2001) e até o momento não foram encontrados estudos sobre as comunidades microbianas associadas a este tipo de cactácea.

Como sugerido em outros estudos, hipotetizamos que a disponibilidade de água delinea as comunidades rizosféricas, resultando em padrões diferentes durante os períodos de chuva e seca. Desta forma, para avaliar a estrutura das comunidades de *Bacteria* obtidas de solo e rizosfera de *C. jamacaru*, durante o período de chuva e seca, para os cinco pontos de coleta, foi utilizada a técnica de T-RFLP, análises multivariadas e sequenciamento em larga escala.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Área de estudo e coleta das amostras de solo e rizosfera de *Cereus jamacaru* durante o período chuvoso e de seca

Os locais de coleta de solo e rizosfera de *Cereus jamacaru* (mandacaru) foram delimitados ao longo da vegetação de Caatinga do semiárido nordestino, nos estados da Bahia (BA), Ceará (CE), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN) (figura 4.1), totalizando cinco pontos de coleta. As amostras foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

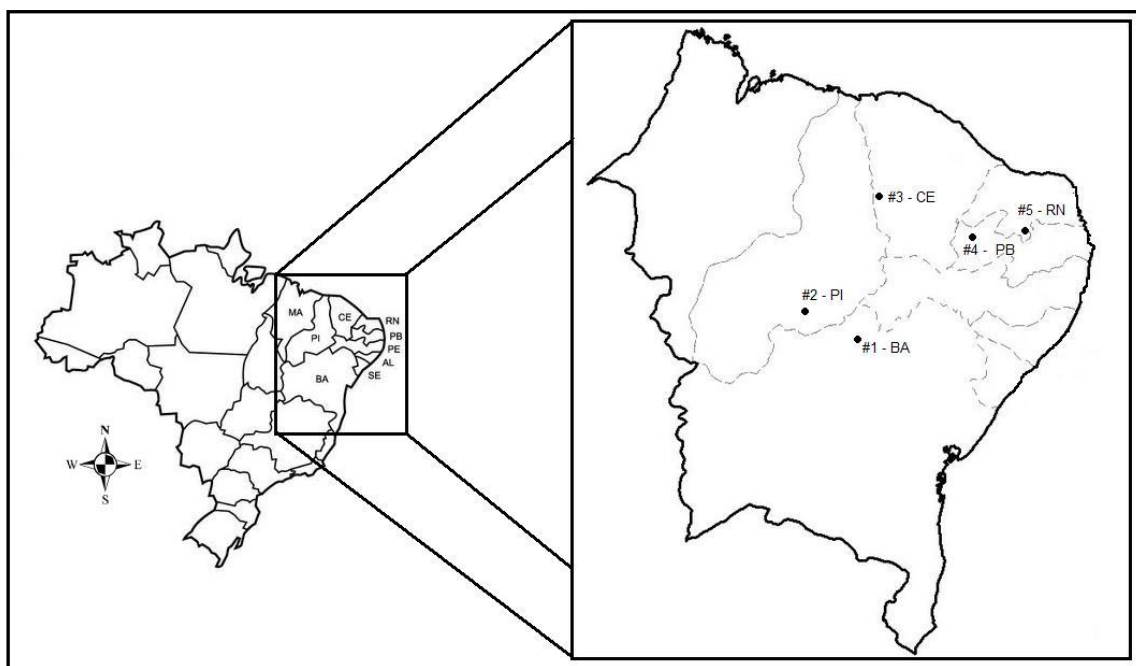


Figura 4.1 - Mapa do Brasil com destaque para a região semiárida do Nordeste brasileiro, ilustrando os cinco pontos de coleta de solo e rizosfera de mandacaru durante o período chuvoso e de seca

A primeira coleta foi realizada durante o período chuvoso, em maio de 2009. A segunda coleta foi realizada durante o período de seca, em outubro de 2010. A temperatura (medida com termômetro digital), para o período chuvoso variou de 28°C a 37°C tanto para o ambiente quanto para o solo. Os dados referentes aos pontos de coleta encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Pontos da coleta realizada durante o período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010) na Caatinga do Semiárido Nordestino. Os valores de temperatura correspondem ao observado para a coleta durante o período de seca. Valores de temperatura para o período chuvoso não são mostrados

| Pontos | Coordenadas | | Altitude (m) | Temperatura (°C) | | Localização |
|--------|--------------|--------------|--------------|------------------|------|--|
| | S | W | | Ambiente | Solo | |
| 1 - BA | 09°13'24,8'' | 41°05'11,4'' | 475 | 33,0 | 44,0 | Estrada com direção para Remanso. Município de Casa Nova. |
| 2 - PI | 08°50'01,6'' | 42°33'13,3'' | 414 | 39,0 | 43,0 | Parque Nacional Serra da Capivara. Município de Coronel José Dias. |
| 3 - CE | 06°27'37,1'' | 40°44'50,5'' | 450 | 44,0 | 45,0 | Após fronteira PI/CE. Município de Parambu. |
| 4 - PB | 06°42'44,2'' | 38°15'08,2'' | 293 | 40,0 | 42,0 | Estrada próxima ao Vale dos Dinossauros. Município de Sousa. |
| 5 - RN | 06°39'15,6'' | 37°29'33,4'' | 259 | 45,0 | 50,0 | Após fronteira PB/RN. Estrada BR-110 rumo a Serra Negra do Norte (RN). |

Dados obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) para o período de coleta foram utilizados para obtenção de dados sobre precipitação, temperatura máxima, umidade relativa do ar e insolação de onde foram feitas as médias (tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Dados sobre precipitação (mm), temperatura máxima (°C), umidade relativa do ar (%) e insolação (h) obtidos por meio do banco de dados do INMET. Média obtida para um período de trinta e nove dias, incluindo vinte e nove dias antes da data do início da coleta e nove dias após a data do início da coleta. A data de início da coleta para o período chuvoso (C) foi: 28/05/2009 e para o período de seca (S) foi: 10/10/2010

| Pontos | Precipitação (mm) | | Temperatura máxima (°C) | | Umidade relativa (%) | | Insolação (h) | |
|--------|-------------------|-----|-------------------------|------|----------------------|------|---------------|------|
| | C | S | C | S | C | S | C | S |
| 1 | 1,1 | 0,0 | 29,3 | 33,7 | 74,4 | 47,3 | 5,0 | 9,9 |
| 2 | 0,6 | 0,1 | 32,0 | 37,0 | 86,9 | 42,2 | 7,5 | 10,0 |
| 3 | 1,4 | 0,1 | 30,3 | 34,3 | 87,4 | 56,8 | 2,0 | 9,8 |
| 4 | 9,1 | 0,0 | 30,4 | 37,0 | 81,4 | 54,7 | 6,6 | 10,8 |
| 5 | 6,5 | 0,0 | 31,7 | 36,4 | 95,5 | 56,9 | 5,5 | 9,8 |

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente. No total, foram coletadas três repetições de cada ponto, totalizando 30 amostras de solo e 30 amostras de rizosfera de mandacaru.

As amostras de solo foram submetidas à análise química básica e análise de micronutrientes pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Atributos obtidos a partir da análise química básica de solo para os cinco pontos de coleta na Caatinga do semiárido nordestino durante o período chuvoso e de seca

| Período | Pontos | O.M. g.dm ⁻³ | pH | -----mmolc.dm ⁻³ ----- | | | | | | V % | -----mg.dm ⁻³ ----- | | | | | |
|---------|--------|----------------------------|------|-----------------------------------|------|------|------|-------|--------|--------|--------------------------------|-------|-----|------|-------|------|
| | | | | K | Ca | Mg | H+Al | S.B. | C.E.C. | | P | B | Cu | Fe | Mn | Zn |
| Chuvoso | 1 | 24,5 | 5,80 | 2,55 | 31,5 | 6,0 | 17,0 | 39,45 | 56,75 | 69,5 | 5 | 0,315 | 0,6 | 12 | 21 | 0,7 |
| | 2 | 20,5 | 4,15 | 0,70 | 4,50 | 1,0 | 32,5 | 6,50 | 39,05 | 17 | 15 | 0,230 | 0,3 | 125 | 3,2 | 4,85 |
| | 3 | 24,0 | 6,20 | 1,40 | 39,0 | 24 | 15,0 | 63,90 | 78,70 | 81 | 3 | 0,180 | 1,0 | 76 | 51 | 12,3 |
| | 4 | 24,5 | 5,25 | 3,60 | 19,5 | 6,0 | 22,0 | 29,30 | 51,80 | 56 | 3,5 | 0,160 | 0,2 | 67 | 18,55 | 3,75 |
| | 5 | 37,0 | 5,65 | 6,40 | 50,5 | 12,0 | 23,5 | 69,15 | 92,90 | 74 | 49,5 | 0,235 | 0,5 | 50 | 41,45 | 7,25 |
| Seca | 1 | 23,0 | 5,60 | 2,30 | 23,0 | 5,0 | 19,0 | 30,10 | 49,35 | 61 | 6 | 0,355 | 0,5 | 16,5 | 65,55 | 1,05 |
| | 2 | 22,0 | 4,20 | 1,50 | 8,50 | 1,5 | 36,0 | 11,45 | 47,65 | 24,5 | 9 | 0,345 | 0,3 | 84 | 12,4 | 0,75 |
| | 3 | 43,0 | 5,65 | 4,60 | 64,0 | 37,5 | 25,0 | 106,7 | 131,70 | 81 | 15,5 | 0,285 | 2,9 | 68 | 53,4 | 1,95 |
| | 4 | 33,5 | 5,30 | 8,25 | 23,5 | 8,0 | 28,0 | 39,65 | 67,40 | 59 | 6,5 | 0,260 | 0,4 | 44 | 52,45 | 1,2 |
| | 5 | 25,5 | 6,30 | 4,65 | 46,5 | 13,0 | 15,0 | 63,90 | 78,65 | 81 | 31,5 | 0,210 | 0,4 | 23 | 32,4 | 1,05 |

H+Al – Acidez potencial; MO – matéria orgânica; C.T.C. – capacidade de troca de cátions; S.B. – soma de bases; V – saturação por bases.

4.2.1.2 Extração de DNA metagenômico de solo e rizosfera

O DNA metagenômico de solo e rizosfera de mandacaru durante o período chuvoso e de seca foi extraído utilizando-se o *Power Soil™ DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantidade e a qualidade de DNA extraído foram verificadas em gel de agarose 1% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e fotografado.

4.2.1.3 Estrutura da comunidade bacteriana por meio da técnica de polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* – T-RFLP)

4.2.1.3.1 Amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*

O DNA metagenômico de cada amostra, obtida de solo e rizosfera de *Cereus jamacaru*, durante o período chuvoso e de seca, para os cinco pontos de coleta e três repetições (totalizando sessenta amostras), foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene 16S rRNA 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT) e 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), a extremidade 5' dos oligonucleotídeos iniciadores 27F foram marcadas com 6-carboxyfluorescein (FAM). A amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *Bacteria* de cada amostra foi feita em solução contendo 2,0 μL de tampão da enzima Dream Taq; 1,2 μL de MgCl_2 ; 1,6 μL de dNTP (2,5 mM); 0,07 μL de cada oligonucleotídeo iniciador a 5 μmol ; 0,2 μL de Dream Taq (Fermentas); 2 μL de DNA metagenômico de solo; água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 20 μL . As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) segundo as condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; extensão final de 10 minutos a 72°C. A qualidade da amplificação foi verificada em gel de agarose 1,5% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e fotografado.

4.2.1.3.2 Reação de restrição dos produtos de PCR

Os produtos de PCR de *Bacteria* foram utilizados na reação de restrição com a endonuclease *HhaI* (GCG[^]C) (Fermentas). Para cada reação foram utilizados 2 µL de tampão (Buffer Tango(10X)); 1 µL da endonuclease de restrição *HhaI* 10U (Fermentas); 10 µL do produto de PCR e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para o volume final de 21 µL. As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) a 37°C por 1h e 30 min, seguida de aumento da temperatura para 65°C durante 30 s.

4.2.1.3.3 Precipitação dos produtos da restrição

Após reação de restrição, os produtos digeridos foram precipitados para posterior análise dos fragmentos. Para a precipitação, foram adicionados a cada reação, 2 µL de EDTA (125 mM); 2 µL de acetato de sódio (3M) e 50 µL de álcool etílico (100%). A mistura foi agitada levemente por inversão por quatro vezes e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 3000 g e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 70 µL de álcool etílico (70%) em cada amostra e centrifugadas por 15 minutos a 1650 g. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas até que não restasse nenhum vestígio de álcool etílico. As amostras foram armazenadas a -20°C até seu uso.

4.2.1.3.4 Análise e processamento dos dados de T-RFLP

A análise dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs) foi realizada por meio de sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Foram adicionados 2 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada em cada produto precipitado. Para o carregamento das amostras no sequenciador, 1 µL do produto precipitado foi ressuspenso em uma mistura contendo 8,7 µL de formamida HiDi e 0,3 µL de padrão de comprimento GeneScan[™] - 600 LIZ[™] Size Standard (Applied Biosystems). Antes do carregamento, as amostras foram desnaturadas por 3 min a 95°C e resfriadas a 0°C por 3 min.

Os dados obtidos no sequenciador foram analisados com o programa Gene Mapper v.4.1 (Applied Biosystems), sendo inspecionados visualmente para conferir a qualidade das corridas. Após esta etapa, os dados contendo as alturas dos picos foram transformados em uma matriz no programa Excel (Microsoft) onde foram organizados para posterior análise. Para os fragmentos terminais de restrição obtidos (T-RFs) de *Bacteria*, uma linha base limite de 50 unidades de fluorescência foi usada para discriminar os “picos verdadeiros” dos ruídos

de *background* provenientes da técnica, sendo considerados T-RFs maiores que 50 pares de base (pb) e menores que 800. As alturas dos picos (unidades de fluorescência) foram transformadas em dados relativos, onde os valores absolutos referentes à intensidade dos picos no eletroferograma e correspondentes aos comprimentos dos fragmentos foram apresentados na forma de valores percentuais de detecção. Essa transformação foi calculada dividindo cada valor de tamanho do pico pelo valor total dos picos de uma amostra. Isso é análogo em transformar cada altura de pico em dados de porcentagem em relação ao total de valores de altura de pico em uma amostra (CULMAN ET AL., 2008).

Os perfis de T-RFLP foram comparados entre as diferentes amostras, calculando a abundância relativa das T-RFS, onde cada T-RF foi considerada como uma Unidade Taxonômica Operacional (UTO) diferente. Foram consideradas T-RFs com fluorescência relativa >1% (LEHOURS et al., 2005) descartando-se os outros valores. Estes dados foram utilizados para elaboração dos histogramas e diagramas de Venn. Estes últimos foram confeccionados por meio de uma ferramenta interativa denominada VENNY (OLIVEROS, 2007).

Para as análises multivariadas, foram elaboradas matrizes com os dados de altura dos picos (amostras) e com os dados de análise de solo (variáveis ambientais). Com esse conjunto de dados, foi primeiramente realizada uma análise de correspondência (*Detrended Correspondence Analysis* – DCA) para verificar o comprimento do gradiente e decidir qual análise usar: Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* – PCA) ou Análise Canônica (*Canonical Analysis* – CA) (sem as variáveis ambientais) e Análise de Redundância (*Redundancy Analysis* – RDA) ou Análise de Correspondência Canônica (*Canonical Correspondence Analysis* – CCA) (com as variáveis ambientais) utilizando o programa Canoco 4.5 (TER BRAAK; SMILAUER, 2002). Foi aplicada análise de RDA, com teste de significância realizado pelo teste de permutação não-paramétrico de Monte Carlo com 499 permutações, oferecendo informações suplementares sobre os efeitos das variáveis ambientais, quantificando a variância explicada por cada fator independentemente (λ) (DIAS et al., 2011). Foi feito o teste de SIMPER (*Similarity Percentage*) para pesar a contribuição de cada T-RF na similaridade/dissimilaridade entre as amostras (MESEL et al., 2004). As T-RFs que foram consideradas como as principais responsáveis pelas diferenças, foram denominadas de T-RFs SIMPER₅₀, cuja contribuição cumulativa foi de 50% (VAJNA et al., 2012). Foi realizada análise de similaridade (ANOSIM) que utiliza a matriz de Bray-Curtis para calcular um valor de R que pode variar de -1 a 1. Valores próximos de 0 indicam hipótese nula de diferença entre os grupos e valores maiores que 1 indicam discriminação

entre os grupos (BENNETT; KASEL; TIBBITS, 2008). Juntamente com ANOSIM foram elaborados gráficos de *Non-metric Multidimensional Scaling* (NMDS) que indicam a similaridade relativa das amostras por meio da distância de ordenação, onde amostras bem similares encontram-se bem próximas (BENNETT; KASEL; TIBBITS, 2008). Também foi efetuado o teste de Mantel na tentativa de compreender as relações entre os atributos do solo e os dados obtidos por T-RFLP. A partir de uma matriz com os dados de abundância de T-RFs obtidos pela análise de T-RFLP, foi calculado o índice de diversidade de Shannon (H') para cada amostra a partir da média das triplicatas de cada uma. As análises descritas acima foram realizadas com os programas Primer 6.1.6 (CLARKE; GORLEY, 2006) e Past 2.12 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4.2.1.4 Análise da comunidade bacteriana por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA em larga escala

4.2.1.4.1 Construção da biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA de *Bacteria* e sequenciamento

Foram selecionadas quarenta amostras obtidas de solo e rizosfera de *Cereus jamacaru*, durante o período chuvoso e de seca, para os cinco pontos de coleta, sendo utilizadas duas repetições por amostra (tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Amostras selecionadas para análise, obtidas de solo (S) e rizosfera de *Cereus jamacaru* (RZ), para o período chuvoso (C) e de seca (S), para os cinco pontos de coleta, onde o primeiro número refere-se ao ponto e o segundo número à repetição. Ex.: 1.2 RZS (Ponto 1, repetição 2, rizosfera, período de seca). Para cada amostra foi atribuído um *tag* (identificação) composto por 5 pares de bases (pb) – *barcode*

| Amostras | Tag | Barcode (5 pb) |
|-----------------|------------|-----------------------|
| 1.2 SC | 1 | GATCT |
| 1.3 SC | 2 | ATCAG |
| 2.2 SC | 3 | ACACT |
| 2.3 SC | 4 | AGCT |
| 3.2 SC | 5 | CACAC |
| 3.3 SC | 6 | ACAGA |
| 4.2 SC | 7 | AGATG |
| 4.3 SC | 8 | CACTG |
| 5.2 SC | 9 | CAGAG |
| 5.3 SC | 10 | CGCAG |
| 1.2 SS | 11 | CTGTG |
| 1.3 SS | 12 | GTGAG |
| 2.2 SS | 13 | TCATG |
| 2.3 SS | 14 | AGCAT |
| 3.2 SS | 15 | CAGCT |
| 3.3 SS | 16 | CATGT |
| 4.2 SS | 17 | CTGAT |
| 4.3 SS | 18 | CTGCA |
| 5.2 SS | 19 | GATGA |
| 5.3 SS | 20 | TACGC |
| 1.2 RZC | 21 | ACTGC |
| 1.3 RZC | 22 | GTCAC |
| 2.2 RZC | 23 | CGTAC |
| 2.3 RZC | 24 | TGCGT |
| 3.2 RZC | 25 | CGACG |
| 3.3 RZC | 26 | CTACT |
| 4.2 RZC | 27 | TGACT |
| 4.3 RZC | 28 | GACAG |
| 5.2 RZC | 29 | ATGCT |
| 5.3 RZC | 30 | TCGTC |
| 1.2 RZS | 31 | TATAC |
| 1.3 RZS | 32 | ACGAC |
| 2.2 RZS | 33 | TGTAG |
| 2.3 RZS | 34 | TCGAG |
| 3.2 RZS | 35 | TAGTG |
| 3.3 RZS | 36 | CGAGT |
| 4.2 RZS | 37 | ATACG |
| 4.3 RZS | 38 | ACTCG |
| 5.2 RZS | 39 | TCTGT |
| 5.3 RZS | 40 | TCGCT |

O DNA metagenômico de cada amostra foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C) e 1046R (CGA CAG CCA TGC ANC ACC T) flanqueadores da região V6 do gene 16S rRNA (SOGIN et al., 2006), entretanto, foi sintetizado um oligonucleotídeo iniciador 967F diferente para cada amostra, adicionando um *tag* de identificação (tabela 4.4) (*barcode*) composto por cinco pares de bases, que serviu para identificar a origem de cada uma das sequências, além disso, também foi adicionado o oligonucleotídeo adaptador AF (CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG

ACT CAG) em cada um, conforme manual do fabricante do sequenciador Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies). Já o oligonucleotídeo 1046R recebeu o adaptador 1R (CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT). Cada biblioteca de amplicon foi gerada por meio da reação de amplificação em solução contendo 5,0 µL de tampão da enzima Dream Taq; 1,0 µL de dNTP (2,5 mM); 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,0 µL de Dream Taq (Fermentas); 1 µL de DNA metagenômico de cada amostra; água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 49 µL. Para cada amostra foram feitas duas reações. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) segundo as condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; extensão final de 10 minutos a 72°C (SOGIN et al., 2006). Após verificação da qualidade das amostras em gel de agarose 1,5% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotografado. As duas reações de cada amostra foram unidas e utilizadas para purificação de 50 µL de cada biblioteca utilizando 90 µL de Agencourt® AMPure® XP Reagent e estante magnética, de acordo com protocolo fornecido por *Life Technologies - Ion Amplicon Library Preparation (Purify the amplicon libraries)* (www.iontorrent.com). Após purificação das bibliotecas, foi realizada a quantificação por meio do NanoDrop (Thermo Scientific) e a concentração de todas elas foi ajustada e foi preparado um *pool* equimolar (26 µM) de todas as bibliotecas, de onde 18 µL deste *pool* foram utilizados para a reação de amplificação de emulsão (PCR de emulsão), onde os fragmentos nas bibliotecas de amplicons foram ligados a esferas, de acordo com protocolo fornecido por *Life Technologies - Ion PGM™ 200 Xpress™ Template Kit* (www.iontorrent.com). Após recuperação das esferas, foi feito enriquecimento e logo em seguida foi feito o preparo e carregamento das esferas no chip 314 e posterior sequenciamento (*Ion Sequencing Kit User Guide v2.0*) no sequenciador *Ion Personal Genome Machine™* (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies).

4.2.1.4.2 Análise das sequências

A manipulação inicial das sequências foi realizada por meio da plataforma Galaxy online (<https://main.g2.bx.psu.edu/root>), onde os dados brutos obtidos no sequenciador *Ion Personal Genome Machine™* (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies) foram convertidos em sequência no formato fasta para que pudessem ser manipuladas.

Para classificação das sequências obtidas utilizou-se o algoritmo *Classifier* do *Ribosomal Database Project* (RDP), com "cutoff" de 50% por tratar de sequências menores

que 250 pb. Este algoritmo compara cada sequência do gene 16S rRNA com sequências depositadas em um banco de dados. Segundo Shokralla et al. (2012) ao comparar as sequências obtidas com uma biblioteca de referência de organismos conhecidos, táxons presentes em amostras ambientais podem ser identificados com grande convicção. Foram realizadas análises de correlação entre algumas variáveis com alguns grupos bacterianos obtidos, por meio do programa Assistat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002). Além disso, as sequências também foram trabalhadas no servidor online *Metagenomics Analysis Server* (MG-RAST) (MEYER et al., 2008) (<http://metagenomics.anl.gov/>) que fornece os dados tabulados, possibilitando a comparação por meio do programa STAMP (*Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*) (PARKS; BEIKO, 2010), que realiza uma análise estatística das sequências obtidas nas amostras, servindo para indicar grupos mais abundantes de modo estatístico, mostrando diferenças relevantes nas comunidades.

Para as análises multivariadas, foram elaboradas matrizes com os dados de frequência relativa dos grupos obtidos para as amostras com os dados de análise de solo e dados sobre precipitação (mm), temperatura máxima (°C) e umidade relativa do ar (%) (variáveis ambientais). Com esse conjunto de dados, foi primeiramente realizada uma análise de correspondência (*Detrended Correspondence Analysis – DCA*) para verificar o comprimento do gradiente e decidir qual análise usar: Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis – PCA*) ou Análise Canônica (*Canonical Analysis – CA*) (sem as variáveis ambientais) e Análise de Redundância (*Redundancy Analysis – RDA*) ou Análise de Correspondência Canônica (*Canonical Correspondence Analysis – CCA*) (com as variáveis ambientais) utilizando o programa Canoco 4.5 (TER BRAAK; SMILAUER, 2002). Foi aplicada análise de RDA, com teste de significância realizado pelo teste de permutação não-paramétrico de Monte Carlo com 499 permutações, oferecendo informações suplementares sobre os efeitos das variáveis ambientais, quantificando a variância explicada por cada fator independentemente (lambda) (DIAS et al., 2011). Foi feito o teste de SIMPER (*Similarity Percentage*) para pesar a contribuição de cada filo na similaridade/dissimilaridade entre as amostras (MESEL et al., 2004).

4.2.2 Resultados e Discussão

4.2.2.1 Análise de T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*

4.2.2.1.1 Estrutura das comunidades de *Bacteria*

Foram elaborados gráficos das análises de T-RFLP das comunidades de *Bacteria* para solo e rizosfera dos cinco pontos amostrados, durante os dois períodos de coleta, chuvoso e de seca. Estes gráficos mostram os perfis das médias de fluorescência relativa para os fragmentos terminais de restrição (T-RFs) obtidos para cada amostra (figuras 4.2 a 4.6). Uma análise visual prévia dos gráficos revelou diferenças nítidas na estrutura das comunidades de solo e rizosfera, para os dois períodos amostrados e para os cinco pontos de coleta. Há picos exclusivos, evidenciando unidades taxonômicas operacionais exclusivas para cada amostra estudada. De modo geral, é possível notar a presença de um maior número de picos para o período chuvoso, tanto em amostras de solo quanto de rizosfera, sugerindo uma maior diversidade durante a presença das chuvas. Com a chegada do período de estiagem, alguns picos que estavam presentes durante o período chuvoso desaparecem, outros ficam menos abundantes enquanto outros aparecem. Estes resultados sugerem a possível alteração na estrutura da comunidade bacteriana de acordo com uma variação sazonal (período chuvoso e de seca). Vários autores reportam variações sazonais alterando e delineando as comunidades microbianas (ALONSO-SÁEZ et al., 2007; COLLIGNON et al., 2011; TATTI et al., 2012).

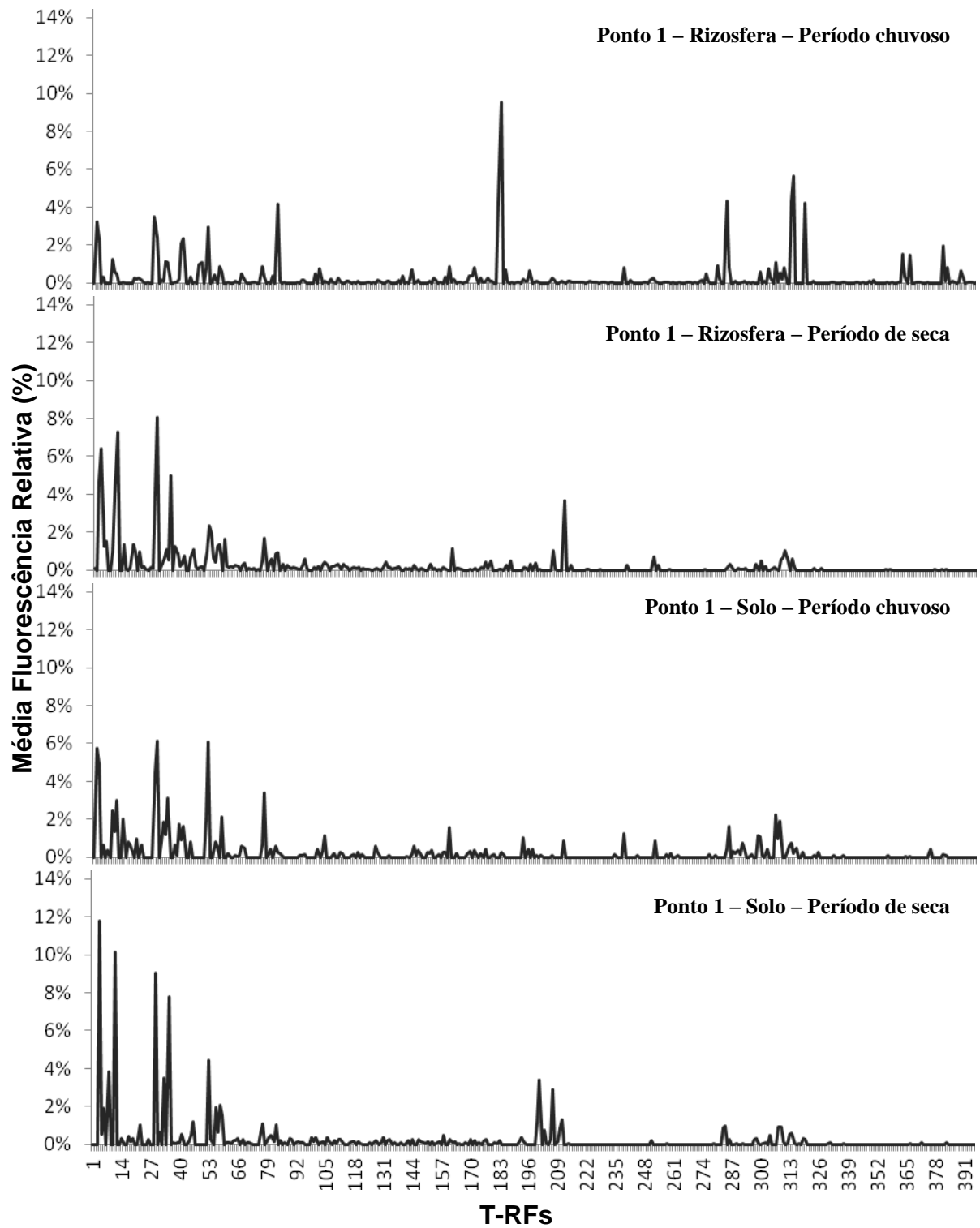


Figura 4.2 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 1, para os dois períodos amostrados

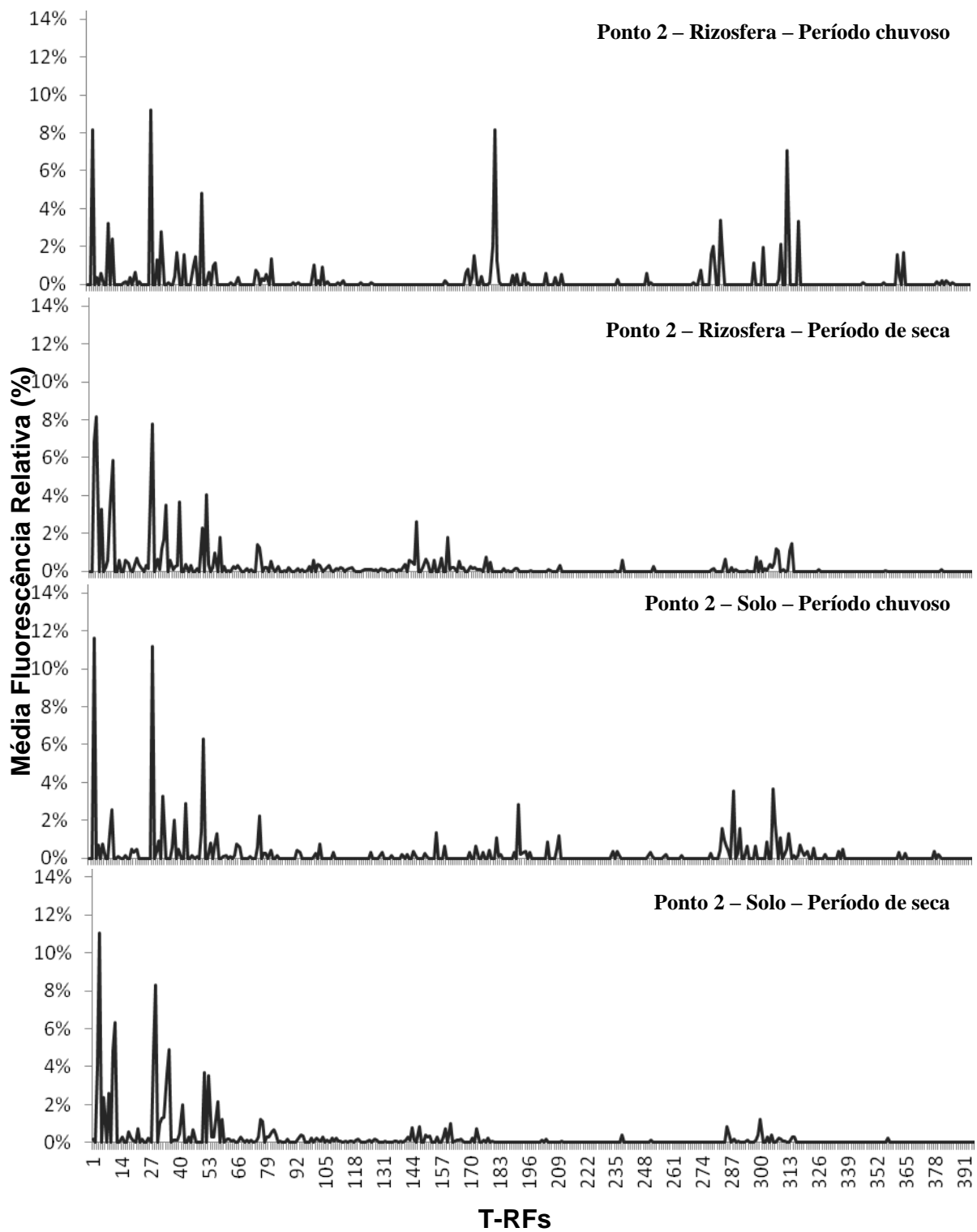


Figura 4.3 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 2, para os dois períodos amostrados

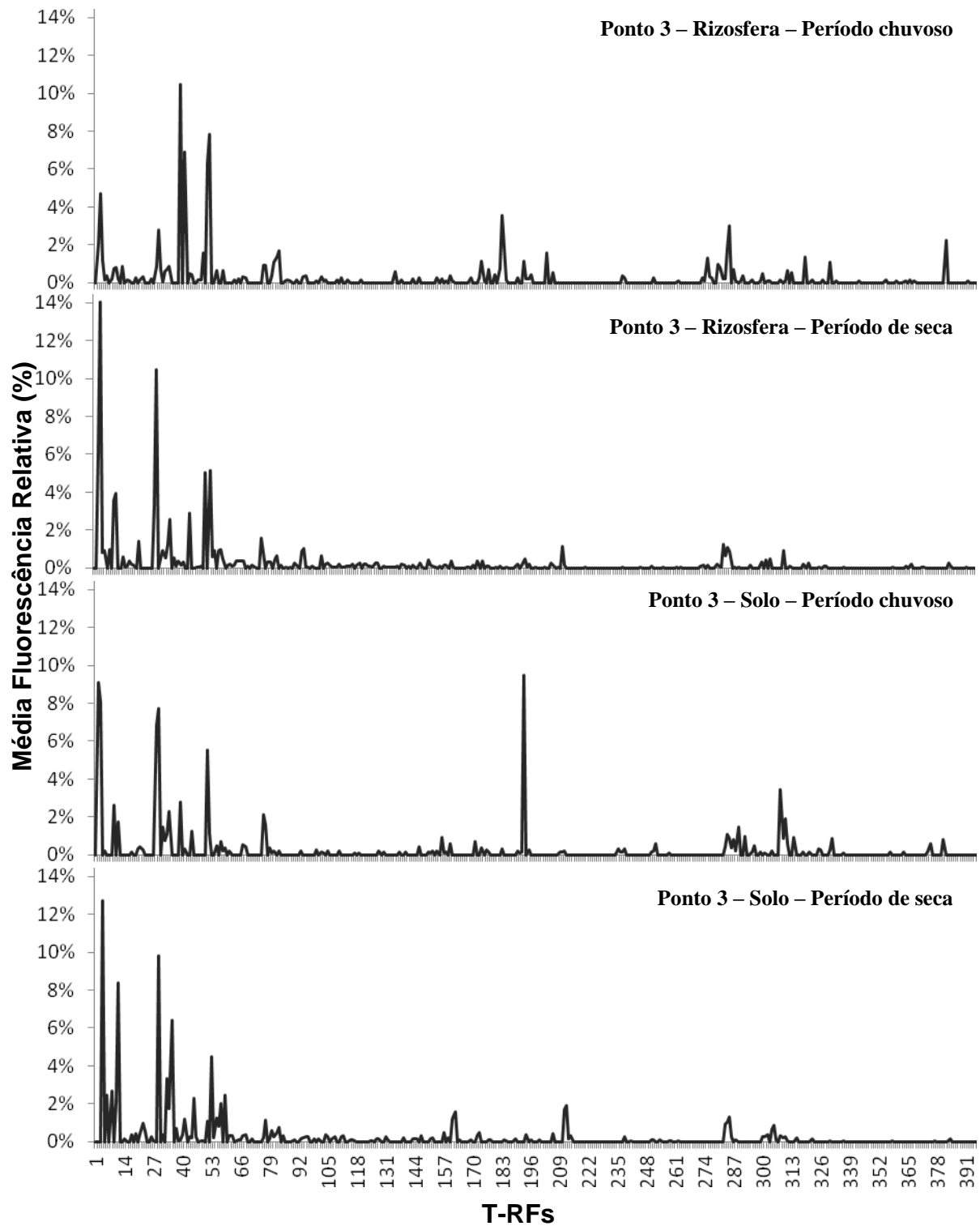


Figura 4.4 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 3, para os dois períodos amostrados

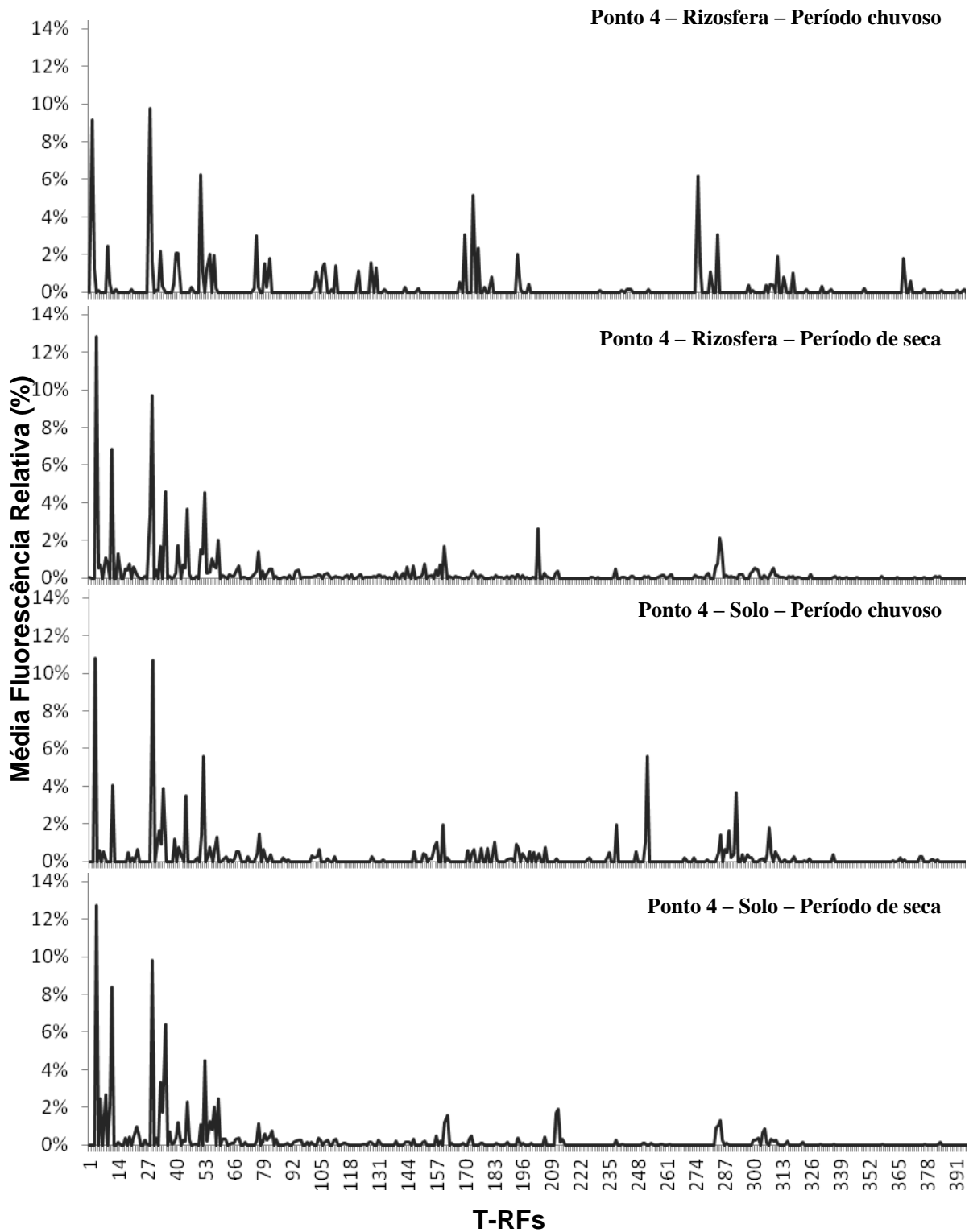


Figura 4.5 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 4, para os dois períodos amostrados

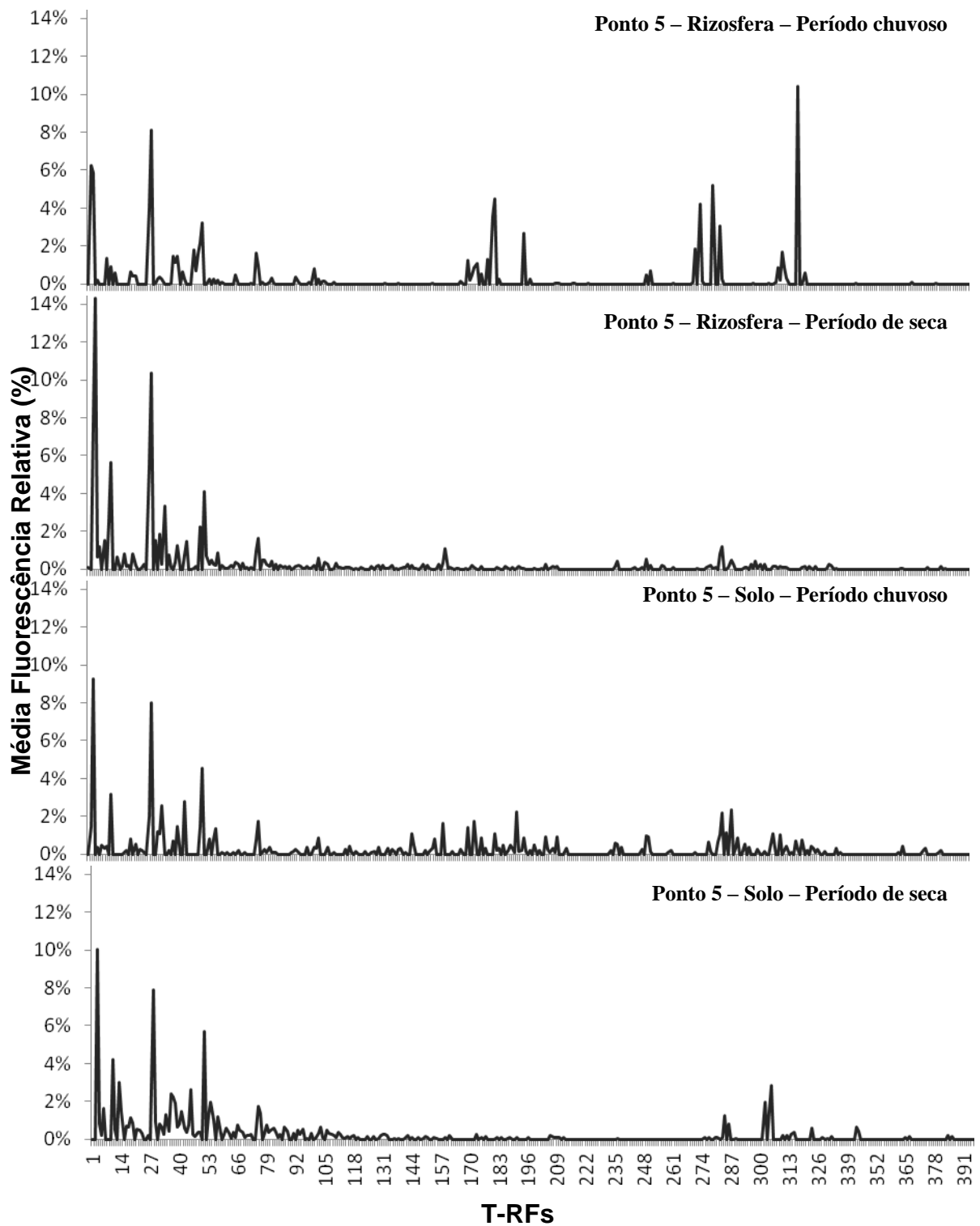


Figura 4.6 - Gráficos comparando os perfis das médias de fluorescência relativa obtidas para as 397 T-RFs de rizosfera e solo do ponto 5, para os dois períodos amostrados

Um total de 397 T-RFs diferentes foram detectados em todas as amostras. O número total de T-RFs obtidos para amostras do período chuvoso, tanto de solo quanto de rizosfera, foram de 343 e para o período de seca foram de 320 T-RFs.

SIMPER é um teste estatístico usado para identificar T-RFs responsáveis por aspectos particulares da estrutura encontrada na matriz de similaridade de Bray-Curtis (WOLSING; PRIEMÉ, 2004). Os dados encontram-se na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Índice de dissimilaridade SIMPER obtido pela técnica de T-RFLP para amostras de rizosfera do período chuvoso (RZC), rizosfera do período de seca (RZS), solo do período chuvoso (SC) e solo do período de seca (SS)

| Amostras | SIMPER ^a | Número T-RFs SIMPER ₅₀ |
|-----------|---------------------|-----------------------------------|
| RZC x RZS | 71,81% | 20 |
| RZC x SC | 64,19% | 25 |
| RZC x SS | 75,05% | 21 |
| RZS x SC | 60,16% | 19 |
| RZS x SS | 42,13% | 22 |
| SC x SS | 65,56% | 19 |

SIMPER^a – quanto maior a porcentagem, maior a dissimilaridade entre as amostras.

Desta forma, como era de se esperar, amostras de rizosfera e solo diferiram entre si, assim como amostras de períodos diferentes. Smalla et al. (2001), por meio da técnica de DGGE, observaram que o padrão de bandas obtido para o solo consistia de uma ou duas bandas mais fortes e várias bandas menos intensas, indicando a dominância de uma ou duas populações. Já para a rizosfera, o padrão de bandas consistiu de várias bandas fortes e um número menor de bandas fracas. É sabido que as plantas afetam as populações microbianas existentes no solo, sendo que cada planta seleciona populações microbianas específicas por meio da exsudação radicular diferindo das comunidades presentes no solo adjacente (BERG; SMALLA, 2009). As amostras RZC x SS (rizosfera de *C. jamaru* do período chuvoso x solo do período de seca) foram as mais dissimilares entre si, diferindo em 75,05%, sendo que 21 T-RFs são responsáveis por mais de 50% das diferenças entre as duas amostras. As 376 T-RFs restantes, contabilizam para os outros 50% das diferenças. Logo em seguida, aparecem as amostras de rizosfera do período chuvoso e de seca (RZC x RZS) com 71,81% de dissimilaridade, sendo que 20 T-RFs são responsáveis por mais de 50% das diferenças e as 377 T-RFs restantes, contabilizam para os outros 50% das diferenças. As amostras com menor porcentagem de dissimilaridade são RZS x SS (rizosfera de *C. jamaru* do período de seca x solo do período de seca), com 42,13% de dissimilaridade.

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) foi utilizado de forma a ordenar as comunidades, juntamente com a análise de similaridade (ANOSIM) para testar a variação das

comunidades de forma espacial, sazonal e de origem. O resultado de ANOSIM veio confirmar o fato anteriormente observado, que a estrutura da comunidade microbiana apresentou uma variação sazonal significativa, com valor de $R = 0,626$ ($p < 0,001$). Pela análise da figura 4.7, é possível observar esta separação bem clara entre o período chuvoso e de seca, tanto para as amostras de solo (figura 4.7A), quanto para as amostras de rizosfera (figura 4.7B).

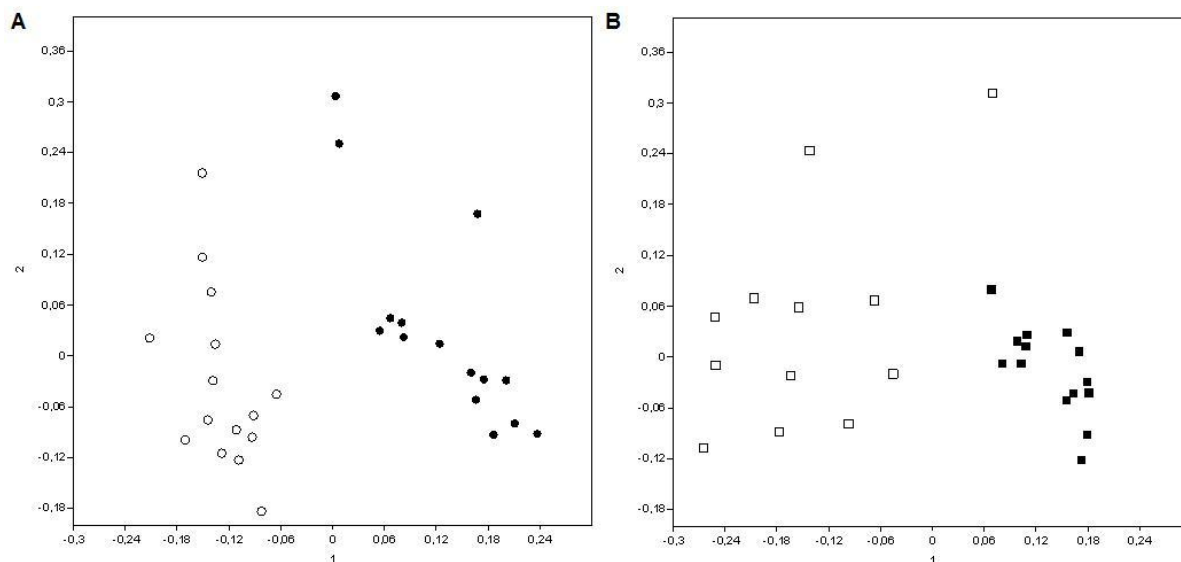


Figura 4.7 - *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) das comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com a endonuclease *HhaI* das amostras estudadas. Variação sazonal (período chuvoso e de seca). A – Comparação entre amostras de solo do período chuvoso (círculo branco) e solo do período de seca (círculo preto). B – Comparação entre amostras de rizosfera do período chuvoso (quadrado branco) e rizosfera do período de seca (quadrado preto)

Já a variação entre amostras de solo e rizosfera produziu um valor de r bem baixo ($R = 0,054$; $p < 0,05$), onde é possível observar uma separação mais clara entre as amostras do período chuvoso (figura 4.8A), enquanto as amostras de solo e rizosfera do período de seca mesclam-se um pouco mais (figura 4.8B), revelando uma maior similaridade entre elas, confirmando os dados obtidos pelo teste de SIMPER.

