



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

MARIA NAIARA PEREIRA DA SILVA

**Caracterização bioquímica, molecular e associativa de bactérias
diazotróficas isoladas de capim-buffel no Semiárido**

PETROLINA – PE

2023

MARIA NAIARA PEREIRA DA SILVA

**Caracterização bioquímica, molecular e associativa de bactérias
diazotróficas isoladas de capim-buffel no semiárido**

Dissertação apresentada a Universidade Federal
do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus
Ciências Agrárias, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Tadeu Vinhas Voltolini

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes
Júnior

PETROLINA – PE

2023

Silva, Maria Naiara Pereira da
S586c Caracterização bioquímica, molecular e associativa de bactérias diazotróficas isoladas de capim-buffel no Semiárido / Maria Naiara Pereira da Silva. – Petrolina-PE, 2023.
63 f.: il.; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2023.

Orientador: Prof.º Dr.º Tadeu Vinhas Voltolini.

Inclui referências.

1. Crescimento (Plantas). 2. Gramínea forrageira. 3. Nitrogênio - Fixação. I. Título. II. Voltolini, Tadeu Vinhas. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 581.31

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA NAIARA PEREIRA DA SILVA

**Caracterização bioquímica, molecular e associativa
de bactérias diazotróficas isoladas de capim-buffel
no semiárido**


Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 20 de Janeiro de 2023.


Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **TADEU VINHAS VOLTOLINI**
Data: 21/02/2023 10:47:56-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

(Tadeu Vinhas Voltolini, Dr. em Zootecnia, Embrapa Semiárido)

Documento assinado digitalmente
 **PAULO IVAN FERNANDES JUNIOR**
Data: 10/02/2023 12:30:36-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

(Paulo Ivan Fernandes Júnior, Dr. Agronomia, Embrapa
Semiárido)

Documento assinado digitalmente
 **PAULA ROSE DE ALMEIDA RIBEIRO**
Data: 13/02/2023 09:49:00-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

(Paula Rose de Almeida Ribeiro, Dra. Microbiologia Agrícola,
Embrapa Semiárido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me fortalecer nos momentos mais difíceis que enfrentei, sendo meu guia e minha fortaleza.

A minha família, meu porto seguro, minha mãe Antônia e meu pai João, meus tios/pais Maria e Valdomir, que continuaram a me ensinar e cuidar com tanto amor e carinho. Ao meu namorado, Silvan, por todo amor e paciência, ao meu irmão Paulo, meu sobrinho Samuel e minha cunhada Claerte, por todo amor e cuidado de sempre, meus tios, primos e meus avós por todos os ensinamentos.

Aos meus orientadores, Tadeu Voltolini e Paulo Ivan, pelos ensinamentos, dedicação e paciência, meu muito obrigado. A Paula Rose pelos ensinamentos e contribuição na realização desse trabalho.

A universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), ao programa de pós-graduação em Ciência Animal, bem como a Embrapa Semiárido, pelo apoio e estrutura para realização deste trabalho.

Aos meus amigos do LANA (Laboratório de Nutrição Animal), que, quando diante de uma nova etapa na minha vida, estiveram dividindo diversos momentos. Fabiana, Luara, Letícia, Leydimara, Kacya, Elisangela, Anna, Alida, Lorrane, Mirna, Paloma, Cleyton, Deneson, Neilson, Italo, Clésio e Renaldo. Assim como os amigos que estiveram comigo do laboratório de Microbiologia do Solo, Viviane, Raíra, Valeria e Iracema. A realização do trabalho com pessoas como vocês se torna mais gratificante, muito obrigado!

Agradeço também a Herbert Mouse da Embrapa semiárido por todo apoio e paciência, assim como todos os funcionários e colegas, que direto ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

Diversas gramíneas forrageiras tem sido utilizadas para formação de pastagens no semiárido brasileiro. O capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*) é uma das espécies que se destaca. O alto teor de nitrogênio exigido nas pastagens forrageiras, leva a problemática quanto ao uso de fertilizantes nitrogenados, tornando-se necessário a implementação de tecnologias sustentáveis como o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas. O objetivo foi isolar e caracterizar bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas a quatro genótipos de capim-buffel (Biloela, West Australian, CPATSA 79134 e CPATSA 79150) e verificar a capacidade de promoção de crescimento para o capim buffel. As bactérias foram isoladas do colmo, raiz e solo rizosférico. Os isolados foram submetidos a extração de DNA por meio de kit comercial, amplificação do gene simbiótico *nifH*, análise de perfis de banda por meio do BOX-PCR, sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, avaliação quanto a produção de ácido indolacético, sideróforos, biofilme, solubilização de fosfato de cálcio e uma avaliação de promoção de crescimento. Foi obtido um total de 23 bactérias positivas para a amplificação do gene *nifH*, oriundas de diferentes genótipos e partes da planta. Das 23 bactérias, 17 apresentaram perfis distintos na análise do BOX-PCR. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA revelou que os 14 isolados sequenciados pertencem a nove diferentes gêneros: *Enterobacter* (3), *Klebsiella* (3), *Agrobacterium* (2), *Azorhizobium* (1), *Bacillus* (1), *Brevibacillus* (1), *Comamonas* (1), *Pseudacidovorax* (1), e *Pseudoxanthomonas* (1). O genótipo CPATSA 79150 apresentou maior abundância de bactérias (9), seguido por Biloela (3), CPATSA 79134 e West Australian apresentaram apenas um isolado cada. Os isolados B3, B7, B10, B18 e B21 apresentaram as maiores produções de ácido indolacético (AIA) com triptofano, um isolado foi positivo para a produção de sideróforos, (B20). Na avaliação de biofilme, o isolado B2 apresentou maior produção. Quanto a solubilização de fosfato de cálcio quatro isolados foram positivos (B3 B9, B20 e B23). O cultivar Áridus, apresentou maior teor de massa seca da parte aérea nos tratamentos nitrogenados, controle e inoculado (B1 e B3) e da raiz, nos tratamentos nitrogenados e inoculados (B1, B2, B3, B8, B15 E B23). Já CPATSA 7754, apenas na parte aérea, as estirpe B9 e B12, apresentaram produções semelhante a aplicação de 50% de nitrogênio, além de ser superior ao tratamento controle. Na composição química, quanto ao teor de MS os inoculados (B7, B8, B12 e B13) tiveram maior teor para a cultivar CPATSA 7754, bem como o teor de MM, onde o tratamento controle foi superior. Já em relação ao teor de MO, o inoculado B4, na cultivar Áridus, foi superior. Quanto ao teor de N e PB, o inoculado B2, tratamento nitrogenado 50%, bem como controle, na cultivar CPATSA 7754, foram superiores em relação a cultivar Áridus. Para avaliação do teor de nitrogênio acumulado na parte aérea, a análise de interação mostrou que na inoculação das cepas B8 e B12, a cultivar CPATSA 7754, foi superior a cultivar Áridus. A região semiárida de Pernambuco apresenta bactérias diazotróficas isoladas de capim-buffel com potencial de promoção de crescimento de gramínea forrageira.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, Gramínea forrageira.

ABSTRACT

Several forage grasses have been used to form pastures in the Brazilian semi-arid region. The buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) is one of the species that stands out. The high nitrogen content required in forage pastures raises the issue of using nitrogen fertilizers, making it necessary to implement sustainable technologies such as the use of plant growth-promoting bacteria. The objective was to isolate and characterize plant growth promoting bacteria associated with four genotypes of buffel grass (Biloela, West Australian, CPATSA 79134 and CPATSA 79150) and to verify their ability to promote growth for buffel grass. Bacteria were isolated from stem, root and rhizosphere soil. The isolates were subjected to DNA extraction using a commercial kit, amplification of the symbiotic *nifH* gene, analysis of band profiles using BOX-PCR, partial sequencing of the 16S rRNA gene, evaluation for the production of indoleacetic acid, siderophores, biofilm, calcium phosphate solubilization and an assessment of growth promotion. A total of 23 bacteria positive for the amplification of the *nifH* gene were obtained, originating from different genotypes and parts of the plant. Of the 23 bacteria, 17 showed different profiles in the BOX-PCR analysis. Partial sequencing of the 16S rRNA gene revealed that the 14 sequenced isolates belong to nine different genera: *Enterobacter* (3), *Klebsiella* (3), *Agrobacterium* (2), *Azorhizobium* (1), *Bacillus* (1), *Brevibacillus* (1), *Comamonas* (1), *Pseudacidovorax* (1), and *Pseudoxanthomonas* (1). The CPATSA 79150 genotype had the highest abundance of bacteria (9), followed by Biloela (3), CPATSA 79134 and West Australian had only one isolate each. The isolates B3, B7, B10, B18 and B21 showed the highest production of indoleacetic acid (IAA) with tryptophan, one isolate was positive for the production of siderophores, (B20). In the biofilm evaluation, isolate B2 showed the highest production. As for the solubilization of calcium phosphate, four isolates were positive (B3, B9, B20 and B23). Cultivar *Áridus* showed a higher dry mass content of the aerial part in the nitrogen treatments, control and inoculated (B1 and B3) and of the root, in the nitrogen treatments and inoculated (B1, B2, B3, B8, B15 and B23). On the other hand, CPATSA 7754, only in the aerial part, strains B9 and B12, presented production similar to the application of 50% nitrogen, in addition to being superior to the control treatment. In the chemical composition, regarding the DM content, the inoculates (B7, B8, B12 and B13) had a higher content for the CPATSA 7754 cultivar, as well as the MM content, where the control treatment was higher. In relation to the OM content, the inoculated B4, in the *Áridus* cultivar, was superior. Regarding the N and CP content, the B2 inoculated, 50% nitrogen treatment, as well as the control, in the CPATSA 7754 cultivar, were superior in relation to the *Áridus* cultivar. To evaluate the accumulated nitrogen content in the aerial part, the interaction analysis showed that in the inoculation of strains B8 and B12, the CPATSA 7754 cultivar was superior to the *Áridus* cultivar. The semi-arid region of Pernambuco has diazotrophic bacteria isolated from buffel grass with the potential to promote the growth of forage grass.

Key-words: Biological nitrogen fixation, Forage grass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dendograma de similaridade das características fenotípicas dos vinte e três isolados de bactérias diazotróficas de quatro genótipos de capim-buffel oriundas da parte aérea, raiz e solo rizosférico.....	40
Figura 2 - Amplificação por meio do Box-PCR dos 23 isolados de capim-buffel.....	41
Figura 3 - Dendograma de similaridade BOX-PCR dos 18 isolados bacterianos do capim-buffel (G1:Biloela; G2: West Australian; G3:CPATSA 79134 e G4:CPATSA 79150)	42
Figura 4 - Árvore filogenética de Neighbor-Joining das sequências do gene 16S rRNA de 14 estirpes bacterianas isoladas de <i>Cenchrus ciliaris</i> e estirpes tipo (1165 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética.....	45
Figura 5 - Halo de solubilização de bactérias isoladas de capim-buffel.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização química do solo do local de coleta do capim-buffel.	30
Tabela 2 - Análise do solo quanto as suas características químicas do campo experimental da Embrapa Semiárido Petrolina – PE.....	38
Tabela 3 - Caracterização fenotípica dos vinte e três isolados de bactérias diazotróficas isoladas de quatro genótipos de capim-buffel.....	39
Tabela 4 - Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 14 bactérias isoladas do colmo, raiz e solo rizosférico de <i>Cenchrus ciliaris</i> cultivado no Campo Experimental da Caatinga da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE.....	44
Tabela 5 - Produção de Ácido Indolacético com triptofano (AIACT) e sem triptofano (AIAST), sideróforos (SDRF), biofilme (BIO) e solubilização de fosfato (SF) por bactérias diazotróficas do colmo, raiz e solo rizosférico de capim-buffel cultivado no campo experimental da Embrapa Semiárido Petrolina – PE.....	47
Tabela 6 - Massa seca da parte aérea e raiz do cultivar Áridus inoculado com 18 bactérias diazotróficas isoladas do capim-buffel, 1 isolado (Ab-V5) e 2 tratamentos nitrogenados.....	49
Tabela 7 - Massa seca da parte aérea e raiz do cultivar CPATSA 7754 inoculado com 18 bactérias diazotróficas isoladas do capim-buffel, 1 isolado (ABV-5) e 2 tratamentos nitrogenados.....	50
Tabela 8. Análise de interação para as cultivares Áridus e CPATSA 7754, inoculado com 18 bactérias diazotróficas isoladas do capim-buffel, 1 isolado (Ab-V5) e 2 tratamentos nitrogenados, para avaliação de matéria seca (MS), minerais totais (MM), proteína bruta (PB), nitrogênio (N) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA).....	52

Lista de abreviaturas e siglas

N	Nitrogênio
PGPB	Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas
PGPR	Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
N ₂	Nitrogênio molecular
NH ₃	Amônia
P	Fósforo
Fe	Ferro
Al	Alumínio
Ca	Cálcio
AIA	Ácido Indol-3-acético
N ₂ O	Oxido nitroso
K ₂ O	Potássio
NaCl	Cloreto de sódio
ADE	Água destilada estéril
CMISA	Coleção de Microrganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido
OPGMA	Unweighed Pair Group Method
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1 Pastagem no semiárido do Brasil	15
2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	16
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	16
2.4 Outros mecanismos para a promoção do crescimento: Solubilização de fosfatos, sideróforos, produção de fitohormônios e biofilme	18
2.4.1 Solubilização de fosfato	18
2.4.2 Produção de Sideróforos	19
2.4.3 Ácido Indolacético (AIA)	19
2.4.4 Biofilme	20
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
Referências bibliográficas	22
Capítulo 2: Caracterização fenotípica, molecular e bioquímica de bactérias diazotróficas e avaliação da promoção do crescimento para capim-buffel	27
1. Introdução	28
2. Material e métodos	30
2.1 Local de coleta e amostragem	30
2.2 Isolamento e purificação das bactérias	30
2.3 Caracterização fenotípica das bactérias	32
2.4 Caracterização genotípica dos isolados bacterianos	32
2.4.1 Extração de DNA	32
2.4.2 Amplificação do gene <i>nifH</i>	32
2.4.3 Box-PCR	33
2.4.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	33
2.5 Caracterização bioquímica dos isolados	34
2.5.1 Produção de ácido indolacético <i>in vitro</i> (AIA)	34
2.5.2 Produção de sideróforos	35
2.5.3 Solubilização de fosfato de cálcio	36
2.5.4 Produção de biofilme	36

2.6 Promoção de crescimento	37
2.7 Análises estatísticas	38
3. Resultados	39
3.1 Caracterização fenotípica dos isolados	39
3.2 Caracterização molecular dos isolados	41
3.2.1 Amplificação do gene <i>nif</i>	41
3.2.2 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	43
3.3 Avaliação da produção de Ácido-indolacético, sideróforos e biofilme	46
3.4 Solubilização de fosfato de cálcio	48
3.5 Avaliação da promoção de crescimento	48
4. Discussão	54
4.1 Caracterização fenotípica	54
4.2 Caracterização molecular e bioquímica dos isolados	54
4.3 Promoção de crescimento	58
5. Conclusão	60
Referências bibliográficas	61

1. Introdução

O semiárido brasileiro tem a caatinga como vegetação predominante a qual fornece uma composição rica e diversificada quanto ao seu potencial forrageiro (CAMPOS et al., 2017). No entanto, o uso das espécies nativas como pastagens não são suficientes para atender as demandas nutricionais, uma vez que, apesar da diversidade, a região semiárida é caracterizada pelas irregularidades das chuvas e longos períodos de “escassez” sendo estes fatores determinantes na produção de pastagens e como estratégia, tem-se o uso de forrageiras adaptadas como o capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*) podendo assim reduzir as deficiências alimentares (SANTOS et al., 2011; FREITAS et al., 2013; ARAUJO et al., 2015; BEZERRA et al., 2014).

O capim-buffel se destaca pelo sistema radicular eficiente, profundo e pelo armazenamento de reservas nutritivas em suas hastes (MOREIRA et al., 2007). É uma gramínea resistente a seca, ao pastejo intensivo e apresenta grande capacidade de rebrota. Os solos da região semiárida apresentam por característica menor teor de nutrientes e matéria orgânica, o qual limita a produção sem adubação (FREITAS et al., 2013). Nesse sentido, o uso de insumos biológicos e a seleção de genótipos com potencial forrageiro, podem contribuir para uma maior exploração desta gramínea no semiárido brasileiro.

O alto teor de nitrogênio (N) exigido nas pastagens de forrageiras, leva a problemáticas quanto ao uso de fertilizantes nitrogenados, sendo necessário a implementação de tecnologias sustentáveis para as pastagens no semiárido como o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, as chamadas PGPB.