A variação espacial, ou seja, entre os cinco diferentes pontos de coleta, não foi significativa, produzindo um valor de r praticamente nulo ($R = -0,002$; $p = 0,456$) pelo teste de ANOSIM. Não há uma divisão clara entre os pontos amostrados, havendo amostras mais dispersas na ordenação, sendo bem distintas, enquanto outras amostras acabam se sobrepondo umas às outras, mostrando uma maior similaridade entre elas (figura 4.9).

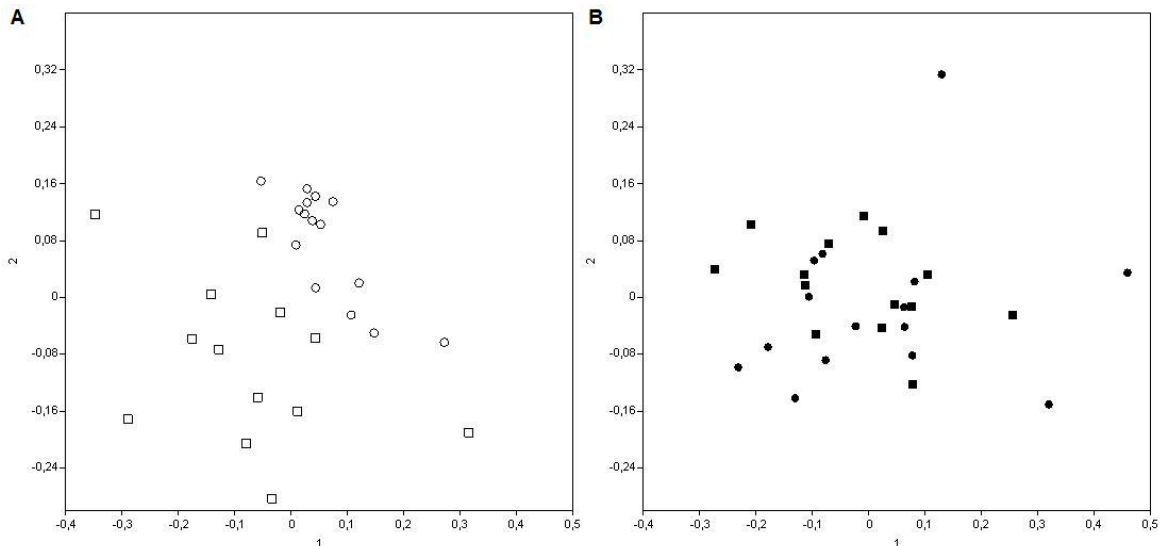


Figura 4.8 - *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) das comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com a endonuclease *HhaI* das amostras estudadas. Variação entre solo e rizosfera. A – Comparação entre amostras de solo do período chuvoso (círculo branco) e rizosfera do período chuvoso (quadrado branco). B – Comparação entre amostras de solo do período de seca (círculo preto) e rizosfera do período de seca (quadrado preto)

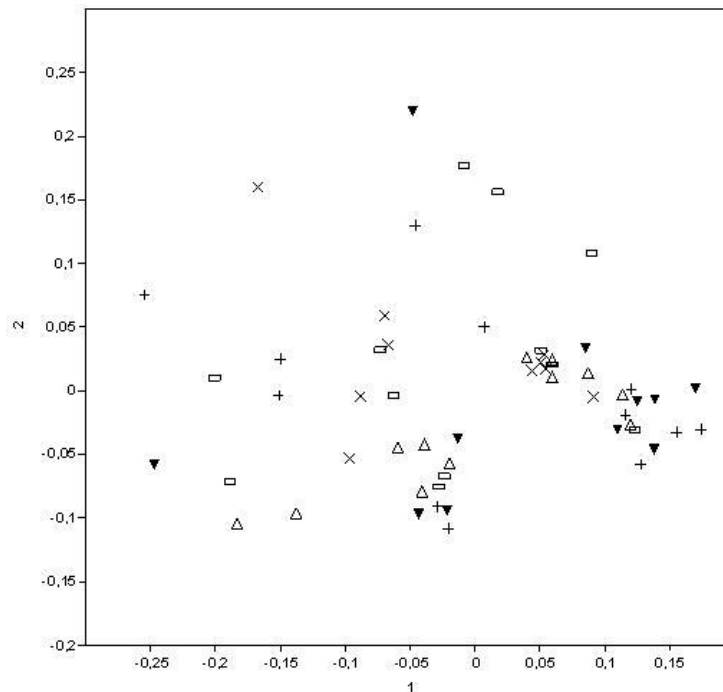


Figura 4.9 - *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) das comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com a endonuclease *HhaI* das amostras estudadas. Variação espacial. Comparação entre amostras de solo e rizosfera do período chuvoso e de seca para os cinco pontos de coleta. Ponto 1 (cruz), ponto 2 (triângulo branco), ponto 3 (xis), ponto 4 (triângulo preto) e ponto 5 (retângulo)

4.2.2.1.2 Análise de riqueza e diversidade das T-RFs

A partir dos dados obtidos com a técnica de T-RFLP, foram analisados os dados de riqueza, onde cada T-RF, com abundância relativa >1%, foi considerada como sendo UTO de organismos dominantes. A figura 4.10 mostra um gráfico de riqueza de UTO's das comunidades de *Bacteria* para solo e rizosfera dos cinco pontos amostrados, durante os dois

períodos de coleta, chuvoso e de seca. Amostras de rizosfera durante o período chuvoso, obtidas para os cinco pontos de coleta, apresentaram mais que 20 UTO's. O número de UTO's variou entre 22 e 31 para as amostras de rizosfera durante o período chuvoso; entre 17 e 24 para as amostras de rizosfera durante o período de seca; entre 19 e 26 para as amostras de solo durante o período chuvoso; e entre 19 e 24 para as amostras de solo durante o período de seca.

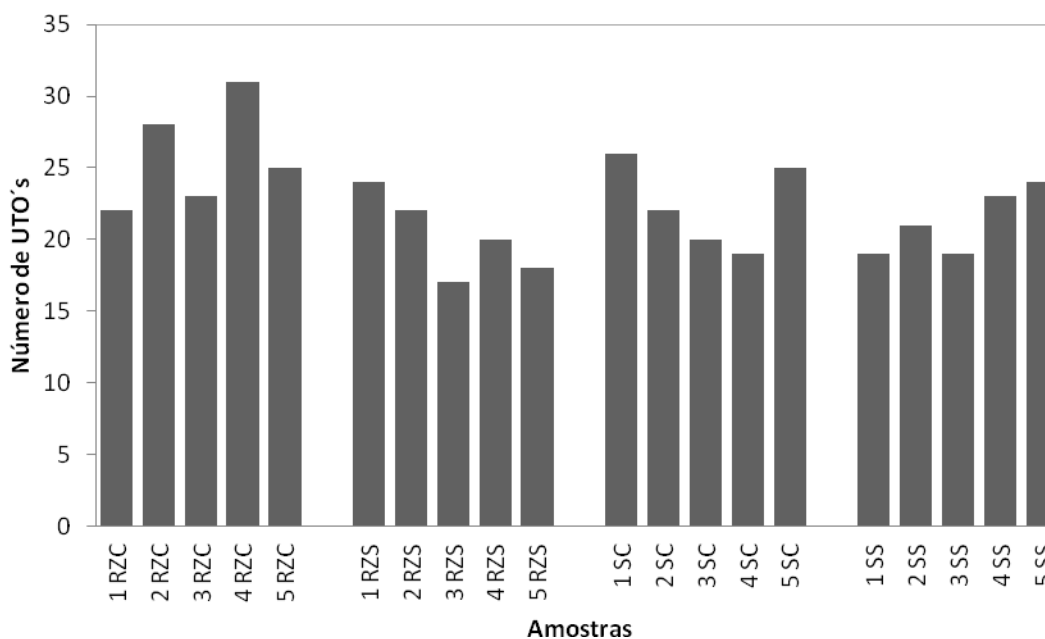


Figura 4.10 - Riqueza de UTO's detectadas com a técnica de T-RFLP para o grupo *Bacteria* em amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) para os dois períodos, chuvoso (C) e de seca (S), para os cinco pontos amostrados

Também foram calculados os índices de diversidade de Shannon (H'). Este índice variou de 2,90 a 3,61 (tabela 4.6). O maior índice de diversidade foi observado para amostras obtidas da rizosfera durante o período de seca (RZS) ($H' = 3,42$), seguida por amostras de solo durante o período de seca ($H' = 3,36$). As amostras que apresentaram maior diversidade não foram aquelas que apresentaram maior riqueza. Foi observada maior riqueza em amostras obtidas da rizosfera durante o período chuvoso (tabela 4.6) ($0,01 \leq p < 0,05$). A menor riqueza foi observada para amostras de rizosfera durante o período de seca. Amostras de solo não apresentaram diferenças quanto à riqueza nos dois períodos.

Estes conceitos são muitas vezes confundidos e utilizados erroneamente da mesma forma. Entretanto, pode-se considerar riqueza como o número de espécies observadas em uma determinada área ou amostra. Já diversidade, pode ser considerada como um índice que

mostra a relação entre o número de espécies e o número de indivíduos, levando em consideração, portanto, a frequência relativa e a uniformidade de distribuição destas espécies (KEYLOCK, 2005; SAX, 2002; SPELLERBERG; FEDOR, 2003). Fierer, Schimel e Holden (2003) ao estudar o efeito de ciclos de secagem-umedecimento sobre a comunidade bacteriana de solos por meio da técnica de T-RFLP, observaram uma tendência na redução da riqueza com aumento do número de ciclos de secagem-umedecimento. Entretanto, a diversidade não foi significativamente afetada. Concluíram que os níveis de pré-adaptação das comunidades ao estresse, somado a outros fatores, podem explicar porque não foram observadas grandes mudanças na diversidade.

De maneira geral, a comunidade bacteriana da rizosfera parece ter sido mais sensível às alterações sazonais, uma vez que foi observada redução no número de espécies do período chuvoso para o de seca. Brusetti et al. (2004) afirmam que a microflora associada às raízes é mais sensível aos fatores ambientais. Sabe-se que as comunidades bacterianas rizosféricas têm origem do solo ao redor (NORMANDER; PROSSER, 2000), entretanto na rizosfera parece ocorrer uma seleção (efeito rizosférico) (ROVIRA, 1965), de modo que os exsudatos radiculares criam um nicho que influencia quais micro-organismos devem colonizar a rizosfera, alterando a composição e diversidade de micro-organismos rizosféricos de uma maneira específica para cada planta (GRAYSTON et al., 1998). Este efeito também foi observado há muito tempo por Mahmoud, El-Fadl e Elmofty (1964) que observaram uma maior densidade bacteriana na rizosfera de plantas do que no solo desértico, devido à matéria orgânica e à maior umidade propiciada pelas raízes.

Tabela 4.6 - Diversidade de filotipos bacterianos estimada por T-RFLP para amostras de solo e rizosfera, durante o período chuvoso e de seca, para os cinco pontos de coleta. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em cada coluna

| Origem | Período | Riqueza (Média) | H' (Média) |
|---------------|----------------|----------------------------|-----------------------|
| Rizosfera | Chuvoso | 26 a | 3,03 b |
| | Seca | 20 b | 3,42 a |
| Solo | Chuvoso | 22 ab | 3,23 ab |
| | seca | 21 ab | 3,36 a |

Foram construídos diagramas de Venn de quatro componentes, de modo a verificar as intersecções entre as amostras, identificando desta forma, UTO's compartilhadas e exclusivas dentro de cada ponto de coleta (figura 4.11). É possível observar um maior número de UTO's exclusivas para amostras obtidas de rizosfera durante o período chuvoso, sendo que para os

cinco pontos de coleta o número de UTO's exclusivas variou entre 11 e 21. O menor número de UTO's exclusivas foi observado para amostras de rizosfera durante o período de seca para os cinco pontos de coleta, variando entre 3 e 8. O número de UTO's exclusivas para as amostras de solo durante o período chuvoso variou entre 5 e 11; e para amostras de solo durante o período de seca variou entre 4 e 14. Analisando-se as UTO's comuns, é interessante ressaltar que há um maior número de UTO's compartilhadas entre amostras de mesmos períodos (chuvoso x chuvoso e seca x seca) do que entre amostras de mesma origem (solo x solo e rizosfera x rizosfera), evidenciando mais uma vez a diferença das comunidades com base na sazonalidade. Por exemplo, amostras de rizosfera obtidas durante o período chuvoso (RZC) e de seca (RZS) do ponto 1 não compartilham nenhuma UTO, enquanto amostra de rizosfera obtida durante o período de seca (RZS) e amostra de solo obtida durante o período de seca (SS) do ponto 1 compartilham 7 UTO's.

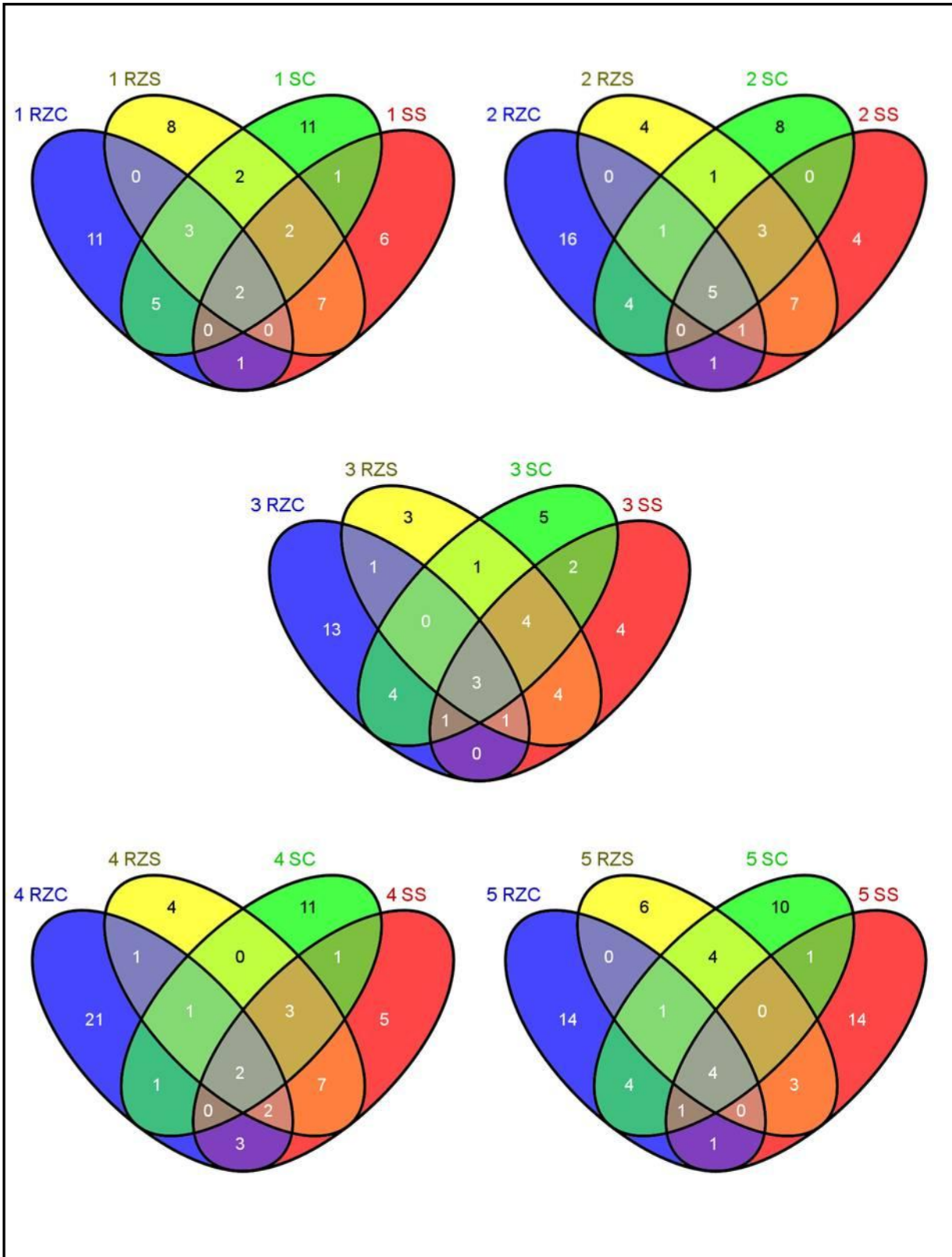


Figura 4.11 - Diagramas de Venn baseados nas UTO's para o grupo *Bacteria* em amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) para os dois períodos, chuvoso (C) e de seca (S), para os cinco pontos amostrados

4.2.2.1.3 Relação das comunidades de *Bacteria* com os atributos do solo

O teste de Mantel indicou uma forte correlação entre amostras de solo obtidas durante o período chuvoso com as variáveis ambientais ($r = 0,9561$; $p < 0,05$) e amostras de solo obtidas durante o período de seca com as variáveis ambientais ($r = 0,976$; $p < 0,05$). A análise de DCCA gerou um valor menor que 3, possibilitando o uso de RDA, um modelo matemático baseado na distribuição linear (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009). Desta forma, foi feita uma análise de RDA para amostras de solo com as variáveis ambientais (figura 4.12A). Esta análise demonstrou a interação da distribuição das espécies (alturas dos picos) obtidas por meio da análise de T-RFLP com as variáveis ambientais.

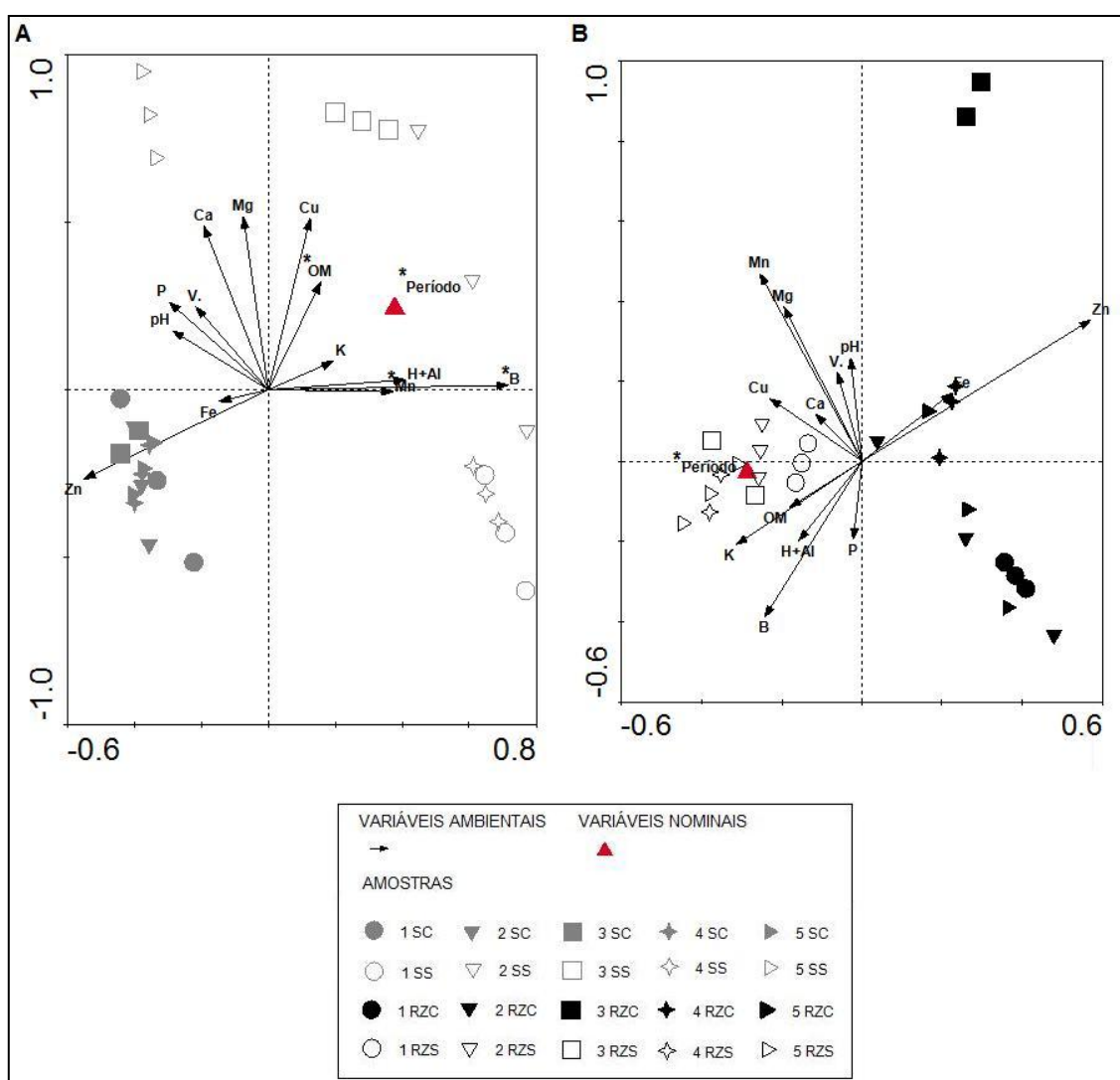


Figura 4.12 - Gráficos de RDA baseado nos perfis de T-RFLP com a enzima *HhaI* obtidos para o grupo *Bacteria* obtidos para os cinco pontos, a partir de amostras de solo durante o período chuvoso (SC) e de seca (SS) (A) e amostras de rizosfera durante o período chuvoso (RZC) e de seca (RZS) (B) juntamente com as variáveis ambientais (setas) e nominais (triângulos virados para cima). Variáveis significativas (pelo teste de permutação de Monte Carlo) encontram-se com *

As variáveis ambientais explicam 68,1% da variabilidade, desta fatia, 41,8% é explicado no eixo 1 e 22,7% no eixo 2. O teste de permutação de Monte Carlo indicou o período de amostragem como a principal causa da variação ($\lambda = 0,23$; $p = 0,002$); seguido por Mn ($\lambda = 0,08$; $p = 0,002$); matéria orgânica ($\lambda = 0,06$; $p = 0,002$) e B ($\lambda = 0,06$; $p = 0,016$). O restante dos atributos não foi significativo. As variáveis ambientais explicam uma porcentagem menor (58,9%) da variabilidade dos dados no caso da análise de RDA feita para amostras de rizosfera (figura 4.9B), desta fatia, 47,4% é explicado no eixo 1 e 12,6% no eixo 2. O teste de permutação de Monte Carlo indicou somente o período de amostragem como o fator significativo nesta variação ($\lambda = 0,25$; $p = 0,002$).

Observando a figura 4.12, setas apontando em direções similares indicam uma correlação positiva, enquanto que setas apontando para direções opostas indicam uma correlação negativa. Além disso, o tamanho da seta também indica o quão significativa é esta relação, sendo que quanto maior a seta, maior a relação (SAUL-TCHERKAS; STEINBERGER, 2011). Segundo Marschner, Crowley e Yang (2004) vários fatores contribuem para o delineamento da composição das comunidades bacterianas. Nesta análise, mais uma vez ficou evidente a separação horizontal das amostras no 1º eixo (x) de acordo com o período de amostragem, chuvoso e de seca, mostrando que a estrutura da comunidade é delineada principalmente pela umidade. Torres-Cortés et al. (2012) também demonstraram alterações nas comunidades rizosféricas de cactáceas, em uma reserva do México, baseadas em dois períodos, chuvoso e de seca. O mesmo foi observado por LaMontagne, Schimel e Holden (2003), que ao estudarem solos coletados de dois transectos de uma pradaria Mediterrânea, pela técnica de T-RFLP associada à análise de componentes principais, observaram que a comunidade microbiana variou de acordo com a profundidade e estação. Ao estudarem a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, associadas a três espécies de plantas diferentes, Diallo et al. (2004) também observaram diferenças claras entre amostras coletadas na estação chuvosa e seca. Castro et al. (2010) também observaram que alterações na precipitação tiveram maior efeito na composição da comunidade microbiana.

A técnica de T-RFLP tem sido amplamente usada para verificar a estrutura de comunidades microbianas em diversos ambientes (HARTMANN; WIDMER, 2008), assim como em ambientes submetidos à seca (REES et al., 2006). Neste estudo, esta técnica, aliada às análises estatísticas multivariadas, mostraram ser adequadas para avaliar como a estrutura da comunidade bacteriana obtida de solo e rizosfera encontrava-se estruturada, além de observar os efeitos da umidade e de outros atributos do solo sobre essa estrutura, como observado por Nunan et al. (2005). Além disso, é uma técnica reproduzível e adequada para

monitorar alterações nas comunidades microbianas de acordo com o espaço e o tempo (DUNBAR; TICKNOR; KUSKE, 2000).

4.2.2.2 Análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA em larga escala

Um total de 590.043 sequências foi obtido por meio do sequenciamento em larga escala. Utilizando-se o RDP Classifier, 239.301 foram atribuídas ao Domínio *Bacteria*. Deste total, 48,8% permaneceram como sequências não classificadas.

As sequências do Domínio *Bacteria* afiliaram-se a vinte e quatro filos, sendo que destes apenas seis deles apresentaram frequência relativa maior que 1% para a maioria das amostras. A maior parte da comunidade de *Bacteria* obtida para amostras de solo durante o período chuvoso pertence ao filo Proteobacteria (média de 11,1%) e amostras de solo obtidas durante o período de seca possuem mais representantes do filo Actinobacteria (média de 31,8%) (figura 4.13). Este filo também foi encontrado com grande abundância em amostras de rizosfera obtidas de cactáceas do semiárido mexicano (AGUIRRE-GARRIDO et al., 2012). Para amostras obtidas de rizosfera, fato semelhante foi observado, onde para amostras do período chuvoso, foi observado um maior número de sequências afiliadas ao filo Proteobacteria (média de 43,4%) e uma média de 25,2% para amostras obtidas durante o período de seca afiliadas ao filo Actinobacteria. Em média, o número de sequências afiliadas ao filo Acidobacteria também foi maior em amostras obtidas durante o período de seca, sendo 2,9% e 4,1%, tanto para solo quanto para rizosfera, respectivamente (figura 4.13), entretanto, este filo não foi detectado com tanta frequência, embora seja bastante abundante em amostras de solo (JENSSEN, 2006) e é bastante abundante em ambientes semiáridos (BACHAR et al., 2010). Com relação às sequências não classificadas, é possível observar um maior número para amostras de solo do que rizosfera, mostrando que ele permanece como um reservatório desconhecido da complexidade biológica (UROZ et al., 2010).

Os membros pertencentes aos filos raros (< 1%) incluem Armatimonadetes, BRC1, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Fibrobacteres, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospira, Planctomycetes, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermotogae, TM7 e WS3 e foram denominados de “outros”.

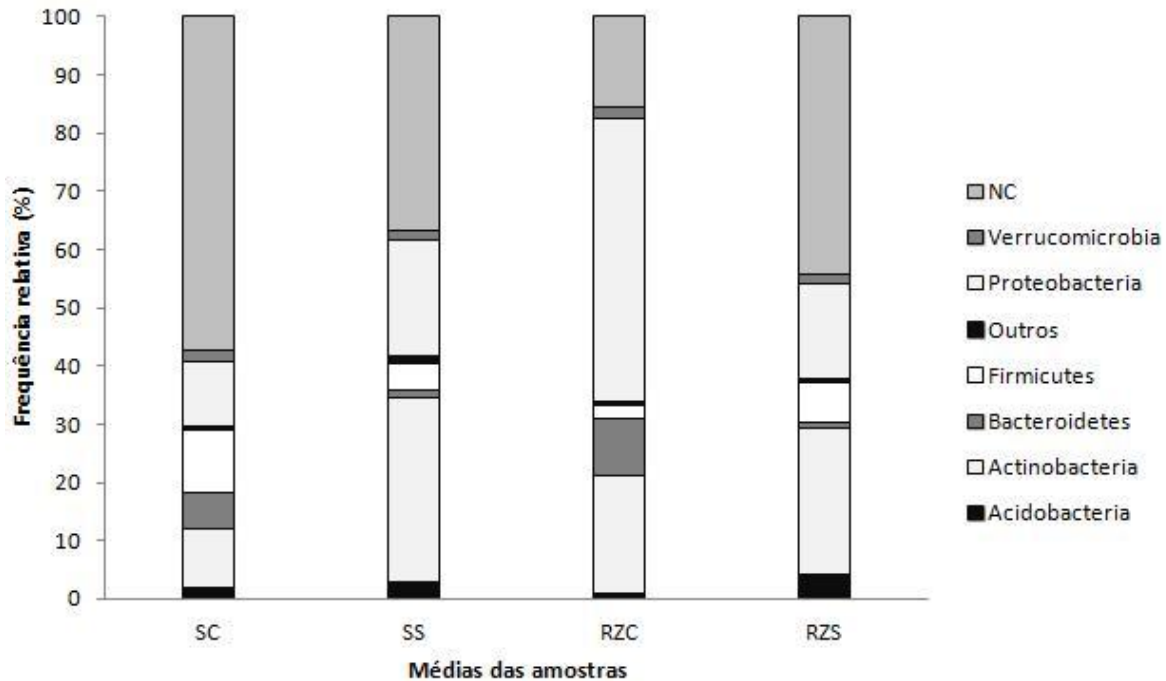


Figura 4.13 - Filos com frequência relativa maior que 1% (para a maioria das amostras) para as médias obtidas de amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) durante o período chuvoso (C) e de seca (S). A categoria “outros” inclui dezoito filos com frequência relativa menor que 1%: Armatimonadetes, BRC1, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Fibrobacteres, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospira, Planctomycetes, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermotogae, TM7 e WS3; “NC” inclui sequências não classificadas

Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA) baseada na abundância relativa dos diferentes filos confirmou que as comunidades bacterianas em amostras de solo durante o período chuvoso (SC), solo durante o período de seca (SS), rizosfera durante o período chuvoso (RZC) e rizosfera durante o período de seca (RZS) diferem entre si (figura 4.14). Amostras com comunidades bacterianas com características semelhantes localizam-se em posições semelhantes no diagrama (NACKE et al., 2011). Assim, amostras obtidas durante o período chuvoso, para solo e rizosfera são mais diferentes entre si do que amostras obtidas durante o período de seca.

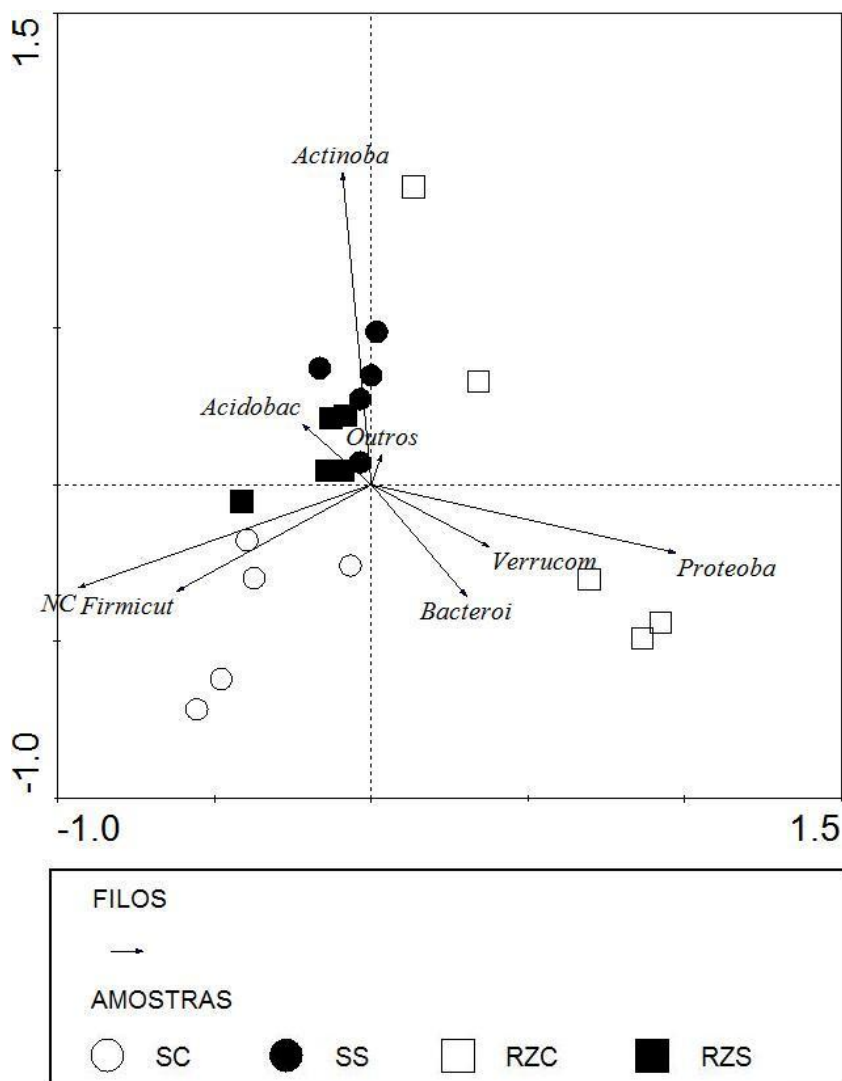


Figura 4.14 - PCA das comunidades bacterianas obtidas para os cinco pontos, a partir de amostras de solo durante o período chuvoso (SC) e de seca (SS) e amostras de rizosfera durante o período chuvoso (RZC) e de seca (RZS) com os seis filós mais representativos: Acidobacteria (*Acidobac*), Actinobacteria (*Actinoba*), Bacteroidetes (*Bacteroi*), Firmicutes (*Firmicut*), Proteobacteria (*Proteoba*), Verrucomicrobia (*Verrucom*). Sequências não classificadas são representadas pela sigla NC e “outros” correspondem aos filós raros

Isto pode ser confirmado pelo teste de SIMPER, onde ao comparar amostras de rizosfera durante o período de seca (RZS) com amostras de solo do mesmo período (SS), a porcentagem de dissimilaridade é de 14,56%; amostras de rizosfera durante o período chuvoso (RZC) comparadas com amostras de solo do mesmo período (SC) possuem 57,18% de dissimilaridade entre si. Setas apontando em direções similares indicam uma correlação positiva, enquanto que setas apontando para direções opostas indicam uma correlação negativa. Além disso, o tamanho da seta também indica o quão significativa é esta relação, sendo que quanto maior a seta, maior a relação (SAUL-TCHERKAS; STEINBERGER, 2011). Desta forma, amostras de seca correlacionam-se mais fortemente com o filo Actinobacteria e levemente com o filo Acidobacteria. Os demais filós apresentam correlação

com amostras obtidas durante o período chuvoso, sendo o filo Proteobacteria mais fortemente correlacionado com amostras de rizosfera do período chuvoso.

De modo a avaliar estatisticamente as diferenças, foram feitas comparações múltiplas entre as amostras, por meio do software STAMP, com base no critério do período (chuvoso e de seca), sendo observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na porcentagem de sequências para três filos. O número de representantes do filo Actinobacteria foi maior no período de seca; o filo Bacteroidetes teve maior representatividade durante o período chuvoso, assim como o filo Proteobacteria. Esses dados corroboram com os dados observados por Castro et al. (2010) que concluíram que alterações na precipitação alteram a abundância relativa de representantes do filo Proteobacteria, cuja predominância é maior em ambientes úmidos e menor em ambientes secos. A abundância de representantes do filo Actinobacteria também tende a ser menor em solos mais úmidos (ALEKHINA et al., 2001; GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Análise de RDA, comparando-se todas as amostras com as variáveis ambientais obtidas por meio de análise química básica e de micronutrientes (tabela 4.3) e dados relativos à temperatura média máxima, precipitação pluviométrica média e umidade média relativa do ambiente para o período amostrado (tabela 4.2), mostrou que as variáveis ambientais explicam 56,4% da variabilidade dos dados. O teste de permutação de Monte Carlo indicou a origem (solo e rizosfera) ($\lambda = 0,19$; $p = 0,016$) e a precipitação ($\lambda = 0,15$; $p = 0,032$) como as principais causas da variação. O restante dos atributos não foi significativo. Análise de RDA, para amostras de solo analisadas separadamente (figura 4.15A), mostrou que desconsiderando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 89,2% da variabilidade dos dados. As variáveis ambientais explicam 100% da variabilidade, sendo 89,2% explicada no eixo 1 e apenas 7,6% explicada no eixo 2. O teste de permutação de Monte Carlo indicou o período de amostragem (chuva e seca) ($\lambda = 0,69$; $p = 0,002$) e o teor de P ($\lambda = 0,12$; $p = 0,024$) como as principais causas da variação. Avaliando-se separadamente amostras de rizosfera (figura 4.15B), desconsiderando-se as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 78,7% da variabilidade dos dados. As variáveis ambientais, por sua vez, explicam 100% da variabilidade, sendo 78,7% explicada no eixo 1 e 16,1% no eixo 2. O teste de permutação de Monte Carlo indicou a umidade relativa do ambiente ($\lambda = 0,55$; $p = 0,002$) como a principal causa da variação. Embora o período não tenha sido considerado uma variável estatisticamente significativa, é possível observar uma separação das amostras de rizosfera do período chuvoso (RZC) com as de seca (RZS).

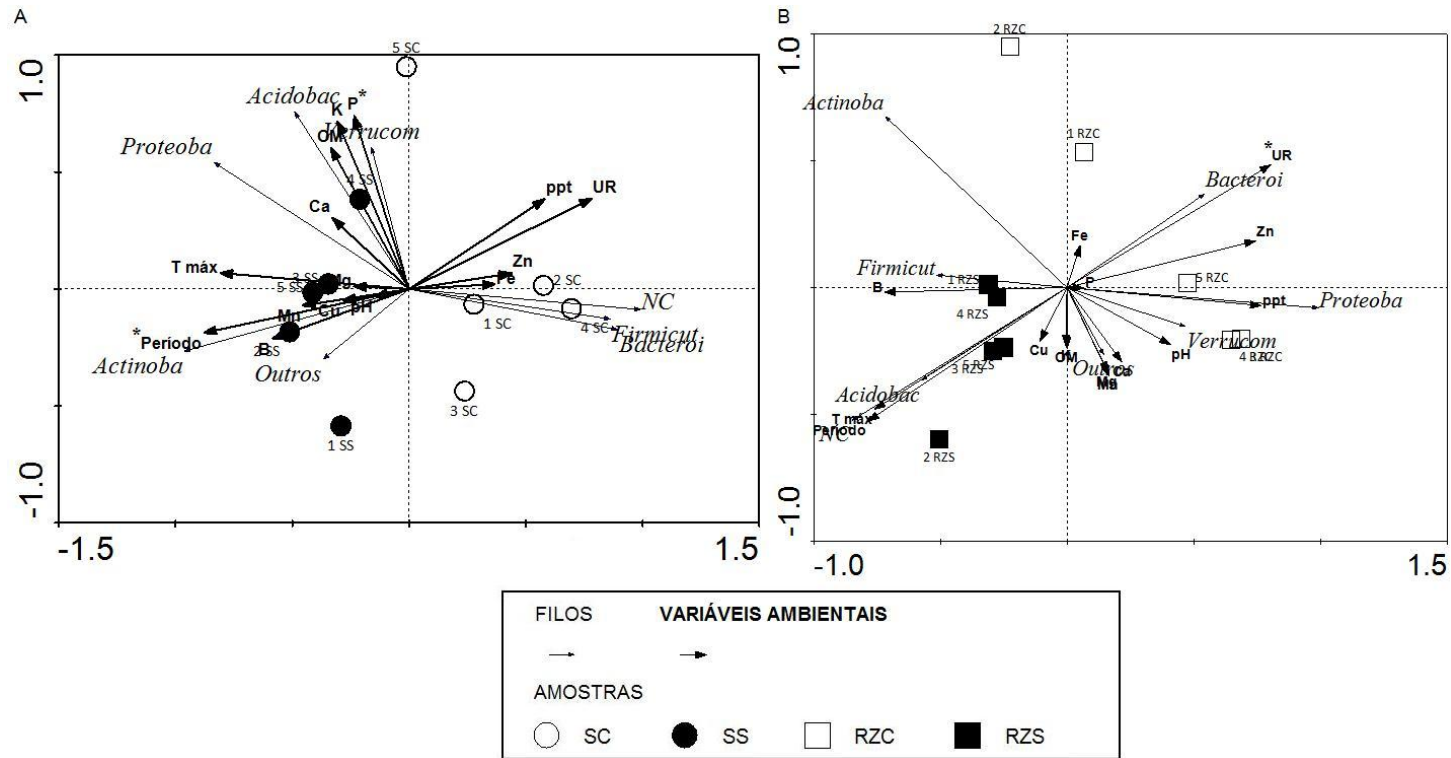


Figura 4.15 - RDA das comunidades bacterianas obtidas para os cinco pontos, a partir de amostras de solo durante o período chuvoso (SC) e de seca (SS) (A) e amostras de rizosfera durante o período chuvoso (RZC) e de seca (RZS) (B) com os seis filios mais representativos: Acidobacteria (Acidobac), Actinobacteria (Actinoba), Bacteroidetes (Bacteroi), Firmicutes (Firmicut), Proteobacteria (Proteoba), Verrucomicrobia (Verrucom). Sequências não classificadas são representadas pela sigla NC e “outros” correspondem aos filios raros. As variáveis ambientais encontram-se representadas pelas setas pretas mais largas. Variáveis significativas (pelo teste de permutação de Monte Carlo) encontram-se com *

Foram feitas correlações com algumas variáveis ambientais, de forma a tentar explicar as diferenças observadas. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,158$) para o filo Acidobacteria, sua abundância tende a ser maior em ambientes secos e menor em ambientes úmidos (CASTRO et al., 2010). Entretanto, não foi estabelecida nenhuma correlação entre o filo Acidobacteria com a umidade relativa do ar, nem com os dados de precipitação pluviométrica média para o período amostrado. Alguns autores relatam que o filo Acidobacteria é mais abundante em solos oligotróficos (FIERER et al., 2007), então foi calculada a correlação entre o teor de matéria orgânica do solo com a presença deste filo. Apenas comparando-se amostras do período chuvoso (rizosfera x solo) é que foi encontrada uma forte correlação ($r = 0,72$; $0,01 \leq p < 0,05$) entre estes dois parâmetros, onde quanto maior o conteúdo de matéria orgânica, maior a abundância de representantes deste filo. Entretanto, estes dados vão de encontro ao estudado por Ward et al. (2009) que reportam que representantes deste filo possuem traços genéticos típicos de microorganismos capazes de sobreviver em solos secos, sendo favorecidos nestes ambientes, uma vez que nestes tipos de solos, o metabolismo da planta é reduzido, reduzindo a exsudação radicular, o que contribui para a oligotrofia.

Foi observada uma forte correlação negativa ($r = -0,85$; $p < 0,01$) entre o teor de umidade relativa média do ambiente com a presença de representantes do filo Actinobacteria presentes no solo, onde quanto menor o teor de umidade, maior a abundância de microorganismos deste filo. O mesmo foi observado ao se comparar dados de precipitação pluviométrica média, obtendo-se forte correlação negativa para amostras de solo ($r = -0,65$; $0,01 \leq p < 0,05$) e amostras de rizosfera ($r = -0,64$; $0,01 \leq p < 0,05$). Goodfellow e Williams (1983) afirmam que o pH do meio determina a distribuição e a atividade de membros do filo Actinobacteria. Entretanto, no presente trabalho, não foi observada nenhuma correlação entre o pH medido no solo com a abundância deste filo. Foi observada uma forte correlação ($r = 0,75$; $0,01 \leq p < 0,05$) entre a temperatura média máxima do ambiente com a presença do filo Actinobacteria. Em condições laboratoriais, membros deste filo são mesófilos ($25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983), entretanto há vários relatos de isolamentos de actinobactérias termofílicas de solos áridos como *Amycolatopsis thermophila* e *A. viridis* (ZUCCHI; TAN; GOODFELLOW, 2012), *Thermoactinospira rubra* (ZHOU et al., 2012) e outros isolados de solos desérticos (KURAPOVA et al., 2012).

Assim como no estudo questão, Cruz-Martínez et al. (2009) observaram uma maior proporção de representantes dos filamentos Bacteroidetes e Proteobacteria durante o período chuvoso e redução do número de representantes do filo Actinobacteria neste mesmo período.

Estas diferenças podem ser devido ao tipo de estratégia adotada por estes micro-organismos, onde grupos abundantes na seca devem possuir uma estratégia de lento crescimento, sendo considerados como estrategistas do tipo **K**; enquanto grupos favorecidos em amostras de chuva podem indicar uma estratégia do tipo **R**, com respostas rápidas à alta disponibilidade de recursos (FIERER et al., 2007).

Analisando-se o filo Proteobacteria com maiores detalhes, quatro classes apresentaram frequência relativa maior que 1% para a maioria das amostras. A maior parte da comunidade do filo Proteobacteria obtida para amostras durante o período de seca, tanto para solo quanto para rizosfera, pertence à classe α -Proteobacteria (figura 4.16). Para o período chuvoso, há grande porcentagem de sequências que fazem parte da classe γ -Proteobacteria. O mesmo foi constatado por Diallo et al. (2004) que ao estudarem biblioteca de clones na rizosfera de uma leguminosa de solo semiárido de Senegal, observaram a presença de mais clones da classe γ -Proteobacteria durante o período chuvoso, enquanto que para o período de seca, observaram maior representatividade da classe α -Proteobacteria.

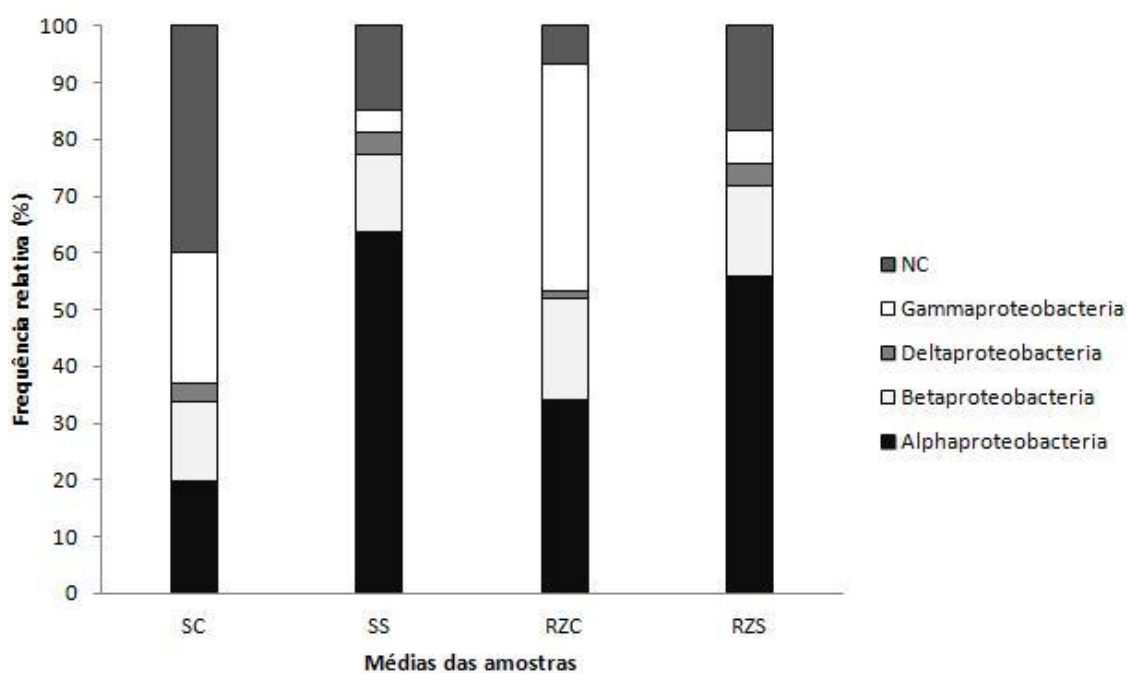


Figura 4.16 - Classes do filo Proteobacteria com frequência relativa maior que 1% (para a maioria das amostras) para as médias obtidas de amostras de solo (S) e rizosfera (RZ) durante o período chuvoso (C) e de seca (S). “NC” inclui sequências não classificadas dentro deste filo

Foi feita análise de RDA comparando-se amostras de solo com rizosfera, com as variáveis ambientais obtidas por meio de análise química básica e de micronutrientes. Desconsiderando-se as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 70,7% da variabilidade dos dados. As variáveis ambientais explicam 86,3% da variabilidade, sendo 82,3% explicada no

eixo 1 e 16,1% explicada no eixo 2. O teste de permutação de Monte Carlo indicou a origem (solo e rizosfera) ($\lambda = 0,64$; $p = 0,002$) como a principal causa da variação entre amostras de solo e rizosfera obtidas durante o período chuvoso (figura 4.17A). O restante dos atributos do solo não foi significativo.

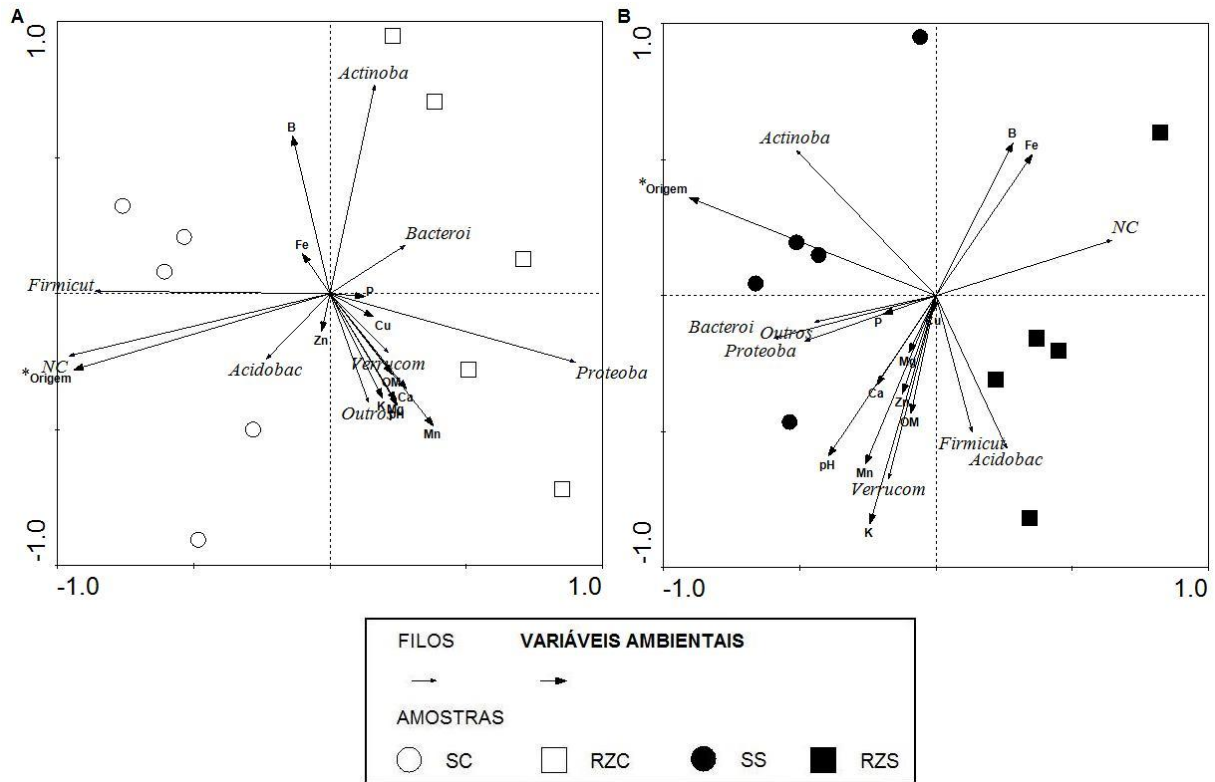


Figura 4.17 - RDA das comunidades bacterianas obtidas para os cinco pontos, a partir de amostras de solo (SC) e rizosfera (RZC) durante o período chuvoso (A) e amostras de solo (SS) e rizosfera (RZS) durante o período de seca (B) com os seis filos mais representativos: Acidobacteria (Acidobac), Actinobacteria (Actinoba), Bacteroidetes (Bacteroi), Firmicutes (Firmicut), Proteobacteria (Proteoba), Verrucomicrobia (Verrucom). Sequências não classificadas são representadas pela sigla NC e “outros” correspondem aos filos raros. As variáveis ambientais encontram-se representadas pelas setas pretas mais largas. Variáveis significativas (pelo teste de permutação de Monte Carlo) encontram-se com *

Análise de RDA, para amostras de solo e rizosfera durante o período de seca (figura 4.17B), mostrou que desconsiderando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 31,1% da variabilidade dos dados. As variáveis ambientais explicam 56,1% da variabilidade, desta fatia, 55,5% é explicado no eixo 1 e 23,6% no eixo 2. O teste de permutação de Monte Carlo indicou a origem (solo e rizosfera) ($\lambda = 0,27$; $p = 0,010$) como a principal causa da variação entre amostras de solo e rizosfera obtidas durante o período de seca. Alguns estudos relatam que as propriedades do solo são importantes no delineamento da estrutura das comunidades bacterianas (NACKE et al., 2011; ROUSK et al., 2010). Neste caso, as variáveis ambientais não tiveram tanta importância na estrutura das comunidades, sendo apenas a origem, o fator preponderante. Desta forma, fica confirmado que comunidades bacterianas

presentes em solo diferem de comunidades bacterianas presentes na rizosfera de *C. jamaicaru*. Esta diferenciação é devida principalmente ao efeito rizosférico, onde os exsudatos radiculares liberados proporcionam um ambiente ativo e dinâmico, tendo forte efeito na composição da comunidade bacteriana rizosférica, selecionando determinados micro-organismos em detrimento de outros (BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2003; HAICHAR et al., 2008).