A presença de bactérias diazotróficas nos solos podem ser uma fonte alternativa de nitrogênio (N) (AMARAL et al., 2022). Uma vez que a presença de tais bactérias é associado ao aumento de enzimas específicas, que por sua vez estão envolvidas no desenvolvimento das plantas e na produção de diferentes fitohormônios (BACKER et al., 2018; RIBEIRO et al., 2020). Além disso, a variação entre genótipos de plantas pode revelar a existência de isolados bacterianos mais eficientes. Em gramíneas tem sido demonstrado uma variação na população de bactérias promotoras de crescimento em plantas entre genótipos, incluindo o capim elefante

(VIDEIRA et al., 2012), brachiaria (RIBEIRO et al., 2020), capim baiano (DOBEREINER, 1996) e na cana-de-açúcar (REIS JR et al., 2000).

Amaral et al. (2022) ao isolar e caracterizar diferentes genótipos de *Paspalum* demonstrou haver uma grande diversidade de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) associadas aos diferentes genótipos estudados. Com o objetivo de isolar e avaliar a diversidade molecular quanto a promoção de crescimento de plantas e a capacidade de PGPB de plantas forrageiras do semiárido, Antunes et al. (2019) descreve uma diversidade de táxons de PGPB entre as forrageiras estudadas, dentre elas o capim-buffel, o qual apresentou três isolados bacterianos (ESA 392, ESA 397 e ESA 398) potencias para inoculantes de gramíneas no semiárido brasileiro.

Apesar da elevada adaptabilidade das espécies de capim-buffel as regiões semiáridas, há poucos estudos avaliando a diversidade e a eficiência dos isolados de bactérias promotoras de crescimento vegetal associado a esta espécie. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias promotoras de crescimento vegetal associada a quatro genótipos de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), bem como, verificar a capacidade de promoção de crescimento para o capim-buffel na região semiárida de Pernambuco.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Pastagem no semiárido do Brasil

A delimitação do semiárido no Brasil é de 1.182.697 Km², sendo o Nordeste responsável por concentrar 89,5%. O semiárido é composto por 1 262 municípios, dos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. A precipitação pluviométrica média anual é igual ou inferior a 800 mm, índice de Aridez de Thornthwaite igual ou inferior a 0,50 e percentual diário de déficit hídrico igual ou superior a 60%, considerando todos os dias do ano (SUDENE, 2017).

A pecuária tem grande impacto socioeconômico para as populações rurais (CANDIDO et al., 2005) em que o uso de pastagens nativas é a principal fonte de alimento para os rebanhos (COUTINHO et al., 2013). No entanto, o manejo inadequado das pastagens no semiárido tem intensificado os processos erosivos e conseqüentemente o aparecimento de áreas descobertas, distúrbios fisiológicos da espécie dominante, mudanças da composição botânica e invasão de novas espécies as quais resultam em menor quantidade e qualidade da pastagem (FREITAS et al., 2013).

Diversas gramíneas forrageiras tem sido utilizadas para formação de pastagens no semiárido em que o capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*) é um dos que se destaca (MOREIRA et al., 2007). Originária da África, Índia e Indonésia é uma espécie perene com crescimento médio 0,6 a 1,5 m de altura a depender do cultivar (OLIVEIRA, 1993). Pertence à família Poaceae, gênero *Cenchrus* e espécie *Cenchrus ciliaris* (AYEZA, 1981). Se destaca pelo sistema radicular eficiente e profundo, bem como pelo armazenamento de reservas nutritivas em suas hastes, a qual confere a capacidade de rebrota durante os períodos de estiagem (MOREIRA et al., 2007; MONÇÃO et al., 2011). Com relação a produtividade, está associada as condições locais, e varia de 4 a 12 t ha⁻¹ ano⁻¹ de matéria seca (OLIVEIRA, 1993).

O uso de fertilizantes é uma das principais estratégias de manejo na produção de pastagens a fim de manter altos níveis de produtividade (PORTO et al., 2014). Nesse sentido, o uso de fertilizantes nitrogenados se faz necessário, uma vez que a limitação deste nas pastagens tropicais ocasiona queda acentuada da capacidade de suporte da pastagem e no ganho de peso animal (ROCHA et al., 2006). Segundo Silva (2008)

a aplicação de nitrogênio leva a uma melhor qualidade das gramíneas forrageiras com relação ao crescimento, aumento da produção de massa seca e a síntese de proteínas com distribuição anual mais uniforme.

O nitrogênio (N) é o nutriente mais limitante na produtividade de gramíneas, está envolvido no processo de emissões de perfilhos e folhas, produção de massa seca e diretamente relacionado a alterações no sistema radicular (SIMIONI et al., 2014). No entanto, o elevado custo de produção, seja ambiental ou econômico, do nitrogênio tem levado a procura por alternativas que minimizem o uso de fertilizantes sem causar perda de produção (HUNGRIA, 2011).

Assim, o uso de forrageiras adaptadas associado aos recursos biológicos das plantas e do solo, como o uso de bactérias diazotróficas, são cada vez mais estudadas, visto a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, e o aumento na absorção de água e nutrientes (QUADROS et al., 2014).

2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

As bactérias que tem efeito benéfico no crescimento e o desenvolvimento das plantas são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BONATELLI et al., 2021). Diversos mecanismos estão envolvidos na promoção do crescimento vegetal, os quais podem ser de ação direta (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de fitormônios) ou indireta (produção de sideróforos e biofilme) além de estar relacionado ao tipo de planta hospedeira (SINGH et al., 2017; KHAN et al., 2020).

2.3 Fixação biológica de Nitrogênio (FBN)

A maior parte do nitrogênio atmosférico na forma de gás é indisponível para os animais e plantas sendo necessário vias de entrada no sistema terrestre como adubação sintética nitrogenada, raios solares e a fixação biológica de nitrogênio (FREITAS et al., 2019).

A FBN consiste em transformar o nitrogênio molecular (N_2) o qual está presente na atmosfera em amônia (NH_3) no qual alguns procaríotos são capazes de converter

de forma a ser absorvido pelas plantas sendo assim chamados de bactérias diazotróficas ou promotoras de crescimento (MARCHETTI; BARP, 2015). Nesse processo de FBN a enzima nitrogenase é responsável pela conversão de nitrogênio molecular (N_2) da atmosfera em amônia facilitando a absorção pelas plantas (FREITAS et al., 2019). O gene chamado *nif* juntamente com outros genes estruturais são responsáveis pelo processo de fixação do N_2 , em que estão envolvidos no processo da síntese e atividade da enzima nitrogenase, como ativação da proteína de ferro, doação de elétrons, biossíntese do cofator de ferro molibdênio dentre outros genes reguladores (REED et al., 2011).

Os microrganismos que desenvolvem associações benéficas com as plantas podem estar presente tanto internamente quanto externamente na planta hospedeira (AFZAL et al., 2019). Segundo Evans e Burris, (1992) as diazotróficas de vida livre fixam e usam para si o N, as simbióticas o processo se dá pela formação de estruturas específicas os chamados nódulos, nas associativas não há formação de estruturas específicas.

O mecanismo de nutrição da planta está associado a um complexo microbioma, essas associações quando se tratando de fixação de nitrogênio é bem reportada as leguminosas e limitando em gramíneas (MAHMUD et al., 2020). Ao se tratar de espécies nativas não leguminosas, a elevada diversidade em especial da caatinga quanto aos fixadores de nitrogênio, ainda não foram avaliadas (FREITAS; FERNANDES JUNIOR, 2021).

É relatado que a contribuição simbiótica de leguminosas em $kg\ ha^{-1}$ é maior que os sistemas não simbióticos, no entanto em culturas como trigo, arroz, cana-de-açúcar e espécies lenhosas, as diazotróficas associativas ou de vida livre atuam na fixação de N_2 atmosférico (MOREIRA et al., 2010). Kavamura et al. (2013) demonstrou a potencialidade dos isolados de bactérias promotoras de crescimento vegetal isolado da rizosfera de cacto nativos. Bem como Fernandes Júnior et al. (2015) ao indicar o potencial de *Tripogon spicatus* no aumento do crescimento da raiz e/ou parte aérea de arroz.

2.4 Outros mecanismos para a promoção do crescimento: Solubilização de fosfatos, sideróforos, produção de fitohormônios e biofilme

2.4.1 Solubilização de fosfato

O fósforo é o segundo nutriente mais exigido pela planta para manutenção de um crescimento saudável, o maior percentual de fósforo presente é indisponível para a planta assim, estas absorvem fosfato apenas como íons monobásicos (H_2PO_4^-) e dibásico (HPO_4^{2-}) (GOUDA et al., 2018). A presença do fósforo é essencial uma vez que este está envolvido em diversos processos fisiológicos da planta, como na transferência e armazenamento de energia, crescimento, reprodução da planta, fotossíntese, metabolismo do carbono e formação da membrana (ANAND et al., 2016).