Ao realizar comparações múltiplas entre as amostras, por meio do software STAMP, com base no critério da origem (solo e rizosfera), foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na porcentagem de sequências para o filo Proteobacteria apenas, havendo um maior número de representantes na rizosfera, sendo as famílias β -Proteobacteria e γ -Proteobacteria mais significativas. Estes dados corroboram com o observado por Fierer et al. (2007) e Uroz et al. (2010) que observaram maior abundância de representantes destas classes em rizosfera. Entretanto, os primeiros autores afirmam que é difícil realizar uma comparação robusta de solo e rizosfera, pois o solo apresenta alta variabilidade. Fierer et al. (2007) relatam que a classe β -Proteobacteria possui micro-organismos copiotróficos, sendo mais abundante em solos com maior disponibilidade de carbono. Entretanto, não foi observada nenhuma correlação entre o teor de matéria orgânica com a abundância desta classe.

No presente estudo, a família Bacillaceae, pertencente ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, foi significativamente maior ($p < 0,05$) durante o período de seca. Esta classe compreende micro-organismos Gram-positivos, formadores de endósporos que são estruturas especializadas de resistência que além de permitirem a sobrevivência de micro-organismos por longos períodos em solos secos (CHEN; ALEXANDER, 1973), também protegem contra vários agentes ambientais estressantes (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2012). Deste modo, foi calculada a correlação entre a abundância da família Bacillaceae com dados de umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica média para o período amostrado e temperatura máxima. Apenas foi observada uma forte correlação negativa ($r = -0,63$; $0,01 \leq p < 0,05$) entre amostras de rizosfera obtidas para os dois períodos, com a umidade relativa do ar, onde quanto menor a umidade relativa maior a abundância de membros desta família. Dados referentes à umidade do solo não foram medidos, não sendo possível efetuar uma correlação mais direta entre a umidade e a família Bacillaceae. Em estudo realizado na rizosfera de uma cactácea *Mammillaria carnea*, durante período chuvoso e de seca, o filo Firmicutes teve sua abundância aumentada durante o período de seca devido principalmente à classe Clostridia (TORRES-CORTÉZ et al., 2012), que também possui bactérias formadoras de endósporos (ONYENWOKE et al., 2004).

Selecionando como critério o período de amostragem (chuvoso e de seca), ao realizar comparações entre amostras de solo (SC x SS) e amostras de rizosfera (RZC x RZS), há cinquenta e um gêneros que foram detectados significativamente em amostras de solo e rizosfera obtidas durante o período chuvoso, sendo 62,7% pertencente ao filo Proteobacteria, 17,6% ao filo Firmicutes, 11,8% ao filo Actinobacteria e 7,8% ao filo Bacteroidetes, mais uma vez evidenciando a maior proporção do filo Proteobacteria em ambientes úmidos (CASTRO et al., 2010). Apenas cinco gêneros significativos foram comuns para amostras de solo e rizosfera durante o período chuvoso: *Amycolatopsis*, *Comamonas*, *Nocardia*, *Ralstonia* e *Terrimonas*. Para o período de seca, foram observados treze gêneros em solo e rizosfera, sendo dez gêneros comuns significativos (figuras 4.18 e 4.19, respectivamente). Estes gêneros são: *Bacillus* (cuja proporção de sequências para solo é maior que 20% e maior que 30% para rizosfera), *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Candidatus Koribacter*, *Geodermatophilus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Pseudonocardia*, *Rhodopseudomonas* e *Streptomyces*. A presença de gêneros significativos em determinado período não exclui a existência deles em outro período e vice-versa. Isto significa que, por exemplo, *Bacillus* que foi identificado significativamente em maior proporção durante o período de seca também está presente durante o período chuvoso, entretanto, ele foi enriquecido sob determinada condição, no caso o período de seca, que proporcionou a maior frequência de sequências deste gênero.

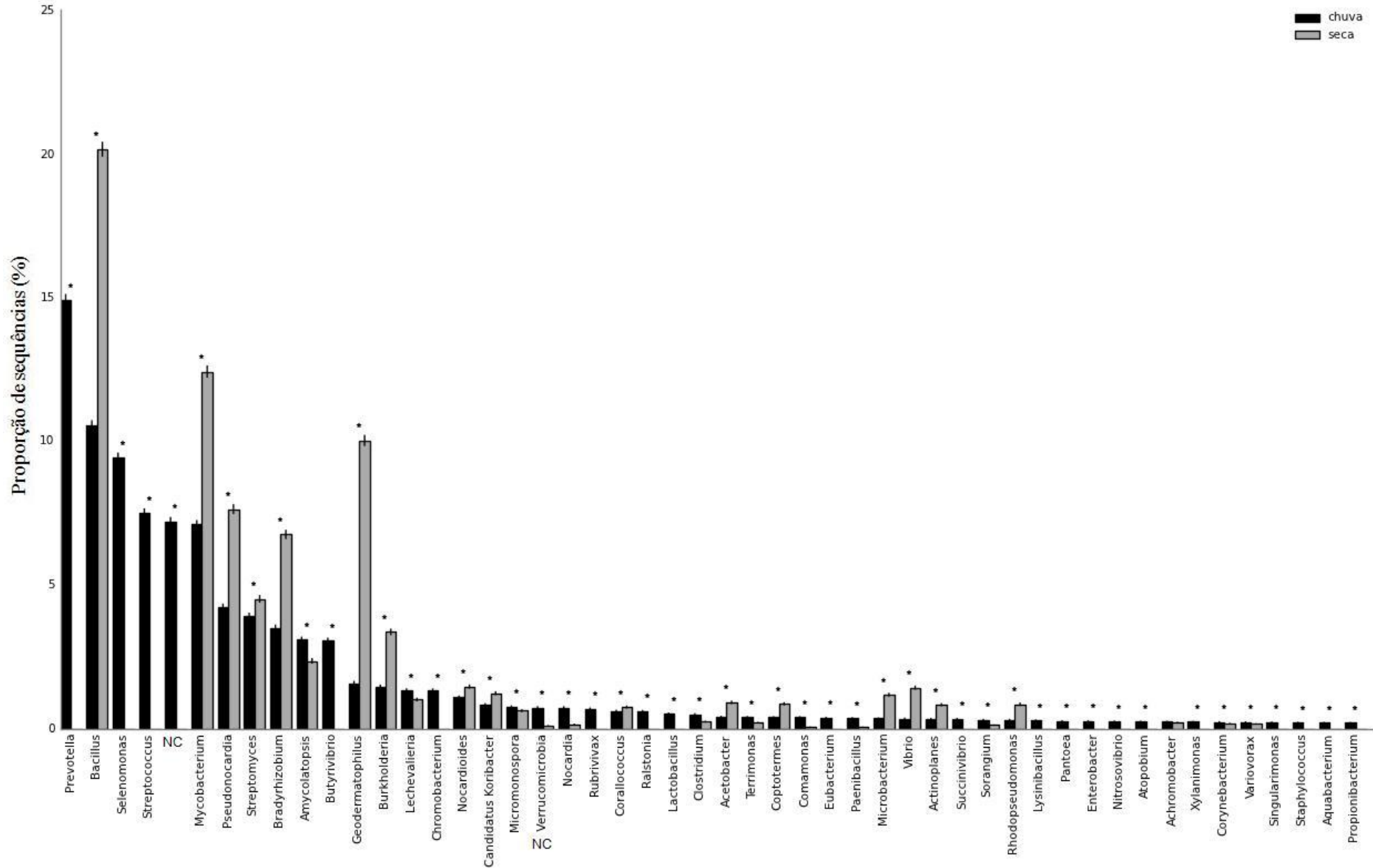


Figura 4.18 - Gráfico mostrando a proporção de seqüências (%) de gêneros obtidos por meio da comparação entre amostras de solo durante o período chuvoso (barras pretas), com solo durante o período de seca (barras cinzas), utilizando o software STAMP. Gêneros estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se com *

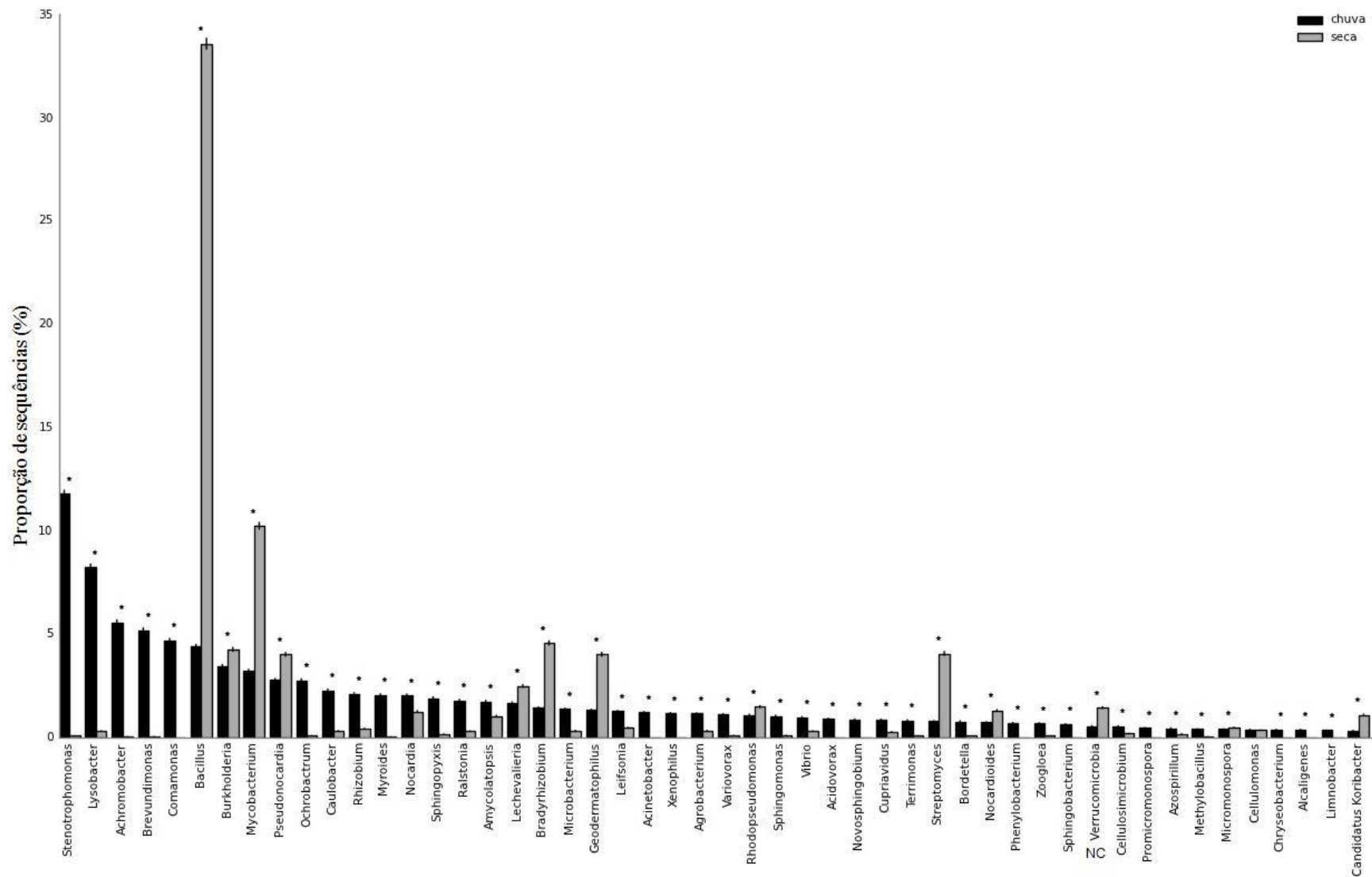


Figura 4.19 - Gráfico mostrando a proporção de sequências (%) de gêneros obtidos por meio da comparação entre amostras de rizosfera durante o período chuvoso (barras pretas), com rizosfera durante o período de seca (barras cinzas), utilizando o software STAMP. Gêneros estatisticamente significativos ($p < 0,05$) encontram-se com *

Em se tratando do período de seca, a presença de um grande número de sequências pertencentes ao gênero *Bacillus*, pode ser explicada pelo fato de possuir bactérias formadoras de endósporos, o que pode favorecer a presença de espécies deste gênero em ambientes secos, devido à resistência ao calor e à dessecação (NICHOLSON et al., 2000). A produção de endósporos é observada apenas em membros do grupo com baixo conteúdo de G+C de bactérias Gram-positivas e são produzidos no interior da célula (célula-mãe) e após maturação podem ser liberados (TRAAG et al., 2010). Cinco dos dez gêneros mais representativos pertencem ao filo Actinobacteria, que também são capazes de resistir em ambientes severos pela produção de esporos, que são resistentes à dessecação e calor extremo (WAWRIK et al., 2007). Diferentemente do primeiro grupo, membros do grupo com alto conteúdo de G+C de bactérias Gram-positivas (Actinobacteria) não são capazes de formar endósporos. Alguns formam esporos, como os produzidos pelo gênero *Streptomyces*, que são diferentes dos endósporos, servindo como estruturas reprodutivas especializadas, que ao encontrarem condições favoráveis, germinam (FLÄRDH; BUTTNER, 2009). Ou então, quando na produzem esporos, o que pode ser observado é um estado de dormência, por *Mycobacterium*, por exemplo, caracterizado por baixa atividade metabólica, como no caso do patógeno humano *M. tuberculosis*, que dentro do granuloma, a limitação de nutrientes e a baixa concentração de oxigênio desencadeiam este estado (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012). Algumas actinobactérias são bastante resistentes à dessecação e à radiação γ , como *Kinoecoccus radiotolerans*, *Rubrobacter radiotolerans* (FERREIRA et al., 1999; PHILLIPS et al., 2002), e tolerantes à radiação ultravioleta (UV), como *Modestobacter multiseptatus* e *Geodermatophilus obscurus* (GTARI et al., 2012). As actinobactérias são conhecidas também pela habilidade de produzir vários metabólitos secundários, o que pode contribuir para a competição com outros micro-organismos pela produção de antibióticos (QUIRINO et al., 2009). Há relatos da detecção de *Streptomyces* spp. em solos semiáridos. Aouar et al. (2012) isolaram actinobactérias do gênero *Streptomyces* de solos semiáridos da Argélia, que além de formarem esporos também são eficazes contra um grande número de patógenos, pela produção de compostos antimicrobianos. *Streptomyces pharetrae* também isolada de solo de regiões semiáridas da África do Sul, possui uma cadeia de esporos cheios de ornamentações e na forma de espiral (ROES; MEYERS, 2005). Os esporos podem acumular substâncias como a trealose que podem contribuir para o aumento na resistência ao calor e à dessecação, como o observado em *Streptomyces griseus* (McBRIDE; ENSIGN, 1987). Estas substâncias, denominadas de osmólitos, também podem ser produzidas intracelularmente pelos micro-organismos, como resposta a alterações ambientais, de forma a proteger as macromoléculas e

células, aumentando sua tolerância às condições extremas (LENTZEN; SCHWARZ, 2006). Desta forma, micro-organismos que não dispõem de estruturas como os endósporos ou esporos como uma forma de proteção às condições extremas, podem sintetizar tais compostos e/ou ainda utilizar outros mecanismos, como será discutido mais adiante.

A Caatinga, bioma inserido no semiárido brasileiro, pode ser considerada um ambiente extremo, devido às elevadas temperaturas, longas e irregulares secas, baixa disponibilidade de água e elevada radiação ultravioleta (DESMARCHELIER et al., 1999; SANTOS et al., 2011). Este tipo de ambiente deve comportar inúmeros micro-organismos capazes de ultrapassar condições que do ponto de vista humano sejam consideradas extremas, embora do ponto de vista dos organismos, estas condições sejam normais; micro-organismos estes denominados de extremófilos (MacELROY, 1974). De maneira geral, como o período de amostagem foi um fator preponderante, as discussões giraram em torno de alguns gêneros representativos e os principais mecanismos de adaptação às condições desfavoráveis impostas pelo estresse hídrico e outros tipos de estresse impostos pelo ambiente. Esse mecanismos podem envolver a tolerância a elevadas temperaturas, genes de tolerância à dessecação, produção de pigmentos para proteção contra a radiação UV, produção de enzimas termoestáveis, produção de esporos e endósporos, sobrevivência em diferentes valores de pH, degradação de diversos compostos xenobióticos, tolerância à radiação e produção de osmólitos intracelulares (tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Gêneros significativos, encontrados em bibliotecas de amplicons do gene 16S rRNA, exclusivos para o período de seca, tanto em amostras de solo quanto de rizosfera (Continua...)

| Gêneros | Filo | Características extremofílicas | Deteção |
|-----------------------|----------------|---|---|
| <i>Bacillus</i> | Firmicutes | <i>Bacillus safensis</i> (resiste a arsênio, B e sal) (RAJA; OMINE, 2012); <i>Bacillus persicus</i> (halofílica) (DIDARI et al., 2012); várias espécies termofílicas (35°C a 78°C) (NAZINA et al., 2001), <i>B. acidocaldarius</i> (ácido-termofílica) (DARLAND; BROCK, 1971), <i>B. badius</i> (alcalifílica) (AHMED et al., 2012); <i>Bacillus</i> spp. podem degradar vários compostos xenobióticos (ARUTCHELVAN et al., 2006; KOLEKAR et al., 2008; SREENIVASULU et al., 2012); <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. alcalophilus</i> , <i>B. psychrophilus</i> e <i>B. pasteurii</i> (produção de vários osmólitos) (KUHLMANN; BREMER, 2002) | Regiões áridas, semiáridas e desérticas (EGAMBERDIYEVA, 2005; HANNA et al., 2012; HERNANDEZ et al., 2009; MORENO et al., 2012) |
| <i>Bradyrhizobium</i> | Proteobacteria | Algumas linhagens podem crescer na presença de sal (50 mM) (MEDEOT et al., 2007); outras são capazes de sobreviver até 48°C (HAFEEZ; ASAD; MALIK, 1991) | Solo do deserto do Atacama (LESTER; SATOMI; PONCE, 2007); nódulos de plantas leguminosas da Caatinga (TEIXEIRA et al., 2010), planta (<i>Retama raetam</i>) cultivada em solos áridos na Índia (MAHDHI; MARS, 2006) |
| <i>Burkholderia</i> | Proteobacteria | Associação deste gênero com solos ácidos e inférteis (GARAU et al., 2009) | Solo do deserto do Atacama (LESTER; SATOMI; PONCE, 2007); nódulos de plantas de Mimosa do Cerrado (CHEN et al., 2005) |

Tabela 4.7 - Gêneros significativos, encontrados em bibliotecas de amplicons do gene 16S rRNA, exclusivos para o período de seca, tanto em amostras de solo quanto de rizosfera (Continua...)

| Gêneros | Filos | Características extremofílicas | Deteção |
|------------------------------|----------------|--|--|
| <i>Candidatus Koribacter</i> | Acidobacteria | Genes para tolerância à dessecação (WARD et al., 2009) | Solo da Colômbia sob elevada altitude (MONTAÑA et al., 2012), pântano sob elevada temperatura (KANOKRATANA et al., 2011) |
| <i>Geodermatophilus</i> | Actinobacteria | <i>G. obscurus</i> (tolerância à radiação UV; produção de esterase altamente termoestável) (GTARI et al., 2012; JAOUANI et al., 2012); resistência à radiação ionizante até 30 kGy (RAINEY et al., 2005) | Isolado de ambientes secos como o deserto de Mojave (GARRITY; HEIMBUCH; GAGLIARDI, 1996); <i>G. nigrescens</i> (deserto na China) (NIE et al., 2012); <i>G. obscurus</i> (frequentemente isolada de ambientes estressantes) (IVANOVA et al., 2010) |
| <i>Mycobacterium</i> | Actinobacteria | <i>Mycobacterium</i> (resistência à UV e radiação ionizante e tolerância a baixas pressões) (THOMAS et al., 2006) | Isolado do deserto da Mongólia (KURAPOVA et al., 2012); <i>M. phlei</i> (isolada de solos áridos do Uzbequistão) (EGAMBERDIYEVA; ISLAM, 2008) |
| <i>Nocardioides</i> | Actinobacteria | Haloalcalifílica e degradadora de 2,4,6-triclorofenol (MALTSEVA; ORIEL, 1997); <i>N. daedukensis</i> (halotolerante) (YOON et al., 2010); <i>N. szechwanensis</i> e <i>N. psychrotolerans</i> (isoladas de geleira na China) (LIU et al., 2012) | Rizosfera de uma gramínea tolerante à seca em um deserto da Índia (CHOWDHURY et al., 2009); deserto de Negev (SAULTCHERKAS; STEINBERGER, 2011); águas ácidas hidrotermais de atividade vulcânica (DONACHIE et al., 2002); “hot springs” (VALVERDE; TUFFIN; COWAN, 2012); McMurdo Dry Valleys (BABALOLA et al., 2009) |
| <i>Pseudonocardia</i> | Actinobacteria | <i>P. asaccharolytica</i> e <i>P. sulfidoxydans</i> (degradam sulfeto de metila) (REICHERT et al., 1998); <i>P. benzenivorans</i> (degrada 1,2,3,5 – tetraclorobenzeno) (KÄMPFER; KROPPESTEDT, 2004); <i>Pseudonocardia</i> sp. (degrada tetraidrofurano) (KOHLWEYER et al., 2000); <i>P. thermophila</i> (consegue sobreviver 30 minutos à 100°C (FERGUS, 1967) | <i>P. antitumoralis</i> sp. nov. (isolada de amostra de sedimento de mar profundo) (TIAN et al., 2012); <i>P. nantongensis</i> (isolada de planta halófito) (XING et al., 2012); <i>P. antarctica</i> (isolada de McMurdo Dry Valley) (PRABAHAR et al., 2004) |

Tabela 4.7 - Gêneros significativos, encontrados em bibliotecas de amplicons do gene 16S rRNA, exclusivos para o período de seca, tanto em amostras de solo quanto de rizosfera (Conclusão)

| Gêneros | Filos | Características extremofílicas | Deteção |
|-------------------------|----------------|---|---|
| <i>Rhodopseudomonas</i> | Proteobacteria | <i>R. capsulata</i> (produz H ₂ a partir de compostos orgânicos) (HILLMER; GEST, 1977); <i>R. acidophila</i> (acidofílica) (PFENNIG, 1969); <i>Rhodopseudomonas</i> sp. (levemente termofílica) (RESNICK; MADIGAN, 1989); <i>R. cryptolactis</i> (termotolerante) (STADTWALD-DEMCHICK; TURNER; GEST, 1990) | Isolada de deserto do Atacama (LESTER; SATOMI; PONCE, 2007); manguezal árido no Egito (SHAKILABANU; KANCHANA; JAYANTHI, 2012) |
| <i>Streptomyces</i> | Actinobacteria | <i>S. clavuligerus</i> (alcalifílico e halotolerante) (THUMAR; SINGH, 2007); <i>S. sodiiphilus</i> (alcalifílico) (LI et al., 2005); <i>Streptomyces</i> sp. (produção de pigmento vermelho que protege contra luz UV) (STANKOVIC et al., 2012) | Isolada do deserto do Atacama (OKORO et al., 2009; SANTHANAM et al., 2012); deserto do Nordeste do platô tibetano (DING et al., 2012) |

Por exemplo, o gênero *Geodermatophilus*, pertencente ao filo Actinobacteria, é frequentemente isolado de ambientes estressantes (GARRITY; HEIMBUCH; GAGLIARDI, 1996; IVANOVA et al., 2010; NIE et al., 2012) e pode possuir resistência à radiação UV (GTARI et al., 2012) e isolados deste gênero foram recuperados de solos submetidos à radiação gamma até 30 kGy (RAINEY et al., 2005) além de ter sido detectada uma enzima produzida pelo micro-organismo extremofílico *G. obscurus* que se mantém ativa a 80°C após 10 horas de incubação (JAOUANI et al., 2012). A maior proporção do gênero *Streptomyces* (filo Actinobacteria) também pode ser devido ao fato da habilidade de esporulação, conforme já mencionado anteriormente. Os esporos de actinobactérias deste gênero são capazes de germinar sob baixas condições de umidade (50% de umidade relativa) (ZVYAGINTSEV et al., 2007). Além disso, já foi isolado no deserto do Atacama (OKORO et al., 2009) sendo descrita uma nova espécie (*S. deserti* sp. nov.) (SANTHANAM et al., 2012), deserto do Nordeste do platô tibetano, com alta radiação UV e precipitação anual de 378,2 mm (DING et al., 2012). Algumas espécies são consideradas alcalofílicas e/ou halotolerantes (LI et al., 2005; THUMAR; SINGH, 2007) e o pigmento vermelho produzido por uma linhagem de *Streptomyces* foi capaz de proteger células expostas à luz UV (STANKOVIC et al., 2012). O gênero *Mycobacterium* também pertencente ao filo Actinobacteria, já foi encontrado no deserto da Mongólia (KURAPOVA et al., 2012), solos áridos do Uzbequistão (EGAMBERDIYEVA; ISLAM, 2008) e possui características de resistência à radiação e tolerância a baixas pressões (THOMAS et al., 2006). Várias espécies de *Pseudonocardia* são capazes de degradar compostos orgânicos (KÄMPFER; KROPPESTEDT, 2004; KOHLWEYER et al., 2000; REICHERT et al., 1998) e podem ser consideradas extremófilas do tipo toxitolerantes, uma vez que são capazes de sobreviver em altas concentrações de agentes danosos, como solventes, por exemplo (HORIKOSHI; BULL, 2011). Produz esporos que podem ser resistentes a altas temperaturas, como os esporos de *P. thermophila* que ficou viável até 30 minutos de exposição a 100°C (FERGUS, 1967). Algumas espécies novas já foram isoladas de sedimentos de mar profundo (TIAN et al., 2012), de plantas halófitas (XING et al., 2012) e de ambientes secos e inóspitos como McMurdo Dry Valleys, na Antártica, que além de apresentarem baixa temperatura e baixa precipitação, a indisponibilidade de água é alta (PRABAHAR et al., 2004). Ward et al. (2009) ao sequenciarem o genoma de *Candidatus Koribacter versatilis*, pertencente ao filo Acidobacteria, observaram a presença de um grande número de genes que codificam para proteínas de alto peso molecular sugerindo traços potenciais para tolerância à dessecação e formação de biofilme, elas exibem taxas metabólicas lentas sob condições oligotróficas e são

bem equipadas para tolerar flutuações na umidade do solo. Por se tratar de um gênero novo, foram achados poucos trabalhos sobre a detecção deste gênero em solos, tendo sido encontrado em solo da Colômbia sob elevada altitude (MONTAÑA et al., 2012), pântano turfoso onde a temperatura é elevada (KANOKRATANA et al., 2011). *Rhodopseudomonas* é um gênero que possui bactérias púrpuras não-sulfurosas fototróficas capazes de crescer anaerobicamente sob a presença de luz ou aerobicamente no escuro, utilizando diferentes fontes de carbono e doadores de elétrons (ZHANG et al., 2002). Tem sido detectada em manguezal árido no Egito (SHAKILABANU; KANCHANA; JAYANTHI, 2012) e no deserto do Atacama (LESTER; SATOMI; PONCE, 2007). *R. capsulata* pode produzir H₂ a partir de compostos orgânicos (HILLMER; GEST, 1977). Algumas espécies foram caracterizadas em ambientes extremos (MADIGAN, 2003), podendo ser acidofílica como *R. acidophila* (PFENNIG, 1969), levemente termofílica como uma espécie não identificada (RESNICK; MADIGAN, 1989) ou termotolerante, crescendo até 46°C como *R. cryptolactis* (STADTWALD-DEMCHICK; TURNER; GEST, 1990). O gênero *Nocardioides* já foi detectado na rizosfera de uma gramínea tolerante à seca em um deserto da Índia (CHOWDHURY et al., 2009), no deserto de Negev (SAUL-TCHERKAS; STEINBERGER, 2011), de águas ácidas hidrotermais de atividade vulcânica (DONACHIE et al., 2002), em “hot springs” (VALVERDE; TUFFIN; COWAN, 2012) e McMurdo Dry Valleys (BABALOLA et al., 2009). Algumas espécies podem produzir esporos ou não (YI; CHUN, 2004). Podem ser haloalcalifílicas (MALTSEVA; ORIEL, 1997); halotolerantes como *N. daedukensis* (YOON et al., 2010) ou ainda psicrotolerantes (cuja temperatura ideal de crescimento é menor ou igual a 15°C), isoladas de geleiras na China como *N. szechwanensis* e *N. psychrotolerans* (LIU et al., 2012). Os gêneros *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* também já foram detectados em solo do deserto do Atacama (LESTER; SATOMI; PONCE, 2007). *Bradyrhizobium* já foi isolado de nódulos de plantas leguminosas da Caatinga (TEIXEIRA et al., 2010), de uma planta (*Retama raetam*) cultivada em solos áridos na Índia (MAHDHI; MARS, 2006). Algumas linhagens de *Bradyrhizobium* são capazes de crescer na presença de sal (50 mM) e a 37°C por meio de modificações na composição dos fosfolipídios, que são alterações adaptativas a esses tipos de estresse (MEDEOT et al., 2007). Outras linhagens são capazes de sobreviver até 48°C (HAFEEZ; ASAD; MALIK, 1991). *Burkholderia*, por sua vez, foi encontrada em nódulos de plantas de *Mimosa* do Cerrado (CHEN et al., 2005), sugerindo uma associação deste gênero com solos ácidos e inférteis (GARAU et al., 2009). O gênero *Bacillus* é frequentemente isolado de regiões áridas, semiáridas e desérticas (EGAMBERDIYEVA, 2005; HANNA et al., 2012; HERNANDEZ et al., 2009; MORENO et

al., 2012), pois como já mencionado anteriormente, os endósporos possibilitam sua resiliência em condições extremas como escassez de água, elevadas temperaturas e altos níveis de radiação UV (ABED et al., 2012). A capa mais interna dos esporos de *B. subtilis* parece ter tido uma função importante na resistência destas estruturas à radiação UV-B artificial e radiações UV-A e UV-B solares (RIESENMAN; NICHOLSON, 2000). Micro-organismos deste gênero parecem ser bem versáteis, podendo resistir a arsênio, B e sal como *Bacillus safensis* (RAJA; OMINE, 2012); crescer em elevadas concentrações de sal, como a espécie halofílica *Bacillus persicus* (DIDARI et al., 2012); crescer sob elevadas temperaturas (35°C a 78°C) como *B. stearothermophilus*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermoleovorans*, *B. kaustophilus* e *B. thermodenitrificans* (NAZINA et al., 2001), crescer em pH ácido (3,0 a 4,0) e temperatura entre 60 a 65°C como a espécie ácido-termofílica *B. acidocaldarius* (DARLAND; BROCK, 1971), crescer em pH alcalino (9,0) como *B. badius* (AHMED et al., 2012) e ainda degradar vários compostos xenobióticos como pesticidas, corantes, solventes, entre outros (ARUTCHELVAN et al., 2006; KOLEKAR et al., 2008; SREENIVASULU et al., 2012). Sob condições de alta osmolalidade, várias espécies de *Bacillus* foram capazes de produzir diversos osmólitos intracelulares, como prolina produzida por *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. megaterium*; glutamato, produzido por *B. cereus*, *B. circulans* e *B. thuringiensis*; ectoína, produzida por *B. alcalophilus*, *B. psychrophilus* e *B. pasteurii* (KUHLMANN; BREMER, 2002).

É sabido que diferentes espécies de plantas hospedam comunidades microbianas específicas quando crescidas em solos iguais, evidenciando o fato de que as plantas são capazes de estruturar sua microbiota rizosférica (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). A maior detecção de alguns gêneros exclusivamente no período de seca, também pode ser devido à função ecológica que alguns micro-organismos podem desempenhar, concedendo certo grau de tolerância contra o estresse hídrico às plantas a que se encontram associados (AROCA; RUIZ-LOZANO, 2010; GROVER et al., 2011). Esses benefícios podem ser desde a melhoria das propriedades físicas do solo, como auxílio na agregação do solo pela produção de exopolissacarídeos e biofilme ou proteção pela produção de substâncias osmoprotetoras denominadas de osmólitos (ALAMI et al., 2000; AMELLAL et al., 1999; KACI et al., 2005; VARDHARAJULA et al., 2011). A inoculação de uma bactéria produtora de exopolissacarídeo modificou a estrutura do solo ao redor do sistema radicular vegetal, anulando o efeito negativo do estresse hídrico (ALAMI et al., 2000). Cytryn et al. (2007) observaram as respostas transcricionais e fisiológicas de *Bradyrhizobium japonicum* ao estresse hídrico induzido. Concluíram que a espécie responde diretamente à dessecação

adaptando-se às alterações impostas pela reduzida atividade de água, com a síntese de trealose e polissacarídeos e posteriormente pela indução de várias proteínas envolvidas na proteção da membrana celular, reparo do DNA, estabilidade e integridade de proteínas e respostas de estresse oxidativo. Além do papel de proteção acima descrito, os micro-organismos podem auxiliar no desenvolvimento de plantas nestes ambientes, pela produção de fitohormônios, disponibilização de fósforo, por meio de mecanismos que tornem o P disponível à absorção pelas plantas, fixação de nitrogênio, entre outros (SARAF et al., 2011). Por exemplo, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* são capazes de realizar simbiose com leguminosas, o que contribuiria para a fixação de N₂ para as plantas (SPRENT; GEHLOT, 2010), assim como *Rhodopseudomonas*, que podem realizar a fixação de nitrogênio de modo assimbiótico, pois são bactérias de vida livre (KAHINDI et al., 1997). *Bacillus* spp. capazes de produzir o hormônio AIA, solubilizar fósforo, produzir sideróforos, amônia, HCN e citocininas, foram inoculados em plântulas de *Zea mays* L. sob estresse hídrico, propiciando um aumento na biomassa vegetal e no conteúdo relativo de água, além de auxiliar na estabilidade dos agregados de solo (VARDHARAJULA et al., 2011). Mais detalhes sobre como os micro-organismos podem auxiliar as plantas a tolerar estresse abiótico, como o hídrico, e ainda auxiliar na promoção de crescimento vegetal serão fornecidos no próximo capítulo.

De maneira geral, a estrutura da comunidade bacteriana apresentou uma alteração clara durante a mudança do período chuvoso para o período de seca. Durante o período chuvoso houve maior proporção de bactérias Gram negativas, representadas pelos filos Bacteroidetes e Proteobacteria, que engloba diversos micro-organismos importantes não somente no solo durante a ciclagem de nutrientes como carbono, nitrogênio e enxofre (KERSTERS et al., 2006), mas também nos ecossistemas de forma global (SPAIN; KRUMHOLZ; ELSHAHED, 2009). Durante o período de seca, foi observada maior proporção de bactérias Gram-positivas, representadas pelo filo Actinobacteria e pelo gênero *Bacillus* durante o período de seca. A presença de grupos dominantes durante o período de seca e que também estavam presentes durante o período chuvoso, entretanto em menor proporção, sugere que no solo há micro-organismos tolerantes à seca, de forma menos ativa e quando as condições tornam-se desfavoráveis, os grupos sensíveis diminuem de proporção e os tolerantes se sobressaem devido aos mecanismos de resistência; por outro lado, há micro-organismos do tipo **R** estrategistas que embora sejam sensíveis à seca, quando as condições voltam a serem favoráveis (período chuvoso) eles são capazes de crescer rapidamente e se reestabelecer na comunidade (VAN GESTEL, 1993). As alterações nas comunidades microbianas observadas podem ser devido às diferentes habilidades dos micro-organismos

nativos em resistir e se adaptar às alterações ambientais. Entretanto, estas habilidades demandam alto gasto energético e variam de acordo com cada micro-organismo (SCHIMMEL; BALSER; WALLENSTEIN, 2007). De acordo com Harris (1981) há quatro categorias em que os micro-organismos podem se encaixar, dependendo do tipo de mecanismo. A categoria i) inclui micro-organismos que não possuem nenhum mecanismo de aclimação; ii) inclui micro-organismos que possuem aclimação pura; iii) inclui micro-organismos que possuem resistência inerente e iv) inclui micro-organismos com resistência inerente e mecanismos de aclimação. As bactérias Gram-negativas tendem a ser incluídas na categoria ii e bactérias Gram-positivas são incluídas nas categorias iii ou iv. Desta forma, bactérias Gram-positivas são mais resistentes aos eventos de chuva/seca, o que pode ser confirmado no presente estudo. Isto evidencia certa seleção de micro-organismos com mecanismos de tolerância eficazes, uma vez que comunidades bacterianas que sofrem regularmente episódios de estresse parecem ser mais tolerantes do que aquelas que passam esporadicamente por estes episódios.

Referências

ABED, R.M.M.; RAMETTE, A.; HÜBNER, V.; DECCKER, P.; BEER, D. Microbial diversity of eolian dust sources from saline lake sediments and biological soil crusts in arid Southern Australia. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 294-304, 2012.

AGUIRRE-GARRIDO, J.F.; MONTIEL-LUGO, D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, CC.; TORRES-CORTES, G.; MILLÁN, V.; TORO, N.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; RAMÍREZ-SAAD, H.C. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 101, n. 4, p. 891-904, 2012.

AHMED, A.T.; OTHMAN, M.A.; SARWADE, V.D.; GAWAI, K.R. Degradation of anthracene by alkaliphilic bacteria *Bacillus badius*. **Environment and Pollution**, Toronto, v.1, n.2, p. 97-104, 2012.

ALAMI, Y.; ACHOUAK, W.; MAROL, C.; HEULIN, T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3393-3398, 2000.

ALEKHINA, L.K.; DOBROVOL'SKAYA, T.G.; POCHATKOVA, T.N.; ZVYAGINTSEV, D.G. Evaluation of bacterial diversity in soil microcosms at different moisture contents. **Microbiology**, Reading, v. 70, n. 6, p. 731-737, 2001.

ALONSO-SÁEZ, L.; BALAGUÉ, V.; SÁ, E.L.; SÁNCHEZ, O.; GONZÁLEZ, J.M.; PINHASSI, J.; MASSANA, R.; PERNTHALER, J.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; GASOL, J.M. Seasonality in bacterial diversity in North-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 60, p. 98-112, 2007.

AMELLAL, N.; BARTOLI, F.; VILLEMIN, G.; TALOUIZTE, A.; HEULIN, T. Effects of inoculation of EPS-producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 211, p. 93-101, 1999.

ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Oregon: Timber Press, 2001. 776p.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.

AOUAR, L.; LERAT, S.; OUFFROUKH, A.; BOULAHROUF, A.; BEAULIEU, C. Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 34, n. 2, p. 165-176, 2012.

ARAÚJO FILHO, J.A.; CRISPIM, S.M.A. Pastoreio combinado de bovinos, caprinos e ovinos em áreas de Caatinga no Nordeste do Brasil. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1., 2002. **Anais...Corumbá:Embrapa, 2002**. p. 1-7.

AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Induction of plant tolerance to semi-arid environments by beneficial soil microorganisms – a review. In: LICHTFOUSE, E. (Ed.). **Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms**. Sustainable Agriculture Reviews. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. cap.5, p. 121-135.

ARUTCHELVAN, V.; KANAKASABI, V.; ELANGO VAN, R.; NAGARAJAN, S.; MURALIKRISHNAN, V. Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, p. 216-222, 2006.

BABALOLA, O.O.; KIRBY, B.M.; ROES-HILL, M.; COOK, A.E.; CARY, S.C.; BURTON, S.G.; COWAN, D.A. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 566-576, 2009.

BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M.I.M.; SKLARZ, M.Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E. D.; GILLOR, O. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 453-461, 2010.

BENNETT, L.T.; KASEL, S.; TIBBITS, J. Non-parametric multivariate comparisons of soil fungal composition: sensitivity to thresholds and indications of structural redundancy in T-RFLP data. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 1601-1611, 2008.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, 2012. In press.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 68, p. 1-13, 2009.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional/SDR. **Relatório final do grupo de trabalho interministerial para redelimitação do semi-árido nordestino e do polígono das secas**. Brasília, 2005. 118p.

BRUSETTI, L.; FRANCA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLIUCA, A.; BORIN, S.; SORLINI, C.; ABRUZZESE, A.; SACCHI, G.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L.; GIUNTINI, E.; BAZZICALUPO, M.; DAFFONCHIO, D. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. **Plant and Soil**, The Hague, v. 266, p. 11-21, 2004.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soils Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 1183-1192, 2003.

CASTRO, H.F.; CLASSEN, A.T.; AUSTIN, E.E.; NORBY, R.J.; SCHADT, C.W. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 4, p. 999-1007, 2010.

CHEN, M.; ALEXANDER, M. Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 5, p. 213-221, 1973.

CHEN, W.-M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; CHOU, J.-H.; CHOU, Y.-J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOT, G.N.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005.

CHOWDHURY, S.P.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; TRIPATHI, A.K. Diversity of 16S-rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. **European Journal of Soil Biology**, Mountrouge, v. 45, p. 114-122, 2009.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER v6: User Manual/Tutorial**. Plymouth: PRIMER-E, 2006.

COLLIGNON, C.; URAZ, S.; TURPAULT, M.-P.; FREY-KLETT, P. Seasons differently impact the structure of mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 43, n. 10, p. 2012-2022, 2011.

CRUZ-MARTÍNEZ, K.; SUTTLE, K.B.; BRODIE, E.L.; POWER, M.E.; ANDERSEN, G.L.; BANFIELD, J.F. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 738-744, 2009.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

CYTRYN, E.J.; CANGURDEKAR, D.P.; STREETER, J.G.; FRANCK, W.R.; CHANG, W.S.; STACEY, G.; EMERICH, D.W.; JOSHI, T.; XU, D.; SADOWSKY, M.J. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 6751-6762, 2007.

DARLAND, G.; BROCK, T.D. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., and acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. **Journal of General Microbiology**, London, v. 67, p. 9-15, 1971.

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

DIALLO, M.D.; MARTENS, M.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; VANDEKERCKHOVE, T.T.M.; NEYRA, M.; LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; VYVERMAN, W.; VAN der GUCHT, K. Phylogenetic analysis of partial bacterial 16 S rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis* subsp. *Raddiana* in Senegal. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 238-252, 2004.

DIALLO, M.D.; WILLEMS, A.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; VANDEKERCKHOVE, T.T.; LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; VYVERMAN, W.; GILLIS, M.; VAN der GUCHT, K. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, 4n. 4, p. 400-415, 2004.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 11, p. 1466-1476, 2011.

DIDARI, M.; AMOOZEGAR, M.A.; BAGHERI, M.; MEHRSHAD, M.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C.; SÁNCHEZ-PORRO, C.; VENTOSA, A. *Bacillus persicus* sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline Iranian lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, 2012. In press.

DING, D.; CHEN, G.; WANG, B.; WANG, Q.; LIU, D.; PENG, M.; SHI, P. Culturable actinomycetes from desert ecosystem in northeast of Qinghai-Tibet Plateau. **Annals of Microbiology**, New York, 2012. In press.

DONACHIE, S.P.; CHRISTENSON, B.W.; KUNKEL, D.D.; MALAHOFF, A.; ALAM, M. Microbial community in acidic hydrothermal waters of volcanically active White Island, New Zealand. **Extremophiles**, Tokyo, v. 6, p. 419-425, 2002.

DUNBAR, J.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 2943-2950, 2000.

EGAMBERDIYEVA, D. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 168, p. 94-99, 2005.

EGAMBERDIYEVA, D.; ISLAM, K.R. Salt-tolerant rhizobacteria: plant growth promoting traits and physiological characterization within ecologically stressed environments. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (Ed.). **Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth**. Weinheim: WILEY-VCH, 2008. cap. 14, p. 257-281.

FERGUS, C.L. Resistance of spores of some thermophilic actinomycetes to high temperature. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 32, n. 3, p. 205-208, 1967.

Ferreira, A.C.; Nobre, M.F.; Moore, E.; Rainey, F.A.; Battista, J.R.; Costa, M.S. Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. **Extremophiles**, Tokyo, v. 3, p. 235-238, 1999.

FIERER, N.; BRADFORD, M.A.; JACKSON, R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, New York, v. 88, n. 6, p. 1354-1364, 2007.

FIERER, N.; SCHIMMEL, J.P.; HOLDEN, P.A. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 63-71, 2003.

FLÄRDH, K.; BUTTNER, M.J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews - Microbiology**, London, v. 7, p. 36-49, 2009.

GARAU, G.; YATES, R.J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J.G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 125-134, 2009.

GARRITY, G.M.; HEIMBUCH, B.K.; GAGLIARDI, M. Isolation of zoosporogenous actinomycetes from desert soils. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 17, n. 3-4, p. 260-267, 1996.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S.H.E. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, p. 514-532, 2012.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, 1983.

GORELICK, R. Evolution of cacti is largely driven by genetic drift, not selection. **Bradleya**, Hornchurch, v. 27, p. 37-48, 2009.

GROVER, M.; ALI, S.Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, p. 1231-1240, 2011.

GTARI, M.; ESSOUSSI, I.; MAAOUI, R.; SGHAIER, H.; BOUJMIL, R.; GURY, J.; PUJIC, P.; BRUSETTI, L.; CHOUAIA, B.; CROTTI, E.; DAFFONCHIO, D.; BONDABOUS, A.; NORMAND, P. Contrasted resistance of stone-dwelling *Geodermatophilaceae* species to stresses known to give rise to reactive oxygen species. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 566-577, 2012.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.Q.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, p. 369-378, 1998.

GRIFFITHS, B.S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 2012. In press.

GTARI, M.; ESSOUSSI, I.; MAAOUI, R.; SGHAIER, H.; BOUJMIL, R.; GURY, J.; PUJIC, P.; BRUSETTI, L.; CHOUAIA, B.; CROTTI, E.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A.; NORMAND, P. Contrasted resistance of stone-dwelling *Geodermatophilaceae* species to stresses known to give rise to reactive oxygen species. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 566-577, 2012.

HAFEEZ, F.Y.; ASAD, S.; MALIK, K.A. The effect of high temperature on *Vigna radiata* nodulation and growth with different bradyrhizobial strains. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 31, n. 3, p. 285-294, 1991.

HAICHAR, F.Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.; BALESSENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 1221-1230, 2008.

- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, California, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HANNA, A.L.; YOUSSEF, H.H.; AMER, W.M.; MONIB, M.; FAYEZ, M.; HEGAZI, N.A. Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts, Egypt. **Journal of Advanced Research**, Cairo, 2012. In press.
- HARRIS, R.F. Effect of water potential on microbial growth and activity. In: PARR, J.F.; GARDNER, W.R.; ELLIOTT, L.F. (Ed.). **Water potential relations in soil microbiology**. Madison: American Society of Agronomy, 1981. p. 23-95.
- HARTMANN, M.; WIDMER, F. Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 249-260, 2008.
- HERNANDEZ, J.-P.; DE-BASHAN, L.E.; RODRIGUEZ, D.J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHAN, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, Mountrouge, v. 45, p. 88-93, 2009.
- HILLMER, P.; GEST, H. H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulate*: H₂ production by growing cultures. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, n. 2, p. 724-731, 1977.
- HORIKOSHI, K.; BULL, T.A. Prologue: definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging field of extremophiles. In: HORIKOSHI, K. (Ed.). **Extremophiles Handbook**, Tokyo: Springer-Verlag, 2011 v. 1. Pt. 1, p. 3-18.
- IVANOVA, N.; SIKORSKI, J.; JANDO, M.; MUNK, C.; LAPIDUS, A.; RIO, T.G.D.; COPELAND, A.; TICE, H.; CHENG, J.-F.; LUCAS, S.; CHEN, F.; NOLAN, M.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y.-J.; JEFFRIES, C.D.; MEINCKE, L.; BRETTIN, T.; DETTER, J.C.; ROHDE, M.; GÖKER, M.; BRISTOW, J.; EISEN, J.A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N.C.; KLENK, H.-P. Complete genome sequence of *Geodermatophilus obscures* type strain (G-20^T). **Standards in Genomics Sciences**, East Lansing, v. 2, n. 2, p. 158-167, 2010.
- JAOUANI, D.A.; NEIFAR, M.; HAMZA, A.; CHAABOUNI, S.; MARTINEZ, J.; GTARI, M. Purification and characterization of a highly thermostable esterase from the actinobacterium *Geodermatophilus obscures* strain G20. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, 2012. In press.
- JENSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 522-531, 2005.

KAHINDI, J.H.P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; MOREIRA, F.M.S.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 55-76, 1997.

KÄMPFER, P.; KROPPESTEDT, R.M. *Pseudonocardia benzenivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 749-751, 2004.

KANOKKRATANA, P.; UENGWETWANIT, T.; RATTANACHOMSRI, U.; UNTERNGSOOK, B.; NIMCHUA, T.; TANGPHATSORNRUANG, S.; PLENGVIDHYA, V.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 61, p. 518-528, 2011.

KERSTERS, K. De Vos P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In: DWARKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes**, 3rd. New York: Springer, 2006. v. 5 p. 3-37.

KEYLOCK, C.J. Simpson diversity and the Shannon-Wiener index as special cases of a generalized entropy. **OIKOS**, Luna, v. 109, n. 1, p. 203-207, 2005.

KOHLWEYER, U.; THIEMER, B.; SCHRÄDER, T.; ANDREESEN, J.R. Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 186, p. 301-306, 2000.

KOLEKAR, Y.M.; PAWAR, S.P.; GAWAI, K.R.; LOKHANDE, P.D.; SHOUCHE, Y.S.; KODAM, K.M. Decolorization and degradation of Disperse Blue 79 and Acid Orange 10, by *Bacillus fusiformis* KMK5 isolated from the textile dye contaminated soil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 8999-9003, 2008.

KUHLMANN, A.U.; BREMER, E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 2, p. 772-783, 2002.

KURAPOVA, A.I.; ZENOVA, G.M.; SUDNITSYN, I.I.; KIZILOVA, A.K.; MANUCHAROVA, N.A.; NOROVSUREN, Z.; ZVYAGINTSEV, D.G. Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia desert steppe zone. **Microbiology**, Reading, v. 81, n. 1, p. 98-108, 2012.