Os microrganismos atuam diretamente na disponibilidade de fósforo para a planta como na liberação de ácidos orgânicos, excreção de íons H, produção de sideróforos, e produção da enzima fosfatase. Nesse sentido a solubilização promovida por tais microrganismos pode se alterar a depender do solo, espécie e idade da planta (ODUNFA; OSO, 1978). A liberação de ácidos orgânicos é relatado como o principal mecanismo de solubilização de fosfato inorgânico promovido pelos microrganismos (SILVA FILHO et al., 2001).

A promoção de solubilização de fosfato inorgânico do solo se dá pela interação dos ácidos orgânicos com o P pela ligação de Fe e Al e/ou atuação como agentes quelantes dos íons de Ca, Al e Fe (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999). Ao se tratar de solos em regiões semiáridas, Novaes e Smyth (1999) relatam elevados teores de Fe e Al diminuindo assim a disponibilidade de Pi no solo.

Diferentes bactérias são descritas com capacidade de liberar fosfato orgânico ou solubilizar fosfato inorgânico, especialmente aquelas presentes na rizosfera, como fosfato tricálcico, dicálcico, fosfato hidroxiapatita e fosfato de rocha (OTEINO et al., 2015). Gêneros de bactérias solubilizadores de fosfato como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* tem sido relatado na literatura (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

2.4.2 Produção de Sideróforos

Assim como as plantas, os microrganismos desenvolvem diversos mecanismos para a obtenção de nutrientes, o ferro embora essencial, nem sempre é acessível a planta (BRIAT et al., 2015). Sob condições limitantes de ferro, os microrganismos produzem pequenas moléculas orgânicas chamadas sideróforos aumentando a absorção de ferro, ou seja, são quelantes específicos de Fe^{3+} incorporando o mineral no metabolismo celular (SILVA & OLIVEIRA, 2011; GOUDA et al., 2018). Segundo Ahmed & Holmstrom (2014) os sideróforos ligam-se ao Fe^{3+} e então o complexo sideróforo-ferro é movido para o interior da célula através da membrana por receptores específicos.

O complexo ferro-sideróforo além da disponibilidade de ferro acaba por atuar na ação contra patógenos, uma vez que há uma competição por nutrientes, impedindo a manutenção destes (PUIG et al., 2017).

2.4.3 Ácido Indolacético (AIA)

A produção de hormônios é também uma das características das bactérias promotoras de crescimento vegetal, as quais são substâncias excretadas em concentrações nano e micromoleculares que influenciam diretamente o crescimento da planta (GLICK, 1995). São descritos diferentes tipos de hormônios vegetais, como o ácido abscísico, citocinas, etileno, giberelinas e ácido indol-3-acético (AIA), sendo o etileno e o AIA os que mais se destacam nas interações planta-bactéria (AFZAL et al., 2019).

O ácido indolacético é uma auxina presente em diversos processos fisiológicos da planta. Segundo Glick et al. (2012) o AIA está relacionado com a formação das raízes laterais e adventícias, biossíntese de metabolitos, e controle de estresse. Diferentes rotas são utilizadas para a síntese do AIA, as que dependem do aminoácido triptofano são chamadas de “dependentes de triptofano”, em que este é convertido em Indol-3-acetamina (IAM) pela ação da enzima Triptofano-2-monooxigenase, e posteriormente convertido a ácido indol-acético por meio da ação da enzima IAM-hidrolase. Já as rotas que não dependem são chamadas de “independentes do triptofano” (PATTEN; GLICK, 2002). Moreira et al. (2013) avaliando espécies

forrageiras como o capim tanzânia (*Panicum maximum*), pensacola (*Paspalum sauræ*), capim brachiaria (*Brachiaria decumbens*) e azevém (*Lolium multiflorum*) verificou que todos produziram ácido indolacético.

2.4.4 Biofilme

O biofilme é caracterizado como uma comunidade microbiana que pode aderir-se a uma superfície ou permanecer intimamente ligada entre si, composta por carboidratos extracelulares, proteínas e exopolissacarídeos (BRANDA et al., 2005). Gêneros como *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* são frequentemente descritas como também produtoras/formadoras de biofilme (UDE et al., 2006). KAVAMURA et al. (2013), descreve o gênero *Bacillus* isolado de cactáceas no semiárido do nordeste brasileiro como positivo a formação de biofilme.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificação de microrganismos fixadores de nitrogênio com capacidade de promoção de crescimento a partir do capim-buffel cultivado no semiárido de Pernambuco.

3.2 Objetivos específicos

- Estruturar uma coleção de cultura dos isolados de quatro genótipos de capim-buffel da parte aérea e raiz.
- Avaliação da diversidade fenotípica e molecular dos isolados de quatro genótipos de capim-buffel
- Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, sideróforos, ácido Indolacético e biofilme.
- Avaliar os isolados bacterianos quanto a promoção de crescimento vegetal em capim-buffel

Referências bibliográficas

- AFZAL, I., SHINWARI, Z. K., SIKANDAR, S., SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological research**, v. 221, p. 36-49, 2019.
- AHMED, E.; HOLMSTROM, S.J.M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbiology Biotechnologic**, v.7, p.196–208, 2014.
- AMARAL, M. B., RIBEIRO, T. G., ALVES, G. C., COELHO, M. R. R., MATTA, F. D. P., BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D. The occurrence of rhizobacteria from Paspalum genotypes and their effects on plant growth. **Scientia Agricola**, v. 79, 2022.
- ANAND, K.; KUMARI, B.; MALLICK, M. A. Phosphate solubilizing microbes: na effective and alternative approach as bio-fertilizers. **International Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v.8, n.2, p.37-40, 2016.
- ANTUNES, G. R., SANTANA, S. R. A., ESCOBAR, I. E. C., DA SILVA BRASIL, M., DE ARAÚJO, G. G. L., VOLTOLINI, T. V., & FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Associative diazotrophic bacteria from forage grasses in the Brazilian semi-arid region are effective plant growth promoters. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 10, p. 899-907, 2019.
- ARAÚJO, D. L. C.; OLIVEIRA, M. E.; LOPES, J. B.; ALVES, A. A.; RODRIGUES, M. M.; MOURA, R. L.; FILHO, M. A. M. Desempenho e Comportamento de caprinos em pastagem de capim Andropógon sob diferentes Ofertas de forragem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 2301-2316, 2015.
- AYEZA, R. El buffel grass: Utilidad y manejo de una gramínea. Buenos Aires: **Hemisferio Sur**, 1981. Hemisfério Sul, 1981.
- BACKER, R.; ROKEM, J. S.; ILANGUMARAN, G.; LAMONT, J.; PRASLICKOVA, D.; RICCI, E.; SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D. L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1473, 2018.
- BEZERRA, H. F. C.; SANTOS, E. M.; OLIVEIRA, J. S.; PINHO, R. M. A.; PERAZZO, A. F.; SILVA, A. P. G.; RAMOS, J. P. F.; PEREIRA, G. A. Fenos de capim-buffel amonizados com ureia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, p. 561-569, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BONATELLI, M. L., LACERDA-JÚNIOR, G. V., DOS REIS JUNIOR, F. B., FERNANDES-JÚNIOR, P. I., MELO, I. S., QUECINE, M. C Beneficial Plant-Associated Microorganisms From Semiarid Regions and Seasonally Dry Environments: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, p. 1–16, 2021.