LaMONTAGNE, M.G.; SCHIMEL, J.P.; HOLDEN, P.A. Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of PCR-Amplified 16S rRNA genes. **Microbial Ecology**, New York, v. 46, p. 216-227, 2003.

LEHOURS, A.-C.; BARDOT, C.; THENOT, A.; DEBROAS, D.; FONTY, G. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7389-7400, 2005.

LENTZEN, G.; SCHWARZ, T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, p. 623-634, 2006.

LESTER, E.D.; SATOMI, M.; PONCE, A. Microflora of extreme arid Atacama desert soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 704-708, 2007.

LIU, Q.; XIN, Y.-H.; LIU, H.-C.; ZHOU, Y.-G.; WEN, Y. *Nocardioides szechwanensis* sp. nov. and *Nocardioides psychrotolerans* sp. nov., isolated from Hailuoguo glacier in SZECHWAN, P.R. China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, 2012. In press.

LI, W.-J.; ZHANG, Y.-G.; ZHANG, Y.-Q.; TANG, S.-K.; XU, P.; XU, L.-H.; JIANG, C.-L. *Streptomyces sodiiphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1329-1333, 2005.

MACEDO, M.J.H.; GUEDES, R.V.S.; SOUSA, F.A.S.; DANTAS, F.R.C. Análise do índice padronizado de precipitação para o estado da Paraíba, Brasil. **Ambiente e Água – an Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Taubaté, v. 5, n. 1, p. 204-214, 2010.

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

MAHDI, M.; MARS, M. Genotypic diversity of rhizobia isolated from *Retama raetam* in arid regions of Tunisia. **Annals of Microbiology**, New York, v. 56, n. 4, p. 305-311, 2006.

MAHMOUD, S.A.Z.; EL-FADL, M.A.; ELMOFTY, M.K. Studies on the rhizosphere microflora of a desert plant. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 9, n. 1, p. 1-8, 1964.

MALTSEVA, O.; ORIEL, P. Monitoring of an alkaline 2,4,6-trichlorophenol-degrading enrichment culture by DNA fingerprinting methods and isolation of the responsible organism, haloalkaliphilic *Nocardioides* sp. strain M6. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4145-4149, 1997.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, The Hague, v. 261, n. 1/2, p. 199-208, 2004.

McBRIDE, M.J.; ENSIGN, J.C. Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 11, p. 4995-5001, 1987.

MEDEOT, D.B.; BUENO, M.A.; DARDANELLI, M.S.; LEMA, M.G. Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium SEMIA 6144* nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. **Current Microbiology**, New York, v. 54, p. 31-35, 2007.

MESEL, I.; DERYCKE, S.; MOENS, T.; VAN der GUCHT, K.; VINCX, M.; SWINGS, J. Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 733-744, 2004.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, p. 386-393, 2008.

MONTAÑA, J.S.; JIMÉNEZ, D.J.; HERNÁNDEZ, M.; ÁNGEL, T.; BAENA, S. Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 101, p. 205-215, 2012.

MORENO, M.L.; PIUBELI, F.; BONFÁ, M.R.L.; GARCÍA, M.T.; DURRANT, L.R.; MELLADO, E. Analysis and characterization of cultivable extremophilic hydrolytic bacterial community in heavy-metal—contaminated soils from the Atacama Desert and their biotechnological potentials. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, 2012. In press.

NACKE, H.; THÜRMER, A.; WOLLHERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHÖNING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2011.

NAZINA, T.N.; TOUROVA, T.P.; POLTARAUS, A.B.; NOVIKOVA, E.V.; GRIGORYAN, A.A.; IVANOVA, A.E.; LYSENKO, A.M.; PETRUNYAKA, V.V.; OSIPOV, G.A.; BELYAEV, S.S.; IVANOV, M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 433-446, 2001.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

NIE, G.-X.; MING, H.; LI, S.; ZHOU, E.-M.; CHENG, J.; YU, T.-T.; ZHANG, J.; FENG, H.-G.; TANG, S.-K.; LI, W.-J. *Geodermatophilus nigrescens* sp. nov., isolated from a dry-hot valley. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 101, p. 811-817, 2012.

NORMANDER, B.; PROSSER, J.I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4372-4377, 2000.

NUNAN, N.; DANIELL, T.J.; SINGH, B.K.; PAPERT, A.; McNICOL, J.W.; PROSSER, J.I. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6784-6792, 2005.

OKORO, C.K.; BROWN, R.; JONES, A.L.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama desert, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 95, p. 121-133, 2009.

OLIVEROS, J.C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007. Disponível em: <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>. Acesso em: 07 jan. 2012.

ONYENWOKE, R.U.; BRILL, J.A.; FARAHI, K.; WIEGEL, J. Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (*Firmicutes*). **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 182, p. 182-192, 2004.

PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 715-72, 2010.

PEFENNIG, N. *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 99, n. 2, p. 597-602, 1969.

PHILLIPS, R.W.; WIEGEL, J.; BERRY, C.J.; FLIERMANS, C.; PEACOCK, A.D.; WHITE, D.C.; SHIMKETS, L.J. *Kineococcus radiotolerans* sp.

PRABAHAR, V.; DUBE, S.; REDDY, G.S.N.; SHIVAJI, S. *Pseudonocardia antarctica* sp. nov. an Actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 66-71, 2004.

QUIRINO, B.F.; PAPPAS, G.J.; TAGLIAFERRO, A.C.; COLLEVATTI, R.G.; NETO, E.L.; SILVA, M.R.S.S.; BUSTAMANTE, M.M.C.; KRÜGER, R.H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, Pavia, v. 164, p. 59-70, 2009.

RAINEY, F.A.; RAY, K.; FERREIRA, M.; GATZ, B.Z.; NOBRE, M.F.; BAGALEY, D.; RASH, B.A.; PARK, M.-J.; EARL, A.M.; SHANK, N.C.; SMALL, A.M.; HENK, M.C.; BATTISTA, J.R.; KÄMPFER, P.; COSTA, M.S. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5225-5235, 2005.

RAJA, C.E.; OMINE, K. Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 9, p. 2267-2275, 2012.

RDP. **Ribosomal Database Project**. Disponível em: <<http://rdp.cme.msu.edu/>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

REES, G.N.; WATSON, G.O.; BALDWIN, D.S.; MITCHELL, A.M. Variability in sediment microbial communities in a semipermanent stream: impact of drought. **Journal of the North American Benthological Society**, Waco, v. 25, n. 2, p. 370-378, 2006.

REICHERT, K.; LIPSKI, A.; PRADELLA, S.; STACKEBRANDT, E.; ALTENDORF, K. *Pseudonocardia asaccharolytica* sp. nov. and *Pseudonocardia sulfidoxydans* sp. nov., two new dimethyl disulfide-degrading actinomycetes and emended description of the genus *Pseudonocardia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 48, n. 2, p. 441-449, 1998.

RESNICK, S.M.; MADIGAN, M.T. Isolation and characterization of a mildlythermophilic nonsulfur purple bacterium containing bacteriochlorophyll *b*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 165-170, 1989.

RIENSENMAN, P.J.; NICHOLSON, W.L. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 2, p. 620-626, 2000.

ROES, M.; MEYERS, P.R. *Streptomyces pharetrae* sp. nov., isolated from soil from the semi-arid Karoo region. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 488-493, 2005.

ROUSK, J.; BÁÁTH, E.; BROOKES, P.; LAUBER, C.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J.G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, New York, v. 4, p. 1340-1351, 2010.

ROVIRA, A.D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 19, p. 241-266, 1965.

SANTHANAM, R.; OKORO, C.K.; RONG, X.; HUANG, Y.; BULL, A.T.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A.; WEON, H.-Y.; GOODFELLOW, M. *Streptoyses deserti* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama desert soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 101, p. 575-581, 2012.

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

SARAF, M.; RAJKUMAR, S.; SAHA, T. Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems. In: Maheshwari, D.K.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Systems**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. cap.13, p. 361-385.

SAUL-TCHERKAS, V.; STEINBERGER, Y. Soil Microbial diversity in the vicinity of a Negev Desert shrub – *Reaumuria negebensis*. **Microbial Ecology**, New York, v. 61, p. 64-81, 2011.

SAX, D.F. Equal diversity in disparate species assemblages: a comparison of native and exotic woodlands in California. **Global Ecology & Biogeography**, Oxford, v. 11, p. 49-57, 2002.

SCHIMEL, J.; BALSER, T.C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, New York, v. 88, n. 6, p. 1386-1394, 2007.

SHAKILABANU, S.; KANCHANA, D.; JAYANTHI, M. Biodiversity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in mangrove ecosystem: a review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, Mandsaur, v. 3, n. 3, p. 418-422, 2012.

SHOKRALLA, S.; SPALL, J.L.; GIBSON, J.F.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, p. 1794-1805, 2012.

SILVA, F.de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assisat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4742-4751, out. 2001.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **PNAS**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

SPAIN, A.M.; KRUMHOLZ, L.R.; ELSHHED, S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 992-1000, 2009.

SPELLERBERG, I.F.; FEDOR, P.J. A tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the "Shannon-Wiener" index. **Global Ecology & Biogeography**, Oxford, v. 12, p. 177-179, 2003.

SPRENT, J.I.; GEHLOT, H.S. Nodulated legumes in arid and semi-arid environments: are they important? **Plant Ecology & Diversity**, Glasgow, v. 3, n. 3, p. 211-219, 2010.

SREENIVASULU, C.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Degradation of *p*-nitrophenol by immobilized cells of *Bacillus* spp. isolated from soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 68, p. 24-27, 2012.

STADTWALD-DEMCHICK, R.; TURNER, F.R.; GEST, H. *Rhodopseudomonas cryptolactis*, sp. nov., a new thermotolerant species of budding phototrophic purple bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 71, n. 1-2, p. 117-121, 1990.

STANKOVIC, N.; RADULOVIC, V.; PETKOVIC, M.; VUCKOVIC, I.; JADRANIN, M.; VASILJEVIC, B.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. **Biotechnological Products and Process Engineering**, New York, 2012. In press.

TATTI, E.; DECOROSI, F.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L. Despite long-term compost amendment seasonal changes are main drivers of soil fungal and bacterial population dynamics in a Tuscan vineyard. **Geomicrobiology Journal**, London, v. 29, n. 6, p. 506-519, 2012.

TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 201-208, 2010.

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **CANOCO**. Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca: Microcomputer Power, 2002. 500p.

THOMAS, D.J.; BOILING, J.; BOSTON, P.J.; CAMPBELL, K.A.; McSPADDEN, T.; McWILLIAMS, L.; TODD, P. Extremophiles for ecopoiesis: desirable traits for and survivability of pioneer martian organisms. **Gravitational and Space Biology**, Gainesville, v. 19, n. 2, p. 91-104, 2006.

THUMAR, J.T.; SINGH, S.P. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 766-772, 2007.

TIAN, X.-P.; LONG, L.-J.; LI, S.-M.; ZHANG, J.; XU, Y.; HE, J.; LI, J.; WANG, F.-Z.; LI, W.-J.; ZHANG, C.-S.; ZHANG, S. *Pseudonocardia antitumoralis* sp. nov., a new deoxyxyboquinone-producing actinomycete isolated from a deep-sea sedimental sample in South China Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, 2012. In press.

TORRES-CORTÉZ, G.; MILLÁN, V.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.J.; AGUIRRE-GARRIDO, J.F.; RAMÍREZ-SAAD, H.C.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; TORO, N.; MARTÍNEZ-ABARCA, F. Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. **Plant and Soil**, The Hague, 2012. In press.

TRAAG, B.A.; DRIKS, A.; STRAGIER, P.; BITTER, W.; BROUSSARD, G.; HATFULL, G.; CHU, F.; ADAMS, K.N.; RAMAKRISHNAN, L.; LOSICK, R. Do mycobacteria produce endospores? **PNAS**, Washington, v. 107, n. 2, p. 878-881, 2010.

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**, Malden, v. 2, n. 2, p. 281-288, 2010.

VAJNA, B.; SZILI, D.; NAGY, A.; MÁRIALIGETI, K. An improved sequence-aided T-RFLP analysis of bacterial succession during oyster mushroom substrate preparation. **Microbial Ecology**, New York, 2012. In press.

VALVERDE, A.; TUFFIN, M.; COWAN, D.A. Biogeography of bacterial communities in hot springs: a focus on the actinobacteria. **Extremophiles**, Tokyo, v. 16, p. 669-679, 2012.

VAN GESTEL, M.; MERCKX, R.; VLASSAK, K. Microbial biomass response to soil drying and rewetting: the fate of fast- and slow-growing microorganisms in soils of different climates. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 25, p. 109-123, 1993.

VARDHARAJULA, S.; ALI, A.Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; BANDI, V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2011.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R.D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.M.; DeBOY, R.T.; DETTER, J.C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L.S.; WATKINS, S.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WAWRIK, B.; KUTLIEV, D.; ABDIVASIEVNA, U.A.; KUKOR, J.J.; ZYLSTRA, G.J.; KERKHOF, L. Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2982-2989, 2007.

WOLSING, M.; PRIEMÉ, A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 261-271, 2004.

XING, K.; QIN, S.; BIAN, G.-K.; ZHANG, Y.-J.; ZHANG, W.-D.; DAI, C.-C.; LIU, C.-H.; LI, W.-J.; JIANG, J.-H. *Pseudonocardia nantongensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from the coastal halophyte *Tamarix chinensis* Lour. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, 2012. In press.

YI, H.; CHUN, J. *Nocardioides ganghwensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1295-1299, 2004.

YOON, J.-H.; PARK, S.; KANG, S.-J.; LEE, J.-S.; LEE, K.C.; OH, T.-K. *Nocardioides daedukensis* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, p. 1334-1338, 2010.

ZHANG, D.; YANG, H.; HUANG, Z.; ZHANG, W.; LIU, S.-J. *Rhodopseudomonas faecalis* sp. nov., a phototrophic bacterium isolated from an anaerobic reactor that digests chicken faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 2055-2060, 2002.

ZHOU, E.-M.; TANG, S.-K.; SJØHOLM, C.; SONG, Z.-Q.; YU, T.-T.; YANG, L.-L.; MING, H.; NIE, G.-X.; LI, W.-J. *Thermoactinospora rubra* gen. nov., sp. nov., a thermophilic actinomycete isolated from Tengchong, Yunnan province, south-west China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 102, p. 177-185, 2012.

ZUCCHI, T.D.; TAN, G.Y.A.; GOODFELLOW, M. *Amycolatopsis thermophila* sp. nov. and *Amycolatopsis viridis* sp. nov., thermophilic actinomycetes isolated from arid soil.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 62, n. 1, p. 168-172, 2012.

ZVYAGINTSEV, D.G.; ZENOVA, G.M.; DOROSHENKO, E.A.; GRYADUNOVA, A.A.; GRACHEVA, T.A.; SUDNITSYN, I.I. Actinomycete growth in conditions of low moisture.

Biology Bulletin, New York, v. 34, n. 3, p. 242-247, 2007.

5 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS CACTÁCEAS PARA TOLERÂNCIA À SECA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE *ZEA MAYS* L.

Resumo

As bactérias que habitam a rizosfera são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) e atuam por meio de vários mecanismos que podem ser diretos e/ou indiretos. A busca por novas e eficientes RPCPs de ambientes inexplorados é importante. Desta forma, bactérias rizosféricas de *Cereus jamacaru* da Caatinga brasileira foram isoladas com base na sua habilidade de crescer em meio com reduzida atividade de água (0,957-0,963 A_w). As linhagens selecionadas foram testadas para mecanismos de proteção contra estresse hídrico, como a produção de exopolissacarídeos (EPS) e biofilme e traços de promoção de crescimento de plantas *in vitro* e *in vivo*. A maior proporção dos isolados obtidos pertence à família Bacillaceae, mais especificamente ao gênero *Bacillus*. Das dezenove bactérias obtidas durante o período chuvoso com capacidade de crescer em meio com reduzida atividade de água (0,963 A_w), 53% foi capaz de crescer em meio com A_w de 0,919, enquanto que para as bactérias obtidas durante o período de seca, 65% cresceu neste mesmo meio. Cerca de 90% e 65% das linhagens, obtidas durante o período chuvoso e de seca, respectivamente, foi capaz de produzir (EPS) em meio contendo sacarose em pH de 7,5 a 28°C e em torno de 22,5% das bactérias obtidas durante os dois períodos produziu biofilme a 0,3M de sorbitol. A produção de uma concentração superior a 51 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido indol acético (AIA) foi observada para 26% e 4% das linhagens, obtidas durante o período chuvoso e de seca, respectivamente. A solubilização de altas concentrações de Ca-P também foi observada em 37% das bactérias obtidas durante o período chuvoso e apenas 6% das bactérias obtidas durante o período de seca. A fixação de nitrogênio também foi observada em 26% e 33% das linhagens, obtidas durante o período chuvoso e de seca, respectivamente. Todas as linhagens foram capazes de produzir a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, sendo provavelmente o mecanismo dominante. Nenhuma linhagem foi capaz de produzir ácido cianídrico (HCN) e para as linhagens obtidas durante o período chuvoso, foi observado que 95% foi capaz de produzir amônia e 58% produziu a enzima celulase. Já para as bactérias obtidas durante o período de seca, 71% foi capaz de produzir amônia e 79% exibiu o halo de degradação no meio contendo carboximetilcelulose (CMC). Com base em todas as características, doze linhagens do período chuvoso e nove do período de seca foram selecionadas para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* L. Sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), nenhuma linhagem foi capaz de incrementar os três parâmetros vegetais avaliados concomitantemente. Sob estresse hídrico (30% da capacidade de campo), duas linhagens de *Bacillus* spp. aumentaram de modo significativo a área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea de *Z. mays* L. quando comparadas com a testemunha. O uso de uma linhagem de *Azospirillum* sp. e *Bacillus* sp. em consórcio foi significativamente tão interessante quanto o uso das linhagens isoladamente. A opção pelo uso do consórcio dependerá do preparo de uma formulação biológica estável e viável para futuras aplicações.

Palavras-chave: RPCP; Tolerância ao estresse hídrico; Promoção de crescimento; *Zea mays* L.; *Bacillus* sp.

Abstract

Bacteria inhabiting the rhizosphere are known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and act through several mechanisms that can be either direct and/or indirect. The search for new and efficient PGPR from unexplored environments is important. Thus, *Cereus jamacaru*- rhizosphere bacteria from Brazilian Caatinga were isolated based on their ability to grow in medium with reduced water availability (0,957-0,963 A_w). The selected strains were tested for mechanisms of drought protection such as exopolysaccharide and biofilm production and *in vitro* and *in vivo* plant growth promotion traits. A great proportion of the isolates belong to the Bacillaceae family, specifically the genus *Bacillus*. From a total of nineteen bacteria obtained during the rainy season that grew in media with reduced water activity (A_w 0.963), 53% were able to grow in medium with A_w of 0.919, while for the strains obtained during the dry season, 65 % grew in the same way. About 90% and 65% of the strains, obtained during the wet and dry seasons, respectively, was capable of producing exopolysaccharides (EPS) in a medium containing sucrose pH 7.5 at 28 ° C and about 22.5% of the strains obtained during both seasons produced biofilm at 0.3 M sorbitol. The production of a concentration exceeding 51 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of indole acetic acid (IAA) was observed for 26% and 4% of the strains, obtained during the rainy and dry seasons, respectively. The solubilization of high concentrations of Ca-P was also observed in 37% of the bacteria obtained during the rainy season and only 6% of the bacteria obtained during the dry season. Nitrogen fixation was also observed in 26% and 33% of the strains, obtained during the rainy and dry seasons, respectively. All strains were capable of producing the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, which is probably the dominant mechanism. No strain was able to produce hydrogen cyanide (HCN) and for the strains obtained during the rainy season, it was observed that 95% were able to produce ammonia and 58% produced cellulase. For bacteria obtained during the dry period, 71% was able to produce ammonia and 79% showed a halo of degradation in media containing carboxymethyl cellulose (CMC). Based on all the features twelve strains from the rainy season and nine from the dry season were selected for *Zea mays* L. growth promotion. Under normal supply of water (80% of field capacity), no strain was able to increase the three plant parameters evaluated concurrently. Under water stress (30% of field capacity), two strains of *Bacillus* spp. significantly increased leaf area, stem length and dry weight of aerial part of *Z. mays* L. compared with the control. The use of a strain of *Azospirillum* sp. and *Bacillus* sp. intercropping was significantly as interesting as the use of isolated strains. The option to use the consortium will depend on the preparation of a biological formulation stable and viable for future applications.

Keywords: PGPR; Water stress tolerance; Plant growth promotion; *Zea mays* L.; *Bacillus* sp.

5.1 Introdução

“A ciência descreve as coisas como são;
a arte, como são sentidas,
como se sente que são.”

(**Fernando Pessoa**)

As cactáceas desenvolveram alguns mecanismos evolutivos que permitiram a redução da perda de água, possibilitando sua adaptação em ambientes áridos e semiáridos. Da mesma forma, os micro-organismos associados a essas espécies também devem ter sofrido adaptações evolutivas de modo a tolerarem estresses ambientais e ainda por cima, conferirem às plantas certa proteção.

A tolerância à seca por micro-organismos pode ser obtida por meio de vários mecanismos como a produção de exopolissacarídeos (EPS) (NOCKER et al., 2012) e formação de biofilme (CHANG et al., 2007). Além da proteção celular, acredita-se que os micro-organismos também podem oferecer proteção vegetal contra a dessecação, pela manutenção de um ambiente úmido e propício ao desenvolvimento radicular, fornecimento de nutrientes, hormônios, atuando também como promotores de crescimento. A promoção de crescimento de plantas por micro-organismos pode ser conferida por meio de mecanismos diretos e/ou indiretos (SARAF et al., 2011), como a produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, produção de compostos voláteis como amônia (NH₃), cianeto de hidrogênio (HCN) e produção de celulase.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo isolar bactérias obtidas de solo e rizosfera de cactáceas como o *Cereus jamacaru*, *Pilosocereus gounellei* e *Melocactus* sp. obtidos durante o período chuvoso e de seca, de modo a selecionar aquelas com habilidade de crescer em meio com reduzida atividade de água, capacidade de produzir exopolissacarídeos e biofilme e com características de promoção de crescimento *in vitro* e com habilidade de promover crescimento de *Zea mays* L. sob condições normais de água e sob estresse hídrico.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Material e Métodos

5.2.1.1 Área de estudo e coleta das amostras de solo e rizosfera de cactáceas durante o período chuvoso e de seca

Os locais de coleta de solo e rizosfera de *Cereus jamacaru* (mandacaru), *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) e *Melocactus* sp. (cabeça-de-frade) foram delimitados ao longo da vegetação de Caatinga do semiárido nordestino, nos estados da Bahia (BA), Ceará (CE), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN), totalizando seis pontos de coleta (tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Pontos da coleta realizada durante o período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010) na Caatinga do Semiárido Nordeste. Os valores de temperatura correspondem ao observado para a coleta durante o período de seca. Valores de temperatura para o período chuvoso não são mostrados

| Pontos | Coordenadas | | Altitude (m) | Temperatura (°C) | | Localização |
|--------|--------------|--------------|--------------|------------------|----------|--|
| | Estado | S | | W | Ambiente | |
| 1-BA | 09°13'24,8'' | 41°05'11,4'' | 475 | 33,0 | 44,0 | Estrada com direção para Remanso. Município de Casa Nova. |
| 2-PI | 08°50'01,6'' | 42°33'13,3'' | 414 | 39,0 | 43,0 | Parque Nacional Serra da Capivara. Município de São Raimundo Nonato. |
| 3-CE | 06°27'37,1'' | 40°44'50,5'' | 450 | 44,0 | 45,0 | Após fronteira PI/CE. Município de Parambu. |
| 4-PB | 06°42'44,2'' | 38°15'08,2'' | 293 | 40,0 | 42,0 | Estrada próxima ao Vale dos Dinossauros. Município de Sousa. |
| 5-RN | 06°39'15,6'' | 37°29'33,4'' | 259 | 45,0 | 50,0 | Estrada BR-110 rumo a Serra Negra do Norte (RN). |
| RN | 06°50'21,4'' | 36°43'21,6'' | 376 | 39,0 | 42,0 | Estrada entre Equador e Santana do Seridó. Área em processo de desertificação. |

As amostras foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente. No total, foram coletadas três repetições de cada ponto, totalizando trinta e seis amostras de solo, trinta e seis amostras de rizosfera de *Cereus jamacaru*, quinze amostras de rizosfera de *Pilosocereus gounellei* e três amostras de rizosfera de *Melocactus* sp. (tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Amostras de solo e rizosfera de *Cereus jamacaru*, *Melocactus* sp., e *Pilosocereus gounellei*, coletadas durante o período chuvoso (Maio/2009) e de seca (Outubro/2010) na Caatinga do semiárido nordestino para os seis pontos de coleta

| Pontos | Amostragem | Número de amostras | |
|--------|-------------------------------|--------------------|-----------------|
| | | Período chuvoso | Período de seca |
| 1 | Solo | 3 | 3 |
| | <i>Cereus jamacaru</i> | 3 | 3 |
| | <i>Pilosocereus gounellei</i> | 0 | 3 |
| 2 | Solo | 3 | 3 |
| | <i>Cereus jamacaru</i> | 3 | 3 |
| 3 | Solo | 3 | 3 |
| | <i>Cereus jamacaru</i> | 3 | 3 |
| | <i>Melocactus</i> sp. | 0 | 3 |
| | <i>Pilosocereus gounellei</i> | 0 | 3 |
| 4 | Solo | 3 | 3 |
| | <i>Cereus jamacaru</i> | 3 | 3 |
| | <i>Pilosocereus gounellei</i> | 0 | 3 |
| 5 | Solo | 3 | 3 |
| | <i>Cereus jamacaru</i> | 3 | 3 |
| | <i>Pilosocereus gounellei</i> | 0 | 3 |
| 6 | Solo | 3 | 3 |
| | <i>Cereus jamacaru</i> | 3 | 3 |
| | <i>Pilosocereus gounellei</i> | 0 | 3 |

0 – Inexistência da amostra.

5.2.1.2 Isolamento de bactérias a partir de amostras de solo e rizosfera de cactáceas durante o período chuvoso e de seca com capacidade de crescer em meio com reduzida atividade de água

O isolamento foi realizado para os dois períodos amostrados, entretanto, as condições de isolamento foram um pouco modificadas, de acordo com a figura 5.1.

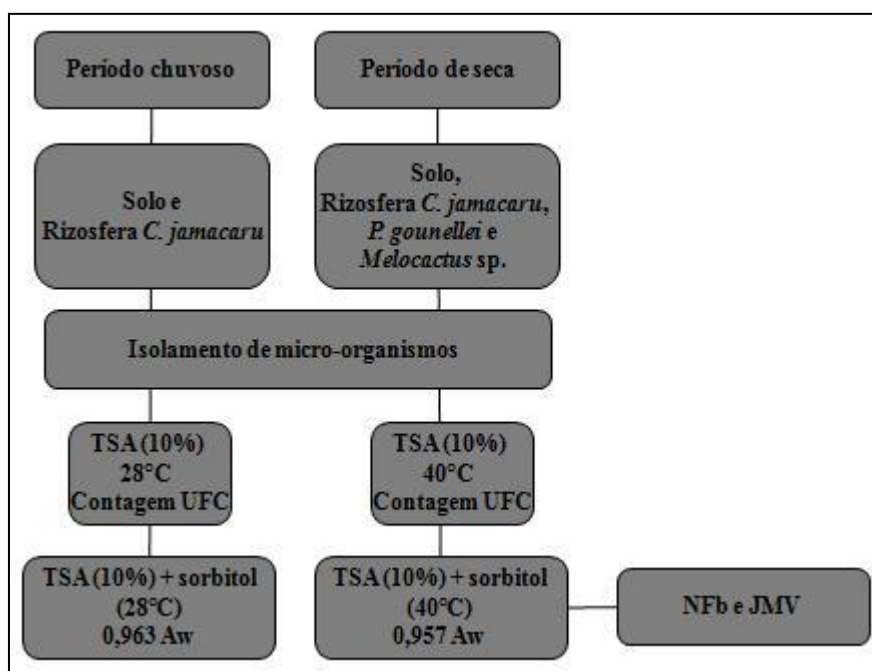


Figura 5.1 - Esquema do isolamento realizado

Para o isolamento de bactérias de solo e rizosfera, cerca de 1 g de solo foi pesado e transferido para Erlenmeyers de 250 mL com 10 mL de tampão (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,14% Na₂HPO₄; 0,024% KH₂PO₄) (ARAÚJO et al., 2002). À essa solução foram adicionadas pérolas de vidro e as amostras foram submetidas ao ultrassom (Ultracleaner 1400A) por 30 segundos e agitação a 150 rpm, durante 1 hora. Após incubação, foram realizadas diluições seriadas de 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ seguida de retirada de alíquotas de 100 µL das diluições adequadas que foram semeadas em meio de cultura apropriado (figura 5.1). O plaqueamento em meio Tryptone Soya Agar (TSA) (10%) foi realizado de modo a obter a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para os dois períodos amostrados. Para as bactérias do período chuvoso, após obtenção dos isolados em TSA (10%), estes foram semeados em meio com concentração de sorbitol a 285 g.L⁻¹, produzindo valor de 0,963 A_w (28°C). A adição de sorbitol ao meio de cultura foi realizada de modo a selecionar bactérias que crescem em meio com reduzida atividade de água. Para as bactérias do período de seca, foram adicionadas três concentrações diferentes de sorbitol (285 g.L⁻¹, 520 g.L⁻¹ e 780 g.L⁻¹) produzindo valores de A_w correspondentes a 0,957, 0,897 e 0,807, respectivamente. Quanto maior a concentração de sorbitol, menor o valor de A_w (HALLSWORTH et al., 1998). Após incubação a 40°C, foi verificado o crescimento das bactérias e realizada a contagem de UFC. Os isolados bacterianos foram purificados e armazenados em meio TSA (10%) em frascos de penicilina inclinados e em tubos criogênicos de 2,0 mL contendo glicerol 50% em freezer -80°C.

5.2.1.4 Caracterização das bactérias

A princípio as bactérias foram caracterizadas pelo perfil de ácidos graxos. As bactérias: i) cujo índice de similaridade foi menor que 0,5; ii) que foram afiliadas apenas a níveis taxonômicos superiores como gênero ou família; iii) que não foram identificadas, tiveram seu DNA genômico extraído e foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S rRNA.

5.2.1.4.1 Extração de ácidos graxos

As bactérias foram cultivadas em meio TSA (100%) pelo método de estrias cruzadas e incubadas a 28°C por 24 horas. Decorrido o tempo, as colônias do terceiro quadrante foram raspadas das placas e transferidas para tubos de vidro com tampa de rosca (Kimex). As amostras foram saponificadas com 1 mL do reagente de saponificação (45 g de NaOH, 150 mL de metanol e 150 mL de água deionizada) e homogenizadas vigorosamente com auxílio de agitador de tubos por 10 segundos. Os tubos foram colocados em água fervente (100°C) por 5 minutos, esfriados, homogenizados por 10 segundos e colocados novamente a 100°C por 25 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL do reagente de metilação (325 mL de HCl 6N e 275 mL de metanol), seguido de incubação em banho-maria a 80°C por 10 minutos. Os ácidos graxos presentes na fase orgânica foram separados da fase aquosa por meio de adição de 1,25 mL do reagente de extração (200 mL de hexano e 200 mL de terc-butil metil éter). A fase aquosa foi descartada e 3 mL do reagente de lavagem (10,8 g NaOH e 900 mL água deionizada) foram adicionados para limpar a fase orgânica a ser analisada. A fase orgânica, contendo os ácidos graxos, foi transferida para tubos de vidro (“vials”) apropriados para análise cromatográfica (SASSER, 1990). A análise dos ácidos graxos foi realizada por meio de cromatógrafo gasoso (Agilent GC System Serie 6850).

5.2.1.4.1.1 Análise de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram analisados por um programa de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock® TSBA versão 6.0, Microbial ID, Newark, DE, USA). Os perfis dos ácidos graxos obtidos foram comparados com os dados contidos na biblioteca TSBA 6 v.6.1 de junho de 2008. O índice de similaridade (IS) maior ou igual a 0,5 e separados no mínimo de 0,1 entre a primeira e a segunda identificação (KUNITSKY et al., 2006), foi

considerado para classificar os isolados a nível específico; índices mais baixos foram considerados apenas para filiação dos isolados a níveis taxonômicos como gênero ou família.

5.2.1.4.2 Extração de DNA genômico

Após a obtenção dos isolados, foi realizada a extração de DNA destes, de acordo com Sunnucks e Hales (1996) com algumas modificações. Os isolados foram crescidos em 5 mL de TSB (10%) a 28°C por 24 horas. Ao “pellet”, obtido por centrifugação a 14000 x g por 5 minutos, foram adicionados 400 µL de tampão TEN (10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2 mM EDTA (pH 8,0); 0,4 M NaCl), 40 µL de dodecil sulfato de sódio (20%) e 8 µL de proteinase K (Sigma) (20 mg.L⁻¹). A suspensão foi incubada a 55°C por 1 hora, seguida de adição de 300 µL de NaCl (5,5 M) e homogenizada vigorosamente com auxílio de agitador de tubos por 30 segundos. A suspensão foi centrifugada a 14000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol e mantido a -20°C por 2 horas. A suspensão foi então centrifugada a 14000 x g por 15 minutos a 4°C e o “pellet” foi lavado com 1 mL de álcool etílico (100%) e centrifugado a 14000 x g por 5 minutos, seguido de descarte do sobrenadante. O “pellet” de DNA foi lavado com álcool etílico (70%) e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O excesso de álcool etílico foi evaporado a temperatura ambiente e foram adicionados 20 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e mantido a -20°C. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,0%. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotografado.

5.2.1.4.2.1 Amplificação do gene 16S rRNA

Com a obtenção de DNA de boa qualidade, foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA, com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT - 3') e 27F (5'- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3'). As reações de PCR foram realizadas para um volume de 25 µL, contendo 17,35 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada, 2,5 µL de Taq buffer (10X) (Fermentas), 0,9 µL de MgCl₂ (25mM) (Fermentas), 2,0 µL de dNTP (2,5 mM), 0,1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,8 µL de DMSO e 1 µL de DNA molde (10 a 20 ng). As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador (Applied Biosystems), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a

94°C; 1 minuto a 60°C; 2 minutos a 72°C, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, juntamente com o marcador de peso molecular 1kb DNA *Ladder* para a observação do fragmento de aproximadamente 1500 pb amplificado. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotografado.

5.2.1.4.2.2 Purificação do produto de PCR

As amostras de DNA amplificadas foram purificadas com 1,5 µL do mix de enzimas na proporção de 2 µL de Fast-Ap (Fermentas) para 0,8 µL de Exonuclease I (Fermentas). As amostras foram submetidas a um termociclador (Applied Biosystems) por 15 minutos a 37°C e 5 minutos a 80°C. As amostras purificadas foram quantificadas em gel de agarose 1,0% a 3 volts. cm⁻¹.

5.2.1.4.2.3 Reação para sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação para sequenciamento, onde para cada amostra foram utilizados três oligonucleotídeos iniciadores: 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT - 3'), 27F (5'- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3') e qPCR (5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3') em reações independentes. Cada reação continha: 1 µL de Big Dye, 3,5 µL de tampão Save Money, 0,08 µL de oligonucleotídeo iniciador, 1 a 3 µL de produto de PCR (50-100 ng) e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 20 µL. As reações foram submetidas a um termociclador (Applied Biosystems), programado para realizar uma desnaturação inicial de 1 minuto a 96°C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 96°C; 15 segundos a 50°C; 4 minutos a 60°C.

5.2.1.4.2.4 Precipitação

As amostras foram precipitadas com adição de 2 µL de EDTA (125 mM), 2 µL de acetato de sódio (3 M) e 50 µL de álcool etílico (100%), seguida de mistura por inversão quatro vezes e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, em cada amostra foram adicionados 70 µL de álcool etílico (70%) e centrifugadas a 1650 x g por 15 minutos a 4°C. O excesso de álcool etílico foi evaporado a temperatura ambiente e as

amostras foram armazenadas a -20°C até preparo para injeção no ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

5.2.1.4.2.5 Análise das sequências e construção árvore filogenética dos isolados

A qualidade das sequências foi checada utilizando-se o programa FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc.) e as três sequências de cada oligonucleotídeo iniciador foram manualmente unidas utilizando o programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999). As sequências foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do Ez Taxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) para identificação de procariotos (KIM et al., 2012). As sequências foram alinhadas com ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e utilizadas para a construção das árvores filogenéticas pelo método de distância de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), utilizando-se o modelo de Jukes-Cantor (JUKES; CANTOR, 1969) com *bootstrap* de 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985), com o programa MEGA 5.01 (TAMURA et al., 2011). A similaridade entre as sequências foi obtida por meio do programa PHYDIT versão 3.1, um editor de sequência para filogenia (CHUN, 2001).

5.2.1.5 Seleção de bactérias com características para tolerância à seca

5.2.1.5.1 Crescimento em meio com reduzida atividade de água

As bactérias que cresceram em meio com reduzida atividade de água, isoladas do período chuvoso e de seca, foram repicadas em meio de cultura TSA (10%) com sorbitol (405 g.L^{-1} e 520 g.L^{-1}) a 40°C , produzindo valores de A_w correspondentes a 0,919 e 0,897, respectivamente.

5.2.1.5.2 Avaliação qualitativa da produção de EPS

A avaliação foi feita de acordo com Paulo (2010). Foram inoculados $5\ \mu\text{l}$ dos isolados bacterianos crescidos em meio Tryptone Soya Broth (TSB) (10%) em discos de $5\text{ mm}\varnothing$ em meio de cultura modificado de Guimarães et al. (1999) (2% de extrato de levedura; 1,5% K_2HPO_4 ; 0,02% MgSO_4 ; 0,0015% MnSO_4 ; 0,0015% FeSO_4 ; 0,003% CaCl_2 ; 0,0015% NaCl ; 1,5% agar) adicionado de 10% de frutose, glicose, manose e sacarose em valores de pH de 5,5 e 7,5 (para os isolados obtidos durante o período chuvoso) e de 10% de sacarose a um

valor de pH de 7,5 (para os isolados obtidos durante o período de seca). Os meios foram submetidos a 28°C para os isolados obtidos durante o período chuvoso e de seca. A produção de EPS foi caracterizada visualmente mediante medida do halo do EPS produzido, sendo + (pouca produção - halo de EPS ≤ 10 mmØ), ++ (média produção - halo de EPS de 10-14 mmØ) e +++ (ótima produção - halo de EPS ≥ 14 mmØ). A confirmação da produção de EPS foi realizada pelo método químico, misturando uma alça de platina impregnada com a colônia em 2 mL de álcool etílico.

5.2.1.5.3 Produção de ácido hialurônico

A produção de ácido hialurônico, um tipo de exopolissacarídeo (EPS) foi quantificada de acordo com Yu et al. (2008) com algumas modificações. Tubos de ensaio com 10 mL do meio contendo: extrato de levedura 2%; K₂HPO₄ 1,5%; MgSO₄ 0,02%; MnSO₄ 0,0015%; FeSO₄ 0,0015%; CaCl₂ 0,003%; NaCl 0,0015%; sacarose 10%, foram inoculados em triplicata com 100 µL de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL⁻¹ (DO_{550nm}=0,1)). As culturas foram mantidas a 28°C, sob agitação constante, durante três dias. Decorrido o tempo, 400 uL do caldo bacteriano foram adicionados a 550 uL de ácido acético (3%) em tubos de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 50 uL da solução de Alcian Blue 8GX, seguida de homogeneização vigorosa com auxílio de agitador de tubos. As amostras foram aquecidas por 30 segundos em micro-ondas e resfriadas em temperatura ambiente por 2 horas e 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 2 minutos, seguida de leitura da DO a 540 nm em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu). A curva padrão foi obtida utilizando solução padrão comercial de ácido hialurônico nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 500 mg.L⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2.1.5.4 Formação de biofilme em superfície abiótica em diferentes condições nutricionais

Foram inoculados 100 µl dos isolados bacterianos crescidos em meio TSB (10%) (10^8 UFC.mL⁻¹ (DO₅₅₀=0,1)) em tubos de polipropileno do tipo eppendorf com 900 µl de meio TSB (10%) adicionado ou não de sorbitol de acordo com a tabela 5.4, em triplicata. Após incubação a 40°C por 96 horas, o conteúdo de cada tubo foi homogeneizado por pipetagem e foi medida a absorbância em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) a 600 nm para verificar o crescimento. As células planctônicas foram removidas e cada tubo foi lavado três vezes com água destilada, seguida de adição de 1000 µl de solução de cristal violeta a

0,1% em cada tubo. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, os tubos foram lavados novamente três vezes com água destilada (adaptado de O'TOOLE e KOLTER, 1998).

Tabela 5.4 - Composição do meio TSB (10%) modificado com sorbitol utilizado para realização do teste de formação de biofilme

| Amostras (período) | Concentração (M) |
|-------------------------------|-------------------------|
| chuva e seca | 0,03 |
| chuva | 0,06 |
| chuva e seca | 0,30 |
| chuva | 0,60 |

5.2.1.5.4.1 Quantificação da formação de biofilme em superfície abiótica

A formação de biofilme foi quantificada mediante adição de 1000 µL de álcool etílico (95%) em cada tubo para solubilização do cristal violeta incorporado à parede. A densidade óptica (DO) do corante solubilizado (anexo A) foi determinada em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) a 560 nm.

5.2.1.6 Seleção de bactérias com características de RPCP

5.2.1.6.1 Mecanismos diretos

5.2.1.6.1.1 Avaliação quantitativa da produção de ácido indol-acético (AIA)

A produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). Tubos de ensaio com 10 mL do meio TSB (10%) suplementado com 5 mM de L-triptofano foram inoculados em triplicata com 100 µL de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL⁻¹ (DO_{550nm}=0,1)). As culturas foram mantidas a 28°C no escuro, sob agitação constante, durante 24 horas. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos, para obtenção do sobrenadante. A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada por meio da mistura de 750 µL do reagente de Salkowski (50 mL de ácido perclórico a 35% e 1 mL de FeCl₃ a 0,5M) com 750 µL do sobrenadante, seguido da leitura da DO a 530 nm em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu), após 30 minutos de incubação no escuro (HARTMANN et al., 1983). Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela formação de uma coloração rósea (anexo A). A concentração de AIA no meio de cultura (y) foi determinada pela comparação com uma curva

padrão, utilizando-se AIA comercial, por meio da equação $y=34,507x^2+43,802x+0,843$, onde x equivale aos valores de absorvância obtidos.

5.2.1.6.1.2 Solubilização de fosfatos inorgânicos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

5.2.1.6.1.2.1 Avaliação qualitativa

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

5.2.1.6.1.2.2 Avaliação quantitativa

Todos os isolados foram semeados em meio líquido NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium*) (NAUTIYAL, 1999), constituído de 1,0% glicose; 0,5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,5% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02% KCl; 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O pH foi ajustado para 7,0 antes da autoclavagem. A análise quantitativa da solubilização de P-Ca foi realizada de acordo com Nautiyal (1999) com algumas modificações. Tubos de ensaio com 10 mL do meio NBRIP foram inoculados em triplicata com 100 μL de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL⁻¹ ($\text{DO}_{550}=0,1$)). O controle constituiu-se de tubos com 10 mL de meio NBRIP sem inóculo. Os tubos foram incubados por 15 dias a 28°C em agitação a 180 rpm. Decorrido o tempo de incubação, 1000 μL de cada amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. Então, a 145 μL de cada amostra foram adicionados 570 μL de água destilada e 285 μL do reagente molibdato-vanadato de amônio (5% molibdato de amônio e 0,25% vanadato de amônio; 1:1, v/v) (MALAVOLTA, 1989; SILVA, 1999). O espectrofotômetro foi zerado

utilizando-se o controle negativo constituído de 145 µL do meio NBRIP sem inóculo, 570 µL de água destilada e 285 µL do reagente molibdato-vanadato de amônio. Para obtenção da curva padrão, foi preparada uma solução estoque de KH_2PO_4 (0,0875%) ($0,1 \text{ mg P.mL}^{-1}$), de onde foram retiradas alíquotas de 1 mL até 10 mL, que foram misturadas com 2,5 mL do reagente molibdato-vanadato de amônio para um volume final de 50 mL. Após 10 minutos da adição do reagente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) a 420 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela formação de uma coloração amarelada (anexo A). Os resultados obtidos em absorbância (valores de x), foram convertidos em concentração de P ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (y) por meio da equação $y = (0,3041x^2 + 0,2566x + 0,0213) * 1000$.

5.2.1.6.1.3 Fixação de nitrogênio de modo assimbiótico em meio livre de nitrogênio (NFb)

As bactérias foram testadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio de modo assimbiótico de acordo com Döbereiner (1989) em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb) (item 5.2.1.3). Tubos de ensaio com 10 mL do meio NFb foram inoculados em triplicata com 100 µL de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL^{-1} ($\text{DO}_{550}=0,1$)). Após 7 dias de incubação, foram novamente repicadas para novos meios. Foram consideradas positivas aquelas que apresentaram uma película visível de crescimento abaixo da superfície do meio (figura 5.2).

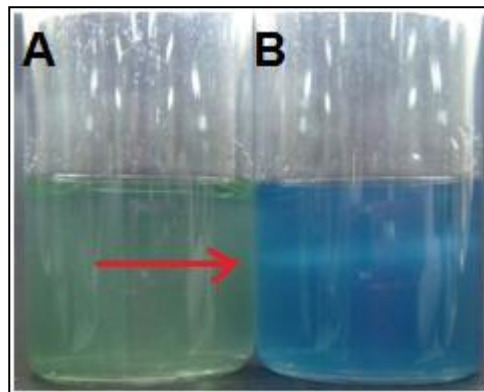


Figura 5.2 - Meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb). A – Controle, sem inóculo bacteriano. B – Formação de película característica de fixação de nitrogênio (seta vermelha). A modificação da coloração do meio ocorre devido à alteração do pH

5.2.1.6.1.4 Determinação da presença da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

A atividade de ACC deaminase foi determinada de acordo com Glick et al. (1995). Cerca de 5 μL de cada isolado cultivado em meio líquido TSB (10%) foram inoculados em placas com meio de cultura com ACC como única fonte de nitrogênio (0,1% K_2HPO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% CaCO_3 ; 0,02% NaCl ; 0,0005% $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1% glicose; 0,03% ACC (adicionado por filtração); 1,5% agar). As placas foram incubadas a 28°C e observadas diariamente para formação de colônia até 4 dias. As colônias que apresentaram crescimento, foram então re-inoculadas e incubadas nas mesmas condições anteriores. O teste é baseado no fato de que as bactérias que possuem a enzima ACC deaminase são capazes de crescer no meio com ACC como única fonte de nitrogênio.

5.2.1.6.2 Mecanismos indiretos

5.2.1.6.2.1 Produção de compostos voláteis

5.2.1.6.2.1.1 Cianeto de hidrogênio (HCN)

A detecção de HCN foi realizada de acordo com Bakker e Schippers (1987), as bactérias foram estriadas isoladamente em meio TSA (10%) adicionado de 4,4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicina e 0,3 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. As placas foram invertidas e em cada tampa foi colocado papel filtro autoclavado impregnado com solução de ácido pícrico a 0,5% e Na_2CO_3 a 2%. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por 48 horas. A produção de HCN é indicada pela mudança da coloração do papel filtro de amarelo para marrom-alaranjado. Como controle negativo foi usada placa sem repique de bactéria e como controle positivo foi utilizada uma linhagem de *Pseudomonas* sp.

5.2.1.6.2.1.2 Amônia (NH_3)

As bactérias foram inoculadas em 10 mL de água peptonada (1% peptona; 0,5% NaCl ; pH 7,0) e incubadas por 48 h a 28°C. Após incubação foram adicionados 500 μL do reagente de Nessler (10% HgI_2 ; 7% KI ; 50% solução aquosa NaOH a 32%). A técnica de Cappuccino e Sherman (1992) é baseada na detecção da presença de N amoniacal, onde é formado um precipitado amarelo-acastanhado e quanto maior a concentração, mais intensa a coloração (anexo A) (DEY et al., 2004).

5.2.1.6.2.2 Controle de fitopatógenos

5.2.1.6.2.2.1 Produção de celulase

A capacidade de degradação de celulose foi verificada pela semeadura de 5 µL de cada isolado em meio sólido CMC agar (0,2% NaNO₃; 0,1% K₂HPO₄; 0,05% MgSO₄; 0,05% KCl; 0,2% carboximetilcelulose sódico (CMC); 0,02% peptona; 1,7% agar). Após incubação a 28°C por 48 h, as placas foram coradas com iodo (0,666% KI; 0,333% iodo) por 5 minutos (KASANA et al., 2008) e foram medidos os diâmetros da colônia e do halo de degradação e foi calculado o índice celulolítico (IC) baseado na razão entre o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia (TEATHER; WOOD, 1982).

5.2.1.7 Promoção de crescimento de *Zea mays* L.

5.2.1.7.1 Desinfestação superficial de sementes de *Zea mays* L.

Sementes de milho (*Zea mays* L.) foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio 2% (7 minutos), álcool 70% (1 minuto), seguido de três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. A última água de lavagem foi plaqueada em meio TSA (10%) e as placas foram incubadas para observar crescimento de possíveis contaminantes e checar a eficiência da desinfestação.

5.2.1.7.2 Microbiolização das sementes de *Zea mays* L.

As bactérias selecionadas foram inoculadas separadamente em Erlenmeyers com meio TSB (10%) e submetidas à agitação a 28°C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, as concentrações bacterianas foram ajustadas para 10⁸ UFC.mL⁻¹ (DO₅₅₀=0,1) com solução salina a 0,85% esterilizada e as sementes de milho desinfestadas foram imersas por duas horas nas suspensões bacterianas. As sementes do tratamento controle, sem bactérias, foram imersas pelo mesmo período em solução salina a 0,85% esterilizada.

5.2.1.7.3 Teste de germinação de sementes

Foi realizado o teste de germinação em papel Germitest (tipo Al-065) autoclavado, onde foi adicionada água destilada autoclavada no volume de 2,5 vezes o peso do papel

(BRASIL, 1992). As bactérias crescidas em meio líquido TSB (10%) por 24 h tiveram sua concentração ajustada para 10^8 UFC. mL⁻¹ (DO_{550nm}=0,1) com solução salina a 0,85% e foram colocadas em contato de 1 hora com as sementes de milho (*Zea mays* L.) desinfestadas superficialmente com álcool 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio 2% (7 minutos), álcool 70% (1 minuto), seguido de três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. As sementes do tratamento controle, sem bactérias, foram imersas pelo mesmo período em solução salina a 0,85% esterilizada. Foram dispostas 10 sementes de milho no terço superior do papel e outro papel Germitest umedecido com água destilada autoclavada foi disposto sobre as sementes de milho. Em seguida, foi feito um rolo. O teste foi realizado em duplicata, totalizando 20 sementes por tratamento. Os rolos foram ensacados e dispostos verticalmente dentro de um béquer a 28°C sob proteção luminosa. Diariamente foi verificada a umidade dos rolos, para garantir a germinação. Após 7 dias, foram realizadas as seguintes avaliações: (a) comprimento (cm) do coleóptilo e da raiz principal.

5.2.1.7.4 Experimentos de plantio de *Zea mays* L. em casa de vegetação

Os experimentos de plantio foram realizados em casa de vegetação de forma casualizada, com cinco repetições, em vasos de 1 litro de capacidade cedidos pela Seção de Campos Experimentais (SCE) da Embrapa.

O primeiro experimento foi realizado de modo a testar as dezenove bactérias que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidas durante o período chuvoso; o segundo experimento foi realizado com sete bactérias selecionadas durante o período de seca. O terceiro experimento foi realizado de modo a testar as duas linhagens, uma de *Bacillus* sp. e outra de *Azospirillum* sp., para promoção de crescimento de *Zea mays* L., isoladamente ou em consórcio.