- BRANDA, S. S.; VIK, Å.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: The matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20–26, 2005.
- BRIAT, J. F.; DUBOS, C.; GAYMARD, F. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 1, p. 33–40, 2015.
- CÂNDIDO, M. J. D., ARAÚJO, G. G. L. D., & CAVALCANTE, M. A. B. Pastagens no ecossistema semiárido brasileiro: atualização e perspectivas futuras. **Simpósio sobre pastagens nos ecossistemas brasileiros: alternativas viáveis visando a sustentabilidade dos ecossistemas de produção de ruminantes nos diferentes ecossistemas**. 2005.
- COUTINHO, M. J. F., CARNEIRO, M. S. D. S., EDVAN, R. L., PINTO, A. P. A pecuária como atividade estabilizadora no Semiárido Brasileiro. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 434-441, 2013.
- DÖBEREINER, Johanna. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **O Instituto**, 1966.
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: **Chapman and Hall**, p.1-42, 1992.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I., AIDAR, S. D. T., MORGANTE, C. V., GAVA, C. A. T., ZILLI, J. É., SOUZA, L. S. B. D., MARTINS, L. M. V. The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 993-1002, 2015.
- FREITAS, P. M. D.; SANTOS, E. M.; RAMOS, J. P. F.; BEZERRA, H. F. C.; SILVA, I. F.; PERAZZO, A. F.; PEREIRA, G. A. Efeito da adubação orgânica e altura de resíduo sobre a produção de fitomassa do capim-buffel. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, p. 587-598, 2013.
- FREITAS, P. V. D. X., TOMAZELLO, D. A., ISMAR, M. G., ROMUALDO, T. T. B. A. F., MACIEL, Â. A. L. P., FIRMINO, A. E., DE SOUZA FRANÇA, A. F. Produção de gramíneas forrageiras inoculadas com *azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 2, p. 31-46, 2019.
- FREITAS, A., D., S., FERNANDES JUNIOR, P., I. Fixação Biológica de Nitrogênio em Agroecossistemas da Região Semiárida do Nordeste. In; FREITAS, A., D., S., FERNANDES JUNIOR, P., I. *Solos Sustentáveis para a Agricultura no Nordeste*. ed. Brasília. **Embrapa Meio-Norte-Livro científico (ALICE)**. cap. 2, p. 375-408, 2021.
- GLICK, B. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.
- Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GOUDA, S., KERRY, R. G., D, G., PARAMITHIOTIS, S., SHIN, H. S., e PATRA, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological research**, v. 206, p. 131-140, 2018.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina, **Embrapa Soja**. (DOCUMENTO 325) p. 36, 2011.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L. DA; et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013.

KHAN, N., BANO, A. M., BABAR, A. Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0231426, 2020.

MAHMUD, K.; MAKAJU, S.; IBRAHIM, R.; MISSAOUI, A. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 97, 2020.

MARCHETTI, M. M., BARP, E. A. Efeito rizosfera: a importância de bactérias fixadoras de nitrogênio para o solo/planta–revisão. **Ignis: Periódico Científico de Arquitetura e Urbanismo, Engenharias e Tecnologia da Informação**, v. 4, n. 1, p. 61-71, 2015.

MONÇÃO, F. P.; OLIVEIRA, E. R.; TONISSI, R. H. e GOES, B. O capim buffel. **Revista Agrarian**, v.4, n.11, p.258-264, 2011.

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

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

MOREIRA, J. N. LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARAÚJO, G. G. L.; SILVA, G. C. Potencial de produção de capim-buffel na época seca no Semiárido Pernambucano. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 22-29, 2007.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. **Universidade Federal de Vicosa**, Vicosa, MG (Brasil). Dept. de Solos, 1999.

ODUNFA, V.S.A.; OSO, B.A. Bacterial population in the rhizosphere soils of cowpea and sorghum. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, Paris, v.15, n.4, p.413-420, 1978.

OLIVEIRA, M.C. de. Capim buffel: produção e manejo nas regiões secas do Nordeste. Petrolina. **Embrapa-CPATSA**, 1993. P.18 (Embrapa-CPATSA. Circular Técnica, 27).

OTEINO, N., LALLY, R. D., KIWANUKA, S., LLOYD, A., RYAN, D., GERMAINE, K. J., & DOWLING, D. N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 745, 2015.

- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. **Canadian journal of microbiology**, v. 48, n. 7, p. 635–642, 2002.
- PORTO, E. M. V., VITOR, C. M. T., ALVES, D. D., LIMA, M. V. G., SILVA, M. F. Características morfogênicas de cultivares do capim buffel submetidos à adubação nitrogenada. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 10, n. 1, p. 14-21, 2014.
- PUIG, S.; RAMOS-ALONSO, L.; ROMERO, A. M.; MARTÍNEZ-PASTOR, M. T. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. **Metallomics**, v. 9, n. 11, p. 1483–1500, 2017.
- QUADROS, P. D. D., ROESCH, L. F. W., SILVA, P. R. F. D., VIEIRA, V. M., ROEHRS, D. D., & CAMARGO, F. A. D. O. Field agronomic performance of maize hybrids inoculated with *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n.2, p.209-218, 2014.
- 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**, v. 42, p. 489-512, 2011.
- REIS JUNIOR, F.B.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic *Herbaspirillum* spp. and *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.) **Plant and soil**, p. 153-159, 2000.
- RIBEIRO, N.V.D.S.; VIDAL, M.S.; BARRIOS, S.C.L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and growth promoting characteristics of diazotrophic bacteria isolated from 20 genotypes of *Brachiaria* spp. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 187-205, 2020.
- ROCHA, G. P., EVANGELISTA, A. R., DE LIMA, J. A., e ROSA, B. Adubação nitrogenada em gramíneas do gênero *Cynodon*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2006.
- RODRIGUEZ, H., FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.
- SANTOS, T. C. P.; ALFARO, C. E. P.; FIGUEIREDO, S. M. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos e ovinos na microrregião de Patos, região Semiárida da Paraíba, **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 206-212, 2011.
- SILVA, D. E. S. G.; OLIVEIRA, L. G. Avaliação da produção de sideróforos em actinomicetos. XIX Congresso Interno de Iniciação Científica UNICAMP, 2011.
- SILVA, A. G. Potencial produtivo e valor nutritivo do capim Mombaça submetido a doses de nitrogênio e alturas de cortes. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfato na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n. 12, p.1495-1508, 2001.

SIMIONI, T. A., HOFFMANN, A., GOMES, F. J., MOUSQUER, C. J., TEIXEIRA, U. H. G., FERNANDES, G. A., PAULA, D. C. Senescência, remoção, translocação de nutrientes e valor nutritivo em gramíneas tropicais. **Pubvet**, v. 8, p. 1551-1697, 2014.

SINGH, S.; SINGH, V.; PAL, K. Importance of micro organisms in agriculture. **Climate and Environmental Changes: Impact, Challenges and Solutions**, , n. February, p. 93–117, 2017.

SUDENE – SUPERINTENDENCIA DO DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE. Delimitação do semiárido: Resolução N° 115, de 23 novembro de 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/sudene/pt-br/assuntos/projetos-e-iniciativas/delimitacao-do-semiarido>. Acesso em 02 outub 2021.

UDE, S.; ARNOLD, D. L.; MOON, C. D.; TIMMS-WILSON, T.; SPIERS, A. J. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1997–2011, 2006.

VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, D.M.; MORAIS, R.F.; BORGES, W.L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1, p. 51-66, 2012.

Capítulo 2: Caracterização fenotípica, molecular e bioquímica de bactérias diazotróficas e avaliação da promoção do crescimento para capim-buffel

Maria Naiara Pereira da Silva¹, Paulo Ivan Fernandes Júnior², Tadeu Vinhas Voltolini²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, Petrolina – PE; ²Embrapa Semiárido

Resumo: A demanda por nutrientes para os pastos da região semiárida brasileira, tem levado a busca por implementação de tecnologias sustentáveis como o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas. O objetivo foi isolar e caracterizar bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas a quatro genótipos de capim-buffel (Biloela, West Australian, CPATSA 79134 e CPATSA 79150) e avaliar a capacidade de promoção de crescimento dos microrganismos em capim-buffel. Plantas de capim-buffel foram colhidas e os microrganismos isoladas do colmo, raiz e solo rizosférico. Os isolados foram submetidos a extração de DNA, amplificação do gene simbiótico *nifH*, análise de perfis de banda BOX-PCR, sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, produção de fitohormônios, sideróforos, biofilme, solubilização de fosfato de cálcio e ensaio para avaliação da promoção de crescimento em casa de vegetação com dois cultivares (Aridus e CPATSA 7754), inoculação com dezoito bactérias, uma bactéria de referência (Ab-V5) e dois tratamentos nitrogenados (50 e 100%) e um grupo controle negativo (sem inoculação e N mineral). Das 23 bactérias, 17 apresentaram perfis distintos na análise do BOX-PCR. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA revelou que os 14 isolados sequenciados pertencem a nove diferentes gêneros: *Enterobacter* (3), *Klebsiella* (3), *Agrobacterium* (2), *Azorhizobium* (1), *Bacillus* (1), *Brevibacillus* (1), *Comamonas* (1), *Pseudacidovorax* (1), e *Pseudoxanthomonas* (1). O genótipo CPATSA 79150 apresentou maior abundância de bactérias (9), seguido por Biloela (3), CPATSA 79134 e West Australian apresentaram apenas um isolado cada. Os isolados B3, B7, B10, B18 e B21 apresentaram as maiores produções de ácido indolacético (AIA) com triptofano, um isolado foi positivo para a produção de sideróforos, (B20). Na avaliação de biofilme, o isolado B2 apresentou maior produção. Quanto a solubilização de fosfato de cálcio quatro isolados foram positivos (B3 B9, B20 e B23). O cultivar Áridus, apresentou maior teor de massa seca da parte aérea nos tratamentos nitrogenados, controle e inoculado (B1 e B3) e da raiz, nos tratamentos nitrogenados e inoculados (B1, B2, B3, B8, B15 E B23). Já CPATSA 7754, apenas na parte aérea, as estirpe B9 e B12, apresentaram produções semelhante a aplicação de 50% de nitrogênio, além de ser superior ao tratamento controle. Na composição química, quanto ao teor de MS os inoculados (B7, B8, B12 e B13) tiveram maior teor para a cultivar CPATSA 7754, bem como o teor de MM, onde o tratamento controle foi superior. Já em relação ao teor de MO, o inoculado B4, na cultivar Áridus, foi superior. Quanto ao teor de N e PB, o inoculado B2, tratamento nitrogenado 50%, bem como controle, na cultivar CPATSA 7754, foram superiores em relação a cultivar Áridus. Para avaliação do teor de nitrogênio acumulado na parte aérea, a análise de interação mostrou que na inoculação das cepas B8 e B12, a cultivar CPATSA 7754, foi superior a cultivar Áridus. A região semiárida de Pernambuco apresenta bactérias diazotróficas isoladas de capim-buffel com potencial de promoção de crescimento de gramínea forrageira.

Palavras –chave: Fixação biológica de nitrogênio, Gramínea forrageira, *Cenchrus ciliaris*

1. Introdução

O nitrogênio (N) é um dos macronutrientes essenciais para o desenvolvimento da planta, e está diretamente associado as características morfogênicas e estruturais, como o surgimento e crescimento de folhas, senescência foliar e aumento da capacidade de rebrota. Em se tratando de pastagens forrageiras, a presença do nitrogênio influencia diretamente nas características morfofisiológicas das plantas forrageiras. A adubação nitrogenada é bastante utilizada com o objetivo de suprir a necessidade do mineral e por sua ação nas diversas atividades metabólicas (ALVES et al., 2021).

Segundo Nogueira et al. (2015) a problemática quanto ao uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos está relacionado tanto a perda, uma vez que é altamente móvel no solo e volátil, o que diminui sua eficácia, quanto a possibilidade de levar danos ambientais devido a emissões de gases como o óxido nitroso (N_2O) e a lixiviação, além de ser um insumo com elevado custo de produção. Dessa forma, tem-se buscado alternativas como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), representando um sistema biológico capaz de aproveitar o nitrogênio atmosférico por meio de microrganismos promotores de crescimento em plantas.

Na atmosfera o N apresenta-se quimicamente estável não sendo acessível a maioria dos seres vivos (SILVA; MELLONI, 2011). Moreira e Siqueira, (2006) descrevem uma pequena parcela de procariontos que possuem a enzima nitrogenase reduzindo assim o N_2 para a forma inorgânica combinada NH_3 tornando assim disponível para as plantas, os quais são estes chamados de diazotróficos.

Além da capacidade de fixar nitrogênio, os microrganismos diazotróficos podem contribuir com a síntese de fitormônios (AFZAL et al., 2019), produção de sideróforos (GOUDA et al., 2018), produção de biofilme (BRANDA et al., 2005), solubilização de fosfato de cálcio (SILVA FILHO et al., 2001), dentre outros mecanismos que estão associados a promoção de crescimento na planta.

Em se tratando de sistemas de pastejo, o capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*) se destaca como espécie forrageira utilizada em ambientes tropicais e subtropicais em todo o mundo, assim como no semiárido brasileiro (BRUNO et al., 2017). No entanto há poucos estudos com avaliação da diversidade de bactérias diazotróficas

associativas e com capacidade para promoção de crescimento em genótipos específicos de capim-buffel, especialmente considerando as cultivares de capim-buffel disponíveis para o uso na região semiárida brasileira.

O conhecimento da população bacteriana nativa, bem como, a otimização das condições de crescimento, são importantes para o entendimento da diversidade de bactérias de culturas específicas, assim como, a compreensão da capacidade de promoção de crescimento. Objetivou-se isolar e caracterizar bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas a quatro genótipos de capim-buffel e avaliar a capacidade de promoção de crescimento de duas cultivares de capim-buffel por meio da inoculação com microrganismos promotores de crescimento em plantas.

2. Material e métodos

2.1 Local de coleta e amostragem

Foram colhidas amostras de plantas de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), composta por parte aérea e raiz, em área de pastagem já estabelecida no campo experimental da Embrapa Semiárido Petrolina, PE (9° 04' 10.9" W e 40° 19' 42.6" W). Amostras de quatro genótipos, com três exemplares de cada, sendo os cultivares: Biloela, West Australian (WA); CPATSA 79134 e CPATSA 79150. As coletas aconteceram em julho de 2021.

Na área em que as amostras foram obtidas, o manejo do capim é em sequeiro, porém, houve irrigação na implementação do experimento, a adubação de fundação/plantio foi de 40 kg/há⁻¹ de nitrogênio (N); 100 Kg/ha⁻¹ de fósforo (P₂O₅); 120 kg/ha⁻¹ de potássio K₂O e 10 m³/ha⁻¹ de esterco caprino. Após 30 dias foi realizado a aplicação de 40 Kg de N/ha⁻¹ (adubação de crescimento). A análise das características químicas do solo é demonstrada na Tabela 1. Anualmente é realizada a mesma adubação de plantio para manutenção.

Tabela 1. Caracterização química do solo do local de coleta do capim-buffel

	C.E	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V
	mS cm ⁻¹	-	Mg dm ⁻³					Cmolc c dm ⁻³				%
0-20 cm	0,7	6,0	4,5	0,4	0,1	1,2	0,5	0,05	1,0	2,3	3,3	70,5
20-40 cm	0,6	5,5	0,9	0,3	0,09	1,7	0,8	0,05	1,0	2,9	3,9	75,2

Fonte: De autoria própria. C.E: Condutividade elétrica; pH: Potencial Hidrogeniônico; P: Fósforo; Na: sódio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; Al: Alumínio; H+Al: Acidez potencial; SB: Saturação de bases; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação por bases.

2.2 Isolamento e purificação das bactérias

Amostras da planta inteira de capim-buffel foram transportadas e armazenadas em câmara fria no laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido para os procedimentos de isolamento. Foram separadas a parte aérea (colmo), raiz e solo rizosférico. Para o isolamento das bactérias, foram obtidas três suspensões bacterianas contendo as bactérias da superfície da raiz, solo rizosférico e colmo, conforme descrito a seguir.

O excesso de solo da raiz foi removido e 5 g de raiz lavada e acondicionada em frascos de solução com contendo solução salina (NaCl 0,85% p/v) e agitada manualmente de forma vigorosa para a obtenção da suspensão 1, com o objetivo de obter os micro-organismos presentes na superfície radicular. Após este processo a raiz foi desinfestada superficialmente com NaClO (2% v/v) e o excesso do agente sanitizante removido por lavagem com água destilada. Posteriormente, a raiz foi lavada em água destilada estéril (ADE) e triturada em 45 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v), para a obtenção da suspensão 2, com o objetivo de isolar os micro-organismos endofíticos da raiz. Para as amostras de colmo, foi utilizado a região da base da parte aérea, logo acima da região do solo. Para cada planta, 5 g do colmo foi desinfestado superficialmente com a remoção do agente sanitizante da mesma forma que foi descrita para a raiz. Também como descrito para a raiz o colmo foi triturado em solução salina para a obtenção da suspensão 3, com o objetivo de isolar os micro-organismos endofíticos do colmo.

As três suspensões obtidas (suspensões 1, 2 e 3) foram diluídas seriadamente até a diluição 10^{-5} . As diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-5} para cada uma das suspensões foram inoculadas em 4 meios sem-issólidos para a obtenção dos micro-organismos capazes de fixar o N em condições microaerofílicas (Döbereiner et al., 1995). As diluições seriadas 10^{-2} a 10^{-5} foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de meios BMGM, JMV, NFB e LGI semi-sólido em triplicata.

Não foi obtido sucesso nos três dos quatro meios, sendo apenas o meio BMGM utilizado para o isolamento das bactérias. Foi utilizada a diluição menos concentrada, onde houve a formação de película no meio semissólido (caracterizando a FBN em condições microaerofílicas). Estas bactérias foram novamente transferidas para os mesmos meios semissólidos e incubadas a 28°C. As repetições onde houve a formação de película após a reinoculação foram purificadas após sucessivas inoculações em placas de Petri contendo meio BMGM sólido. As bactérias puras foram crescidas em meio YM líquido com glicerol e preservados em freezer a -80 °C na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA).