As condições de rega foram estabelecidas da seguinte maneira: fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo) e fornecimento reduzido de água, simulando uma condição de estresse hídrico (30% da capacidade de campo). Foram semeadas 20 sementes por vaso, sendo que após a germinação as plântulas foram desbastadas, mantendo cinco plantas por vaso, totalizando vinte e cinco plantas por tratamento. Como controle, foram utilizadas plantas sem inóculo bacteriano (testemunha).

5.2.1.7.4.1 Avaliação

A avaliação da promoção de crescimento das plantas pelas rizobactérias foi baseada no comprimento do caule, peso seco da parte aérea e medida da área foliar (para os dois primeiros experimentos) e comprimento do caule, peso seco da parte aérea, medida da área foliar e peso seco radicular (para o terceiro experimento). No primeiro experimento, decorridos os vinte dias, a parte aérea foi retirada e acondicionada em sacos de papel e secos em estufa a 60°C até obtenção de peso seco constante. As raízes foram lavadas, secas ao ar, pesadas e acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a 60°C até obtenção de peso constante. Em todos os casos, comparou-se a testemunha com as plantas inoculadas. O peso da massa da matéria seca foi determinado em balança analítica. Foram avaliadas todas as plantas germinadas por vaso e a medida das plantas de cada unidade experimental foi considerada uma repetição. Para o segundo experimento, decorridos quarenta dias, as mesmas avaliações foram realizadas. Já para o terceiro, foram decorridos quarenta e sete dias para o experimento sob fornecimento normal de água e sessenta e quatro dias para o experimento sob reduzido fornecimento de água.

5.2.1.8 Análise estatística

Para os experimentos de casa de vegetação, os dados foram submetidos à análise de variância One-Way Anova, seguida de uma classificação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de significância, de modo a comparar os tratamentos com a testemunha.

Nos demais testes, as médias foram comparadas pelo teste aglomerativo de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Este teste segundo Borges e Ferreira (2003) visa à separação de médias de tratamentos em grupos distintos, por meio da minimização da variação dentro e maximização da variação entre grupos, gerando resultados de maior objetividade e clareza. As correlações simples entre as variáveis e as análises estatísticas acima citadas foram realizadas utilizando o programa Assistat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).

5.2.2 Resultados e Discussão

5.2.2.1 Isolamento e contagem de unidades formadoras de colônias das amostras de solo e rizosfera de cactáceas durante o período chuvoso e de seca

Com relação à contagem de micro-organismos cultiváveis de solo e rizosfera, para o período chuvoso e de seca, foram considerados valores estimados de log das unidades formadoras de colônias.

Para amostras de solo, não foi observada diferença entre os pontos de coleta, sendo obtido para todos os pontos, valores de log maiores ou iguais a 6 para o período chuvoso e valores entre 5 e 6 para o período de seca (figura 5.3). Rao e Venkateswarlu (1983) verificaram a comunidade de bactérias por grama de solo seco para dez diferentes solos áridos, com a comunidade variando de $0,22 \times 10^5$ até $32,67 \times 10^5$. Embora as temperaturas do solo fossem elevadas (50°C) e o solo estivesse seco durante o verão, os autores não observaram declínio significativo na comunidade microbiana.

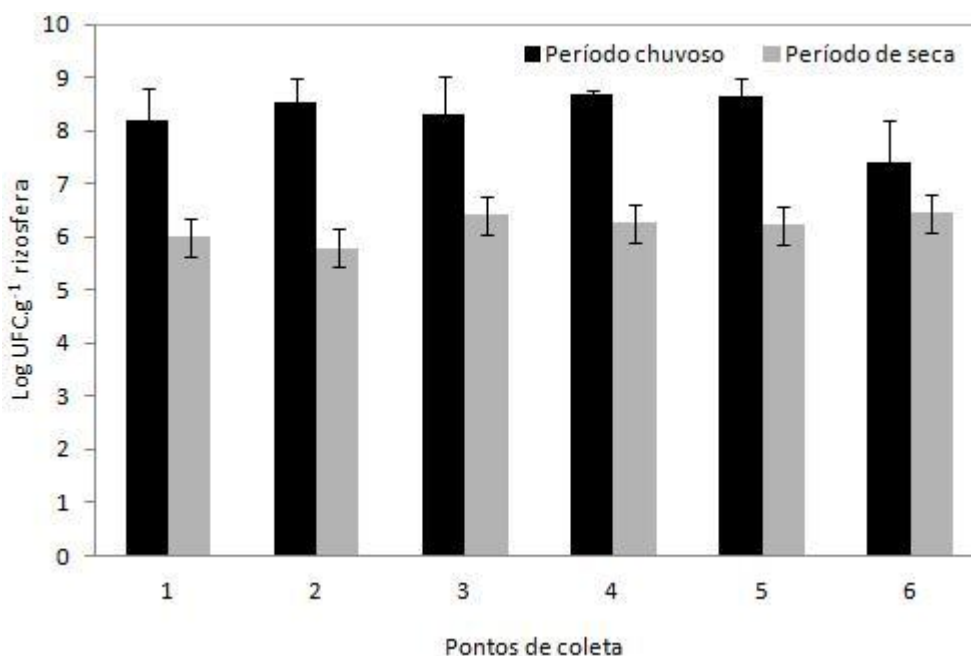


Figura 5.3 - Densidade bacteriana cultivada a partir de amostras de solo dos seis pontos de coleta, obtidos de período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010). As barras indicam o desvio padrão das médias obtidas para três repetições

Para amostras de rizosfera de *Cereus jamacaru* (figura 5.4), foram observados valores de log maiores que 8 para todos os pontos de coleta durante o período chuvoso, com exceção da área em processo de desertificação (ponto 6). Já para o período de seca, foram observados valores de log entre 5 e 7. Esta redução na contagem de micro-organismos também foi observada por Griffiths et al. (2003). Aguilera et al. (1999) estudando a variação da frequência de micro-organismos do solo em duas temporadas (chuva e seca) em uma região costeira árida do Chile, também observaram que para as bactérias, o log de UFC.g⁻¹ de solo estava em torno de 6 após 8 meses de seca, enquanto que após um intenso regime de chuvas, o observado foi em torno de log de 8. Bachar et al. (2010) coletaram solos de uma área

Mediterrânea, uma semiárida e outra árida, com precipitação decrescente de 400, 300 e 100 mm anual, respectivamente, observando que a abundância bacteriana foi significativamente menor na área árida.

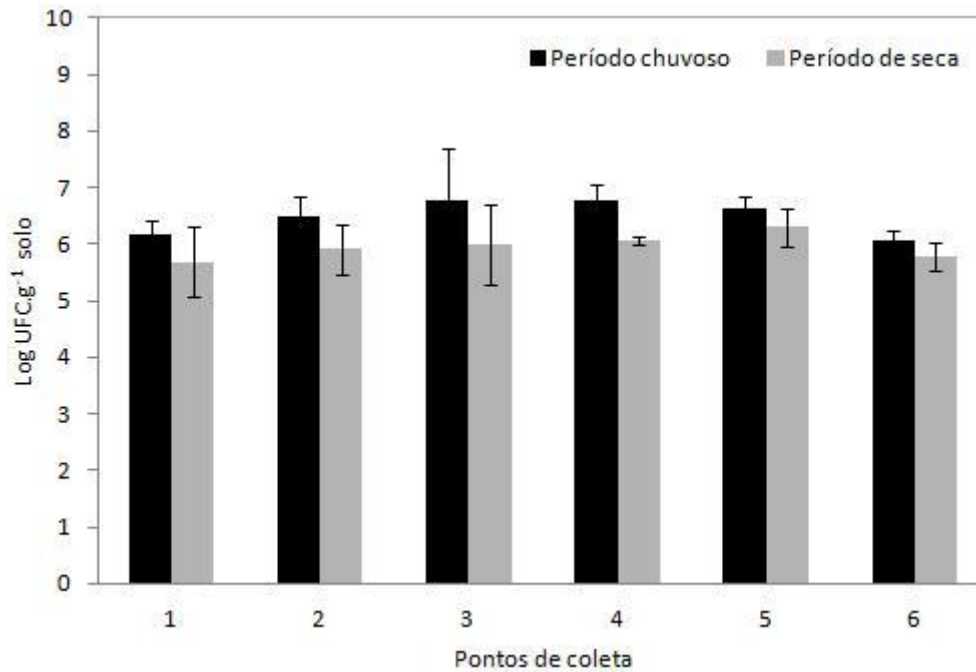


Figura 5.4 - Densidade bacteriana cultivada a partir de amostras de rizosfera de *Cereus jamacaru* dos seis pontos de coleta, obtidos de período chuvoso (Maio/2009) e período de seca (Outubro/2010). As barras indicam o desvio padrão das médias obtidas para três repetições

Com relação ao isolamento em meio de cultura TSA (10%) com sorbitol, após sete dias de incubação, foi observado o aparecimento de colônias apenas no meio com atividade de água correspondente a 0,957 A_w (figura 5.5). Nos meios com atividade de água correspondente a 0,897 A_w e 0,807 A_w não foi observada nenhuma colônia.

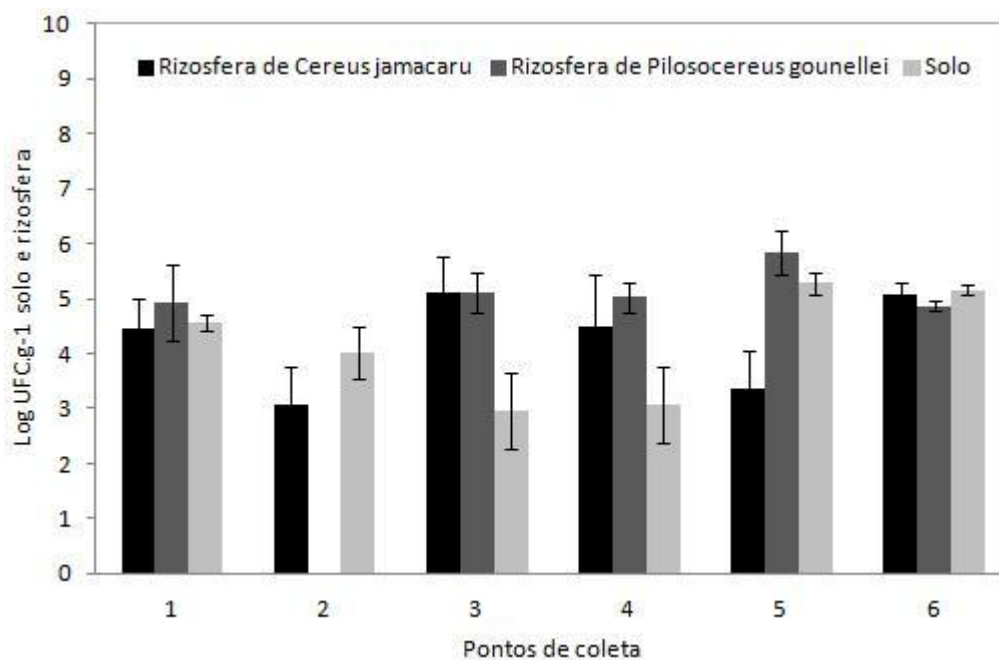


Figura 5.5 - Contagem de UFC obtida de isolamento a 40°C após 7 dias, em meio contendo sorbitol com atividade de água correspondente a 0,957 A_w

Em meio com reduzida atividade de água, os valores de log de UFC.g⁻¹ de solo variam de 3 a 5 para a rizosfera de *Cereus jamacaru*, 4 a 6 para a rizosfera de *Pilosocereus gounellei* e 3 a 6 para o solo. Os maiores valores de log observados para amostras da rizosfera de *P. gounellei*, podem ser devido a essas espécies vegetais serem encontradas com frequência em Caatinga de lajedo, onde os micro-organismos rizosféricos, ou até mesmo rizoplanos, ficam em contato direto com as rochas, que são expostas a vários tipos de estresse como radiação solar, dessecação, flutuações de temperatura, falta de nutrientes (GORBUSHINA, 2007). Puente et al. (2004) estudaram os micro-organismos do rizoplano de três espécies de cactáceas (*Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi* e *Opuntia cholla*) crescendo em rochas desprovidas de solo, observando que os micro-organismos são termotolerantes, halotolerantes e tolerantes à estação seca anual de 10 meses.

Para o período de seca em meio de cultura com sorbitol (0,957 A_w), foram isoladas setenta e cinco bactérias, das quais quarenta e oito encontram-se na tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Identificação por meio de análise de ácidos graxos e sequenciamento do gene 16S rRNA de linhagens bacterianas obtidas da rizosfera de *Cereus jamacaru* (RZS), *Melocactus* sp. (CFS) e *Pilosocereus gounellei* (XXS) e de solo (SS), durante o período de seca. Bactérias foram isoladas em meio TSA (10%) com reduzida atividade de água (0,957 Aw) e temperatura de 40°C (Continua...)

| Linhagem | Família | FAME | | 16S rRNA | | |
|-------------|--------------------|------------------------------------|------------|----------------------------------|-------|--------------|
| | | Espécie mais próxima | Índice Sim | Espécie mais próxima | Sim | nt dif/total |
| 6.2 RZS 1 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,739 | - | - | - |
| 6.2 RZS 2 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,616 | - | - | - |
| 6.2 RZS 3 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,860 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,6% | 5/1385 |
| 6.2 RZS 4 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus safensis</i> | 99,9% | 1/1392 |
| 6.2 RZS 5 | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> sp. | 0,458 | <i>Bacillus cereus</i> | 99,9% | 1/1250 |
| 6.1 XXS 10 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,827 | - | - | - |
| 6.1 XXS 11 | Bacillaceae | <i>Brevibacillus reuszeri</i> | 0,758 | - | - | - |
| 6.1 XXS 11' | Bacillaceae | <i>Virgibacillus pantotheticus</i> | 0,642 | - | - | - |
| 6.1 XXS 12 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,873 | - | - | - |
| 6.1 XXS 15 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,9% | 1/1286 |
| 6.1 XXS 16 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,669 | - | - | - |
| 6.1 XXS 18 | Bacillaceae | <i>Bacillus atrophaeus</i> | 0,692 | - | - | - |
| 3.3 XXS 20 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus solisalsi</i> | 97,8% | 15/671 |
| 3.3 XXS 21 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,1% | 10/1168 |
| 3.3 XXS 22 | Bacillaceae | - | 0,496 | <i>Bacillus tequilensis</i> | 99,9% | 1/1048 |
| 3.3 XXS 27 | Bacillaceae | <i>Brevibacillus reuszeri</i> | 0,624 | - | - | - |
| 1.1 XXS 28 | Enterobacteriaceae | - | 0,854 | <i>Pantoea cypripedii</i> | 97,2% | 35/1246 |
| 1.1 XXS 29 | Enterobacteriaceae | - | 0,798 | <i>Enterobacter helveticus</i> | 99,4% | 6/944 |
| 1.1 XXS 30 | Bacillaceae | <i>Bacillus pumilus</i> | 0,507 | - | - | - |
| 1.1 XXS 31 | Bacillaceae | <i>Bacillus cereus</i> | 0,586 | - | - | - |
| 1.1 XXS 32 | Paenibacillaceae | - | - | <i>Paenibacillus cineris</i> | 99,6% | 5/1386 |
| 3.1 CFS 33 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus methylotrophicus</i> | 99,9% | 1/1246 |
| 3.1 CFS 34 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,569 | - | - | - |
| 3.1 CFS 38 | Bacillaceae | <i>Bacillus cereus</i> | 0,599 | - | - | - |
| 4.1 XXS 40 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,566 | - | - | - |
| 4.1 XXS 41 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,524 | - | - | - |
| 4.1 XXS 42 | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> sp. | 0,645 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,3% | 9/1373 |
| 3.1 RZS 43 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,651 | - | - | - |
| 3.1 RZS 44 | Enterobacteriaceae | - | - | <i>Pantoea stewartii</i> | 95,4% | 59/1294 |
| 3.1 RZS 46 | Micrococcaceae | <i>Arthrobacter nicotianae</i> | 0,815 | - | - | - |
| 3.1 RZS 47 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,844 | - | - | - |
| 5.2 SS 48 | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> sp. | 0,407 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 100% | 0/1279 |

Tabela 5.5 - Identificação por meio de análise de ácidos graxos e sequenciamento do gene 16S rRNA de linhagens bacterianas obtidas da rizosfera de *Cereus jamacaru* (RZS), *Melocactus* sp. (CFS) e *Pilosocereus gounellei* (XXS) e de solo (SS), durante o período de seca. Bactérias foram isoladas em meio TSA (10%) com reduzida atividade de água (0,957 Aw) e temperatura de 40°C (Conclusão)

| | | | | | | | |
|------------|-----------------------|-------------------------------------|-------|----------------------------------|-------|---------|---|
| 5.2 SS 49 | Enterobacteriaceae | - | 0,590 | - | - | - | - |
| 4.1 RZS 52 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus tequilensis</i> | 99,9% | 2/1296 | - |
| 4.1 RZS 53 | Paenibacillaceae | - | - | <i>Paenibacillus cineris</i> | 99,9% | 1/1281 | - |
| 1.3 SS 55 | Paenibacillaceae | <i>Paenibacillus lentimorbus</i> | 0,543 | - | - | - | - |
| 1.3 SS 56 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus methylotrophicus</i> | 99,5% | 7/1360 | - |
| 1.3 SS 57 | Bacillaceae | <i>Bacillus subtilis</i> | 0,531 | - | - | - | - |
| 5.3 SS 58 | Bacillaceae | <i>Bacillus subtilis</i> | 0,643 | - | - | - | - |
| 5.3 SS 61 | Paenibacillaceae | <i>Paenibacillus lentimorbuss</i> | 0,586 | - | - | - | - |
| 4.1 RZS 63 | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> sp. | 0,503 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,8% | 3/1322 | - |
| 4.1 RZS 64 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,9% | 1/1405 | - |
| 6.3 XXS 67 | Gordoniaceae | <i>Gordonia amarae</i> | 0,876 | - | - | - | - |
| 6.3 XXS 68 | Micrococcaceae | - | - | <i>Arthrobacter defluvii</i> | 98,8% | 14/1146 | - |
| 6.3 XXS 69 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,824 | - | - | - | - |
| 6.3 XXS 71 | Promicromonosporaceae | <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> | 0,853 | - | - | - | - |
| 6.3 XXS 73 | Bacillaceae | <i>Bacillus pumilus</i> | 0,635 | - | - | - | - |
| 6.3 XXS 74 | Nocardiaceae | <i>Nocardia</i> sp. | 0,766 | - | - | - | - |

Sim - similaridade

nt dif/total - número de nucleotídeos diferentes pelo número de nucleotídeos totais

A maioria, 73%, pertence à família Bacillaceae que compreende bactérias formadoras de endósporos. Da mesma forma, Rao e Venkateswarlu (1983) em estudo da comunidade microbiana durante o verão observaram que bactérias formadoras de endósporos e cistos foram encontradas com maior frequência. No presente trabalho, as linhagens caracterizadas pela análise de ácidos graxos ou pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, apresentaram similaridade com 10 espécies de *Bacillus*: *B. aryabhatai*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. methylotrophicus*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. solisalsi*, *B. subtilis* e *B. tequilensis*, e outros dois representantes da família Bacillaceae, *Brevibacillus reuszeri* e *Virgibacillus pantothenicus*. O gênero *Bacillus* é amplamente estudado, e a alta frequência de *Bacillus* spp. detectados no presente estudo, pode ser devido à capacidade de formação de endósporos. Eles permanecem em um estado metabólico inativo, sendo uma estratégia para tolerância a condições ambientais desfavoráveis, como danos físicos, calor úmido e seco, radiação UV e gamma, dessecação, agentes oxidativos, além de possuírem outras funções (NICHOLSON et al., 2000; NICHOLSON, 2002). A linhagem 6.2 RZS 3 foi caracterizada pela análise de ácidos graxos, com 0,860 de similaridade a *B. megaterium* e por meio do gene 16S rRNA como *B. aryabhatai* com 99,6% de similaridade e 5 bases divergentes de 1385. Esta divergência nos bancos de dados, pode ser devido ao fato da biblioteca de ácidos graxos ser anterior (2008) à descrição da nova espécie por Shivaji et al. (2009). Árvores filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, agrupam em um mesmo clado *B. aryabhatai* com a bactéria comumente encontrada em solo, *B. megaterium* (LEE et al., 2012; ADERIBIGBE et al., 2011). Algumas espécies de *Bacillus* caracterizadas neste trabalho são ainda pouco estudadas, como *B. aryabhatai*, descrita primeiramente em criotubos utilizados para coleta de amostras de ar de altitudes entre 27 e 41 km (SHIVAJI et al., 2009) e também foi isolada de solo de regiões semiáridas no México (AGUIRRE-GARRIDO et al., 2012); *Bacillus atrophaeus*, identificado em solo desértico por Köberl et al. (2011); *Bacillus safensis*, isolada por Raja e Omine (2012) em solo desértico da Mongólia e descrita como resistente à sal, boro e arsênio; *B. solisalsi*, isolada de solo salino na China, é descrita como halotolerante (até 15% (p/v) de NaCl e alcalifílica (pH 5,0-13,0) (LIU et al., 2009); *Bacillus tequilensis*, isolada primeiramente de uma tumba de 2000 anos na cidade de Tequila, no México, apresenta 99% de similaridade com *B. subtilis* (GATSON et al., 2006).

Duas outras famílias, Paenibacillaceae e Enterobacteriaceae que correspondem a 8,3% (cada uma), são o segundo maior grupo, com *P. cineris* e *P. lentimorbus*; *Enterobacter helveticus*, *Pantoea cypripedii* e *P. stewartii*. Há ainda uma menor porcentagem (4,2%) da família Micrococcaceae, representada por *Arthrobacter nicotianae* e *A. defluvii* e 2,1% (cada

de espécies das famílias Gordoniaceae, Promicromonosporaceae e Nocardiaceae, representadas por *Gordonia amarae*, *Cellulosimicrobium cellulans* e *Nocardia* sp., respectivamente. Há poucos relatos destes micro-organismos de ambientes áridos e semiáridos. A espécie *Paenibacillus cineris* foi descrita em solos vulcânicos da Antártica, com temperatura máxima de crescimento de 50°C (LOGAN et al., 2004). Outra espécie de *Paenibacillus* foi isolada de nódulos radiculares de *Prosopis farcta*, em diferentes solos áridos da Tunísia (FTERICH et al., 2011). Em estudo da diversidade de comunidades procarióticas no deserto de Tatouine ao sul da Tunísia, Chanal et al. (2006) isolaram 31 linhagens, sendo o filo Actinobacteria dominante, com 12 espécies afiliadas à *Arthrobacter*. Este gênero é bastante comum em solos e também constituem importante fração na rizosfera e a existência em solos áridos pode ser devido a vários fatores como baixa taxa de crescimento, longo tempo de sobrevivência durante privação de nutrientes e alta resistência à dessecação (CACCIANARI; LIPPI, 1987). Hanna et al. (2012) isolaram micro-organismos rizosféricos, endorizosféricos e endofíticos de várias espécies vegetais de desertos ao norte de Sinai, no Egito, detectando várias espécies de *Bacillus*, semelhantemente ao presente estudo, como *B. megaterium* e *B. pumilus*, além de *B. polymyxa*, *B. macerans* e *B. licheniformis*. Também isolaram representantes da família Enterobacteriaceae como *Enterobacter agglomerans*, *E. sakazakii*, *E. cloacae*, *Serratia adorifera*, *S. liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea* sp., entretanto, nenhuma espécie em comum foi obtida para a amostragem realizada durante o período de seca neste trabalho. No mesmo deserto, em trabalho semelhante, Othman et al. (2003) observaram representantes comuns às famílias Bacillaceae e Enterobacteriaceae obtidas no presente estudo, entretanto, nenhuma espécie similar. Vardharajula et al. (2011) isolaram várias espécies de *Bacillus* da rizosfera de diferentes plantas em áreas semiáridas da Índia. As espécies, caracterizadas como xerotolerantes, foram identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* e *Bacillus subtilis*, além de uma espécie de *Paenibacillus flavisporus*. Kieft (2003) faz uma ampla revisão sobre as comunidades microbianas em desertos quentes, relatando que as bactérias mais comumente cultiváveis pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Arthrobacter*, entre outras, que não foram isoladas aqui. Alguns isolados endofíticos dominantes obtidos de tecidos de cactáceas crescendo em um deserto quente são pertencentes à família Enterobacteriaceae como *Klebsiella* spp., além de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., que não foram observados no presente estudo (PUENTE et al., 2009).

Para o período chuvoso, foram isoladas 440 bactérias da rizosfera de *C. jamacaru* para os seis pontos amostrados. Dentre estas, apenas dezenove foram capazes de crescer em meio

TSA (10%) adicionado de sorbitol, num valor de 0,963 A_w , conforme ilustrado na figura 5.6 (tabela 5.6).



Figura 5.6 - Placas de Petri mostrando o crescimento bacteriano a 28°C, dos isolados obtidos durante o período chuvoso, em meio TSA (10%) adicionado ou não de sorbitol. Da esquerda para a direita observa-se uma crescente concentração de sorbitol adicionado e decrescente atividade de água, partindo de 0,998 A_w até 0,859 A_w . Crescimento bacteriano é observado apenas até 0,963 A_w .

Tabela 5.6 - Linhagens bacterianas obtidas da rizosfera de *Cereus jamacaru* por meio de isolamento em meio TSA (10%) que cresceram em meio com reduzida atividade de água (0,963 A_w) a 28°C

| Linhagem | Família | FAME | | 16S rRNA | | |
|-------------|--------------------|-----------------------------|------------|---------------------------------------|-------|--------------|
| | | Espécie mais próxima | Índice Sim | Espécie mais próxima | Sim | nt dif/total |
| 5.1 RZC 11 | Enterobacteriaceae | <i>Enterobacter cloacae</i> | 0,953 | <i>Enterobacter asburiae</i> | 99,3% | 7/942 |
| 5.2 RZC 17 | Enterobacteriaceae | - | 0,859 | <i>Enterobacter</i> sp. | 99,3% | 7/1008 |
| 5.2 RZC 22 | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> sp. | 0,472 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,8% | 2/1251 |
| 5.2 RZC 40 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,509 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,4% | 7/1209 |
| 5.3 RZC 55 | Bacillaceae | - | 0,741 | <i>Bacillus anthracis</i> | 99,9% | 2/1292 |
| 4.1 RZC 72 | Bacillaceae | - | 0,793 | <i>Bacillus aerophilus</i> | 99,6% | 6/1321 |
| 4.1 RZC 73 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,529 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,6% | 1/1286 |
| 4.3 RZC 107 | Enterobacteriaceae | - | 0,699 | <i>Serratia</i> sp. | 99,6% | 5/1280 |
| 4.3 RZC 108 | Enterobacteriaceae | - | 0,783 | <i>Enterobacter mori</i> | 99,3% | 9/1258 |
| 4.3 RZC 118 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,665 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,8% | 3/1320 |
| 3.3 RZC 158 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 100% | 0/945 |
| 3.3 RZC 165 | Enterobacteriaceae | - | 0,870 | <i>Enterobacter mori</i> | 99,2% | 11/1315 |
| 2.1 RZC 189 | Xanthomonadaceae | <i>Stenotrophomonas</i> sp. | 0,542 | <i>Stenotrophomonas nitrireducens</i> | 99,6% | 5/1370 |
| 2.2 RZC 192 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,755 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,7% | 4/1360 |
| 2.2 RZC 214 | Enterobacteriaceae | - | - | <i>Enterobacter asburiae</i> | 99,5% | 5/955 |
| 2.2 RZC 231 | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> sp. | 0,493 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,9% | 1/1225 |
| 4.2 RZC 297 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,693 | - | 99,78 | 3/1378 |
| 3.1 RZC 305 | Bacillaceae | <i>Bacillus megaterium</i> | 0,530 | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,7% | 4/1365 |
| 2.2 RZC 324 | Bacillaceae | - | - | <i>Bacillus aryabhatai</i> | 99,6% | 5/1279 |

Sim - similaridade

nt dif/total - número de nucleotídeos diferentes pelo número de nucleotídeos totais

Semelhantemente ao que ocorreu para as linhagens do período de seca, a maioria dos isolados que consegue crescer em meio com reduzida atividade de água ($0,963 A_w$) pertence à família Bacillaceae (63,2%), seguida pela família Enterobacteriaceae (31,6%) e apenas um membro da família Xanthomonadaceae, representado pela espécie *Stenotrophomonas nitrireducens* (5,2%), que não foi observado no período de seca. Além disso, a família Paenibacillaceae que foi observada anteriormente com mesma frequência que Enterobacteriaceae não foi detectada durante o período chuvoso. Da mesma forma que ocorreu anteriormente, as linhagens caracterizadas por ácidos graxos como *B. megaterium*, também foram caracterizadas como *B. aryabhatai* por meio do gene 16S rRNA. Chowdhury et al. (2007) ao isolarem micro-organismos em meio livre de nitrogênio, associados a *Lasiurus indicus*, uma gramínea perene tolerante à seca no Deserto de Thar na Índia, observaram uma maior frequência de bactérias Gram-negativas, entre elas uma espécie de *Stenotrophomonas*.

No presente trabalho, as linhagens serão tratadas com o nome do gênero, seguido de sp., mesmo que o índice de similaridade obtido tenha sido alto, pois para determinar uma espécie procariótica com 100% de certeza, é necessário realizar uma abordagem polifásica (VANDAMME et al., 1996), o que inclui além da exploração da informação genotípica, por meio de sequenciamento e hibridização, informações fenotípicas (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

5.2.2.2 Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio a partir de amostras de solo e rizosfera durante o período de seca

O meio NFb propiciou o isolamento de 17 bactérias, enquanto 27 bactérias foram isoladas no meio JMV. A identificação de 6% e 15% destas encontra-se na tabela 5.7, para os meios NFb e JMV, respectivamente.

Tabela 5.7 - Identificação por meio de análise de ácidos graxos e sequenciamento do gene 16S rRNA de linhagens bacterianas obtidas da rizosfera de *Cereus jamacaru* (RZS) e *Pilosocereus gounellei* (XXS) e de solo (SS), durante o período de seca. As bactérias foram isoladas em meio NFb e JMV

| Linhagem | Família | FAME | | 16S rRNA | | |
|----------------|---------------------|--------------------------------------|------------|------------------------------------|-------|--------------|
| | | Espécie mais próxima | Índice Sim | Espécie mais próxima | Sim | nt dif/total |
| NFb 6.1 SS 1 | Sphingomonadaceae | <i>Sphingobium yanoikuyae</i> | 0,713 | - | - | - |
| NFb 6.1 SS 2 | Sphingomonadaceae | - | - | <i>Sphingobium yanoikuyae</i> | 99,2% | 9/1148 |
| NFb 6.3 SS 4 | Gordoniaceae | <i>Gordonia</i> sp. | 0,844 | - | - | - |
| NFb 2.3RZS 5 | Rhizobiaceae | <i>Rhizobium radiobacter</i> | 0,885 | <i>Rhizobium</i> sp. | 99,9% | 1/1149 |
| NFb 3.2 XXS 6 | Methylobacteriaceae | <i>Roseomonas fauriae</i> | 0,868 | - | - | - |
| NFb 2.3 RZS 13 | Rhizobiaceae | - | - | <i>Rhizobium radiobacter</i> | 99,6% | 5/1188 |
| NFb 3.1 RZS 16 | Rhodospirillaceae | <i>Azospirillum brasilense</i> | 0,921 | - | - | - |
| NFb 3.1 RZS 17 | Rhodospirillaceae | <i>Azospirillum brasilense</i> | 0,559 | <i>Azospirillum formosense</i> | 99,3% | 7/1047 |
| JMV 1.3 SS 4 | Rhizobiaceae | - | - | <i>Rhizobium radiobacter</i> | 100% | 0/1207 |
| JMV 1.3 SS 5 | Phyllobacteriaceae | <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> | 0,574 | - | - | - |
| JMV 6.1 RZS 10 | Phyllobacteriaceae | <i>Phyllobacterium rubiacearum</i> | 0,559 | - | - | - |
| JMV 5.1 SS 18 | Pseudomonadaceae | - | 0,818 | <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> | 99,3% | 4/548 |

Sim - similaridade

nt dif/total - número de nucleotídeos diferentes pelo número de nucleotídeos totais

O meio NFb propiciou o isolamento de algumas bactérias conhecidas pela capacidade de fixação de nitrogênio. A espécie *Sphingobium yanoikuyae* é provavelmente capaz de fixar nitrogênio atmosférico, uma vez que também foi isolada por Hashidoko et al. (2006) do rizoplane de arroz, uma espécie que utiliza fonte de nitrogênio na forma de NH_4^+ ao invés de NO_3^- . *Rhizobium radiobacter*, anteriormente classificada como *Agrobacterium tumefaciens* (YOUNG et al., 2001), foi isolada dos dois meios de cultura. O gênero *Rhizobium* compreende bactérias Gram-negativas, de vida livre, presentes no solo ou como endossimbiontes de raízes de leguminosas e até agora é sabido que possuem capacidade de fixar nitrogênio atmosférico somente quando em simbiose. Barnett e Catt (1991) observaram que espécies de rápido crescimento, relacionadas ao gênero *Rhizobium*, foram obtidas de áreas áridas, sugerindo que as interações entre plantas e micro-organismos em áreas mais secas tendem a ser dominadas por micro-organismos de rápido crescimento (HOQUE; BROADHURST; THRALL, 2011). O gênero *Azospirillum*, diferentemente de *Rhizobium*, é do tipo associativo, capaz de fixar nitrogênio de modo assimbiótico (KUMAR; RAO, 2012). A espécie *A. formosense* foi descrita recentemente por Lin et al. (2012), como sendo Gram-negativa, na forma de espiral ou bacilos, não formadora de esporos e diazotrófica, assim como sua espécie mais próxima, *A. brasilense*, com 97,4% de similaridade genética. Talvez devido à esta similaridade e à recente descoberta, a linhagem 3.1 RZS 17 tenha sido caracterizada como *A. brasilense* pelo banco de dados de ácidos graxos e como *A. formosense* com similaridade de 99,3%. Quiviger et al. (1982) detectaram homologia estrutural entre o complexo da nitrogenase (genes *nifHDK*) de *K. pneumoniae* com o DNA total de várias linhagens de *Azospirillum*, sugerindo capacidade de fixação de nitrogênio, entretanto, a regulação da fixação de nitrogênio por *A. brasilense*, uma espécie estudada detalhadamente (FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012) é um tanto complicada, pois responde às alterações nas concentrações de oxigênio e nitrogênio fixado (ZHANG et al., 1997). Também foi isolada uma linhagem caracterizada como *Roseomonas fauriae* (*Roseomonas* genospecies 3) por meio da análise de ácidos graxos, com 0,868 de similaridade. É Gram-negativa e com pigmentação rosa e foi incluída no gênero *Roseomonas* por Rihs et al. (1993), entretanto, vários trabalhos demonstram a próxima relação existente entre *Azospirillum* spp. e *Roseomonas fauriae* (COHEN et al., 2004; MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006), devendo esta última ser reclassificada, portanto, como *Azospirillum brasilense* (HELSEL et al., 2006).

O meio JMV é comumente utilizado para a seleção de bactérias do gênero *Burkholderia* (BALDANI et al., 1996). Entretanto, foram identificadas espécies de *Phyllobacterium* pertencente ao grupo Proteobacteria da ordem Rhizobiales

(BALACHANDAR et al., 2007), também capazes de fixar nitrogênio. Também foi isolada a linhagem caracterizada pelo gene 16S rRNA com similaridade de 99,3% à *Pseudomonas psychrotolerans*. Até pouco tempo, a habilidade de fixação de nitrogênio por espécies do gênero *Pseudomonas* não era reconhecida, entretanto, Yan et al. (2008) sequenciaram o genoma de *Pseudomonas stutzeri* e descobriram genes responsáveis pela fixação de nitrogênio. Uma espécie de *Gordonia* também foi isolada no meio NFb no presente estudo. Mahmoud et al. (2010) também detectaram a presença de *Pseudomonas mediterranea* e *Gordonia polyisoprenivorans* obtidas em meio livre de nitrogênio e sua capacidade de fixar nitrogênio foi confirmada pela redução de acetileno.

5.2.2.3 Seleção de bactérias com características para tolerância à seca

5.2.2.3.1 Crescimento em meio com reduzida atividade de água

Para as 19 bactérias do período chuvoso, crescidas em meio com sorbitol (0,963 A_w , a 28°C), apenas 53% foi capaz de crescer em meio com atividade de água correspondente a 0,919 A_w , o que corresponde às linhagens *Bacillus* spp.. Nove linhagens não cresceram, o que corresponde a *Enterobacter* spp, *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp. e duas linhagens similares a *B. anthracis* e *B. aerophilus*. Para as bactérias obtidas durante o período de seca, isoladas em meio com sorbitol (0,957 A_w , a 40°C), 65% foi capaz de crescer em meio com menor atividade de água. Foram elas: *Bacillus* spp., *Brevibacillus* sp. e *Virgibacillus* sp. Com relação ao gênero *Bacillus*, apenas as linhagens 6.2 RZS 5, 1.1 XXS 31 e 3.1 CFS 38 (similares a *B. cereus*) não cresceram em meio com menor atividade de água. Desta forma, para os dois períodos, apenas representantes da família Bacillaceae foram capazes de crescer em meio com atividade de água correspondente a 0,919 A_w . Também não foi observado crescimento para nenhuma espécie da família Enterobacteriaceae, Paenibacillaceae e demais famílias.

Todos os organismos dependem de água para manutenção de suas atividades fisiológicas e nenhum grupo de organismo desenvolveu a capacidade de sobreviver sem água (POTTS, 1994). O conceito de atividade de água (A_w) é diferente da porcentagem de água existente em um determinado sistema, pois este não considera a quantidade de água termodinamicamente disponível (GRANT, 2004). O valor de A_w que inibe qualquer atividade celular depende se cada organismo (CONNON et al., 2007). Há poucos estudos sobre xerofilismo, pois a definição deste é um tanto complicada, uma vez que para os fungos, o

termo pode ser definido de acordo com as taxas máximas de crescimento ($A_w < 0,950$) ou de acordo com a capacidade de crescimento ($A_w < 0,850$) (HUANG et al., 2009). Para as bactérias, são definidos valores mínimos de A_w em que é observado crescimento, sendo que a maioria cresce na faixa de $0,900 A_w$ e algumas haloarquéias conseguem crescer até $0,750 A_w$. Abaixo deste valor, somente algumas leveduras como *Zygosaccharomyces rouxii* e alguns fungos como *Xeromyces bisporus* conseguem crescer (BROWN, 1976; GRANT, 2004). No presente estudo, as bactérias capazes de crescer em meio de cultura com reduzida A_w podem ser consideradas xerotolerantes, uma vez que conseguem crescer em meio com A_w normal, não necessitando necessariamente e exclusivamente de meio com baixa A_w para crescimento.

5.2.2.3.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

5.2.2.3.2.1 Determinação dos parâmetros

De modo a determinar as melhores condições de produção de EPS, todas as 440 bactérias isoladas durante o período chuvoso em meio TSA (10%) foram testadas quanto à capacidade de produção de EPS a 28°C em cinco diferentes fontes de carbono e em pH levemente ácido (5,5) e neutro (7,5). Para todos os pontos de coleta foram obtidas bactérias capazes de produzir EPS, com variação na porcentagem dependendo da fonte de carbono utilizada e o valor de pH (figura 5.7).

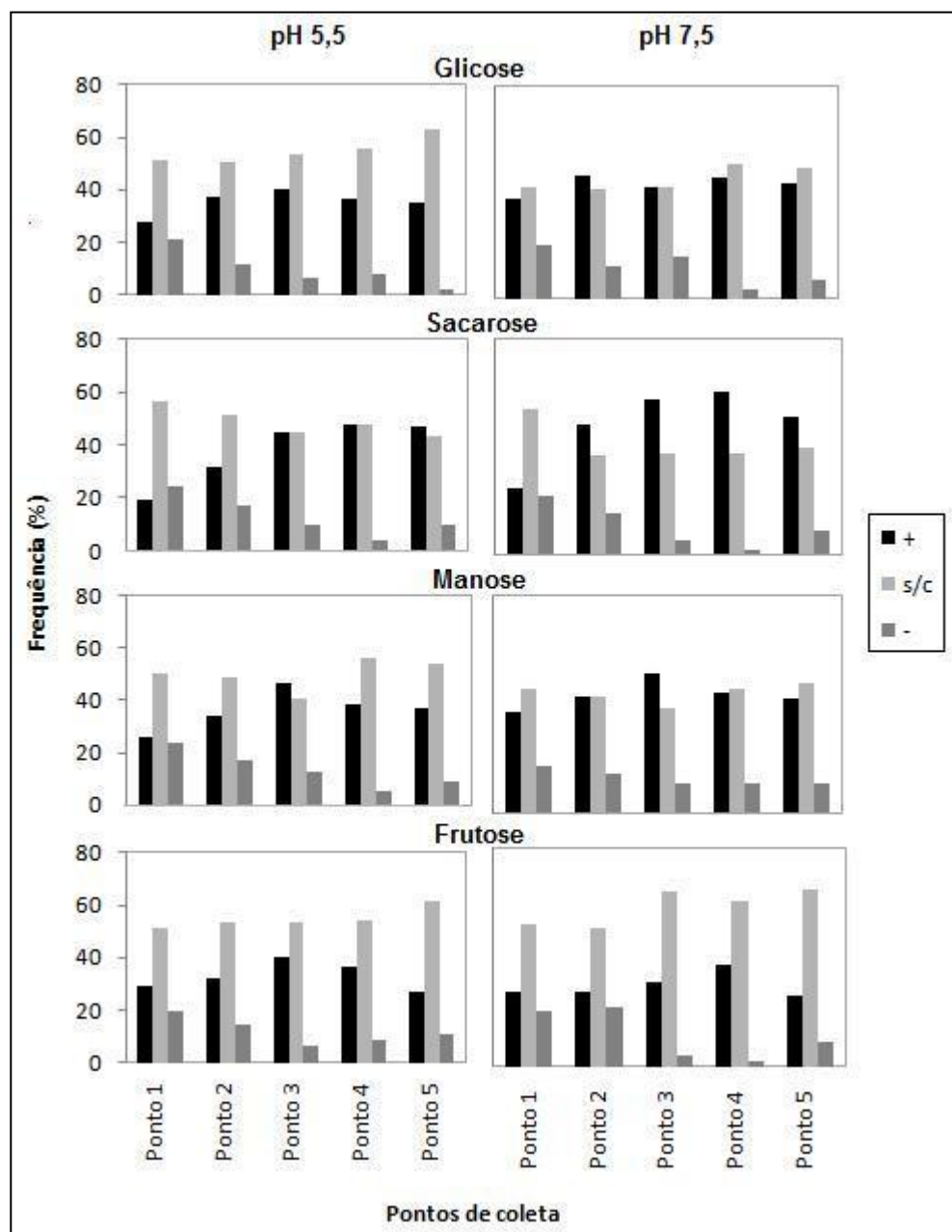


Figura 5.7 - Frequência de isolados obtidos durante o período chuvoso, com capacidade de produção de EPS a 28°C em meio contendo quatro fontes de carbono e dois valores de pH. Produção de EPS (+); ausência de crescimento (s/c); ausência de EPS (-)

A figura 5.8A ilustra a leitura dos testes qualitativos para a produção de EPS, por meio do método de discos, sendo possível visualizar a produção de EPS pelas linhagens, por meio da formação de uma substância mucóide ao redor do disco. A ausência desta substância caracteriza linhagens não produtoras. A confirmação da formação de EPS foi verificada em álcool etílico (PAULO, 2010), onde linhagens que não produzem EPS ao serem misturadas em álcool etílico ficam em suspensão, deixando o meio turvo. Já o EPS produzido pelas linhagens, ao ser misturado com o álcool etílico, é precipitado (figura 5.8B). Observa-se uma maior produção de EPS no meio contendo sacarose em pH 7,5. Com exceção do meio

contendo frutose, o pH 7,5 foi o que propiciou maior frequência de isolados capazes de produzir EPS.

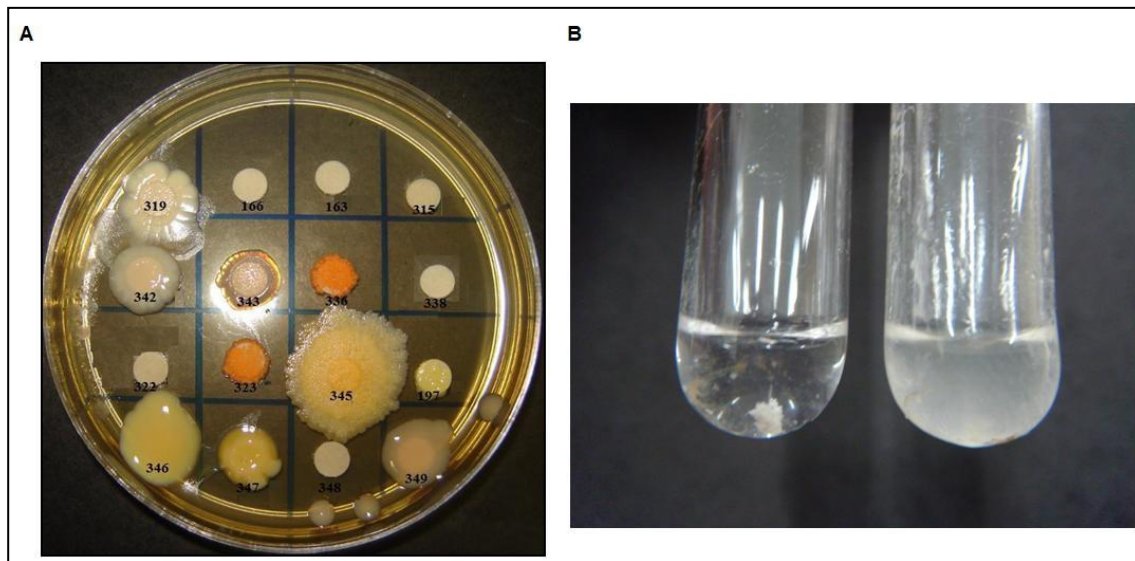


Figura 5.8 - Resultado do teste qualitativo da produção de EPS. A – Teste em placa, com meio de cultura adicionado de sacarose em pH 7,5, com dezesseis linhagens testadas por placa. As linhagens 346 e 349 apresentam uma aparência bem mucóide, sendo ótimas produtoras de EPS. B – Confirmação da produção de EPS em álcool etílico, onde o EPS é precipitado (tubo da esquerda); a ausência de EPS, com presença apenas de massa celular, torna o meio turvo (tubo da direita)

Sabe-se que a fonte de carbono e a temperatura influenciam a síntese de EPS (TALLON et al., 2003). O meio contendo frutose foi o que apresentou a menor frequência de isolados capazes de produzir EPS, nos dois valores de pH. Isso também foi constatado por Looijesteijn et al. (1999) que ao estudarem a produção de EPS por *Lactococcus lactis* observaram uma maior produção de exopolissacarídeos em meio de cultura contendo glicose em detrimento da frutose. A produção de EPS foi estudada também para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em meios contendo várias fontes de carbono (glicose, frutose, sucrose e lactose), observando que a glicose foi a fonte mais eficiente, além de que as concentrações utilizadas também influenciaram, sendo a maior concentração testada (30 g.L^{-1}) a que apresentou melhores resultados (YUKSEKDAG; ASLIM, 2008). Cerning et al. (1994) também testaram a produção de EPS por *Lactobacillus casei* em seis fontes de carbono (galactose, glicose, lactose, sucrose, maltose e milibiose), em diferentes concentrações, sendo a glicose a melhor fonte. Desta forma, a composição do meio e as condições de cultivo interferem diretamente na produção dos exopolissacarídeos microbianos (BARBOSA et al., 2004), além de também afetarem sua composição (CERNING et al., 1994; FLEMMING et al., 2011). Mozzi et al. (1996) observaram síntese máxima de EPS por *L. casei* em pH 6,0 e temperatura de 30°C , entretanto, foi observada produção ideal

em pH 4,0. A diferença na produção de EPS observada entre as linhagens do presente estudo, também pode ser devido ao fato de a bactéria não estar expressando a produção de EPS nestas condições, tendo sido identificados quatro agrupamentos distintos de genes de EPS em *Streptococcus thermophilus* (BROADBENT et al., 2003).

5.2.2.3.2.2 Avaliação qualitativa da produção de EPS

Como para os isolados obtidos do período chuvoso, o meio contendo sacarose em pH 7,5 foi o que propiciou a maior produção de EPS, este mesmo meio foi utilizado para os isolados obtidos do período de seca e para os isolados obtidos durante o período chuvoso, que cresceram em meio com reduzida atividade de água.

Das 19 linhagens obtidas durante o período chuvoso, que cresceram em meio com reduzida atividade de água (0,963 A_w), 90% foi capaz de formar EPS a 28°C (figura 5.9). As linhagens correspondem a *Bacillus* spp., *Enterobacter* sp. e *Serratia* sp. A única linhagem que não produziu EPS nestas condições, foi 2.1 RZC 189, caracterizada como *Stenotrophomonas* sp.. Da mesma forma, Joshi et al. (2008) não observaram a produção de EPS por *Stenotrophomonas* sp. isolada de um lago alcalino na Índia.

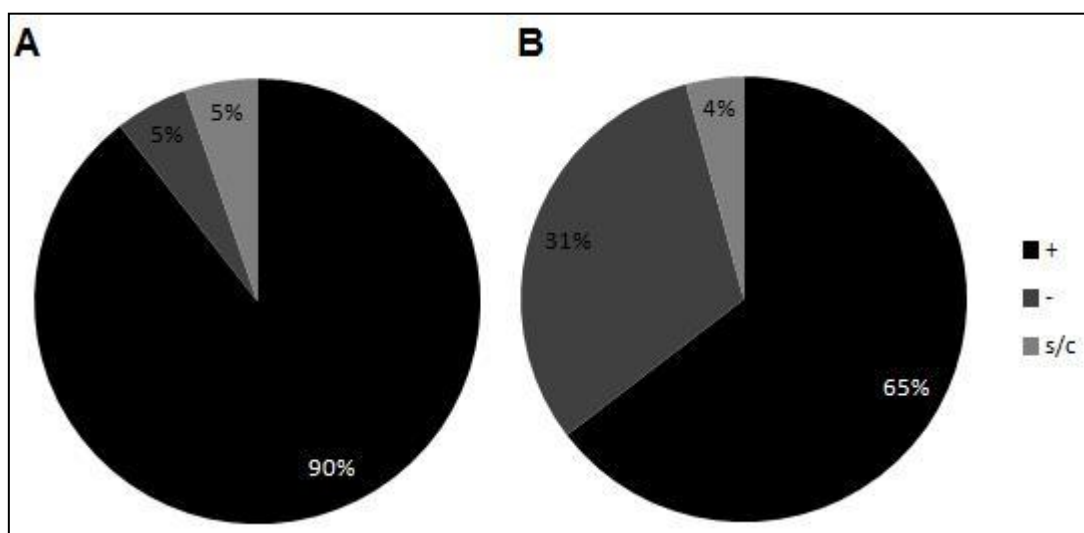


Figura 5.9 - Frequência de produção de EPS a 28°C, em meio contendo sacarose em pH 7,5, pelos isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B). Produção de EPS (+); ausência de crescimento (s/c); ausência de EPS (-)

Para o período de seca, das 48 linhagens avaliadas, 65% foi capaz de produzir EPS (figura 5.9). A produção foi verificada por algumas linhagens de *Bacillus* spp., *Brevibacillus* sp., *Virgibacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Cellulosimicrobium* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp. e uma linhagem pertencente à família Enterobacteriaceae, não atribuída a nenhum gênero.

Sete linhagens de *Bacillus* spp., com similaridade a *Bacillus subtilis*, *B. tequilensis* e *B. cereus* não foram capazes de produzir EPS a 28°C, entretanto, quando submetidas a 40°C, foi possível observar a produção de bastante EPS (dados não mostrados). Como já discutido anteriormente, entre outros fatores, a temperatura afeta diretamente a produção de EPS (BROADBENT et al., 2003). Para *Pseudomonas cepacia*, Allison e Goldsbrough (1994), observaram uma maior produção de EPS a 35°C.

A produção de EPS por espécies de *Bacillus*, como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis* é bastante relatada (CHOWDHURY, ET AL., 2011; KUMAR et al., 2004; LEE et al., 1997; MAUGERI et al., 2002; SCHUCH; FISCHETTI, 2009; TOLEDO et al., 2008; YUAN et al., 2001; ZHAO; ZHOU; WU, 2010). *Paenibacillus jamilae* também produz EPS (AGUILERA et al., 2001). Membros da família Enterobacteriaceae, como *Enterobacter* e *Klebsiella* também são reportados com a produção de um tipo de EPS caracterizado como ácido colânico (RÄTTÖ et al., 2006). Chen, Lee e Mao (2004) ao estudarem *Escherichia coli*, observaram que células deficientes na produção de ácido colânico foram mais suscetíveis à NaCl e H₂O₂ do que células selvagens, atribuindo um papel importante deste EPS na proteção celular contra estresse osmótico e oxidativo. Essa proteção celular conferida por EPS contra condições ambientais adversas, também foi detectada por Wai et al. (1998), em células de *Vibrio cholerae* contra os mesmos tipos de estresses anteriores. Ashraf et al. (2004) sugerem que a inoculação de bactérias (*Bacillus* sp., *Bacillus insolitus* e *Aeromonas hydrophila*) produtoras de EPS em plantas sensíveis à salinidade poderia aliviar o estresse salino. O EPS funcionaria para atração de cátions de Na⁺, o que reduziria o conteúdo de Na⁺ disponível à absorção pelas plantas. Para verificar a proteção contra a dessecação, conferida por EPS, Nocker et al. (2012) avaliaram a viabilidade de algumas espécies bacterianas suplementadas com algumas substâncias, observando que os exopolissacarídeos mostraram claramente um efeito protetor contra a dessecação. A ausência de formação de EPS pela bactéria *Myxococcus xanthus* reduziu significativamente sua viabilidade em longo prazo e a resistência a condições estressantes (HU et al., 2012). Yi, Huang e Ge (2008) ainda associam a produção de EPS produzido por linhagens de *Enterobacter* spp., *Azotobacter* sp. com a solubilização de fosfato de cálcio tricálcico.

5.2.2.3.3 Formação de biofilme

5.2.2.3.3.1 Determinação dos parâmetros

Para o período chuvoso, apenas nove isolados foram selecionados aleatoriamente e avaliados com relação às condições de crescimento e formação de biofilme, de modo a determinar os melhores parâmetros.

Primeiramente, com relação ao crescimento foram verificados alguns parâmetros como agitação ou não do meio e temperatura de crescimento e a influência de cada um sobre os isolados (tabela 5.8). Todos os isolados cresceram bem a uma temperatura de 28°C sob agitação, não havendo diferenças significativas de crescimento entre os isolados. A não-agitação do meio provocou diferenças significativas entre o crescimento dos isolados nas duas temperaturas testadas, sendo que as linhagens 5.2 RZC 17, 4.3 RZC 108 e 2.2 RZC 214, todas *Enterobacter* sp., cresceram mais que as outras a 28°C. Já a 40°C, todas as linhagens com exceção de 5.3 RZC 55 (similar a *B. anthracis*) e 2.1 RZC 189 (*Stenotrophomonas* sp.) cresceram significativamente mais.

Tabela 5.8 - Comparação entre os dezesseis isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos durante o período chuvoso. Crescimento dos isolados em meio TSB (10%) sem agitação a 40°C e 28°C e com agitação a 28°C

| Isolados | Sem agitação | | Com agitação |
|-------------|-----------------------|----------|--------------|
| | 28°C | 40°C | 28°C |
| 5.2 RZC 17 | 0,636 ¹ aA | 0,527 aA | 0,628 aA |
| 5.2 RZC 40 | 0,486 bA | 0,644 aA | 0,624 aA |
| 5.3 RZC 55 | 0,197 dB | 0,281 bB | 0,505 aA |
| 4.3 RZC 108 | 0,747 aA | 0,515 aB | 0,722 aA |
| 3.3 RZC 158 | 0,417 bA | 0,604 aA | 0,497 aA |
| 2.1 RZC 189 | 0,303 cA | 0,433 bA | 0,558 aA |
| 2.2 RZC 192 | 0,375 bA | 0,579 aA | 0,558 aA |
| 2.2 RZC 214 | 0,691 aA | 0,715 aA | 0,525 aB |
| 2.2 RZC 324 | 0,414 bA | 0,520 aA | 0,455 aA |

¹ Média de 3 repetições. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas e maiúsculas não diferem estatisticamente entre si nas colunas e linhas, respectivamente, pelo teste de Scott-Knott a 5%

As diferentes condições de crescimento não afetaram significativamente, 66,7% dos isolados. A temperatura de 40°C afetou significativamente apenas um isolado (4.3 RZC 108) caracterizado como *Enterobacter* sp., que apresentou melhor crescimento a 28°C. A agitação afetou significativamente dois isolados, 5.3 RZC 55 (similar a *B. anthracis*) e 2.2 RZC 214 (*Enterobacter* sp.), que apresentaram melhor crescimento no cultivo com agitação e estático, respectivamente.

Visto que não houve muita interferência das condições de cultivo no crescimento da maioria das bactérias, os testes de formação de biofilme foram realizados em cultivo estático a 40°C.

5.2.2.3.3.2 Formação de biofilme em superfície abiótica sob adição de sorbitol

A formação de biofilme para nove isolados obtidos durante o período chuvoso foi realizada em quatro concentrações diferentes de sorbitol (0,03M; 0,06M; 0,30M e 0,60M), simulando diferentes níveis de estresse. Em meio TSB (10%) 89% das linhagens não produziram biofilme (figura 5.10A), enquanto que com a adição de sorbitol, houve redução desta porcentagem. Sendo que, das nove bactérias testadas, 44% e 22% formaram pouco biofilme a 0,03M e 0,30M de sorbitol, respectivamente.

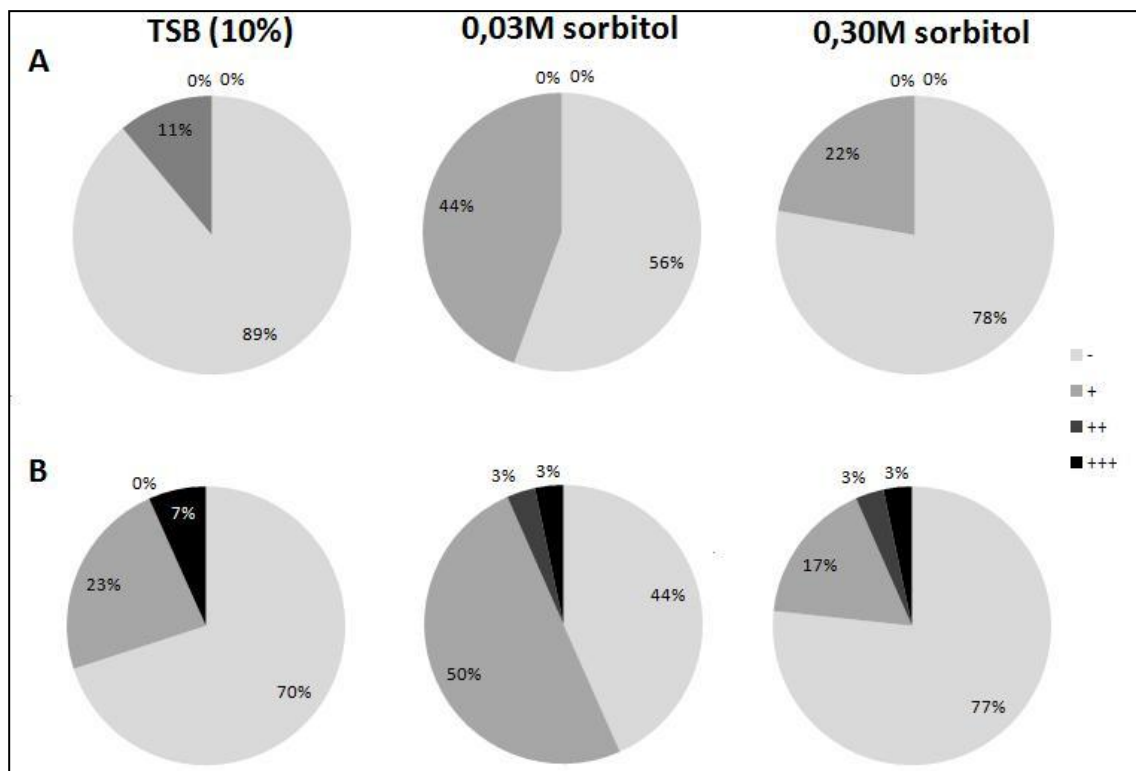


Figura 5.10 - Frequência de isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B), com capacidade de formação de biofilme em meio TSB (10%), meio TSB (10%) com 0,03M de sorbitol e meio TSB (10%) com 0,30M de sorbitol a 40°C em cultivo estático. A quantidade de biofilme formada foi baseada nos valores de absorbância obtidos, onde: $DO_{560m} < 0,1$ (-) (ausência de formação); $DO_{560m} 0,1-0,2$ (+) (baixa formação); $DO_{560m} 0,2-1,0$ (++) (média formação) e $DO_{560m} > 1,0$ (+++) (alta formação) de biofilme

Apenas duas concentrações de sorbitol adicionadas ao meio afetaram significativamente a formação de biofilme pelos nove isolados testados. A menor concentração de sorbitol (0,03M) e a concentração de 0,60M não afetaram significativamente a produção de biofilme. Entretanto, as concentrações de 0,06M e 0,30M de sorbitol tiveram efeito significativo na produção de biofilme, sendo que o isolado 5.2 RZC 17 (*Enterobacter* sp.) foi o que formou mais biofilme a 0,06M e 0,30M de sorbitol (figura 5.11). Os isolados

4.3 RZC 108, 2.2 RZC 214 (*Enterobacter* spp.) e 2.2 RZC 324 (*Bacillus* sp.) produziram significativamente mais biofilme em uma condição mais estressante (0,30M de sorbitol).

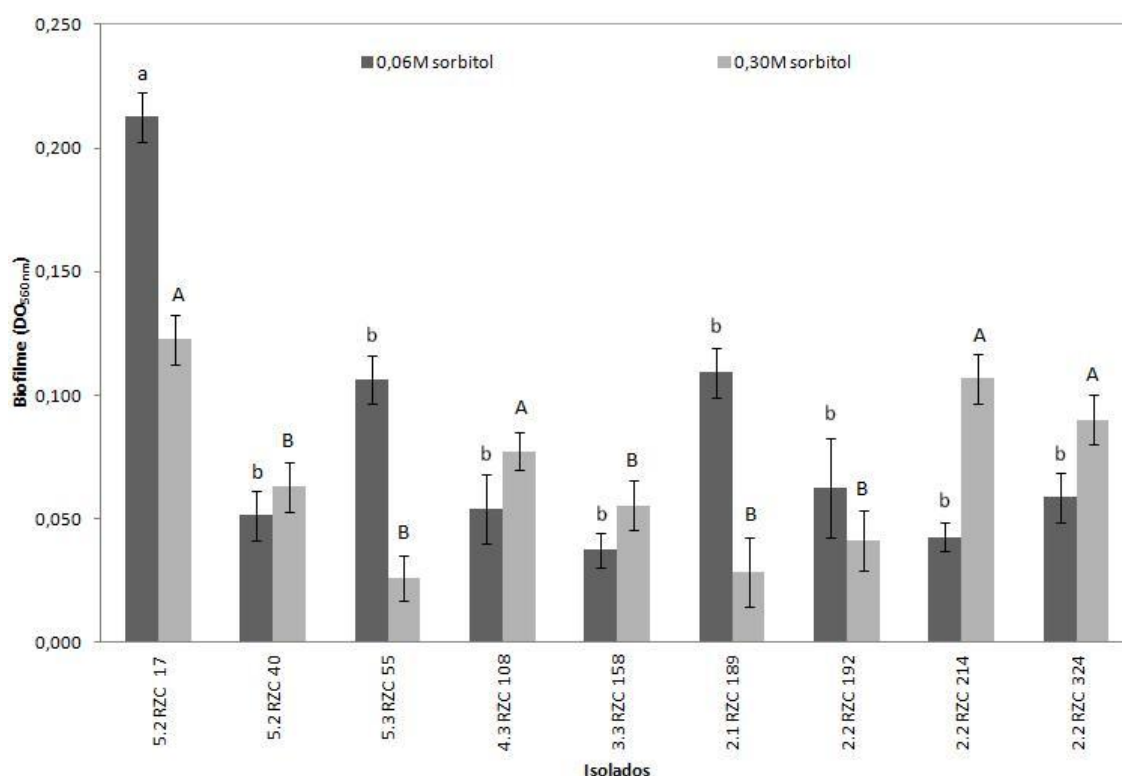


Figura 5.11 - Formação de biofilme por nove isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água, do período chuvoso a 0,06M e 0,30M de sorbitol. Médias seguidas de letras de mesmo tamanho, porém diferentes, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para três repetições

Para as bactérias obtidas durante o período de seca, a formação de biofilme foi testada apenas em duas concentrações de sorbitol (0,03M e 0,30M), por haver um maior número de isolados. Das quarenta e oito bactérias, trinta foram selecionadas aleatoriamente para a produção de biofilme. Da mesma forma que ocorre para os isolados do período chuvoso, o sorbitol induziu a formação de biofilme, principalmente na concentração de 0,03M. Desta forma, 56% e 23% dos isolados formaram biofilme nas concentrações de 0,03M e 0,30M de sorbitol, respectivamente (figura 5.10B). Apenas dois isolados, 3.3 XXS 22 (similar a *B. tequilensis*) e 1.3 SS 57 (similar a *Bacillus subtilis*) foram capazes de formar bastante biofilme em meio TSB (10%). Entretanto, com a adição de sorbitol a 0,03M, foi observada grande formação de biofilme somente pela segunda linhagem. Como observado, o sorbitol agiu como indutor de biofilme em algumas linhagens. Khan et al. (2011) sugerem que a formação de biofilme pode ser induzida por algumas substâncias. Morikawa et al. (2006) observaram aumento na produção de biofilme por *B. subtilis* com incremento da concentração de Mn^{2+} e glicerol adicionados ao meio de cultura. Segundo Hallsworth et al. (1998), o

glicerol quando adicionado a algum meio ou solução também reduz sua atividade de água. Na concentração de 0,30M de sorbitol, o isolado 6.1 XXS 11' (similar a *Virgibacillus pantothenicus*) formou bastante biofilme (absorbância equivalente a 1,819), assim como o isolado 4.1 RZC 53 (similar a *Paenibacillus cineris*), cuja absorbância foi de 0,812. Santos et al. (2010) verificaram a produção de pouco biofilme por *Virgibacillus pantothenicus* associado a esponjas marinhas. De acordo com Sarkar, Roy e Mukherjee (2011), *V. pantothenicus* é uma espécie produtora de biofilme, assim como *Bacillus subtilis* (BRANDA et al., 2006). A formação de biofilme por *Bacillus subtilis* é um processo complexo que envolve a secreção de surfactina, um lipopeptídeo que também atua como agente antimicrobiano (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004).

Durante o período chuvoso, foi observada pouca formação de biofilme por *Enterobacter* spp. e *Bacillus* sp.. A formação de biofilme por espécies da família Enterobacteriaceae é relatada para a espécie *E. sakazakii* (LEHNER et al., 2005) e para outras espécies (HURRELL et al., 2009). A formação de bastante biofilme por *B. megaterium* foi detectada por Amalraj, Maiyappan e Peter (2012).

Como já discutido anteriormente, a formação de EPS oferece proteção celular contra condições ambientais adversas e ainda contribui para a formação de biofilme (CHANG et al., 2007; WAI et al., 1998). Mais recentemente, Seminara et al. (2012) observaram que a produção de EPS é crucial para o espalhamento do biofilme em *B. subtilis*. O biofilme, por sua vez, pode auxiliar na colonização radicular durante o crescimento vegetal (RAMEY et al., 2004) e também pode proteger as células da privação de nutrientes, alterações no pH, radicais livres de oxigênio, antibióticos, fagocitose (JEFFERSON, 2004) e condições limitantes de água (CHANG et al., 2007). Alguns exopolissacarídeos são altamente hidratados devido à incorporação de água em sua estrutura por meio de pontes de hidrogênio, o que poderia prevenir a dessecação em alguns biofilmes (FLEMMING; WINGENDER; MAYER, 2000). Desta forma, a verificação da formação de biofilme pelos isolados neste estudo, é uma característica interessante, pois podem auxiliar na tolerância à dessecação.

5.2.2.4 Seleção de bactérias com características de RPCP

5.2.2.4.1 Mecanismos diretos

5.2.2.4.1.1 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

5.2.2.4.1.1.1 Avaliação quantitativa

Dentre as dezenove bactérias obtidas durante o período chuvoso, que cresceram em meio com reduzida atividade de água, foi observada produção de AIA ($> 1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por todas as linhagens (figura 5.12A).

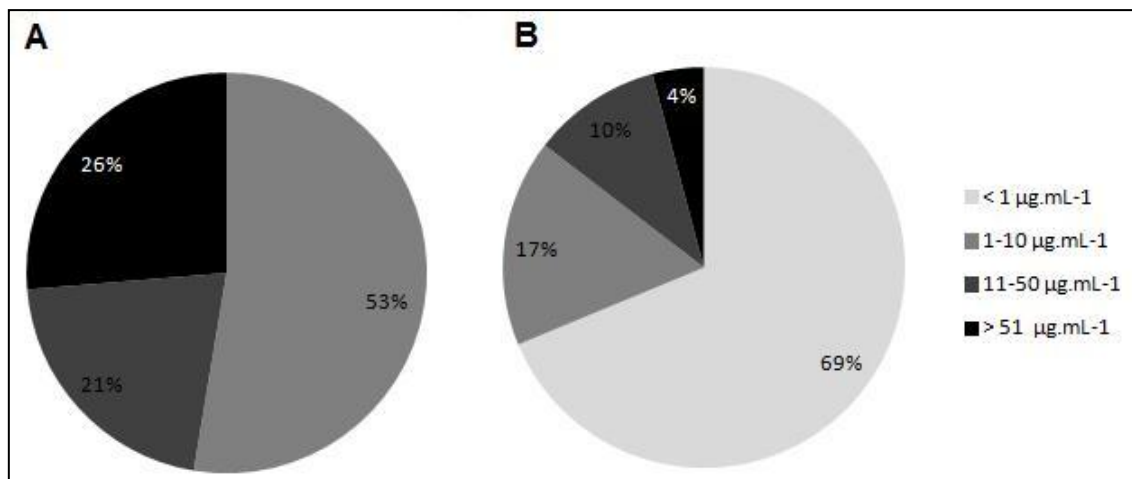


Figura 5.12 - Frequência de isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B) com capacidade de produção de AIA. De acordo com a concentração de AIA detectada, temos: < 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (+) (baixa produção); 3) 1-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (++) (média produção); 4) 11-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (+++) (alta produção); 5) > 51 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (++++) (elevada produção) de AIA

Cerca de 26%, o que corresponde a cinco linhagens, 5.1 RZC 11, 5.2 RZC 17, 4.3 RZC 108, 3.3 RZC 165 (*Enterobacter* spp.) e 4.3 RZC 107 (*Serratia* sp.) pertencentes à família Enterobacteriaceae, com exceção do isolado 2.2 RZC 214 (similar a *Enterobacter asburiae*), foram capazes de produzir AIA acima de $51 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, a linhagem 5.2 RZC 17 produziu significativamente mais AIA do que as demais (figura 5.13).

Dos quarenta e oito isolados do período de seca, apenas 30% produziu AIA numa concentração maior que $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (figura 5.12B). Apenas dois isolados (4%), 1.1 XXS 28 (*Pantoea* sp.) e 6.3 XXS 68 (*Arthrobacter* sp.) produziram uma elevada concentração de AIA, 113,57 e 135,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, (figura 5.14). Para os dois períodos amostrados, foi observado que as espécies de *Bacillus* produziram AIA abaixo de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

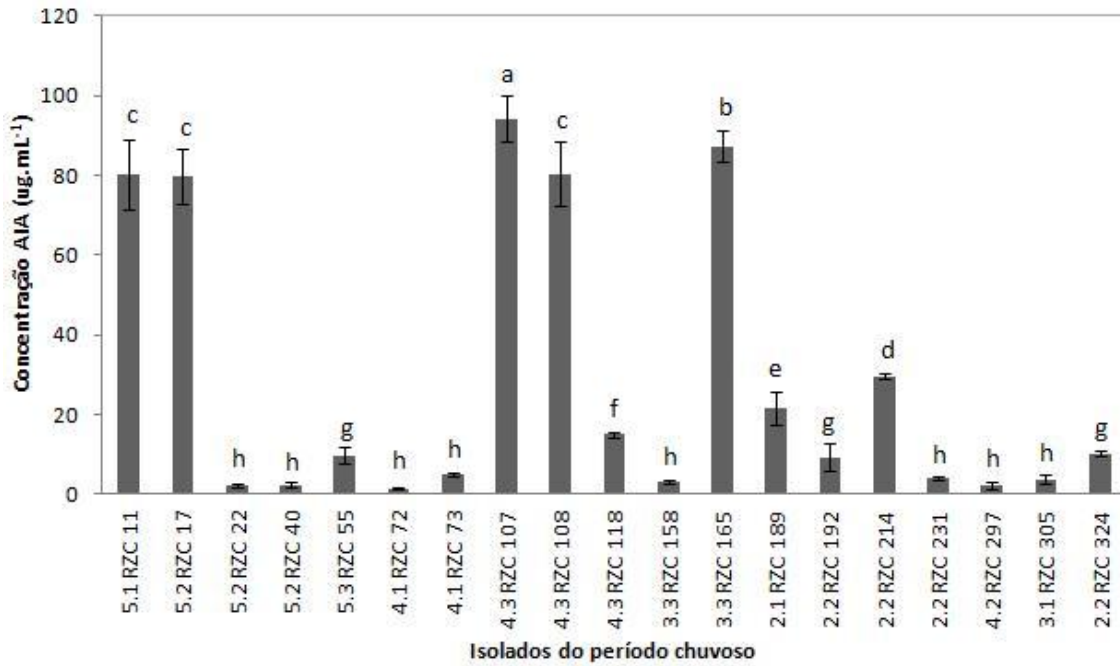


Figura 5.13 - Produção de AIA por isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para três repetições. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade

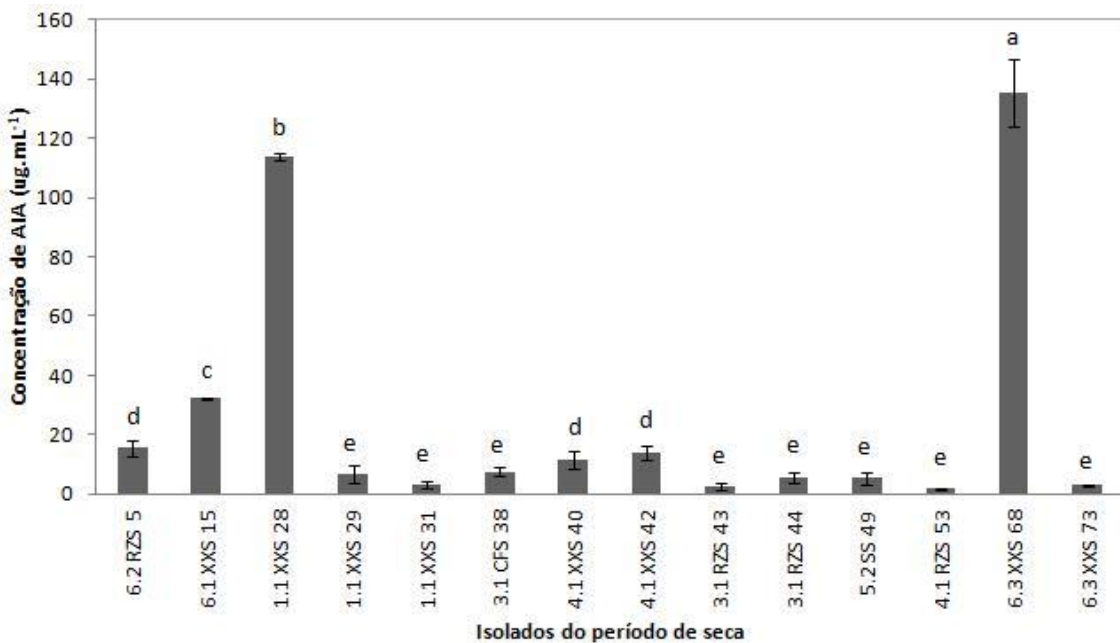


Figura 5.14 - Produção de AIA por isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, sendo exibidos somente aqueles cuja produção foi superior a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para três repetições. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade

A maioria das linhagens mostrou habilidade em sintetizar AIA na presença do precursor L-triptofano. As linhagens tiveram variação quanto a esta síntese, e até mesmo linhagens pertencentes ao mesmo gênero como *Bacillus*, produziram diferentes quantidades de AIA em meio líquido. Isso pode ser devido ao fato de que a síntese de AIA pode ser

influenciada pelas condições de cultura, estágio de crescimento e disponibilidade de substrato (MIRZA et al., 2001). A verificação da capacidade de produção de AIA pelas linhagens é importante, pois este hormônio é responsável pela regulação de processos celulares e de desenvolvimento dos vegetais (KENDE; ZEEVAART, 1997). Entretanto, a habilidade das bactérias em produzir AIA na rizosfera dependerá de muitos fatores, como a disponibilidade de algum precursor como o L-triptofano e ainda, a simples síntese de AIA pelas linhagens não garante que a planta absorverá tal hormônio (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1993).

Como mostrado, as linhagens pertencentes à família Enterobacteriaceae produziram elevadas concentrações de AIA. Essa capacidade é relatada por vários autores como Souchie et al. (2007), em que um isolado desta mesma família produziu AIA equivalente a $7.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; *Serratia marcescens*, produziu entre 8,1 a $20,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dependendo da temperatura de incubação (SELVAKUMAR et al., 2008); *Pantoea* sp. produziu mais de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FARINA et al., 2012); *Pantoea* spp. e *Pantoea agglomerans* produziram de 121,6 e 194,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e *Enterobacter* spp. produziram de 98,4 a $258,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MONTAÑEZ et al., 2012). Prischl et al. (2012) observaram a produção de AIA por endófitos de milho pertencentes a várias classes: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Flavobacteria, Sphingobacteria, Gammaproteobacteria, incluindo um representante da família Enterobacteriaceae como *Pantoea* e Bacilli, com apenas dois isolados, um de *Bacillus* e outro de *Paenibacillus*. A produção de AIA por *Bacillus* spp. parece ser baixa. Ahmad et al. (2008) observaram que *Bacillus* sp. produziu $7,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Pereira et al. (2012) verificaram a produção de AIA por *Bacillus* sp. e *Bacillus subtilis* variando de 1,92 a $19,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Erturk et al. (2010) mediram a concentração de AIA por duas linhagens bacterianas: *Bacillus simplex* e *Paenibacillus polymyxa*, observando concentrações de $33,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $32,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Apesar de sua importância no desenvolvimento do sistema radicular da planta hospedeira (PATTEN; GLICK, 2002) e engatilhamento de vários mecanismos de defesa que conferem tolerância a diversas condições de estresse como produção de trealose, lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos e biofilme (BIANCO et al., 2006), se produzido em altas concentrações, é capaz de bloquear o crescimento de leveduras. Por outro lado, baixas concentrações deste hormônio podem induzir a adesão em plantas, o que pode levar ao processo de infecção dos tecidos vegetais (PRUSTY et al., 2004).

5.2.2.4.1.2 Solubilização de fosfato

5.2.2.4.1.2.1 Avaliação qualitativa

No meio NBRIP, após o período de incubação, foi observado o halo de solubilização apenas para algumas linhagens (figura 5.15).

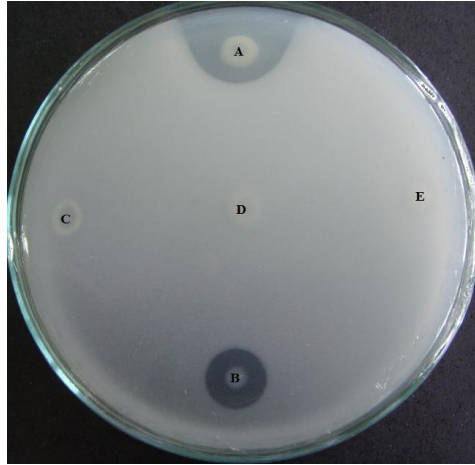


Figura 5.15 - Solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso e de seca. Presença de halo de solubilização pelas linhagens 1.1 XXS 28 (*Pantoea* sp.) e 1.1 XXS 29 (*Enterobacter* sp.) (A e B, respectivamente). Não foi observado halo de solubilização pelos isolados 4.1 RZS 64 (*Bacillus* sp.), 3.3 XXS 27 (*Brevibacillus* sp.) e 4.1 RZS 52 (*Bacillus* sp.) (C, D e E, respectivamente)

Dos dezenove isolados obtidos para o período chuvoso, que cresceram em meio com reduzida atividade de água, 74% não formou halo de solubilização. Para as quarenta e oito linhagens obtidas durante o período de seca, 62,5% não foi capaz de solubilizar fosfato em meio sólido. Dos que apresentaram halo, todos do período chuvoso apresentaram de média a alta solubilização com IS variando de 2,20 a 3,06. Para as linhagens do período de seca todas, com exceção de uma, apresentaram baixa solubilização, com o índice variando de 1,00 a 1,96 (tabela 5.9). Apenas o isolado 1.1 XXS 29 (*Enterobacter* sp.) apresentou alta solubilização, com IS de 3,44.

Tabela 5.9 - Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 15 dias de incubação. Médias obtidas de três repetições

| Período | Isolado | Ø Halo (mm) | Ø Colônia (mm) | IS |
|---------|-------------|-------------|----------------|------|
| Chuvoso | 5.1 RZC 11 | 1,70 | 0,75 | 2,27 |
| | 5.2 RZC 17 | 1,65 | 0,65 | 2,54 |
| | 4.3 RZC 107 | 1,65 | 0,75 | 2,20 |
| | 4.3 RZC 108 | 2,60 | 0,85 | 3,06 |
| | 3.3 RZC 165 | 1,80 | 0,65 | 2,77 |
| Seca | 6.1 XXS 12 | 1,10 | 0,85 | 1,29 |
| | 3.3 XXS 20 | 0,67 | 0,50 | 1,33 |
| | 3.3 XXS 21 | 0,70 | 0,55 | 1,27 |
| | 1.1 XXS 28 | 1,83 | 0,93 | 1,96 |
| | 1.1 XXS 29 | 2,07 | 0,60 | 3,44 |
| | 1.1 XXS 30 | 0,55 | 0,40 | 1,38 |
| | 1.1 XXS 32 | 0,60 | 0,50 | 1,20 |
| | 3.1 CFS 33 | 0,90 | 0,90 | 1,00 |
| | 4.1 XXS 40 | 1,10 | 0,93 | 1,18 |
| | 4.1 XXS 42 | 1,10 | 0,85 | 1,29 |
| | 3.1 RZS 44 | 0,80 | 0,70 | 1,14 |
| | 5.2 SS 49 | 0,80 | 0,63 | 1,26 |
| | 4.1 RZS 53 | 0,63 | 0,50 | 1,27 |
| | 4.1 RZS 63 | 1,23 | 0,80 | 1,54 |
| | 6.3 XXS 69 | 1,10 | 0,93 | 1,18 |
| | 6.3 XXS 71 | 0,57 | 0,37 | 1,55 |
| | 6.3 XXS 73 | 0,93 | 0,60 | 1,56 |
| | 6.3 XXS 74 | 0,80 | 0,65 | 1,23 |

IS – Índice de solubilização de fosfato

De acordo com Nautiyal (1999), alguns isolados podem ser capazes de solubilizar fosfato, porém, muitas vezes não o fazem em meio sólido. Desta forma, todas as linhagens foram avaliadas quantitativamente com relação à solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido.

5.2.2.4.1.2.2 Avaliação quantitativa

Para o período chuvoso, 37% das linhagens apresentou elevada solubilização de Ca-P (acima de $501 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (figura 5.16A). Estas linhagens correspondem a 5.1 RZC 11, 5.2 RZC 17, 4.3 RZC 108, 3.3 RZC 165, todas pertencentes à *Enterobacter* spp.; 4.3 RZC 107 (*Serratia* sp.); 5.2 RZC 40 e 3.1 RZC 305 (*Bacillus* spp.). As linhagens pertencentes à família Enterobacteriaceae produziram os valores mais elevados de P solúvel (acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Já as linhagens de *Bacillus* spp. solubilizaram $506,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $609,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma que aconteceu para a produção de AIA, a linhagem 2.2 RZC 214, embora pertencente à família Enterobacteriaceae não seguiu os padrões de elevada solubilização, solubilizando apenas $65,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Apenas uma linhagem (5.3 RZC 55,

similar a *B. anthracis*) solubilizou apenas $31,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O restante das linhagens, todas pertencentes a *Bacillus* spp. e uma *Stenotrophomonas* sp. teve solubilização variando de média (16%) a alta (42%).

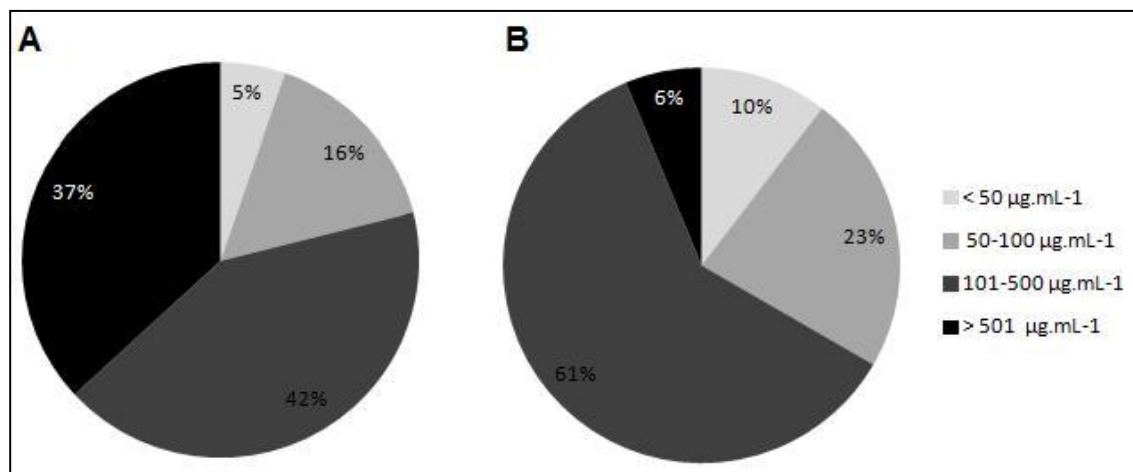


Figura 5.16 - Frequência de isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B) com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio NBRIP líquido. De acordo com a concentração de P solúvel detectado, temos: < $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+) (baixa solubilização); $50\text{-}100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++) (média solubilização); $101\text{-}500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (+++) (alta solubilização); $> 501 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (++++) (elevada solubilização) de P-Ca

Para os isolados obtidos durante o período de seca, 6% foi capaz de solubilizar Ca-P numa concentração acima de $501 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (figura 5.16B), com P solúvel de mais de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que corresponde às linhagens 1.1 XXS 28 (*Pantoea* sp), 1.1 XXS 29 (*Enterobacter* sp.) e 5.2 SS 49, todas pertencentes à família Enterobacteriaceae. Os isolados pertencentes à família Bacillaceae parecem ser solubilizadores de fosfato medianos, enquadrando-se dentro da faixa de 29 até $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os isolados 4.1 RZS 53 (*Paenibacillus* sp.) e 6.3 XXS 71 (*Cellulosimicrobium* sp.) solubilizaram pouco fosfato, com P solúvel de 24,95 e $33,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Visto que os solubilizadores mais potentes pertencem à família Enterobacteriaceae, a porcentagem de linhagens capazes de elevada solubilização foi menor para o período de seca, justamente devido à porcentagem de representantes desta família ser menor para este período do que para o período chuvoso. A habilidade de solubilização de fosfato por representantes da família Enterobacteriaceae também tem sido demonstrada por vários estudos (COLLAVINO et al., 2010). *Enterobacter* sp. obtido de solos com baixa concentração de P, exibiu alto nível de solubilização (568 a $642 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (KUMAR; BHARGAVA; RAI, 2010). O mesmo foi observado por Chung et al. (2005), onde isolados de *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. e *Klebsiella* sp., todos pertencentes à família Enterobacteriaceae solubilizaram cerca de $96,2$ a

142,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de fosfato. *Enterobacter* sp. solubilizou 362,72 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (KUMAR et al., 2012a) e *E. asburiae* também foi caracterizada como solubilizadora de fosfato (Zhao et al., 2011) e neste estudo uma linhagem similar a esta espécie apresentou a maior solubilização *in vitro*. A solubilização de fosfato por espécies de *Bacillus* também foi constatada por Çakmakçi et al. (2010), com *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. pumilus*, além de *Brevibacillus reuszeri* e *Paenibacillus* spp., todas comuns ao estudo em questão.

Embora abundante nos solos, tanto na forma orgânica quanto inorgânica, o fósforo é o segundo nutriente limitante ao crescimento de plantas no solo. Isto é devido ao fato do fósforo biodisponível encontrar-se em concentrações muito baixas ou ligar-se facilmente a Ca, Fe e Al, o que ocasiona sua precipitação (GYANESHWAR et al., 2002). Os solos obtidos no presente estudo são levemente acidificados ou neutros (pH variando de 4,1 a 6,3), estando o P mais associado com Fe e Al, entretanto, os solos do Nordeste tendem a ser levemente ácidos ou alcalinos (PEREIRA e FARIA, 1998), sendo o P associado a Ca, por isso a escolha do meio NBRIP com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Os micro-organismos podem desempenhar um importante papel na disponibilidade de fósforo para as plantas (RICHARDSON, 2001). Desta forma, a busca por micro-organismos capazes de solubilizar fosfato é uma alternativa interessante para substituir os fertilizantes químicos (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007; MEHRVARZ; CHAICHI; ALIKHANI, 2008).

Os micro-organismos solubilizam o fosfato inorgânico por meio da liberação de ácidos orgânicos e pela redução do pH (CHEN et al., 2006; KHAN et al., 2009). Chen et al. (2006) relatam a produção de ácidos orgânicos como ácido cítrico, ácido glucônico, ácido succínico, ácido láctico e ácido propiônico por *Bacillus megaterium*, *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter* sp., *Arthrobacter ureafaciens*, *Serratia marcescens*, *Delftia* sp., *Chryseobacterium* sp., *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Gordonia* sp. Zaidi et al. (2009) ainda relacionam outros mecanismos relacionados à solubilização de fosfato como produção de ácidos inorgânicos, produção de exopolissacarídeos, produção de H_2S , produção de fosfatases ácidas e fitases e produção de H_2CO_3 . Alguns autores relatam acidificação do meio (WU et al., 2012) e ainda observam uma correlação inversa entre pH e liberação de P, o que indica que a solubilidade de fosfato é diretamente correlacionada com os ácidos orgânicos produzidos (SON et al., 2006). No presente trabalho, para as linhagens obtidas durante o período chuvoso, foram observados valores finais de pH variando de 3,9, para a linhagem 5.1 RZC 11, que solubilizou 1780,48 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 6,0, para a linhagem 5.3 RZC 55 que solubilizou apenas 31,21 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para este caso, foi observada uma forte correlação negativa ($r = -0,76$) (CALLEGARI-JACQUES, 2006) significativa ($p < 0,01$) entre os valores de pH e fosfato

solubilizado. Esta observação pode sugerir que o principal mecanismo de solubilização de fosfato pode ser devido à acidificação do meio (CASTAGNO et al., 2011). Já para os isolados do período de seca, foi observada uma correlação negativa regular ($r = -0,48$) significativa ($p < 0,01$), com pH variando de 4,3 para a linhagem 1.1 XXS 29 que solubilizou $1656,44 \mu\text{g.ml}^{-1}$ para 6,8 para a linhagem 3.1 CFS 34, que solubilizou apenas $28,99 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

5.2.2.4.1.3 Fixação de nitrogênio de modo assimbiótico

Segundo Franche et al. (2009), o nitrogênio é considerado um dos maiores limitantes ao crescimento vegetal. O nitrogênio atmosférico, embora abundante, precisa ser transformado em formas disponíveis à absorção pelas plantas, como a amônia, por meio da fixação de nitrogênio por micro-organismos. A fixação pode ocorrer de dois jeitos, de modo simbiótico e assimbiótico (REED et al., 2011). A busca por micro-organismos capazes de realizar a fixação de nitrogênio de modo assimbiótico é interessante, tendo em vista a substituição dos fertilizantes químicos que podem ser facilmente lixiviados, aumentando a poluição aquática causada pela eutrofização (FRANCHE et al., 2009).

A capacidade dos micro-organismos em crescerem em meio livre de nitrogênio é um método fácil de comprovar sua capacidade de fixar nitrogênio, como demonstrado por Weber et al. (1999). Desta forma, 26% dos isolados da época chuvosa foram positivos para esta característica, representados por cinco linhagens: 5.2 RZC 22, 4.3 RZC 118, 2.2 RZC 192, 4.2 RZC 297 e 2.2 RZC 324, todos pertencentes ao gênero *Bacillus*. Para o período de seca, 33% apresentou resultado positivo, sendo onze linhagens de *Bacillus* spp. (6.2 RZS 4, 6.1 XXS 15, 6.1 XXS 18, 3.3 XXS 22, 1.1 XXS 30, 4.1 XXS 40, 4.1 XXS 42, 4.1 RZS 52, 5.3 SS 58, 4.1 RZS 63 e 4.1 RZS 64), uma de *Brevibacillus* sp. (6.1 XXS 11), uma de *Pantoea* sp. (1.1 XXS 28), outra de *Enterobacter* sp. (1.1 XXS 29), uma de *Paenibacillus* sp. (5.3 SS 61) e uma linhagem pertencente à família Enterobacteriaceae (5.2 SS 49). Para os dois períodos amostrados, a família Bacillaceae foi a que apresentou o maior número de linhagens com possível capacidade de fixação de nitrogênio, uma vez que apresentaram uma película visível característica, abaixo da superfície do meio NFb.

A capacidade de fixação de nitrogênio por espécies da família Bacillaceae foi demonstrada por Ding et al. (2005) que detectaram pela primeira vez a presença do gene *nifH* em *Bacillus marisflavi*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus*. As duas últimas espécies haviam sido descritas como fixadoras de nitrogênio apenas segundo atividade da enzima nitrogenase (XIE et al., 1998). Alguns gêneros encontrados neste estudo já são conhecidos por

sua capacidade de fixar nitrogênio de modo assimbiótico como *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Serratia* e *Stenotrophomonas*, entretanto, no presente trabalho, linhagens caracterizadas como pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* não cresceram no meio sem nitrogênio (AMBROSINI et al., 2012; LIU; PENG; LI, 2012; SELDIN et al., 2011; TILAK et al., 2005). Algumas linhagens do presente estudo, capazes de fixar nitrogênio, são similares a linhagens já caracterizadas como *B. pumilus*, isolada de solos de uma zona árida (HERNANDEZ et al., 2009); *B. safensis* (ARUN; GOPINATH; SHARMA, 2012); *B. subtilis* (ELKOCA; TURAN; DONMEZ, 2010); *B. megaterium* (PIAO et al., 2005); corroborando os resultados obtidos neste estudo.

5.2.2.4.1.4 Produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

Com relação à produção de ACC deaminase, todos os isolados foram capazes de crescer em meio contendo ACC como única fonte de nitrogênio, indicando que provavelmente possuem a enzima ACC deaminase, que cliva o composto ACC, precursor de etileno. Esta característica é de extrema importância, pois o etileno é produzido pelas plantas quando submetidas a condições estressantes (GLICK et al., 2007). Os tipos de estresse que podem induzir a produção de etileno podem ser os mais variados como extremos de temperatura, estresse hídrico, luz ultravioleta, doenças e injúrias e produtos químicos (GLICK, 2005). Este hormônio, em altas concentrações, tende a ter efeitos deletérios nas plantas, como senescência precoce, apodrecimento dos frutos e inibição do alongamento radicular (SALEH-LAKHA et al., 2004). Até que os níveis de etileno e o estresse não sejam reduzidos, a planta não consegue crescer e se proliferar (GAMALERO; GLICK, 2012). O uso de bactérias na melhora de estresse causado por fatores abióticos com atividade de ACC deaminase tem aumentado, devido aos inúmeros benefícios concedidos aos vegetais. As bactérias com atividade de ACC deaminase ao se ligarem com o tegumento da semente de uma plântula, podem assegurar que os níveis de etileno não se tornem elevados de modo a prejudicar o crescimento radicular. Podem também facilitar a formação de raízes mais longas, aumentando a sobrevivência de plântulas durante os primeiros estágios de desenvolvimento. Além disso, quando ligadas às raízes das plantas podem atuar dissipando o ACC, protegendo-as contra os efeitos do estresse causado por etileno (GLICK, 2005).

São inúmeros trabalhos sobre o efeito de bactérias contendo a enzima ACC deaminase na melhora do desempenho da planta e proteção contra vários tipos de estresse, como o estresse salino (KARTHIKEYAN et al., 2012; WU et al., 2012), excesso de água

(GRICHKO; GLICK, 2001), contaminação por metais pesados (STEARNS et al., 2005) e estresse hídrico (ARSHAD; SHAHAROONA; MAHMOOD, 2008; MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004a; ZAHIR et al., 2008).

A enzima ACC deaminase já foi constatada em vários gêneros e espécies comuns ao presente estudo, como *Enterobacter cloacae* (LI et al., 2001), *Arthrobacter* sp. (SZIDERICS et al., 2007); *Bacillus pumilus* (Belimov et al., 2001); *Bacillus subtilis* (SGROY et al., 2009); *Bacillus* spp. (GHOSH et al., 2003); *Bacillus megaterium*, *Bacillus* spp. (ZHANG et al., 2011); *Serratia* sp. (ZAHIR et al., 2009); *Paenibacillus* sp. (ISLAM et a., 2009); *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp. (KUMAR et al., 2012a).

5.2.2.4.2 Mecanismos indiretos

5.2.2.4.2.1 Antibiose pela produção de compostos voláteis – amônia (NH₃) e cianeto de hidrogênio (HCN)

A promoção de crescimento de plantas por micro-organismos pode ocorrer de modo indireto, por meio da supressão de fitopatógenos por HCN e amônia. Kang et al. (2010) sugerem que algumas RPCPs podem proteger plantas contra o ataque de patógenos, por meio da produção de compostos como o HCN, por exemplo. Este composto é altamente tóxico aos micro-organismos aeróbicos em concentrações picomolares e bloqueia a via da citocromo oxidase (PAL; McSPADDEN GARDENER, 2006), aceceptor final da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (COOPER; BROWN, 2008).

Com relação à produção de HCN, esta habilidade não foi detectada por nenhuma das linhagens testadas. Joseph et al. (2007) analisando espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* e *Rhizobium* obtidas de rizosfera também constataram que nenhum dos isolados foi capaz de produzir HCN *in vitro*, assim como Chen et al. (2010). Há relatos da produção de HCN por espécies de *Bacillus* (BANERJEE et al., 2010; KUMAR et al., 2012a; KUMAR et al., 2012b) e *Pseudomonas monteilli*, cujo HCN produzido contribuiu na inibição de *Sclerotium rolfsii* (RAKH et al., 2011). Voisard et al. (1989) verificaram que mutantes *hcn+* tiveram uma melhora na supressão de doença causada pelo fungo *Thielaviopsis basicola*, entretanto, não foi o único fator envolvido na supressão.

O fato de não ter sido observada a produção de HCN por nenhum dos isolados, é de certo modo satisfatório, uma vez que existem relatos de que este composto volátil pode ser tóxico para as plantas (BLOM et al., 2011).

A produção de amônia é outro atributo de RPCPs responsável pela promoção indireta de crescimento de plantas de modo indireto por meio do controle de patógenos (MINAXI; YADAV; SAXENA, 2011). Deste modo, a produção de amônia foi verificada para 95% dos isolados obtidos para o período chuvoso, sendo que apenas o 5.2 RZC 40 não produziu. Para os isolados obtidos durante o período de seca, 71% foram capazes de produzir amônia. Três linhagens de *Paenibacillus* spp. e as linhagens 6.1 XXS 11 (*Virgibacillus* sp.), 6.3 XXS 67 (*Gordonia* sp.) e 6.3 XXS 71 (*Cellulosimicrobium* sp.) e 21% das linhagens de *Bacillus* sp. não foram capazes de produzir amônia *in vitro*. Joseph et al. (2007) detectaram produção de amônia em 95% dos isolados de *Bacillus* sp. seguido por 94,2% de *Pseudomonas* sp., 74,2% de *Rhizobium* sp. e 45% de *Azotobacter* sp.. Kumar et al. (2012b) verificaram a produção de amônia por 75% dos isolados de *Bacillus* sp.. Em isolados obtidos de solo rizosférico, mais de 64% produziram amônia (CHAIHARN et al., 2008). *Enterobacter* sp. também foi caracterizada como produtora de amônia por Jha, Patel e Saraf (2012). Gulati et al. (2009) indicam que a amônia produzida também pode ser utilizada pelas plantas como fonte de nitrogênio para o seu crescimento, além de controlar patógenos como *Pythium* (HOWELL; BEIER; STIPANOVIC, 1988).

5.2.2.4.2.2 Produção de celulase

Com relação à produção de celulase, dos dezenove isolados obtidos durante o período chuvoso, 58% exibiu halo de degradação no meio CMC. Eles correspondem às linhagens de *Bacillus* spp. e *Serratia* sp. A maior frequência dos degradadores (37%) foi observada para aqueles cujo índice celulolítico variou entre 2 e 3 (figura 5.17). O restante (42%) não foi capaz de degradar CMC, o que corresponde a todas as cinco linhagens de *Enterobacter* spp., 5.2 RZC 40 (*Bacillus* sp.), 4.1 RZC 72 (similar a *Bacillus aerophilus*) e 2.1 RZC 189 (*Stenotrophomonas* sp.).