2.3 Caracterização fenotípica das bactérias

As bactérias crescidas em meio BMGM sólido por um período de 48 h, foram avaliadas quanto a sua cor, produção ou não de muco, tamanho (< ou > 2mm), elevação, aparência (homogênea ou heterogênea) e transparência ou opacidade das colônias. A similaridade entre os isolados foi avaliado por meio de suas características fenotípicas, os dados foram tabulados em uma matriz binária, estimada e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) e representados por um dendograma pelo Past (HAMMER et al., 2001).

2.4 Caracterização genotípica dos isolados bacterianos

2.4.1 Extração de DNA

Os isolados bacterianos que apresentaram capacidade de formação de película em meio semissólido tiveram o DNA extraído utilizando o kit comercial e o protocolo modificado em que as bactérias foram crescidas em meio YM líquido em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio e mantidos sob agitação constante em um agitador orbital de 120 rpm por 48 h. Posteriormente foram retiradas alíquotas de 1 mL do caldo de cultivo e transferidos para microtubos tipo eppendorfs de 1,5 mL. As amostras foram congeladas a -80 °C por 20 minutos e descongeladas a temperatura ambiente, centrifugadas a 10 000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido as etapas de extração do Kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (LGC Biotecnologia).

2.4.2 Amplificação do gene *nifH*

Foi realizada a amplificação para o gene *nifH*, que codifica a enzima nitrogenase redutase. A amplificação foi feita utilizando a técnica de PCR direto e nested-PCR. Na primeira reação foi utilizado o par de iniciadores PoIF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PoIR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) os quais na maioria dos procariotos fixadores de nitrogênio (N) são utilizados para amplificar uma

região do gene *nifH* altamente conservada. O segundo par utilizado foi o *nifH*For (ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAGG) e o *nifH*Rev (ACGATGTAGATTTTCCTGGGCCTTGTT) segundo a metodologia de Soares et al. (2006). A reação de PCR foi realizada por meio do mix de soluções de volume final de 10 µL, contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ 2,0 mM, dNTP 0,30 mM, Taq DNA polimerase 0,25 U, água Miliq estéril, e 0,30 µM de cada iniciador PolF e PolR para a primeira reação, a segunda foi realizada em 10 µL do mix de solução mais 1,0 µL do produto da primeira PCR como molde. Os ciclos de amplificação constam de um ciclo de desnaturação inicial (5 min a 94 °C), 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (45 segundos a 55 °C), extensão (1 min a 72 °C) e um ciclo de extensão final (10 min a 72°C), 4 °C final em um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram detectados por eletroforese de gel de agarose (1%) por trinta minutos e visualizados sob luz UV em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia).

2.4.3 BOX-PCR

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 20 µL, contendo 1 µM do primer Box A1R, dNTP 1,5 mM, Taq DNA polimerase 0,25 U, água Miliq estéril, 2 µM do DNA extraído das amostras. Os ciclos de amplificação constam de um ciclo de desnaturação inicial (6 min a 95 °C), 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min a 52 °C), extensão (2 min a 72 °C) e um ciclo de extensão final (10 min a 72°C), 4 °C final em um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram detectados por eletroforese de gel de agarose (1%) por trinta minutos e visualizados sob luz UV em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia). As imagens foram exportadas para o software Bionumerics v 7.5 (Applied Maths) e construído o dendograma de similaridade pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Dice.

2.4.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a determinação do posicionamento taxonômico dos isolados, as bactérias consideradas “*nifH* positivas” tiveram o gene 16S rRNA amplificado por PCR e

purificado com kit comercial, seguindo as orientações do fabricante. Para a amplificação, a reação foi dimensionada para 30 µl contendo solução tampão de reação 1x, MgCl₂ 2,0 mM, dNTP 0,5 mM, Taq DNA polimerase 0,25 U, água Miliq estéril e 0,20 mM de cada primer iniciador. Os primers iniciadores foram o Y1 (TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) e Y3 (TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC).

A amplificação foi realizada em um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems) sendo uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 6 min e 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e extensão final 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose (1%), posteriormente purificado com kit de purificação (EasyPure PCR), para o sequenciamento do DNA. O sequenciamento foi realizado na empresa ACTgene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada – RS).

Para análise da qualidade das sequências do gene 16S rRNA foi utilizado o programa SeqScanner v. 2.0 (Applied Biosystems). As sequências com boa qualidade e tamanho igual ou superior a 1000 pb foram utilizadas na análise comparativa com as sequências depositadas no GeneBank do NCBI por meio do Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências disponíveis e com alta similaridade foram baixadas bem como sequências de similaridade próximas, para o alinhamento e a construção da árvore filogenética. Para ao alinhamento foi utilizado algoritmo Clustalw Multiple Alignment e a árvore construída pelo método estatístico Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) utilizando o método Jukes-Cantor para o cálculo das distâncias. Foi utilizado o Programa Mega x (Kumar et al. 2018) para as análises de alinhamento e filogenia.

2.5 Caracterização bioquímica dos isolados

2.5.1 Produção de ácido idolacético *in vitro* (AIA)

A quantificação do AIA foi realizado para todos os isolados obtidos utilizando o método calorimétrico desenvolvido por Sarwar e Kremer (1995) com adaptações e utilizando *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) como referência. As bactérias foram inoculadas em meio líquido, DYGS, com e sem suplementação de triptofano, a partir

de um pré-inoculo (as bactérias foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura líquido DYGS, sob agitação constante por três dias). Posteriormente, foi avaliado a densidade ótica (DO) das culturas em espectrofotômetro, ajustando-se a concentração para 540 nm (OD540) para 0,5, afim de padronizar a concentração celular. Após o ajuste alíquotas de 1 mL foram centrifugadas por 5 min a 6000 g e 250 µL do sobrenadante foi reservado. Posteriormente para a estimativa de produção do AIA 100 µL de reagente de Salkowski (2% de FeCl₃, 0,5 M em 35% de ácido perclórico) foi adicionado a 100 µL do sobrenadante em poços de microplacas de poliestireno (microplacas de Elisa com 96 poços) e incubados em temperatura ambiente no escuro por 30 minutos. Nos isolados capazes de produzir AIA foi observado o surgimento da cor rósea (sendo a maior intensidade de cor para aquelas com maior potencial de produção de AIA) as amostras foram lidas em espectrofotômetro (UV-vis Thermo) para avaliar a intensidade de coloração com comprimento de onda (λ) a 530 nm. A estimativa de produção de AIA foi realizada por meio de uma curva de calibração, onde os dados de absorbância foram interpolados nesta curva. Para elaboração da curva foram utilizadas concentrações conhecidas de AIA sintético: 0, 150, 300, 500 e 750 µM. Os dados de absorbância foram plotados em um gráfico de dispersão (x, y) no Microsoft Office Excel.

2.5.2 Produção de sideróforos

Foi utilizada a metodologia quantitativa de microplacas descrito por Arora e Verma (2017) com adaptações para verificar a produção de sideróforos. As bactérias foram crescidas em meio DYGS líquido (bactérias inoculadas em 5 mL de meio líquido DYGS e sob agitação constante por três dias). Um mL do caldo de cultivo foi centrifugado a 9.500 g por 5 min. *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) foi utilizado como referência e uma amostra branca (apenas com meio DYGS para verificar possíveis contaminações), ambos submetidos ao mesmo processo de centrifugação. Do sobrenadante 100 µl foram transferidos para poços de microplacas poliestireno (microplaca de Elisa) contendo 100 µl do corante cromoazurol S (CAS). Posteriormente a placa foi armazenada no escuro por 30 min (tempo necessário para ocorrer a mudança da coloração). Os isolados que apresentaram mudança de cor do azul para o amarelo foram considerados positivos para a produção de sideróforos.

Em espectrofotômetro (UV-Vis Multiskan GO, Thermo-Scientific) foram avaliados a intensidade da coloração e da curva de calibração em comprimento de onda (λ) 630 nm. Os dados de absorbância foram interpolados em uma curva de calibração para a estimativa de produção de sideróforos. A curva foi então construída em concentrações conhecidas de EDTA: (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6 μ M). Os dados de absorbância foram plotados em um gráfico de dispersão (x, y) no Microsoft Office Excel.