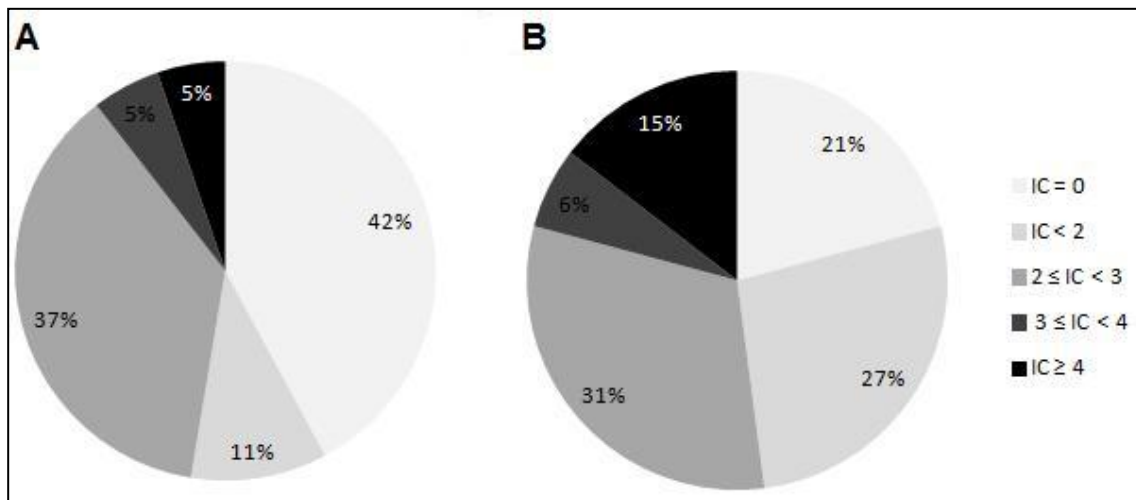


Figura 5.17 - Frequência de isolados bacterianos tolerantes à seca, obtidos para o período chuvoso (A) e de seca (B) com capacidade de degradar CMC. De acordo com o índice celilolítico (IC) obtido, temos: IC = 0 (-); IC < 2 (+); $2 \leq \text{IC} < 3$ (++); $3 \leq \text{IC} < 4$ (+++); IC ≥ 4 (++++)

Para os isolados do período de seca, 21% não apresentou a enzima celulase (figura 5.17), o que corresponde às linhagens 6.2 RZS 4 (similar a *B. safensis*), 6.1.1 XXS 30 e 6.3 XXS 73 (similares a *B. pumilus*), 1.1 XXS 32 e 4.1 RZS 53 (similares a *Paenibacillus cineris*), três linhagens pertencentes à família Enterobacteriaceae (1.1 XXS 28, 1.1 XXS 29 e 5.2 SS 49), 6.3 XXS 67 (*Gordonia* sp.) e 6.3 XXS 74 (*Nocardia* sp.). Foi observada maior frequência dos isolados do período de seca com capacidade de degradar celulose e também maior frequência de linhagens com IC ≥ 4 (figura 5.17). Os isolados 6.2 RZS 1, 6.1 XXS 18, 3.3 XXS 22 (*Bacillus* spp.) e 1.3 SS 55 (*Paenibacillus* sp.) degradaram significativamente mais CMC, produzindo os maiores índices (tabela 5.10).

Tabela 5.10 - Índice celulolítico (IC) obtido por meio da degradação do meio CMC por isolados bacterianos que cresceram em meio com reduzida atividade de água, obtidos para o período chuvoso e de seca. Médias obtidas para três repetições seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade

| Período | Isolado | IC |
|-------------|-------------|-----------|
| Chuvoso | 5.2 RZC 22 | 2,67 c |
| | 5.3 RZC 55 | 5,03 b |
| | 4.1 RZC 73 | 2,50 c |
| | 4.3 RZC 107 | 1,53 d |
| | 4.3 RZC 118 | 2,92 c |
| | 3.3 RZC 158 | 2,83 c |
| | 2.2 RZC 192 | 1,80 d |
| | 2.2 RZC 231 | 3,21 c |
| | 4.2 RZC 297 | 2,03 d |
| | 3.1 RZC 305 | 2,40 c |
| | 2.2 RZC 324 | 2,55 c |
| | Seca | 6.2 RZS 1 |
| 6.2 RZS 2 | | 1,67 d |
| 6.2 RZS 3 | | 2,01 d |
| 6.2 RZS 5 | | 3,00 c |
| 6.1 XXS 10 | | 2,07 d |
| 6.1 XXS 11 | | 1,78 d |
| 6.1 XXS 11' | | 1,67 d |
| 6.1 XXS 12 | | 2,60 c |
| 6.1 XXS 15 | | 1,71 d |
| 6.1 XXS 16 | | 2,30 c |
| 6.1 XXS 18 | | 6,20 a |
| 3.3 XXS 20 | | 1,80 d |
| 3.3 XXS 21 | | 1,62 d |
| 3.3 XXS 22 | | 6,36 a |
| 3.3 XXS 27 | | 4,17 b |
| 1.1 XXS 31 | | 3,33 c |
| 3.1 CFS 33 | | 2,85 c |
| 3.1 CFS 34 | | 1,94 d |
| 3.1 CFS 38 | | 2,50 c |
| 4.1 XXS 40 | | 1,81 d |
| 4.1 XXS 41 | | 2,17 d |
| 4.1 XXS 42 | | 3,25 c |
| 3.1 RZS 43 | | 1,78 d |
| 3.1 RZS 44 | | 1,12 d |
| 3.1 RZS 46 | | 1,14 d |
| 3.1 RZS 47 | | 1,67 d |
| 5.2 SS 48 | | 2,17 d |
| 4.1 RZS 52 | | 2,26 c |
| 1.3 SS 55 | | 6,13 a |
| 1.3 SS 56 | | 2,80 c |
| 1.3 SS 57 | | 4,57 b |
| 5.3 SS 58 | 5,33 b | |
| 5.3 SS 61 | 2,75 c | |
| 4.1 RZS 63 | 2,40 c | |
| 4.1 RZS 64 | 2,17 d | |
| 6.3 XXS 68 | 2,83 c | |
| 6.3 XXS 69 | 2,56 c | |
| 6.3 XXS 71 | 1,55 d | |

Lodewyckx et al. (2002) reportam que várias linhagens de *Bacillus e Paenibacillus*, também constatados no presente estudo, são capazes de produzir celulasas, além de proteases

que degradam a parede celular de fungos, inibindo os fitopatógenos. Outras espécies caracterizadas como celulolíticas e comuns ao estudo incluem *Bacillus atrophaeus* (ANN, 2012); *Bacillus cereus* (YAN et al., 2011; WENZEL et al., 2002); *Bacillus megaterium* (WENZEL et al., 2002); *Bacillus subtilis* (ESSGHAIER et al., 2009; MAWADZA et al., 2000). Apesar de no presente estudo nenhuma linhagem de *Enterobacter* sp. ter apresentado atividade celulolítica, há indícios desta atividade para este gênero (SAMIL; AWAIS; SHAKOORI, 2008; UPADHYAYA et al., 2012).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da serrapilheira, então, micro-organismos com enzimas, como a celulase, são importantes na decomposição do material vegetal ali depositado (ŠTURSOVÁ et al., 2012). A maior frequência de micro-organismos capazes de degradar celulose observada durante o período de seca no presente estudo pode ser devido ao aumento na deposição de serrapilheira durante a estação seca (LOPES et al., 2009). Além disso, micro-organismos com atividade celulolítica e com outras características como solubilização de fosfato, por exemplo, podem ser ótimos inoculantes e biofertilizadores, podendo aumentar o crescimento vegetal quando aplicados no solo, pois podem auxiliar na decomposição de resíduos de culturas vegetais (HAMEEDA et al., 2006).

Além do papel ecológico, os micro-organismos celulolíticos também podem atuar no controle de fitopatógenos, como já mencionado, contribuindo para a supressão de doenças pela inibição do crescimento de fitopatógenos (SINDHU; DADARWAL, 2001) como os oomicetos *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora cinnamomi* e espécies de *Pythium* (HARDHAM, 2007) que possuem celulose, mais especificamente, 1,4- β -glucana, na composição de suas paredes (BARTNICKI-GARCIA; WANG, 1983; VITERBO et al., 2002). O oomiceto *Achlya ambisexualis*, por exemplo, contém em uma fração de sua parede celular, um misto de ligação de 1,4-1,3- β -glucana (LOPRETE; HILL, 2002), o que poderia ser degradado por celulases do tipo endoglucanase (endo- β -1,4-glucanase). Thrane, Tronsmo e Jensen (1997), a partir de indícios de que as enzimas celulase e endo-1,3- β -glucanase produzidas por *Trichoderma harzianum* eram induzidas na presença de *Pythium ultimum*, constataram que estas mesmas enzimas, quando purificadas, eram capazes de inibir a germinação de zoósporos do fitopatógeno. Kumar, Dubey e Maheshwari (2012) constataram que a inibição de fitopatógenos por *Bacillus* sp. pode ter sido devido à vários fatores, entre eles a produção de enzimas quitinolíticas e celulolíticas. De modo similar, Jha et al. (2009) concluíram que *Pseudomonas* spp. podem ser usadas como biofertilizantes, assim como agentes de biocontrole, devido a algumas características como produção de protease, celulase, AIA, HCN e solubilização de fosfato.

5.2.2.5 Linhagens com características para tolerância à seca e características de RPCP

Após análises de todos os resultados referentes às características para tolerância à seca e características para promoção de crescimento *in vitro*, por mecanismos diretos e indiretos, foi confeccionada a tabela 5.11. Esta tabela contém todas as linhagens isoladas durante o período chuvoso e de seca que cresceram em meio com reduzida atividade de água.

Tabela 5.11 - Isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água obtidos durante o período chuvoso (RZC – rizosfera de *C. jamacaru*) e de seca (RZS – rizosfera de *C. jamacaru*; SS – solo; XXS – rizosfera de *P. gounellei*; CFS – rizosfera de *Melocactus* sp.) com a respectiva identificação e os resultados referentes às características para promoção de crescimento *in vitro*. Em negrito encontram-se os isolados selecionados para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* L (Continuação...)

| Linhagem | Identificação | 0,919 A _w | AIA | Solubilização Ca ₃ (PO ₄) ₂ | IS | Biofilme | EPS | NFb | NH ₃ | Celulase |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------|------|--|-------------|-----------|-----|-----|-----------------|----------|
| 5.1 RZC 11 | <i>Enterobacter</i> sp. | - | ++++ | ++++ | 2,27 | ND | + | - | +++ | - |
| 5.2 RZC 17 | <i>Enterobacter</i> sp. | - | ++++ | ++++ | 2,54 | + | s/c | - | +++ | - |
| 5.2 RZC 22 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | - | ND | ++ | + | ++ | ++ |
| 5.2 RZC 40 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | ++++ | - | - | +++ | - | - | - |
| 5.3 RZC 55 | <i>Bacillus</i> sp. | - | ++ | + | - | - | +++ | - | ++ | ++++ |
| 4.1 RZC 72 | <i>Bacillus</i> sp. | - | ++ | ++ | - | ND | +++ | - | +++ | - |
| 4.1 RZC 73 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | - | ND | + | - | +++ | ++ |
| 4.3 RZC 107 | <i>Serratia</i> sp. | - | ++++ | ++++ | 2,20 | ND | ++ | - | +++ | + |
| 4.3 RZC 108 | <i>Enterobacter</i> sp. | - | ++++ | ++++ | 3,06 | - | + | - | ++ | - |
| 4.3 RZC 118 | <i>Bacillus</i> sp. | + | +++ | +++ | - | ND | +++ | + | ++ | ++ |
| 3.3 RZC 158 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | - | - | +++ | - | +++ | ++ |
| 3.3 RZC 165 | <i>Enterobacter</i> sp. | - | ++++ | ++++ | 2,77 | ND | +++ | - | +++ | - |
| 2.1 RZC 189 | <i>Stenotrophomonas</i> sp. | - | +++ | ++ | - | - | - | - | +++ | - |
| 2.2 RZC 192 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | - | - | +++ | + | + | + |
| 2.2 RZC 214 | <i>Enterobacter</i> sp. | - | +++ | ++ | - | + | - | - | + | - |
| 2.2 RZC 231 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | - | ND | +++ | - | +++ | +++ |
| 4.2 RZC 297 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | - | ND | +++ | + | ++ | ++ |
| 3.1 RZC 305 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | ++++ | - | ND | - | - | +++ | ++ |
| 2.2 RZC 324 | <i>Bacillus</i> sp. | + | +++ | +++ | - | - | +++ | + | ++ | ++ |
| 6.2 RZS 1 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | - | + | - | ++ | ++++ |
| 6.2 RZS 2 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | ++ | - | ND | + | - | - | + |
| 6.2 RZS 3 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | ++ | - | + | + | - | + | ++ |
| 6.2 RZS 4 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | + | - | ND | + | + | - | - |
| 6.2 RZS 5 | <i>Bacillus</i> sp. | - | +++ | ++ | - | - | - | - | +++ | +++ |

Tabela 5.11 - Isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água obtidos durante o período chuvoso (RZC – rizosfera de *C. jamaicaru*) e de seca (RZS – rizosfera de *C. jamaicaru*; SS – solo; XXS – rizosfera de *P. gounellei*; CFS – rizosfera de *Melocactus* sp.) com a respectiva identificação e os resultados referentes às características para promoção de crescimento *in vitro*. Em negrito encontram-se os isolados selecionados para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* L (Continuação...)

| Linhagem | Identificação | 0,919 A _w | AIA | Solubilização Ca ₃ (PO ₄) ₂ | IS | Biofilme | EPS | NFb | NH ₃ | Celulase |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|------|--|-------------|----------|-----|-----|-----------------|----------|
| 6.1 XXS 10 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | - | + | - | + | ++ |
| 6.1 XXS 11 | <i>Brevibacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | - | + | + | + | + |
| 6.1 XXS 11' | <i>Virgibacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | +++ | + | - | - | + |
| 6.1 XXS 12 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | 1,29 | ND | - | - | + | ++ |
| 6.1 XXS 15 | <i>Bacillus</i> sp. | + | +++ | +++ | - | - | - | + | + | + |
| 6.1 XXS 16 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | ND | - | - | + | ++ |
| 6.1 XXS 18 | <i>Bacillus</i> sp. | - | + | ++ | - | ND | s/c | + | +++ | ++++ |
| 3.3 XXS 20 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | 1,33 | - | s/c | - | ++ | + |
| 3.3 XXS 21 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | 1,27 | ND | + | - | - | + |
| 3.3 XXS 22 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | ++ | - | - | - | + | ++ | ++++ |
| 3.3 XXS 27 | <i>Brevibacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | - | s/c | - | +++ | ++++ |
| 1.1 XXS 28 | <i>Pantoea</i> sp. | - | ++++ | ++++ | 1,96 | + | + | + | ++ | - |
| 1.1 XXS 29 | <i>Enterobacter</i> sp. | - | ++ | ++++ | 3,44 | ND | + | + | +++ | - |
| 1.1 XXS 30 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | + | s/c | + | + | - |
| 1.1 XXS 31 | <i>Bacillus</i> sp. | - | ++ | +++ | - | ND | - | - | +++ | +++ |
| 1.1 XXS 32 | <i>Paenibacillus</i> sp. | - | + | +++ | 1,20 | - | - | - | - | - |
| 3.1 CFS 33 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | + | 1,00 | - | +++ | - | - | ++ |
| 3.1 CFS 34 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | + | - | - | - | - | + | + |
| 3.1 CFS 38 | <i>Bacillus</i> sp. | - | ++ | +++ | - | + | - | - | +++ | ++ |
| 4.1 XXS 40 | <i>Bacillus</i> sp. | + | +++ | +++ | 1,18 | - | - | + | + | + |
| 4.1 XXS 41 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | ND | - | - | ++ | ++ |
| 4.1 XXS 42 | <i>Bacillus</i> sp. | + | +++ | +++ | 1,29 | - | + | + | ++ | +++ |
| 3.1 RZS 43 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | - | - | - | - | + | + |
| 3.1 RZS 44 | <i>Pantoea</i> sp. | - | ++ | +++ | 1,14 | - | - | - | + | + |

Tabela 5.11 - Isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água obtidos durante o período chuvoso (RZC – rizosfera de *C. jamaçaru*) e de seca (RZS – rizosfera de *C. jamaçaru*; SS – solo; XXS – rizosfera de *P. gounellei*; CFS – rizosfera de *Melocactus* sp.) com a respectiva identificação e os resultados referentes às características para promoção de crescimento *in vitro*. Em negrito encontram-se os isolados selecionados para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* (Conclusão)

| Linhagem | Identificação | 0,919 A _w | AIA | Solubilização Ca ₃ (PO ₄) ₂ | IS | Biofilme | EPS | NFb | NH ₃ | Celulase |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------|------|--|------|-----------|-----|-----|-----------------|----------|
| 3.1 RZS 46 | <i>Arthrobacter</i> sp. | - | + | ++ | - | - | - | - | + | + |
| 3.1 RZS 47 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | ++ | - | ND | + | - | - | + |
| 5.2 SS 48 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | - | + | - | + | ++ |
| 5.2 SS 49 | Enterobacteriaceae | - | ++ | ++++ | - | ND | ++ | + | +++ | - |
| 4.1 RZS 52 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | ++ | - | ND | - | + | + | ++ |
| 4.1 RZS 53 | <i>Paenibacillus</i> sp. | - | ++ | + | 1,27 | ++ | + | - | - | - |
| 1.3 SS 55 | <i>Paenibacillus</i> sp. | - | + | ++ | - | - | - | - | +++ | ++++ |
| 1.3 SS 56 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | ++ | - | + | - | - | - | ++ |
| 1.3 SS 57 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | ++ | - | - | - | - | ++ | ++++ |
| 5.3 SS 58 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | ND | s/c | + | ++ | ++++ |
| 5.3 SS 61 | <i>Paenibacillus</i> sp. | - | + | +++ | - | ND | + | + | - | ++ |
| 4.1 RZS 63 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | 1,54 | ND | - | + | + | ++ |
| 4.1 RZS 64 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | - | - | + | + | + | ++ |
| 6.3 XXS 67 | <i>Gordonia</i> sp. | - | + | +++ | - | ND | - | - | - | - |
| 6.3 XXS 68 | <i>Arthrobacter</i> sp. | - | ++++ | +++ | - | - | - | - | +++ | ++ |
| 6.3 XXS 69 | <i>Bacillus</i> sp. | + | + | +++ | 1,18 | ND | - | - | + | ++ |
| 6.3 XXS 71 | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | - | + | + | 1,55 | - | + | - | - | + |
| 6.3 XXS 73 | <i>Bacillus</i> sp. | + | ++ | +++ | 1,56 | - | - | - | - | - |
| 6.3 XXS 74 | <i>Nocardia</i> sp. | - | + | +++ | 1,23 | ND | - | - | - | - |

Onde: ND (não determinado); AIA: < 1 µg.mL⁻¹ (+); 1-10 µg.mL⁻¹ (++); 11-50 µg.mL⁻¹ (+++); > 51 µg.mL⁻¹ (++++); Solubilização Ca₃(PO₄)₂: < 50 µg.mL⁻¹ (+); 50-100 µg.mL⁻¹ (++); 101-500 µg.mL⁻¹ (+++); > 501 µg.mL⁻¹ (++++); Formação biofilme (0,30M) sorbitol: DO_{560nm} < 0,1 (-); DO_{560nm} 0,1-0,2 (+); DO_{560nm} 0,2-1,0 (++); DO_{560nm} > 1,0 (+++); EPS meio sacarose pH 7,5 a 28°C: - (sem produção), s/c (ausência de crescimento; halo de EPS ≤ 10 mmØ (+); halo de EPS de 10-14 mmØ (++); halo de EPS ≥ 14 mmØ (+++); NFb (capacidade de fixar nitrogênio); NH₃ (capacidade de produzir amônia); celulase baseada no índice celolítico: IC = 0 (-); IC < 2 (+); 2 ≤ IC < 3 (++); 3 ≤ IC < 4 (+++); IC ≥ 4 (++++); Produção de NH₃ baseada na intensidade da coloração castanho-alaranjada: baixa produção (+); média produção (++); alta produção (+++)

Para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* L., foram testadas as dezenove bactérias obtidas do período chuvoso. Já para o período de seca, foram selecionadas nove linhagens com características diversificadas (tabela 5.11). Procurou-se selecionar linhagens que variassem quanto à produção de AIA, solubilização de fosfato, produção de EPS e biofilme e quanto às características como fixação de nitrogênio, produção de amônia e celulase. Isto porque segundo Rana et al. (2011), a promoção de crescimento de plantas por bactérias é um fenômeno complexo e bem estabelecido geralmente realizado por bactérias associadas às plantas que possuem mais de uma característica de promoção. Desta forma, foram selecionadas as linhagens: 6.2 RZS 3 (*Bacillus* sp.) por produzir AIA e solubilizar fosfato, formar biofilme e EPS, além de NH_3 e celulase; 6.1 XXS 15 (*Bacillus* sp.) por produzir alta concentração de AIA, alta solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e produção de NH_3 e celulase; 3.3 XXS 22 (*Bacillus* sp.) por produzir AIA, solubilizar fosfato, além de ser capaz de fixar nitrogênio, produzir NH_3 e celulase; 1.1 XXS 28 (*Pantoea* sp.) pela elevada produção de AIA, possuir elevada capacidade de solubilizar fosfato, formar biofilme e EPS, além de produzir NH_3 e fixar nitrogênio; 3.1 CFS 33 (*Bacillus* sp.) por produzir AIA e solubilizar fosfato, produzir bastante EPS, além de produzir celulase; 3.1 CFS 34 (*Bacillus* sp.) por produzir AIA, solubilizar fosfato, além de produzir NH_3 e celulase; 4.1 XXS 40 (*Bacillus* sp.), pela alta concentração de AIA, alta solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e produção de NH_3 e celulase; 4.1 XXS 42 (*Bacillus* sp.) por produzir alta concentração de AIA e solubilizar alta concentração de fosfato, produzir EPS, NH_3 , celulase e fixar nitrogênio; 5.2 RZS 52 (*Bacillus* sp.) por produzir AIA, solubilizar fosfato, produzir NH_3 , celulase e fixar nitrogênio. Foram construídas duas árvores filogenéticas para verificar a relação entre as linhagens selecionadas (figuras 5.18 e 5.19).

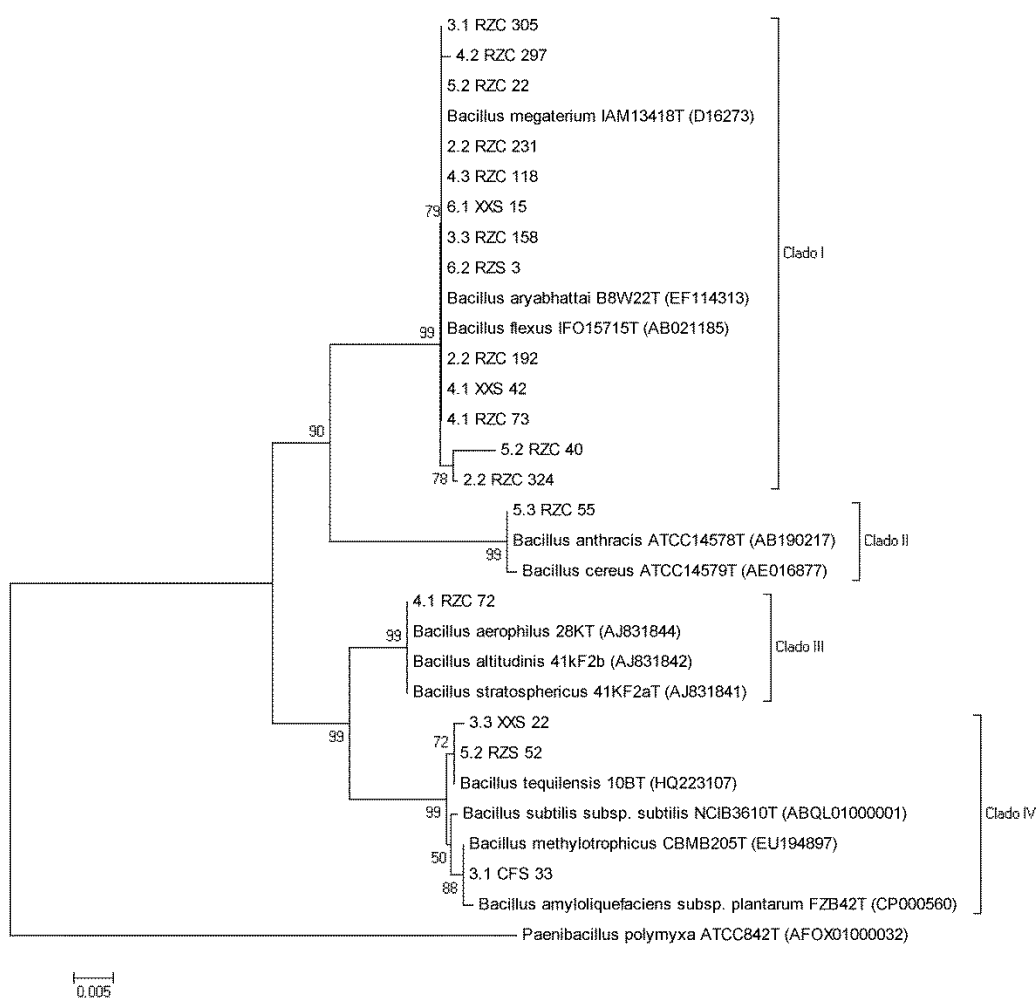


Figura 5.18 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o Filo Firmicutes, comparando as linhagens obtidas durante o período chuvoso e de seca, selecionadas para o teste de promoção de crescimento de *Zea mays* L., com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído utilizando o programa Mega 5.01, com o método de distância de Neighbor-Joining com o modelo de Jukes-Cantor. Os dados nos ramos são referentes aos valores de *bootstrap*, para um total de 1000 replicações. A barra indica a distância em nucleotídeos. *Paenibacillus polymyxa* foi utilizado como grupo externo

Análises filogenéticas para o filo Firmicutes revelaram que treze linhagens selecionadas foram agrupadas ao clado I, suportado por um valor de *bootstrap* de 99, pertencente ao grupo de *Bacillus megaterium*, com similaridade entre as linhagens estudadas e as linhagens tipo variando de 98,35% a 100%, correspondendo a 20 nucleotídeos (nt) de diferença em um total de 1029. O clado II, suportado por um valor de *bootstrap* de 99, inseriu uma linhagem ao grupo de *B. anthracis*, com similaridade variando de 99,71% e 99,85%, o que corresponde a 4 nt de diferença em um total de 1367 e 2 nt em 1292, respectivamente. Uma linhagem foi inserida no clado III, pertencente ao grupo de *B. aerophilus*, *B. altitudinis* e

B. stratosphericus (SHIVAJI et al., 2006), com *bootstrap* de 99. Esta linhagem apresentou similaridade do gene 16S rRNA com as linhagens tipo de 99,55% e 6 nt diferentes de um total de 1321. O clado IV, com valor de *bootstrap* de 99, inseriu três linhagens ao grupo de *Bacillus subtilis*, onde as linhagens 3.3 XXS 22 e 5.2 RZS 52 apresentaram similaridade de 99,9% (1 nucleotídeo diferente de 1048) e 99,85% (2 nucleotídeos diferentes de 1296) à linhagem tipo *Bacillus tequilensis*, respectivamente. Já a linhagem 3.1 CFS 33 apresentou similaridade com as espécies *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. methylotrophicus* e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* de 99,49% , 99,92% e 99,76%, com 6 nt diferentes de 1167; 1 nt de 1246 e 3 nt de 1246, respectivamente.

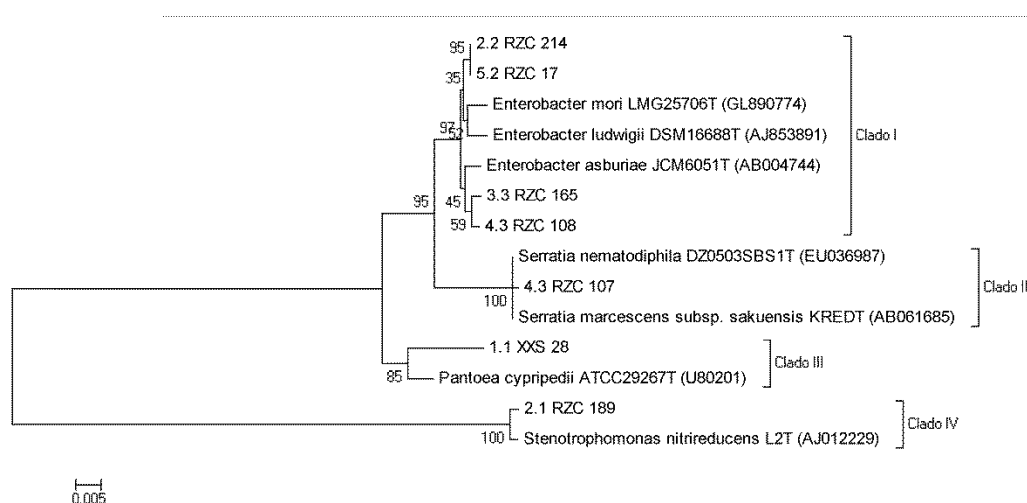


Figura 5.19 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o filo Proteobacteria, comparando as linhagens obtidas durante o período chuvoso e de seca, selecionadas para o teste de promoção de crescimento de *Zea mays* L., com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído utilizando o programa Mega 5.01, com o método de distância de Neighbor-Joining com o modelo de Jukes-Cantor. Os dados nos ramos são referentes aos valores de bootstrap, para um total de 1000 replicações. A barra indica a distância em nucleotídeos. Não foi utilizado nenhum grupo externo

Análises filogenéticas para o filo Proteobacteria, mais especificamente Classe γ -Proteobacteria, também dividiram as linhagens selecionadas em quatro clados distintos. O clado I (*Enterobacter asburiae*), composto por quatro linhagens, encontra-se com suporte no valor de 97. A similaridade entre as linhagens com as linhagens tipo apresentaram variação de 99,16% a 99,28% e 8 nt diferentes de 955 a 11 nt diferentes de 1315 quando comparadas com *Enterobacter mori*; 98,65% a 99,31% e 7 nt diferentes de 955 a 17 nt diferentes de 1314 quando comparadas com *E. ludwigii* e 98,49% a 99,48% e 5 nt diferentes de 955 a 12 nt

diferentes de 1314 quando comparadas com *E. asburiae*. Uma linhagem (4.3 RZC 107) foi inserida no clado II, pertencente ao grupo de *Serratia marcescens*, com bootstrap de 100. Esta linhagem apresentou similaridade do gene 16S rRNA com as linhagens tipo de 99,61% e 5 nt diferentes de um total de 1280. A linhagem 1.1 XXS 28 foi inserida no clado III (*Pantoea cypripedii*) com bootstrap de 85 e similaridade à linhagem tipo de 97,19% e 35 nt diferentes de 1246. Esta linhagem provavelmente corresponde a uma espécie não descrita devido à baixa similaridade. Como proposto por Stackebrandt e Ebers (2006), valores de similaridade abaixo de 98,7% de similaridade podem ser usados para delinear uma nova espécie procariótica. Entretanto, será necessário utilizar outras abordagens polifásicas para caracterizar essa linhagem. A linhagem 2.1 RZC 189 apresentou 99,64% de similaridade e 5 nt diferentes de 1370 com a linhagem tipo *Stenotrophomonas nitrireducens*, sendo agrupada no clado IV, com valor de bootstrap de 100.

5.2.2.6 Promoção de crescimento de *Zea mays* L. por isolados que cresceram em meio com reduzida atividade de água

Sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), dos dezenove isolados obtidos durante o período chuvoso, cinco tiveram um crescimento muito irregular (5.1 RZC 11, 5.2 RZC 40, 4.3 RZC 108, 3.3 RZC 165 e 2.2 RZC 214), sendo excluídos da análise. Desta forma, apenas a linhagem 2.2 RZC 192 (*Bacillus* sp.) foi capaz de aumentar significativamente a área foliar de *Zea mays* L. em 27,68% quando comparado com a testemunha ($p < 0,01$) (tabela 5.12). Com relação ao comprimento do caule, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Três linhagens de *Bacillus* spp. (4.1 RZC 72, 2.2 RZC 231 e 4.2 RZC 297) parecem ter produzido efeito deletério no milho, reduzindo significativamente o peso seco da parte aérea ($p < 0,01$).

Tabela 5.12 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período chuvoso. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito

| Tratamento | Área foliar (cm ²) | Comprimento caule (cm) | Peso seco parte aérea (g) |
|-------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Testemunha | 92,94 | 12,85 | 0,1887 |
| 5.2 RZC 17 | 93,32 | 14,07 | 0,1853 |
| 5.2 RZC 22 | 82,72 | 12,44 | 0,1627 |
| 5.3 RZC 55 | 90,03 | 12,21 | 0,1627 |
| 4.1 RZC 72 | 86,23 | 13,12 | 0,1487* |
| 5.1 RZC 73 | 92,11 | 12,98 | 0,1653 |
| 4.3 RZC 107 | 89,61 | 13,09 | 0,1720 |
| 4.3 RZC 118 | 98,70 | 13,14 | 0,1967 |
| 3.3 RZC 158 | 94,82 | 13,47 | 0,1680 |
| 2.1 RZC 189 | 100,70 | 13,45 | 0,1613 |
| 2.2 RZC 192 | 118,67* | 12,87 | 0,1587 |
| 2.2 RZC 231 | 80,06 | 12,87 | 0,1540* |
| 4.2 RZC 297 | 92,36 | 12,74 | 0,1400* |
| 3.1 RZC 305 | 91,00 | 12,62 | 0,1687 |
| 2.2 RZC 324 | 98,67 | 13,39 | 0,1853 |

Para os isolados obtidos durante o período de seca, para dois parâmetros avaliados, área foliar e peso seco da parte aérea, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas das linhagens quando comparadas com a testemunha (tabela 5.13). Três isolados, 3.1 CFS 33, 3.1 CFS 34 e 4.1 XXS 40 (*Bacillus* spp.) aumentaram significativamente ($p < 0,01$) o comprimento do caule de *Z. mays* L. em 13,16%, 11,09% e 16,48%, respectivamente, em comparação com plantas sem inóculo bacteriano.

Tabela 5.13 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período de seca. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito

| Tratamento | Área foliar (cm ²) | Comprimento caule (cm) | Peso seco parte aérea (g) |
|------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Testemunha | 160,03 | 9,65 | 0,5500 |
| 6.2 RZS 3 | 168,80 | 10,30 | 0,5800 |
| 6.1 XXS 15 | 171,44 | 10,38 | 0,6280 |
| 3.3 XXS 22 | 189,30 | 10,37 | 0,6350 |
| 1.1 XXS 28 | 163,18 | 10,47 | 0,5070 |
| 3.1 CFS 33 | 175,14 | 10,92* | 0,6550 |
| 3.1 CFS 34 | 194,09 | 10,72* | 0,6960 |
| 4.1 XXS 40 | 172,49 | 11,24* | 0,6130 |
| 4.1 XXS 42 | 166,35 | 9,97 | 0,5770 |
| 5.2 RZS 52 | 155,06 | 10,59 | 0,5290 |

Gholami et al. (2012) reportam a promoção de crescimento de plantas por *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia*, entretanto, destas, apenas linhagens de *Bacillus* spp. do presente estudo atuaram como promotoras de crescimento de *Z. mays* L., mas nenhuma foi capaz de aumentar significativamente e concomitantemente os três parâmetros avaliados. Embora todos os isolados tenham exibido características de promoção de crescimento *in vitro*, não há garantias de que o isolado possuidor de tais características seja capaz de promover crescimento vegetal naturalmente, pois o solo não é homogêneo (Dey et al. 2004). Além disso, o fato das linhagens possuírem múltiplas características de RPCP pode muitas vezes não conferir a promoção de crescimento, como observado para *Pseudomonas* spp. (KUMAR et al., 2012c).

Sob fornecimento reduzido de água, simulando uma condição de estresse hídrico (30% da capacidade de campo), dos isolados obtidos durante o período chuvoso, apenas 4.3 RZC 107 (*Serratia* sp.) foi capaz de aumentar significativamente a área foliar de *Zea mays* L. em 51,61% quando comparado com a testemunha ($p < 0,01$) (tabela 5.14). Com relação ao comprimento do caule, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Duas linhagens, 4.3 RZC 107 (*Serratia* sp.) e 2.2 RZC 231 (*Bacillus* sp.), foram capazes de aumentar o peso seco da parte aérea de *Z. mays* L. em 42,64%, quando comparadas com a testemunha ($p < 0,01$).

Tabela 5.14 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período chuvoso. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito

| Tratamento | Área foliar (cm ²) | Comprimento caule (cm) | Peso seco parte aérea (g) |
|-------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Testemunha | 31,91 | 7,89 | 0,0680 |
| 5.2 RZC 17 | 44,48 | 9,73 | 0,0850 |
| 5.2 RZC 22 | 44,14 | 8,93 | 0,0870 |
| 5.3 RZC 55 | 22,10 | 6,35 | 0,0590 |
| 4.1 RZC 72 | 31,64 | 7,29 | 0,0700 |
| 5.1 RZC 73 | 29,36 | 8,04 | 0,0540 |
| 4.3 RZC 107 | 48,06* | 9,80 | 0,0970* |
| 4.3 RZC 118 | 31,16 | 8,58 | 0,0700 |
| 3.3 RZC 158 | 28,78 | 7,14 | 0,0520 |
| 2.1 RZC 189 | 24,58 | 7,6 | 0,0530 |
| 2.2 RZC 192 | 39,82 | 7,59 | 0,0630 |
| 2.2 RZC 231 | 33,94 | 7,71 | 0,0970* |
| 4.2 RZC 297 | 21,07 | 5,92 | 0,0500 |
| 3.1 RZC 305 | 21,60 | 6,49 | 0,0630 |
| 2.2 RZC 324 | 40,88 | 9,10 | 0,0810 |

Para os isolados obtidos durante o período de seca, cinco linhagens, quatro de *Bacillus* spp. (6.2 RZS 3, 4.1 XXS 40, 4.1 XXS 42 e 5.2 RZS 52) e uma linhagem de *Pantoea* sp. (1.1 XXS 28) aumentaram significativamente ($p < 0,01$) a área foliar de *Z. mays* L. quando comparadas com a testemunha (tabela 5.15). A linhagem 6.2 RZS 3 foi a que proporcionou o maior incremento da área foliar de *Z. mays* L. (81,01%), quando comparada com as demais linhagens, seguida por 4.1 XXS 40 (80,91%), 1.1 XXS 28 (77,67%), 4.1 XXS 42 (75,03%) e 5.2 RZS 52 (67,49%). Três linhagens de *Bacillus* spp. (6.2 RZS 3, 3.1 CFS 34 e 4.1 XXS 40) apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$) do comprimento do caule de *Z. mays* L. em 17,02%, 17,42% e 17,95%, respectivamente. Três linhagens, 6.2 RZS 3, 6.1 XXS 15 e 4.1 XXS 40, foram capazes de aumentar o peso seco da parte aérea de *Z. mays* L., de modo estatisticamente significativo ($p < 0,01$) em 66,28%, 56,70% e 65,9%, respectivamente, quando comparados com a testemunha.

Tabela 5.15 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo), por isolados selecionados do período de seca. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule e peso seco da parte aérea. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito

| Tratamento | Área foliar (cm ²) | Comprimento caule (cm) | Peso seco parte aérea (g) |
|------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Testemunha | 62,53 | 7,52 | 0,2610 |
| 6.2 RZS 3 | 113,19* | 8,80* | 0,4340* |
| 6.1 XXS 15 | 97,67 | 8,45 | 0,4090* |
| 3.3 XXS 22 | 100,43 | 7,47 | 0,3610 |
| 1.1 XXS 28 | 111,10* | 7,99 | 0,3830 |
| 3.1 CFS 33 | 80,75 | 6,92 | 0,3090 |
| 3.1 CFS 34 | 83,08 | 8,83* | 0,3450 |
| 4.1 XXS 40 | 113,12* | 8,87* | 0,4330* |
| 4.1 XXS 42 | 109,45* | 8,45 | 0,3450 |
| 5.2 RZS 52 | 104,73* | 7,66 | 0,3730 |

Na tentativa de achar alguma correlação entre a produção de AIA e solubilização de fosfato com os parâmetros de *Z. mays* L. avaliados, observou-se que a produção de AIA e solubilização de fosfato correlacionaram-se positivamente e significativamente com o comprimento do caule ($r = 0,48$; $0,01 \leq p < 0,05$) e ($r = 0,45$; $0,01 \leq p < 0,05$) sob estresse hídrico, respectivamente. Para os demais parâmetros não foi achada nenhuma outra correlação significativa. Xu et al. (2012) apontam para uma forte correlação entre os índices de crescimento de pinheiro com a concentração de AIA aplicada.

A inoculação de linhagens de *Bacillus* spp., *Pantoea* sp. e *Serratia* sp. em *Z. mays* L. mostraram aumentos significativos no peso seco da parte aérea, comprimento do caule e principalmente na área foliar quando submetida ao estresse hídrico, mas não estão claramente

correlacionados com a produção de AIA, solubilização de fosfato e demais mecanismos. A habilidade de solubilizar P, por exemplo, não é necessariamente associada à promoção de crescimento de plantas (COLLAVINO et al., 2010). Araújo e Guerreiro (2010), também observaram que bactérias que promoveram o crescimento de milho não foram necessariamente aquelas que mais produziram AIA, por exemplo. Aumentos no crescimento, produtividade e absorção de nutrientes por vegetais deve ocorrer devido à expressão de uma ou mais características de promoção de crescimento. Desta forma, é importante selecionar bactérias *in vitro* para múltiplas características de RPCP e avaliá-las sob condições controladas em casa de vegetação (Rana et al., 2011).

Apenas duas linhagens 6.2 RZS 3 e 4.1 XXS 40 (*Bacillus* sp.) foram capazes de promover crescimento de *Z. mays* L. sob estresse hídrico, sendo significativos para os três parâmetros analisados, em comparação com a testemunha. Além disso, a inoculação dessas linhagens parece ter protegido a planta contra os efeitos negativos da dessecação (figura 5.20).

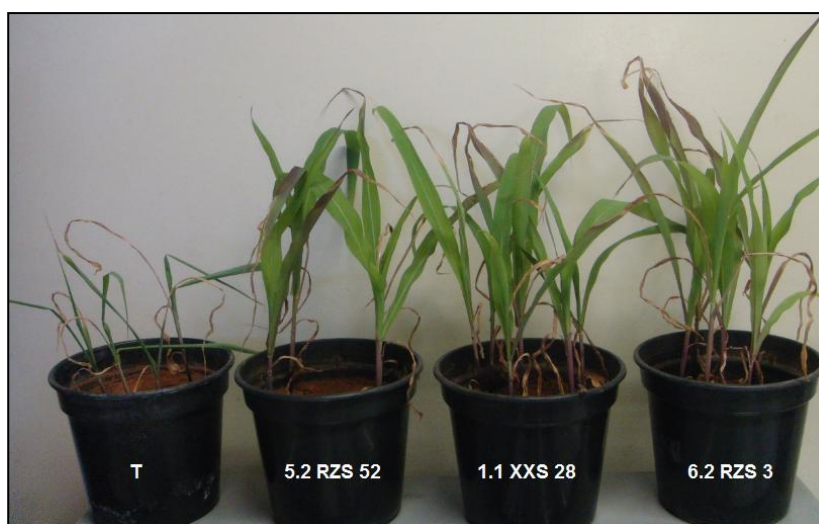


Figura 5.20 - Plantio de *Zea mays* L. sob estresse hídrico (30% da capacidade de campo). Plantas inoculadas com as linhagens 5.2 RZS 52, 1.1 XXS 28 e 6.2 RZS 3 foram protegidas contra os efeitos negativos da dessecação, quando comparadas com plantas sem inóculo bacteriano (T)

A seca é uma das principais condições ambientais adversas capazes de reduzir a produtividade, uma vez que a produção de biomassa pelas plantas é regulada pela disponibilidade de água. A resposta vegetal ao estresse hídrico é complexa, envolvendo uma coordenação entre expressão gênica e sua integração com os hormônios (COHEN et al., 2009). Uma das respostas mais comuns ao estresse é o ajuste osmótico. A célula vegetal concentra alguns osmólitos (FAROOQ et al., 2009) em seus vacúolos que manterão a pressão de turgescência, diminuindo o potencial osmótico, permitindo que as plantas continuem seus processos fisiológicos (ANSARI et al., 2012). Sob estresse abiótico, os níveis de ácido

abscísico aumentam, o que desencadeia a sinalização e resposta ao estresse, como fechamento dos estômatos, por exemplo, para redução da perda de água (AALTO et al., 2012).

A capacidade de produzir biofilme pelas linhagens correlacionou-se fortemente com a área foliar ($r = 0,65$; $p < 0,01$), comprimento do caule ($r = 0,72$; $p < 0,01$) e peso seco da parte aérea ($r = 0,56$; $0,01 \leq p < 0,05$) de *Zea mays* L. sob estresse hídrico, sugerindo que a produção de biofilme pelas linhagens pode ter conferido certa proteção à planta, que foi capaz de crescer sob reduzida aplicação de água. Sandhya et al. (2009) observaram que a inoculação de *Pseudomonas putida*, capaz de formar EPS, em plântulas de girassol sob estresse hídrico, induziu a formação de biofilme na superfície radicular e melhorou a estrutura do solo, o que deve ter protegido as plantas do estresse hídrico. Esta proteção pode ter sido conferida, além da produção de EPS e biofilme, por outros mecanismos como produção de AIA e óxido nítrico que aumentam a proliferação radicular, aumentando sua capacidade de absorção de água; alteração, mediada por bactérias, da elasticidade das membranas celulares radiculares, aumentando a tolerância à deficiência hídrica (DIMKPA; WEINAND; ASCH, 2009) ou ainda por mecanismos que não foram estudados como acúmulo e liberação de osmólitos, estabilização de lipídeos e proteínas por trealose e sucrose, modificação de lipídeos de membrana, reparo eficiente de DNA, enzimas antioxidantes, estruturas de dormência como esporos, acinetos, cistos (KIEFT, 2003). Além disso, como já comentado anteriormente, bactérias contendo a enzima ACC deaminase têm sido reportadas no aumento da resistência de plantas a vários tipos de estresse, como salino, excesso de água, metais pesados, seca (BELIMOV et al., 2005; GRICHKO; GLICK, 2001; MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004a; MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004b), devido à redução de etileno. Esta redução foi confirmada por Shakir, Bano e Arshad (2012), que por meio de cromatografia gasosa observaram a redução dos níveis de etileno endógenos por rizobactérias inoculadas em trigo sob estresse hídrico. Desta forma, os micro-organismos desempenham papel fundamental no manejo do estresse, devido às propriedades únicas de tolerância a diversas condições adversas, o que faz aumentar cada vez mais os estudos na sua implantação na produção agrícola (ANSARI et al., 2012).

Ao realizar buscas nos principais bancos de dados, até o momento não foram encontrados trabalhos sobre micro-organismos associados às cactáceas utilizadas neste estudo, sendo este trabalho pioneiro no isolamento e identificação de bactérias associadas a *C. jamacaru*, *P. gounellei* e *Melocactus* sp. da Caatinga do semiárido brasileiro, com características de promoção de crescimento.

Além disso, o presente estudo indicou o potencial de *Bacillus* sp. como promotor de crescimento vegetal sob estresse hídrico, devido ao incremento nos três parâmetros avaliados, em comparação com a testemunha. Sabe-se que linhagens de *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. pasteurii*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*, *P. polymyxa*, *P. azotofixans* são conhecidas por influenciarem o crescimento, desenvolvimento e a produtividade de várias culturas sob condições controladas e naturais, por meio de mecanismos diretos ou indiretos (KUMAR; PRAKASH; JOHRI, 2011). Lee et al. (2012) sugerem que a habilidade de *Bacillus aryabhatai* em promover crescimento de plantas, pode ser devido à produção de vários fitohormônios como AIA, ácido abscísico e giberelina, além de solubilização de fosfato, podem tornar o uso deste micro-organismo interessante para revegetação de terras. Sandhya et al. (2011) observaram os efeitos da inoculação de espécies tolerantes à seca de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* e *Paenibacillus flavisporus* em *Zea mays* L., concluindo que as plântulas mostraram respostas fisiológicas (aumentou os osmólitos e reduziu as enzimas antioxidantes) que poderiam aliviar os efeitos negativos do estresse hídrico. O benefício do uso de micro-organismos no controle do estresse hídrico em plantas também foi demonstrado por Kasim et al. (2012). Eles utilizaram *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense* sugerindo que têm forte impacto em vários mecanismos de tolerância ao estresse em plantas, e que em conjunto, resultam na melhoria dos mecanismos homeostáticos frente ao estresse, devido à combinação de efeitos morfológicos, fisiológicos e metabólicos na planta, proporcionado por estes micro-organismos.

Há potencial de *Bacillus* sp. como RPCP em cultivo de *Z. mays* L. sob estresse hídrico, entretanto, é necessário um melhor entendimento das interações entre plantas e micro-organismos (MONTAÑEZ et al., 2012), além da investigação de colonização radicular e ainda, testes com mutantes para algumas características como produção de AIA, solubilização de fosfato, entre outros, para ter certeza dos reais mecanismos envolvidos na promoção.

5.2.2.7 Promoção de crescimento de *Zea mays* L. por *Bacillus* sp. e *Azospirillum* sp.

5.2.2.7.1 Caracterização das linhagens selecionadas

A linhagem de *Bacillus* sp. (6.2 RZS 3) foi selecionada, pois propiciou aumento significativo em plantas de *Zea mays* L. submetidas a estresse hídrico (item anterior - 5.2.2.6), além de possuir outras características como produção de AIA, solubilização de fosfato, produção de EPS e celulase (tabela 5.16). Como *Bacillus* sp. não exibiu capacidade de fixar nitrogênio em meio NFb, procurou-se selecionar uma linhagem diazotrófica de *Azospirillum* sp. para testes em consórcio. Desta forma, uma linhagem equilibraria a outra em características defasadas. Por exemplo, embora *Azospirillum* sp. não cresça em meio com reduzida atividade de água, *Bacillus* sp. pode conferir certa proteção à *Azospirillum* sp. ao estresse hídrico, uma vez que bactérias Gram-positivas tendem a tolerar mais o estresse hídrico do que bactérias Gram-negativas (MANZONI; SCHIMEL; PORPORATO, 2012). Essa associação benéfica também pode ocorrer por meio de outro mecanismo, como fornecimento de nutrientes, entre outros, como observado por Halsall e Gibson (1989) onde a degradação de celulose por *Cellulomonas* sp., por exemplo, fornece fonte de carbono para espécies de *Azospirillum* fixarem nitrogênio, que por sua vez é usado pelas espécies de *Cellulomonas*.

Além disso, *Azospirillum* é um gênero comumente usado como inoculante, devido à sua versatilidade quanto à fixação de nitrogênio, produção de hormônio e solubilização de fosfato (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Já *Bacillus* spp. oferecem inúmeras vantagens para aplicação na agricultura, podendo ser usados como biopesticidas ou biofertilizantes (PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; VICENTE, 2011).

Tabela 5.16 - Características das linhagens selecionadas para os testes de promoção de crescimento de *Zea mays* L.

| Linhagens | 0,919 A _w | AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | Solubilização $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | EPS | Ácido hialurônico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | NFb | Celulase |
|-------------------------|-------------------------|---|---|-----|---|-----|----------|
| <i>Bacillus</i> sp. | + | 0,84 | 90,91 | + | 971,394 | - | 2,00 |
| <i>Azospirillum</i> sp. | - | 4,45 | 440,73 | - | 1049,638 | + | 3,60 |

Onde: 0,919 A_w (capacidade de crescimento em meio com atividade de água reduzida); Formação de EPS em meio contendo sacarose em pH 7,5 a 28°C: - (sem produção), s/c (ausência de crescimento); halo de EPS ≤ 10 mmØ (+); halo de EPS de 10-14 mmØ (++); halo de EPS ≥ 14 mmØ (+++); NFb (capacidade de fixar nitrogênio); celulase baseada no índice celulolítico: IC = 0 (-); IC < 2 (+); $2 \leq \text{IC} < 3$ (++); $3 \leq \text{IC} < 4$ (+++); IC ≥ 4 (++++); Produção de NH₃ baseado na intensidade da coloração castanho-alaranjada: baixa produção (+); média produção (++); alta produção (+++)

As duas linhagens testadas 3.1 RZS 17 (*Azospirillum* sp.) e 6.2 RZS 3 (*Bacillus* sp.) foram capazes de produzir ácido hialurônico *in vitro* (tabela 5.16). Embora a linhagem de *Azospirillum* sp. não ter sido capaz de formar EPS em meio contendo sacarose em pH 7,5 a 28°C, foi capaz de produzir ácido hialurônico nas condições testadas no presente estudo.

Como já discutido no capítulo anterior, as condições de cultivo, as fontes de carbono têm influência na produção de EPS (BARBOSA et al., 2004; FLEMMING et al., 2011).

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear formado por unidades dissacarídicas contendo N-acetil-D-glicosamina e ácido glucurônico (KOGAN et al., 2007). É um tipo de exopolissacarídeo, assim como a xantana, dextrana, alginato, ácido colânico e alginato, e pode ser secretado ou sintetizado extracelularmente por micro-organismos (REHM, 2010). Está presente nos vertebrados e ausentes em fungos, plantas e insetos (KOGAN et al., 2007). Devido às suas características de retenção de umidade, viscoelasticidade, ausência de toxicidade, é utilizado em aplicações biomédicas, alimentícias e cosméticas (CHONG et al., 2005). Na área clínica pode atuar como protetor, repositivo e potenciador de tecidos, além de proteger tecidos da dessecação e de agentes nocivos (BALAZS, 2004). A produção de ácido hialurônico por *Streptococcus* é bastante conhecida, estando presente nas cápsulas das espécies *Streptococcus thermophilus* (IZAWA et al., 2009), *Streptococcus pyogenes* (KANG et al., 2012) e *Streptococcus zooepidemicus* (PATIL et al., 2011), além de *Chlorella* e *Pasteurella multocida* (DeANGELIS, 2012). Entretanto, a inserção de genes *has* que codificam para a enzima hialurona sintase, responsável por sua síntese, também foi eficiente para *Bacillus subtilis* (WIDNER et al., 2005) e *Lactococcus lactis* (CHIEN; LEE, 2007) produzirem esse polímero.

A produção de ácido hialurônico por micro-organismos pode ter a função de proteger as células de fagocitose assim como auxiliar na virulência, o que foi observado por *Streptococcus* (WESSELS et al., 1991), além de oferecer proteção contra auto destruição por oxigênio em bactérias anaeróbicas (CLEARY; LARKIN, 1979).

Os exopolissacarídeos, como já comentado anteriormente, contribuem diretamente nas propriedades do biofilme, uma vez que permitem que quantidades consideráveis de água sejam ligadas a eles. O ácido hialurônico, por exemplo, tem alta capacidade de retenção de umidade (LIU et al., 2011), podendo se combinar facilmente a até 1 kg de água (SUTHERLAND, 2001). Desta forma, este tipo de EPS parece ser ideal para testes com estresse hídrico.

5.2.2.7.2 Promoção de crescimento de *Zea mays* L. por *Bacillus* sp. e *Azospirillum* sp. isoladamente ou em consórcio

Nos testes de germinação, com inoculação das duas linhagens em sementes de *Zea mays*, foi observado que *Azospirillum* sp. aumentou significativamente ($P < 0,01$) o

comprimento da parte aérea de sementes de *Z. mays* L. em 17,37% e o comprimento radicular em 28,84%, quando comparada com sementes sem inóculo.

Com relação à promoção de crescimento sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), apenas o tratamento com as duas linhagens juntas foi capaz de aumentar de modo significativo ($p < 0,01$), o comprimento do caule de *Zea mays* L. em 27,29% (tabela 5.17). Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas dos tratamentos quando comparados com a testemunha.

Tabela 5.17 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo), por *Bacillus* sp. e *Azospirillum* sp.. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule, peso seco da parte aérea e peso seco radicular. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito

| Tratamento | Área foliar (cm ²) | Comprimento caule (cm) | Peso seco parte aérea (g) | Peso seco radicular (g) |
|---|--------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Testemunha | 196,22 | 19,90 | 1,2480 | 0,7664 |
| <i>Bacillus</i> sp. | 212,10 | 22,87 | 1,2720 | 0,7868 |
| <i>Azospirillum</i> sp. | 185,51 | 22,89 | 1,1873 | 0,7724 |
| <i>Bacillus</i> sp. + <i>Azospirillum</i> sp. | 207,67 | 27,29* | 1,3193 | 0,6304 |

Sob fornecimento reduzido de água, simulando uma condição de estresse hídrico (30% da capacidade de campo), para todos os parâmetros avaliados, com exceção do comprimento do caule, os tratamentos diferiram estatisticamente ($p < 0,01$) da testemunha (tabela 5.18). Incrementos na área foliar foram na ordem de 40,03% para plantas de *Z. mays* L. tratadas com *Bacillus* sp.; 31,38% para aquelas tratadas com *Azospirillum* sp. e 7,05% para aquelas tratadas com as duas linhagens concomitantemente. *Bacillus* sp. foi o que proporcionou maior incremento do peso seco da parte aérea de *Z. mays* L. (48,98%), seguido dos tratamentos com *Azospirillum* sp. (25,67%) e *Bacillus* sp.+*Azospirillum* sp. (25,62%). Em relação ao peso seco radicular, os três tratamentos propiciaram aumento deste parâmetro, com o maior aumento observado para o tratamento com *Azospirillum* sp. (38,26%), seguido de 28,22% e aumento por *Bacillus* sp. e 24,15% com as duas linhagens em consórcio.

Tabela 5.18 - Promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo), por *Bacillus* sp. e *Azospirillum* sp.. Valores médios obtidos de vinte e cinco repetições, durante avaliação de área foliar, comprimento do caule, peso seco da parte aérea e peso seco radicular. Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade, encontram-se com *, em negrito

| Tratamento | Área foliar (cm ²) | Comprimento caule (cm) | Peso seco parte aérea (g) | Peso seco radicular (g) |
|---|--------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Testemunha | 76,92 | 17,91 | 1,2386 | 1,1112 |
| <i>Bacillus</i> sp. | 184,64* | 18,51 | 1,8453* | 1,4248* |
| <i>Azospirillum</i> sp. | 177,99* | 17,60 | 1,5567* | 1,5364* |
| <i>Bacillus</i> sp. + <i>Azospirillum</i> sp. | 159,27* | 18,25 | 1,5560* | 1,3796* |

Azospirillum tem sistemas complicados para controlar a fixação de nitrogênio em resposta às condições ambientais. Mais especificamente, eles fixam nitrogênio apenas sob condições microaeróbicas e quando o nitrogênio fixado é limitante (ZHANG et al., 1997). *A. brasilense* tem sido muito utilizada como RPCP na agricultura até mesmo em escala comercial (FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012) devido a outras propriedades fisiológicas que não sejam a fixação de nitrogênio. Isto foi constatado por Bashan, Singh e Levanony (1989) que ao testarem mutantes de *A. brasilense* (Nif⁻) deficientes para a fixação de nitrogênio em plântulas de tomate, observaram que a melhora do crescimento ocorreu por outro mecanismo diferente da fixação de nitrogênio. No presente trabalho, a promoção de crescimento pode ter sido devido à produção de AIA, solubilização de fosfato, uma vez que esta linhagem produz altas concentrações do fitohormônio e ainda solubiliza bastante Ca-P, entretanto, não é possível afirmar quais mecanismos estão certamente envolvidos.

Sob estresse hídrico, tanto *Bacillus* sp. quanto *Azospirillum* sp. isoladamente, ou em consórcio parecem ter protegido *Z. mays* L. devido à produção de EPS, como o ácido hialurônico, biofilme ou algum outro mecanismo. Embora *Bacillus* sp. tenha proporcionado os maiores incrementos na área foliar e no peso seco da parte aérea, *Azospirillum* sp. proporcionou o maior incremento do peso seco radicular. O uso do consórcio foi significativamente tão interessante quanto o uso das linhagens isoladamente. Então, a escolha do uso do consórcio dependerá além da escolha pessoal, da possibilidade de unir as duas linhagens em uma única formulação biológica que seja viável para futuras aplicações.

De acordo com Cassán et al. (2009), os inoculantes são formulações biológicas que combinam uma população estável de micro-organismo com vários tipos de compostos como fitohormônios e reguladores de crescimento vegetais produzidos e liberados durante a fermentação. Os bacilos parecem ser candidatos ideais para inoculação de plantas sob estresse hídrico, pois sob o ponto de vista de Kumar, Prakash e Johri (2011), algumas características como a formação de esporos e secreção de enzimas contribuem para a sua sobrevivência em

condições ambientais adversas por períodos prolongados. Já o gênero *Azospirillum* é comumente utilizado sozinho ou em combinação com outra RPCP ou fungo micorrízico, como inoculante em vários tipos de culturas (BASHAN; HOLGUIN; de-BASHAN, 2004), pois um pode contribuir para o desenvolvimento do outro. Os benefícios da inoculação de duas ou mais linhagens também foi demonstrado por Figueiredo et al. (2008), que observaram que a co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Paenibacillus polymyxa* atenua alguns efeitos negativos da seca em *Phaseolus vulgaris* L. Vivas et al. (2003) sugerem que bactérias de vida livre e fungos micorrízicos arbusculares devem ser co-inoculados para otimizar a formação e o funcionamento da simbiose micorrízica, tanto em condições normais quanto em condições adversas, uma vez que *Bacillus* sp. sob estresse hídrico tiveram um efeito estimulante no desenvolvimento de *Glomus intraradices*. Gholami et al. (2012) observaram que a inoculação de *Azotobacter* com *Azospirillum* aumentou significativamente o peso seco total em 115%.

Desta forma, apesar de Ahemad e Khan (2011) dizerem que no futuro, o próximo passo é explorar as rizobactérias com múltiplas características de promoção de crescimento, a busca por esse “super” isolado, que expresse todos os caracteres desejáveis, ainda é difícil, então o uso de micro-organismos em consórcio é interessante. Entretanto, Requena et al. (1997) deixaram claro que antes de estabelecer um consórcio é essencial levar em consideração as relações específicas de compatibilidade entre as funções dos micro-organismos selecionados para fazer parte do consórcio, de modo que em conjunto possam melhorar o desempenho da planta.

Referências

- AALTO, M.K.; HELENIUS, E.; KARIOLA, T.; PENNANEN, V.; HEINO, P.; HÖRAK, H.; PUZŮRJOVA, I.; KOLLIST, H.; PALVA, E.T. ERD15 – an attenuator of plant ABA responses and stomatal aperture. **Plant Science**, Limerick, v. 182, p. 19-28, 2012.
- ADERIBIGBE, E.Y.; VISESSANGUAN, W.; SUMPAPAPOL, P.; KONGTONG, K. Sourcing starter cultures for *Parkia biglobosa* fermentation I: phylogenic grouping of *Bacillus* species from commercial ‘iru’ samples. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, Nairobi, v. 2, n. 7, p. 121-127, 2011.
- AGUILERA, L.E.; GUTIÉRREZ, J.R.; MESERVE, P.L. Variation in soil micro-organisms and nutrients underneath and outside the canopy of *Adesmia bedwellii* (Papilionaceae) shrubs in arid coastal Chile following drought and above average rainfall. **Journal of Arid Environments**, London, v. 42, p. 61-70, 1999.

AGUILERA, M.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.; SUÁREZ, A.; GUERRA, V.; LIZAMA, C.; BENNASAR, A. *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1687-1692, 2001.

AGUIRRE-GARRIDO, J.F.; MONTIEL-LUGO, D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, CC.; TORRES-CORTES, G.; MILLÁN, V.; TORO, N.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; RAMÍREZ-SAAD, H.C. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 101, n. 4, p. 891-904, 2012.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: recent advancements. **Insight Microbiology**, New York, v. 1, n. 3, p. 39-54, 2011.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Pavia, v. 163, p. 173-181, 2008.

ALLISON, D.G.; GOLDSBROUGH, M.J. Polysaccharide production in *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 34, p. 3-10, 1994.

AMALRAJ, E.L.D.; MAIYAPPAN, S.; PETER, A.J. In vivo and in vitro studies of *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* on nutrient mobilization, antagonism and plant growth promoting traits. **Journal of Ecobiotechnology**, Humnabad, v. 4, n. 1, p. 35-42, 2012.

AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; STEFANSKI, T.; PINHEIRO, F.G.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, n. 1/2, p. 245-264, 2012.

ANN, Y.C. Rhizobacteria of pepper (*Piper nigrum*) and their antifungal activities. **African Journal of Microbiology**, Nairobi, v. 6, n. 19, p. 4185-4193, 2012.

ANSARI, M.H.; RAHMANI, H.A.; ARDAKANI, M.R.; PAKNEJAD, F.; HABIBI, D.; MAFAKHERI, S. Effect of *Pseudomonas fluorescens* on proline and phytohormonal status of maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. **Annals of Biological Research**, Hefei, v. 3, n. 2, p. 1054-1062, 2012.

ARAÚJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LAKAVA, P.L. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Departamento de Genética – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba ESALQ – USP. 2002. 79p.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER Jr., W.T. Microbial production of plant growth regulators. In: BLAINE, F., METTING Jr. (Ed.). **Soil Microbial Ecology**. New York: Marcel and Dekker, 1993. p. 307-347.

ARSHAD, M.; SHAHAROONA, B.; MAHMOOD, T. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). **Pedosphere**, Nanjing, v. 18, n. 5, p. 611-620, 2008.

ARUN, B.; GOPINATH, B.; SHARMA, S. Plant growth promoting potential of bacteria isolated on N free media from rhizosphere of *Cassia occidentalis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 2012. In press.

ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; BERGE, O.; MAHMOOD, T. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 157-162, 2004.

BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M.I.M.; SKLARZ, M.Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 453-461, 2010.

BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 134, p. 307-319, 2004.

BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 451-457, 1987.

BALACHANDAR, D.; RAJA, P.; KUMAR, K.; SUNDARAM, S.P. Non-rhizobial nodulation in legumes. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, Nairobi, v. 2, n. 2, p. 49-57, 2007.

BALAZS, E.A. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. (Ed.). **Chemistry and biology of hyaluronan**. Amsterdam: Elsevier, 2004. 415p.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. **Meios de cultura para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam N₂ atmosférico**. Brasília: Embrapa, 1996. p. 1-14. (Comunicado Técnico,12).

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

BANERJEE, S.; PALIT, R.; SENGUPTA, C.; STANDING, D. Stress induced solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. **Australian Journal of Crop Science**, New South Wales, v. 4, n. 6, p. 378-383, 2010.

BARBOSA, A.N.; CUNHA, P.D.T.; PIGATTO, M.M.; SILVA, M.L.C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BARNET, Y.M.; CATT, P.C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. **Plant and Soil**, The Hague, v. 135, p. 109-120, 1991.

BARTNICKI-GARCIA, S.; WANG, M.C. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, pathology**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p. 121-137.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 521,577, 2004.

BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, p. 2429-2434, 1989.

BELIMOV, A.A. HONTZEAS, N.; SAFRANOVA, V.I.; DEMCHINSKAYA, S.V.; PILUZZA, G.; BULLITTA, S.; GLICK, B.R. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard *Brassica juncea* L. Czern.). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 241-250, 2005.

BELIMOV, A.A.; SAFRANOVA, V.I.; SERGEYEVA, T.A.; EGOROVA, T.N.; MATVEYEVA, V.A.; TSYGANOV, V.E.; BORISOV, A.Y.; TIKHONOVICH, I.A.; KLUGE, C.; PREISFELD, A.; DIETZ, K.-J.; STEPANOK, V.V. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 642-652, 2001.

BERRAQUEIRO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Pharmaceutica**, Granada, v.17, p.399-406, 1976.

BIANCO, C.; IMPERLINI, E.; CALOGERO, R.; SENATORE, B.; AMORESANO, A.; CARPENTIERI, A.; PUCCI, P.; DEFEZ, R. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 185, p. 373-382, 2006.

BLOM, D.; FABBRI, C.; EBERL, L.; WEISSKOPF, L. Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 3, p. 1000-1008, fev. 2011.

BORGES, L.C.; FERREIRA, D.F. Poder e taxas de erro tipo I dos testes Scott-Knott, Tukey e Student-Newman-Keuls sob didstribuições normal e não normais dos resíduos. **Revista de Matemática e Estatística**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 67-83, 2003.

BRANDA, S.S.; CHU, F.; KEARNS, D.B.; LOSICK, R.; KOLTER, R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 1229-1238, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/DNPV/CLAV, 1992. 365p.

BROADBENT, J.R.; McMAHON, D.J.; WELKER, D.L.; OBERG, C.J.; MOINEAU, S. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 407-423, 2003.

BROWN, A.D. Microbial water stress. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 40, n. 4, p. 803-846, 1976.

CACCIARI, I.; LIPPI, D. Arthrobacters: a successful arid soil bacteria: a review. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, Logan, v. 1, n. 1, p. 1-30, 1987.

ÇAKMAKÇI, R.; DÖNMEZ, M.F.; ERTÜRK, Y.; ERAT, M.; HAZNEDAR, A.; SEKBAN, R. Diversity and metabolic potentail of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 332, p. 299-318, 2010.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. 3ª Reimpressão. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.

CAPPUCCINO, J. C., SHERMAN, N. **Microbiology: A Laboratory Manual**, New York: Benjamim/Cummings Science Publishing, 1992. p. 125-179.

CASTAGNO, L.N.; ESTRELLA, M.J.; SANNAZZARO, A.I.; GRASSANO, A.E.; RUIZ, O.A. Phosphate-solubilization mechanism and *in vitro* plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 110, p. 1151-1165, 2011.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, p. 28-35, 2009.

CERNING, J.; RENARD, C.M.G.C.; THIBAUT, J.F.; BOUILLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M.; TOPISIROVIC, L. Carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 11, p. 3914-3919, 1994.

CHAIHARN, M.; CHUNHALEUCHANON, S.; KOZO, A.; LUMYONG, S. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. **KMITL Science and Technology Journal**, Bangkok, v. 8, n. 1, p. 18-23, 2008.

CHANAL, A.; CHAPON, V.; BENZERARA, K.; CHRISTEN, R.; ACHOUAK, W.; BARRAS, F.; HEULIN, T. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 514-525, 2006.

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

CHEN, F.; WANG, M.; ZHENG, Y.; LUO, J.; YANG, X.; WANG, X. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 675-684, 2010.

CHEN, J.; LEE, S.M.; MAO, Y. protective effect of exopolysaccharide colonic acid of *Escherichia coli* O157:H7 to osmotic and oxidative stress. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 93, p. 282-286, 2004.

CHEN, Y.P.; REKHA, P.D.; ARUN, A.B. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 33-41, 2006.

CHIEN, L.-J.; LEE, C.-K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 77, p. 339-346, 2007.

CHONG, B.F.; BLANK, L.M.; McLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 66, p. 341-351, 2005.

CHOWDHURY, S.P.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; TRIPATHI, A.K. identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar desert, India. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 82-90, 2007.

CHOWDHURY, S.R.; BASAK, R.K.; SEN, R.; ADHIKARI, B. Production of extracellular polysaccharide by *Bacillus megaterium* RB-05 using jute as substrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, p. 6629-6632, 2011.

CHUNG, H.; PARK, M.; MADHAIYAN, M.; SESHADRI, S.; SONG, J.; CHO, H.; SA, T. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 1970-1974, 2005.

CHUN, J. PHYDIT version 3.1. (2001). Disponível em: <<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

CLEARY, P.P.; LARKIN, A. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 140, n. 3, p. 1090-1097, 1979.

COLLAVINO, M.M.;; SANSBERRO, P.A.; MROGINSKI, L.A.; AGUILAR, O.M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 727-738, 2010.

COHEN, A.C.; TRAVAGLIA, C.N.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. Participation of abscísico acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, Ottawa, v. 87, p. 455-462, 2009.

COHEN, M.F.; HAN, X.Y.; MAZZOLA, M. Molecular and physiological comparison of *Azospirillum* spp. isolated from *Rhizoctonia solani* mycelia, wheat rhizosphere, and human skin wounds. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 291-297, 2004.

CONNON, S.A.; LESTER, E.D.; SHAFAT, H.S.; OBENHUBER, D.C.; PONCE, A. Bacterial diversity in hyperarid Atacama desert soils. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 112, p. 1-9, 2007.

COOPER, C.E.; BROWN, G.C. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 40, p. 533-539, 2008.

DeANGELIS, P.L. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 94, p. 295-305, 2012.

DEY, R.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, Pavia, v. 159, p. 371-394, 2004.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 32, p. 1682-1694, 2009.

DING, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; CHEN, S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, p. 1271-1281, 2005.

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

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

ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ, M.F. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Elkoca-05'). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, p. 2104-2119, 2010.

ERTURK, Y.; ERCISLI, S.; HAZNEDAR, A.; CAKMAKCI, R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. **Biological Research**, Santiago de Chile, v. 91, p. 91-98, 2010.

ESSGHAIER, B.; FARDEAU, M.L.; CAYOL, J.L.; HAJLAOUI, M.R.; BOUDABOUS, A.; JIJAKLI, H.; SADFI-ZOUAOUI, N. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 833-846, 2009.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B.; LISBOA, B.B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 55, p. 44-52, 2012.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 29, p. 185-212, 2009.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 326, p. 99-108, 2012.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTÍNEZ, C.R.; CHANWAY, C.P. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 40, p. 182-188, 2008.

FLEMMING, H.-C. The perfect slime. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 251-259, 2011.

FLEMMING, H.-C.J.; WINGENDER, G.; MAYER, C. Physico-chemical properties of biofilms. In: EVANS, L.V. (Ed.). **Biofilms: recent advances in their study and control**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 19-34.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 35-59, 2009.

FTERICH, A.; MAHDHI, M.; CAVIEDES, M.A.; PAJUELO, E.; RIVAS, R.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I.D.; MARS, M. Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 193, p. 385-397, 2011.

GAMALERO, E.; GLICK, B.R. Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. (Ed). **Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change**. Berlin: Springer, 2012. p. 395-412.

GATSON, J.W.; BENZ, B.F.; CHANDRASEKARAN, C.; SATOMI, M.; VENKATESWARAN, K.; HART, M.E. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1475-1484, 2006.

GHOLAMI, A.; BIYARI, A.; GHOLIPOOR, M.; RAHMANI, H.A. Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 43, p. 1263-1272, 2012.

GHOSH, S.; PENTERMAN, J.N.; LITTLE, R.D.; CHAVEZ, R.; GLICK, B.R. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 277-281, 2003.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 1-7, 2005.

GLICK, B.R.; CHENG, Z.; CZARNY, J.; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 329-339, 2007.

GORBUSHINA, A.A. Life on the rocks. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 7, p. 1613-1631, 2007.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 26, p. 192-195, 1951.

GRANT, W.D. Life at low water activity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences**, London, v. 359, p. 1249-1267, 2004.

GRICHKO, V.P.; GLICK, B.R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, p. 11-17, 2001.

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 6961-6968, 2003.

GUIMARÃES, D.P.; COSTA, F.; RODRIGUES, M.J.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acid hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 129-139, 1999.

GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R.C. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 371-377, 2009.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soils microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 83-93, 2002.

HALLSWORTH JE, NOMURA Y, IWAHARA M. Ethanol-induced water stress and fungal growth, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.86, p. 451-456, 1998.

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

HALSALL, D.M.; GIBSON, A.H. Nitrogenase activity of a range of diazotrophic bacteria on straw, straw breakdown products and related compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 21, n. 2, p. 291-298, 1989.

HAMEEDA, B.; REDDY, Y.H.K.; RUPELA, O.P.; KUMAR, G.N.; REDDY, G. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. **Current Microbiology**, New York, v. 53, p. 298-302, 2006.

HANNA, A.L.; YOUSSEF, H.H.; AMER, W.M.; MONIB, M.; FAYEZ, M.; HEGAZI, N.A. Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts, Egypt. **Journal of Advanced Research**, Cairo, 2012. In press.

HARDHAM, A.R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2007.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 916-923, 1983.

HASHIDOKO, Y.; HAYASHI, H.; HASEGAWA, T.; PRUNOMO, E.; OSAKI, M.; TAHARA, S. Frequent isolation of sphingomonads from local rice varieties and other weeds grown on acid sulfate soil in South Kalimantan, Indonesia. **Tropics**, Osaka, v. 15, n. 4, p. 319-385, 2006.

HELSEL, L.O.; HOLLIS, D.G.; STEIGERWALT, A.G.; LEVETT, P.N. Reclassification of *Roseomonas fauriae* Rihs *et al.* 1998 as a later heterotypic synonym of *Azospirillum brasilense* Tarrand *et al.* 1979. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 2753-2755, 2006.

HERNANDEZ, J.-P.; BASHAN, L.E.; RODRIGUEZ, D.J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHAN, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 45, p. 88-93, 2009.

HOQUE, M.S.; BROADHURST, L.M.; THRALL, P.H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 299-309, 2011.

HOWELL, C.R.; BEIER, R.C.; STIPANOVIC, R.D. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* damping-off by the bacterium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 8, p. 1075-1078, 1988.

HUANG, Y.; CHAPMAN, B.; WILSON, M.; HOCKING, A.D. Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, p. 179-185, 2009.

HURRELL, E.; KUCEROVA, E.; LOUGHLIN, M.; CAUBILLA-BARRON, J.; FORSYTHE, S.J. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella serovars* and Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, p. 227-231, 2009.

HU, W.; WANG, J.; McHARDY, I.; LUX, R.; YANG, Z.; LI, Y.; SHI, W. Effects of exopolysaccharide production on liquid vegetative growth, stress survival, and stationary recovery in *Myxococcus xanthus*. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 50, n. 2, p. 241-248, 2012.

ISLAM, M.R.; MADHAIYAN, M.; DEKA BORUAH, H.P.; YIM, W.; LEE, G.; SARAVANAN, S.; QINGLING, F.; HONGQING, H.; TONGMIN, S. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 10, p. 1213-1222, 2009.

IZAWA, N.; HANAMIZU, T.; IIZUKA, R.; SONE, T.; MIZUKOSHI, H.; KIMURA, K.; CHIBA, K. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 2, p. 119-123, 2009.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, p. 163-173, 2004.

JHA, B.K.; PRAGASH, M.G.; CLETUS, J.; RAMAN, G.; SAKTHIVEL, N. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 573-581, 2009.

JHA, C.K.; PATEL, B.; SARAF, M. Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 891-899, 2012.

JOSEPH, B.; PATRA, R.R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, Gorgan, v. 1, n. 2, p. 141-152, 2007.

JOSHI, A.A.; KANEKAR, P.P.; KELKAR, A.S.; SHOUCHE, Y.S.; VANI, A.A.; BORGAVE, S.B.; SARNAIK, S.S. Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar lake, India. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 163-172, 2008.

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

KANG, S.O.; WRIGHT, J.O.; TESORERO, R.A.; LEE, H.; BEALL, B.; CHO, K.H. Thermoregulation of capsule production by *Streptococcus pyogenes*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

KARTHIKEYAN, B.; JOE, M.M.; ISLAM, M.R.; SA, T. ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 56, p. 77-86, 2012.

KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, p. 503-507, 2008.

KASIM, W.A.; OSMAN, M.E.; OMAR, M.N.; EL-DAIM, I.A.A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, 2012. In press.

KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.D. The five "classical" plant hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1197-1210, 1997.

KHAN, A.A.; JILANI, G.; AKHTAR, M.S.; NAQVI, S.M.S.; RASHEED, M. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Science**, Ipswich, v. 1, n. 1, p. 48-58, 2009.

KHANG, B.G.; KIM, W.T.; YUN, H.S.; CHANG, S.C. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. **Plant Biotechnology Reports**, Heidelberg, v. 4, p. 179-183, 2010.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.

KHAN, N.; MISHRA, A.; CHAUHAN, P.S.; NAUTIYAL, C.S. Induction of *Paenibacillus lentimorbus* biofilm by sodium alginate and CaCl₂ alleviates drought stress in chickpea. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 159, p. 371-386, 2011.

KIEFT, T.L. Desert environments: soil microbial communities in hot deserts. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471263397.env178/full>>. Acesso em: 15 maio 2012.

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

KÖBERL, M.; MÜLLER, H.; RAMADAN, E.M.; BERG, G. Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-9, 2011.

KOGAN, G.; ŠOLTÉS, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, p. 17-25, 2007.

KUMAR, A.; BHARGAVA, P.; RAI, L.C. Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing *Enterobacter* and *Exiguobacterium* species from paddy fields of Eastern Uttar Pradesh, India. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 4, n. 9, p. 820-829, 2010.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; DEVI, S.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. **Recent Research in Science and Technology**, Humnabad, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2012a.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiological Crop Ecosystems**. Berlin: Springer, 2011. cap 2, p. 37-59.

KUMAR, C.G. JOO, H.-S.; CHOI, J.-W.; KOO, Y.-M.; CHANG, C.-S. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 673-681, 2004.

KUMAR, D.P.; ANUPAMA, P.D.; SINGH, R.K.; THENMOZHI, R.; NAGASATHYA, A.; THAJUDDIN, N.; PANEERSELVAM, A. Performance studies of free-living tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) rhizospheric *Bacillus* for their multiple plant growth promoting activity. **Journal of Soil Science and Environmental Management**, Nairobi, v. 3, n. 6, p. 142-153, 2012b.

KUMAR, G.P.; KISHORE, N.; AMALRAJ, E.L.D.; HASSAN, S.K.; RASUL, A.; DESAI, S. Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 67, p. 133-140, 2012c.

KUMAR, P.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, Pavia, 2012. In press.

KUMAR, S.R.S.; RAO, K.V.B. Biological nitrogen fixation: a review. **International Journal of Advanced Life Sciences**, Tamil Nadu, v. 1, p. 1-9, 2012.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock Microbial Identification System. In: MILLER, M. (Ed.). **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2006. V.3, p. 1-18.

LEE, I.Y.; SEO, W.T.; KIM, G.J.; KIM, M.K.; AHN, S.G.; KWON, G.S.; PARK, Y.H. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 16, p. 71-75, 1997.

LEE, S.; KA, J.-O.; SONG, H.-G. Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 50, n. 1, p. 45-49, 2012.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005.

LI, J.; SHAH, S.; MOFFATT, B.A.; GLICK, B.R. Isolation and characterization of an unusual 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase gene from *Enterobacter cloacae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 80, p. 255-261, 2001.

LIN, S.-Y.; SHEN, F.-T.; YOUNG, L.-S.; ZHU, Z.-L.; CHEN, W.-M.; YOUNG, C.-C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p. 1185-1190, 2012.

LIU, H.; ZHOU, Y.; LIU, R.; ZHANG, K.-Y.; LAI, R. *Bacillus solisalsi* sp. nov., a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 1460-1464, 2009.

LIU, J.; PENG, M.; LI, Y. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria and the *nifH* gene from mangrove rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, p. 531-539, 2012.

LIU, L.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, p. 99-108, 2011.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOGAN, N.A.; CLERCK, E.; LEBBE, L.; VERHELST, A.; GORIS, J.; FORSYTH, G.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; HEYNDRIKX, M.; VOS, P. *Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookie* sp. nov., from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1071-1076, 2004.

LOOIJESTEIJN, P.J.; BOELS, I. C.; KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 5003-5008, 1999.

LOPRETE, D.M.; HILL, T.W. Isolation and characterization of an endo-(1,4)- β -glucanase secreted by *Achlya ambisexualis*. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 6, p. 903-911, 2002.

LOPES, J.F.B.; NADRADE, E.M.; LOBATO, F.A.O.; PALÁCIO, H.A.Q.; ARRAES, F.D.D. Deposição e decomposição de serapilehira em área de Caatinga. **Revista Agro@mbiente Online**, Boa Vista, v. 3, n. 2, p. 72-79, jul.-dez. 2009.

MAHMOUD, H.M.; SULEMAN, P.; SORKHOH, N.A.; SALAMAH, S.; RADWAN, S.S. The potential of established turf cover for cleaning oily desert soil using rhizoshpehe technology. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 156-167, 2010.

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

MANZONI, S.; SCHIMEL, J.P.; PORPORATO, A. Responses of soil microbial communities to water stress: results from meta-analysis. **Ecology**, New York, v. 93, n. 4, p. 930-938, 2012.

MAUGERI, T.L.; GUGLIANDOLO, C.; CACCAMO, D.; PANICO, A.; LAMA, L.; GAMBACORTA, A.; NICOLAUS, B. A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, p. 515-519, 2002.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 83, p. 177-187, 2000.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promotinf bacteria that confer resistance to water sress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, Limerick, v. 166, p. 525-530, 2004a.

_____. Plant growth-promoting bacteria cinfer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 565-572, 2004b.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 326-335, 2006.

MEHRVARZ, S.; CHAICHI, M.R.; ALIKHANI, H.A. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barely (*Hordeum vulgare* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, Dubai, v. 3, n. 6, p. 822-828, 2008.

MINAXI, L.T.; YADAV, R.C.; SAXENA, J. Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 124-135, 2012.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; Latif, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 47-54, 2001.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A.R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 21-28, 2012.

MORIKAWA, M.; KAGIHIRO, S.; HARUKI, M.; TAKANO, K.; BRANDA, S.; KOLTER, R.; KANAYA, S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. **Microbiology**, Reading, v. 152, p. 2801-2807, 2006.

MOZZI, F.; GIORI, G.S.; OLIVER, G.; VALDEZ, G.F. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 435-439, 1996.

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

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

NICHOLSON, W.L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, p. 410-416, 2002.

NOCKER, A.; FERNÁNDEZ, P.S.; MONTIJN, R.; SCHUREN, F. Effect of air drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 90, p. 86-95, 2012.

OTHMAN, A.A.; AMER, W.M.; FAYEZ, M.; MONIB, M.; HEGAZI, N.A. Biodiversity of diazotrophs associated to the plant cover of north Sinai deserts. **Archives of Agronomy and Soil Science**, London, v. 49, n. 6, p. 683-705, 2003.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 449-461, 1998.

PAL, K.K.; McSPADDEN GARDENER, B. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**, Saint Paul, v.1, p. 1-25, 2006.

PATIL, K.P.; PATIL, D.K.; CHAUDHARI, B.L.; CHINCHOLKAR, S.B. Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidermicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 111, n. 3, p. 286-288, 2011.

PATTEN, C.L.; GLICK, BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3795-3801, 2002.

PAULO, E.M. **Encapsulamento de *Lactobacillus acidophilus* por atomização em spray drying, utilizando exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias lácticas**. 2010. 222p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

PEREIRA, G.V.M.; MAGALHÃES, K.T.; LORENZETTI, E.R.; SOUZA, T.P.; SCHWAN, R.F. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, p. 405-417, 2012.

PEREIRA, J.R.; FARIA, C.M.B. Sorção de fósforo em alguns solos do semiárido do Nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 7, p. 1179-1184, 1998.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 22, p. 187-193, 2011.

PIAO, Z.; CUI, Z.; YIN, B.; HU, J.; ZHOU, C.; XIE, G.; SU, B.; YIN, A. Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 41, p. 371-378, 2005.

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

PRISCHL, M.; HACKL, E.; PASTAR, M.; PFEIFFER, S.; SESSITSCH, A. Genetically modified Bt maize lines containing *cry3Bb1*, *cry1A105* or *cry1Ab2* do not affect the structure and functioning of root-associated endophyte communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 54, p. 39-48, 2012.

PRUSTY R, GRISAFI P, FINK GR. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, p 4153-4157, 2004.

PUENTE, M.E.; BASHAN, Y.; LI, C.Y.; LEBSKY, V.K. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. root colonization and weathering of igneous rocks. **Plant Biology**, New York, v. 6, p. 629-642, 2004.

PUENTE, M.E.; LI, C.Y, BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, p. 389-401, 2009.

QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G.; RICE, D.; HASELKORN, R.; ELMERICH, C. Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. **Biochimie**, Paris, v. 64, p. 495-502, 1982.

RAJA, C.E.; OMINE, K. Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 9, p. 2267-2275, 2012.

RAKH, R.R. RAUT, L.S.; DALVI, S.M.; MANWAR, A.V. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii* 9. **Recent Research in Science and Technology**, Humnabad, v. 3, n. 3, p. 26-34, 2011.

RAMEY, B.E.; KOUTSOUDIS, M.; von BODMAN, S.B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 602-609, 2004.

RANA, A.; SAHARAN, B.; JOSHI, M.; PRASANNA, R.; KUMAR, K.; NAIN, L. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 61, n. 4, p. 893-900, 2011.

RAO, A.V.; VENKATESWARLU, B. Microbial ecology of the soils of Indian Desert. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 10, p. 361-369, 1983.

RÄTTÖ, M.; VERHOEF, R.; SUIHKO, M.-L.; BLANCO, A.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J.; WILTING, R.; SIIKA-AHO, M.; BUCHERT, J. Colanic acid is an exopolysaccharide common to many enterobacteria isolated from paper-machine slimes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 33, p. 359-367, 2006.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 42, p. 489-512, 2011.

REHM, B.H.A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews – Microbiology**, London, v. 8, p. 578-592.

REQUENA, B.Y.N.; JIMENEZ, I.; TORO, M. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. **New Phytologist**, Cambridge, v. 136, p. 667-677, 1997.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 897-906, 2001.

RIHS, J.D.; BRENNER, D.J.; WEAVER, R.E.; STEIGERWALT, A.G.; HOLLIS, D.G.; YU, V.L. *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 12, p. 3275-3283, 1993.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Washington, v. 25, p. 39-67, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALEH-LAKHA, S.; GRICHKO, V.P.; SISLER, E.C.; GLICK, B.R. The effect of the ethylene action inhibitor 1-cyclopropenylmethyl butyl ether on early plant growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, n. 4, p. 307-312, 2004.

SAMIL, A.J.; AWAIS, M.; SHAKOORI, A.R. Preliminary studies on the production of endo-1,4- β -D-glucanases activity produced by *Enterobacter cloacae*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 9, p. 1318-1322, 2008.

SANDHYA, V.; ALI, S.Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; VENKATESWARLU, B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 17-26, 2009.

SANDHYA, V.; ALI, S.Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; VENKATESWARLU, B. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2011.

SANTOS, O.C.S.; PONTES, P.V.M.L.; SANTOS, J.F.M.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M.; LAPORT, M.S. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, p. 604-612, 2010.

SARKAR, S.; ROY, D.; MUKHERJEE, J. Enhanced protease production in a polymethylmethacrylate conico-cylindrical flask by two biofilm-forming bacteria. **Bioresource Biotechnology**, Essex, v. 102, p. 1849-1855, 2011.

SASSER, M. **Technical Note # 101**: Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids (MIDI). Newark, 1990. 6p.

SCHUCH, R.; FISCHETTI, V.A. The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1-23, 2009.

SELDIN, L. *Paenibacillus*, nitrogen fixation and soil fertility. In: LOGAN, N.A.; DE VOS, P. (Eds.). **Endospore-forming soil bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. cap.15, p. 287-307.

SELVAKUMAR, G.; MOHAN, M.; KUNDU, S.; GUPTA, A.D.; JOSHI, P.; NAZIM, S.; GUPTA, H.S. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). **Letters in Applied Microbiology**, Washington, v. 46, p. 171-175, 2008.

SEMINARA, A.; ANGELINI, T.E.; WILKING, J.N.; VLAMAKIS, H.; EBRAHIM, S.; KOLTER, R.; WEITZ, D.A.; BRENNER, M.P. Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. **PNAS**, Washington, v. 109, n. 4, p. 1116-1121, 2012.

SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; PAPA, M.F.; LAGARES, A.; LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 371-381, 2009.

SHAKIR, M.A.; BANO, A.; ARSHAD, M. Rhizosphere bacteria containing ACC-deaminase conferred drought tolerance in wheat grown under semi-arid climate. **Soil and Environment**, Faisalabad, v. 31, n. 1, p. 108-112, 2012.

SHIVAJI, S.; CHATUVERDI, P.; BEGUM, Z.; PINDI, P.K.; MANORAMA, R.; PADMANABAN, D.A.; SHOUCHE, Y.S.; PAWAR, S.; VAISHAMPAYAN, P.; DUTT, C.B.S.; DATTA, G.N.; MANCHANDA, R.K.; RAO, U.R.; BHARGAVA, P.M.; NARLIKAR, J.V. *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 2977-2986, 2009.

SHIVAJI, S.; CHATUVERDI, P.; SURESH, K.; REDDY, G.S.N.; DUTT, C.B.S.; WAINWRIGHT, M.; NARLIKAR, J.V.; BHARGAVA, P.M. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes for collecting air samples from high altitudes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1465-1473, 2006.

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

SILVA, F.de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

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

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

SON, H.-J.; PARK, G.-T.; CHA, M.-S.; HEO, M.-S. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 204-210, 2006.

SOUCHIE, E.L.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; da SILVA, E.M.R. Indoleacetic acid production by P-solubilizing microorganisms and interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 29, n. 3, p. 315-320, 2007.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, Reading, v. 33, p. 152-155, 2006.

STEARNS, J.C.; SHAH, S.; GREENBERG, B.M.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 701-708, 2005.

ŠTURSOVÁ, M.; ŽIFČÁKOVÁ, L.; LEIGH, M.B.; BURGESS, R.; BALDRIAN, P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 735-746, 2012.

SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Microbial cellulases – production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 64, p. 832-844, 2005.

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, n. 3, p. 510-524, 1996.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 3-9, 2001.

SZIDERICS, A.H.; RASCHE, F.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A.; WILHELM, E. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 1195-1202, 2007.

TALLON, R.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M.C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 705-712, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

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

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

THRANE, C.; TRONSMO, A.; JENSEN, D.F. Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 4, p. 331-344, 1997.

TILAK, K.V.B.R.; RANGANAYAKI, N.; PAL, K.K.; DE, R.; SAXENA, A.K.; SHEKHAR NAUTIYAL, C.; MITTAL, S.; TRIPATHI, A.K.; JOHRI, B.N. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 136-150, 2005.

TOLEDO, F.L.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; CALVO, C. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 8470-8475, 2008.

UPADHYAYA, S.K.; MANANDHAR, A.; MAINALI, H.; PKHREL, A.R.; RIJAL, A.; PRADHAN, B.; KOIRALA, B. Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from gut of termite. **Rentech Symposium Compendium**, Dhulikhel, v. 1, p. 14-18, 2012.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De Vos, P.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 60, p. 407-438, 1996.

VARDHARAJULA, S.; ALI, A.Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; BANDI, V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2011.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 81, p. 549-556, 2002.

VIVAS, A.; MARULANDA, A.; RUIZ-LOZANO, J.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 13, p. 249-256, 2003.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 8, n. 2, p. 351-358, 1989.

WAI, S.N.; MIZUNOE, Y.; TAKADE, A.; KAWABATA, S.-I.; YOSHIDA, S.-I. *Vibrio cholera* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3648-3655, 1998.

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 210, p. 103-113, 1999.

WENZEL, M.; SCHÖNIG, I.; BERCHTOLD, M.; KÄMPFER, P.; KÖNIG, H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 32-40, 2002.

WESSELS, M.R.; MOSES, A.E.; GOLDBERG, J.B.; DiCESARE, T.J. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, p. 8317-8321, 1991.

WIDNER, B.; BEHR, R.; DOLLEN, S.V.; TANG, M.; HEU, T.; SLOMA, A.; STERNBERG, D.; DeANGELIS, P.L.; WEIGEL, P.H.; BROWN, S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3747-3752, 2005.

WU, Z.; YUE, H.; LU, J.; LI, C. Characterization of rhizobacterial strain Rs-2 with ACC deaminase activity and its performance in promoting cotton growth under salinity stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 2383-2393, 2012.

XIE, G.H.; SU, B.L.; CUI, Z.J. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. **Acta Microbiologica Sinica**, Beijing, v. 38, p. 480-483, 1998.

XU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; LI, G.; LIU, D.; ZHAO, M.; CAI, N. Growth promotion of Yunnan pine early seedlings in response to foliar application of IAA and IBA. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 6507-6520, 2012.

YAN, H.; DAI, Y.; ZHANG, Y.; YAN, L.; LIU, D. Purification and characterization of an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus cereus*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 72, p. 16277-16285, 2011.

YAN, Y.; YANG, J.; DOU, Y.; CHEN, M.; PING, S.; PENG, J.; LU, W.; ZHANG, W.; YAO, Z.; LI, H.; LIU, W.; HE, S.; GENG, L.; ZHANG, X.; YANG, F.; YU, H.; ZHAN, Y.; LI, D.; LIN, Z.; WANG, Y.; ELMERICH, C.; LIN, M.; JIN, Q. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. **PNAS**, Washington, v. 105, p. 7564-7569, 2008.

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 1059-1065, 2008.

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 89-103, 2001.

YUAN, S.-J.; SUN, M.; SHENG, G.-P.; LI, Y.; LI, W.-W.; YAO, R.-S.; YU, H.-Q. Identification of key constituents and structure of the extracellular polymeric substances excreted by *Bacillus megaterium* TF10 for their flocculation capacity. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 45, p. 1152-1157, 2011.

YUKSEKDAG, Z.N.; ASLIM, B. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 3, p. 581-585, 2008.

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

ZAHIR, Z.A.; GHANI, U.; NAVEED, M.; NADEEM, S.M.; ASGHAR, H.N. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum*) under salt-stressed conditions. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 191, p. 415-424, 2009.

ZAHIR, Z.A.; MUNIR, A.; ASGHAR, H.N.; SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, n. 5, p. 958-963, 2008.

ZHANG, Y.; BURRIS, R.H.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, p. 195-204, 1997.

ZHANG, Y.-F.; HE, L.-Y.; CHEN, Z.-J.; WANG, Q.-Y.; QIAN, M.; SHENG, X.-F. Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 186, p. 1720-1725, 2011.

ZHAO, H.; YAN, H.; ZHOU, S.; XUE, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, L.; DONG, X.; CUI, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, Z. The growth promotion of mung bean (*Phaseolus radiatus*) by *Enterobacter asburiae* HPP16 in acidic soils. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 63, p. 13802-13814, 2011.

ZHAO, J.-L.; ZHOU, L.-G.; WU, J.-Y. Promotion of *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide-protein fractions of plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus*. **Process Biochemistry**, London, v. 45, p. 1517-1522, 2010.





6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Dados de T-RFLP combinados com o sequenciamento em larga escala, propiciaram o entendimento dos principais fatores envolvidos na diferenciação da estrutura da comunidade bacteriana do presente estudo. As variáveis ambientais (dados de análise do solo) tiveram pouca influência nesta diferenciação. O principal fator envolvido na estrutura das comunidades bacterianas estudadas foi o período de amostragem, chuva e seca.
- ✓ Durante o período chuvoso, os micro-organismos encontram-se no solo e na rizosfera de *Cereus jamacaru* de forma diversa e abundante, sendo possível notar a presença de inúmeros gêneros distintos, pertencentes principalmente aos filos Proteobacteria e Bacteroidetes, que podem ser selecionados ou não de modo diferencial na rizosfera, com cada micro-organismo desempenhando uma função específica. Com a chegada do período de seca, as condições tornam-se desfavoráveis, os grupos sensíveis diminuem de proporção e os tolerantes, representados principalmente pelo filo Actinobacteria e pelo gênero *Bacillus*, que dispõem de mecanismos de resistência e aclimatação, são ressaltados. Alguns gêneros representativos podem desempenhar funções importantes na manutenção da interação solo-micro-organismo-*Cereus jamacaru* durante o período de seca, podendo ser selecionados pela cactácea, conferindo algum mecanismo que propicie certo grau de tolerância contra o estresse hídrico às plantas a que se encontram associados.
- ✓ Com os dados obtidos por meio do sequenciamento em larga escala e com os dados obtidos por meio do isolamento em meio com reduzida atividade de água, a detecção de uma alta frequência de *Bacillus*, sugere a adaptação destas bactérias na tolerância ao estresse hídrico, com mecanismos que envolvem principalmente a formação de endósporos, e outros mecanismos de aclimatação que auxiliam sua sobrevivência nestas condições.
- ✓ As bactérias isoladas que cresceram em meio com reduzida atividade de água possuem mecanismos de proteção contra estresse hídrico, como a produção de exopolissacarídeos e/ou biofilme, sendo a produção de EPS dominante sobre a produção de biofilme.

- ✓ A maioria das bactérias que cresceram em meio com reduzida atividade de água possui pelo menos algum tipo de mecanismo envolvido na promoção de crescimento de plantas, seja ele direto e/ou indireto. Os mecanismos dominantes são a produção de ACC deaminase, seguido pela capacidade de solubilização de fosfato, produção de amônia, celulase, AIA e fixação de nitrogênio.
- ✓ Nenhuma linhagem foi considerada ideal na promoção de crescimento de *Zea mays* L. sob fornecimento normal de água, uma vez que não foram observados incrementos nos três parâmetros concomitantemente, quando comparados com a testemunha.
- ✓ Os resultados de plantio de *Z. mays* L. sob estresse hídrico sugerem que a linhagem de *Bacillus* sp. (6.2 RZS 3) protegeu *Zea mays* L. contra os efeitos do estresse hídrico, reduzindo a inibição do crescimento induzida pela seca. Esta proteção pode ter sido conferida pela produção de EPS, biofilme, ACC deaminase, ou ainda por outro mecanismo não aprofundado no presente estudo.
- ✓ O uso do consórcio foi significativamente tão interessante quanto o uso das linhagens isoladamente, uma vez que as linhagens de *Bacillus* sp. (6.2 RZS 3) e *Azospirillum* sp. (3.1 RZS 17) conferiram certa proteção às plantas de *Z. mays* L. na presença de estresse hídrico. A opção pelo uso do consórcio dependerá exclusivamente da possibilidade de criação de uma formulação biológica que seja viável para futuras aplicações.

Anexo

ANEXO A - Padrões de coloração observados durante os testes

| | |
|---|--|
|  | <p>Formação de biofilme</p> <p>A escala de 1 a 5 representa uma ordem crescente na intensidade da coloração violeta, conforme solubilização do cristal violeta incorporado ao biofilme e quantificada a DO a 560 nm (DO_{560nm}), onde: 1) controle negativo; 2) $DO_{560nm} < 0,1$ (-) (ausência de formação); 3) DO_{560nm} 0,1-0,2 (+) (baixa formação); 4) DO_{560nm} 0,2-1,0 (++) (média formação) e 5) $DO_{560nm} > 1,0$ (+++) (alta formação) de biofilme.</p> |
|  | <p>Produção de AIA</p> <p>A escala de 1 a 5 representa uma ordem crescente na intensidade da coloração avermelhada e na concentração de AIA, onde: 1) controle negativo; 2) $< 1 \mu g.mL^{-1}$ (+) (baixa produção); 3) $1-10 \mu g.mL^{-1}$ (++) (média produção); 4) $11-50 \mu g.mL^{-1}$ (+++) (alta produção); 5) $> 51 \mu g.mL^{-1}$ (++++) (elevada produção) de AIA.</p> |
|  | <p>Solubilização de fosfato</p> <p>A escala de 1 a 5 representa uma ordem crescente na intensidade da coloração amarelada, onde o amarelo indica a presença de fosfato solúvel. Assim, temos: 1) controle negativo; 2) $< 50 \mu g.mL^{-1}$ (+) (baixa solubilização); 3) $50-100 \mu g.mL^{-1}$ (++) (média solubilização); 4) $101-500 \mu g.mL^{-1}$ (+++) (alta solubilização); 5) $> 501 \mu g.mL^{-1}$ (++++) (elevada solubilização) de P-Ca.</p> |
|  | <p>Produção de amônia</p> <p>A escala de 1 a 5 representa uma ordem crescente na intensidade da coloração castanho-alaranjada. Por tratar-se de um teste qualitativo, ficaram assim atribuídos: 1) controle negativo; 2) (+) (baixa produção); 3) (++) (média produção) e 4) e 5) (+++) (alta produção) de amônia.</p> |