2.5.3 Solubilização de fosfato de cálcio

As bactérias foram avaliadas quanto a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio (CaHPO_4) em meio sólido, onde inicialmente foram crescidas em meio Dygs por 48 h a 28 °C sob agitação constante em mesa agitadora a 100 rpm. Foram coletadas 10 μ L do caldo de cultivo em triplicata em pontos equidistantes de placas de Petri contendo meio de cultura GL (Glicose 10 g L^{-1} , extrato de levedura 0,5 g L^{-1} e ágar 15 g L^{-1}), foi acrescido ao meio antes da distribuição em placas 100 mL L^{-1} de cloreto de cálcio (10%) e 50 mL L^{-1} de fosfato de sódio bibásico (10%) (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). A capacidade de solubilizar foi observado pela formação de halo translúcido ao redor da colônia avaliado dez dias após a inoculação. O cálculo de índice de solubilização foi feito pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia correspondente: $(IS) = \text{Ø Halo (mm)} / \text{Ø Colônia (mm)}$, para cada uma das placas calculando a média das três réplicas que formaram uma repetição. Os isolados foram então classificados: baixa ($IS <$), média ($2 < IS < 4$) e alta ($IS > 4$) capacidade de solubilização.

2.5.4 Produção de biofilme

As bactérias foram crescidas em meio Dygs (5 mL de meio sob agitação constante por 48 h). A densidade ótica DO foi ajustada a 0.1 em espectrofotômetro (540 nm). Posteriormente 5 μ L do caldo de cultivo foram transferidos para poços de microplacas de poliestireno (microplaca de Elisa) suplementado com 195 μ L de meio Dygs. Os isolados foram então submetidos ao período de crescimento em triplicata de forma estática (sem agitação) em temperatura ambiente. Posteriormente ao período

de crescimento o conteúdo da placa foi descartado seguido por três lavagem com 200 µl de ADE em cada poço, as placas foram então deixadas para secar em temperatura ambiente por 20 min, sendo adicionados 100 µl de violeta Genciana (0,25%) por 5 min em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas como descrito anteriormente, foram então adicionados 200 µl da solução álcool-acetona (80:20). A capacidade de produzir biofilme foi observado a coloração nos poços roxo azulado sendo então submetidos ao espectrofotômetro a 620 nm.

Foi construído uma curva de calibração para estimar a produção de biofilme em que as diluições de violeta Genciana (0,25%) em solução álcool-acetona (80:20) foram realizadas nas concentrações de 0; 25; 50; 75; 100; 130; 160; 187,5 e 250 µg mL⁻¹.

2.6 Promoção de crescimento

18 isolados bacterianos, anteriormente descritos pela análise do BOX-PCR, foram inoculados diretamente nas sementes de duas cultivares de capim-buffel (Áridus e CPATSA 7754), em vasos, sob condições de casa de vegetação. Foram utilizados vasos de 5 L preenchidos com solo coletado no Campo Experimental de Bebedouro na Embrapa Semiárido, Petrolina – PE. As características químicas do solo estão descritas na tabela 2. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. As bactérias isoladas foram crescidas em meio DYGS líquido em tubos de ensaio e mantidos sob agitação constante em um agitador orbital de 120 rpm por 48 h. Cinco sementes foram semeadas por vaso e 1 mL do caldo de cultivo foram inoculadas sobre cada semente em março de 2022. Os tratamentos experimentais incluíram inoculações únicas de cada bactéria isolada, a cepa de referência *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) (recomendada pelo MAPA para *Brachiaria* spp.), tratamento não inoculado e sem nitrogênio mineral e dois tratamentos com adição de 50 e 100 mg de N (NH₄NO₃) aplicados uma vez por semana após o desbaste.

Trinta e cinco dias após a emergência, foi realizado o desbaste, ficando uma planta por vaso, as plantas receberam 400 mL de água de torneira por dia, divididos no período da manhã e tarde. A colheita ocorreu 72 dias após a emergência, as raízes foram separadas da parte aérea e lavados cuidadosamente com água corrente da torneira, posteriormente secos separadamente a 65 °C em estufa e pesados. As

variáveis de massa seca da parte aérea (folha e colmo) e raiz, foram avaliadas e posteriormente as amostras foram moídas em moinho (Willey SL-31) com peneira de malha 1 mm para análise de componentes químicos, matéria seca (MS), nitrogênio (N), proteína bruta (PB), matéria orgânica (MO) e minerais totais (MM).

Tabela 2. Análise do solo quanto as suas características químicas do campo experimental da Embrapa Semiárido Petrolina - PE

C.E	pH	P	K	Na	Ca	Mg	H+ Al	SB	CTC	V	Cu	Fe	Mn	Zn
mS cm ⁻¹	-	mg dm ⁻³				cmol _c dm ⁻³				%		mg dm ⁻³		
0,76	6,1	2,80	0,30	0,51	1,0	0,50	1,4	2,3	3,8	61,6	1,37	29,26	18,71	0,65

Fonte: De autoria própria. C.E: Condutividade elétrica; pH: Potencial Hidrogeniônico; P: Fósforo; K: Potássio; Na: Sódio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; H+Al: Acidez potencial; SB: Saturação de bases; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação por bases; Cu: Cobre; Mn: Manganês; Zn: Zinco

2.7 Análises estatísticas

A avaliação da similaridade das características fenotípicas foi avaliada por uma matriz binária, onde os dados foram comparados e a similaridade foi estimada e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) e graficamente por um dendograma construído pelo programa PAST (V. 2001). Para as análises quantitativas (AIA, sideróforos, solubilização de fosfato e biofilme) os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste de comparação de médias (Scott-Knott, $p < 0,05$) através do Software Sisvar 5.0. Para avaliação do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, os dados foram submetidos ao programa Sequence Scanner software v.2.0 e o programa Mega x (Kumar et al. 2018) para alinhamento e construção da árvore filogenética. Os dados de promoção do crescimento para o teor de massa seca, foram submetidos a análise de variância pelo teste de comparação de médias (Scott-Knott, $p < 0,05$) pelo Software Sisvar 5.0. Para a composição química, os dados foram submetidos a análise fatorial pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) pelo Software Sisvar 5.0.

3. Resultados

3.1 Caracterização fenotípica dos isolados

Dos 23 isolados 70% apresentaram tamanho maior que 2 mm enquanto 30% foram menores que 2 mm (Tabela 3). Para a coloração das colônias, 65% apresentaram cor branca, 22% creme e 13% amarela. Quanto a quantidade de muco produzido, 74% produziram pouco muco, apenas uma colônia apresentou-se opaca as demais foram translúcidas. Quanto a elevação todas as colônias apresentaram-se de forma convexa, de forma circular e homogêneas.

Tabela 3. Caracterização fenotípica dos 23 isolados de bactérias diazotróficas isoladas de quatro genótipos de capim-buffel.

Estirpe	Genótipo	Parte/planta	Cor	Tamanho	Muco	Opacidade	Elevação	Aparência	Forma
B1	G3	RIZ	BR	< 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B2	G4	RA	CR	< 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B3	G1	RA	BR	< 2	MT	TRL	CV	HOM	CIR
B4	G2	COL	BR	< 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B5	G2	COL	CR	> 2	MT	TRL	CV	HOM	CIR
B6	G1	RIZ	BR	< 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B7	G4	COL	BR	> 2	PC	OP	CV	HOM	CIR
B8	G1	COL	BR	> 2	PC	TRL	CV	HET	CIR
B9	G3	COL	AM	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B10	G4	RA	CR	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B11	G4	RA	BR	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B12	G4	RA	CR	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B13	G4	RIZ	AM	> 2	MT	TRL	CV	HOM	CIR
B14	G3	COL	AM	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B15	G4	COL	CR	< 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B16	G3	COL	BR	> 2	MT	TRL	CV	HOM	CIR
B17	G2	RA	BR	< 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B18	G2	COL	BR	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B19	G1	RA	BR	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B20	G1	RIZ	BR	> 2	PC	TRL	CV	HET	CIR
B21	G2	RA	BR	> 2	MT	TRL	CV	HOM	CIR
B22	G1	RA	BR	> 2	PC	TRL	CV	HOM	CIR
B23	G4	RIZ	BR	> 2	MT	TRL	CV	HOM	CIR

Fonte: De autoria própria. (G1 Biloela; G2 West Australian; G3 CPATSA 79134; G4 CPATSA 79150); (RA= Raiz, RIZ= Rizosfera; COL= Colmo); (BR= Branco, CR=Creme, AM=Amarela); Tamanho da colônia (> 2mm a < 2mm); (MT=Muito, PC=Pouco); (OP=Opaca; TRL=Translúcido); (CV=Convexa); (HOM=Homogênea, HET=Heterogênea); (CIR=Circular).

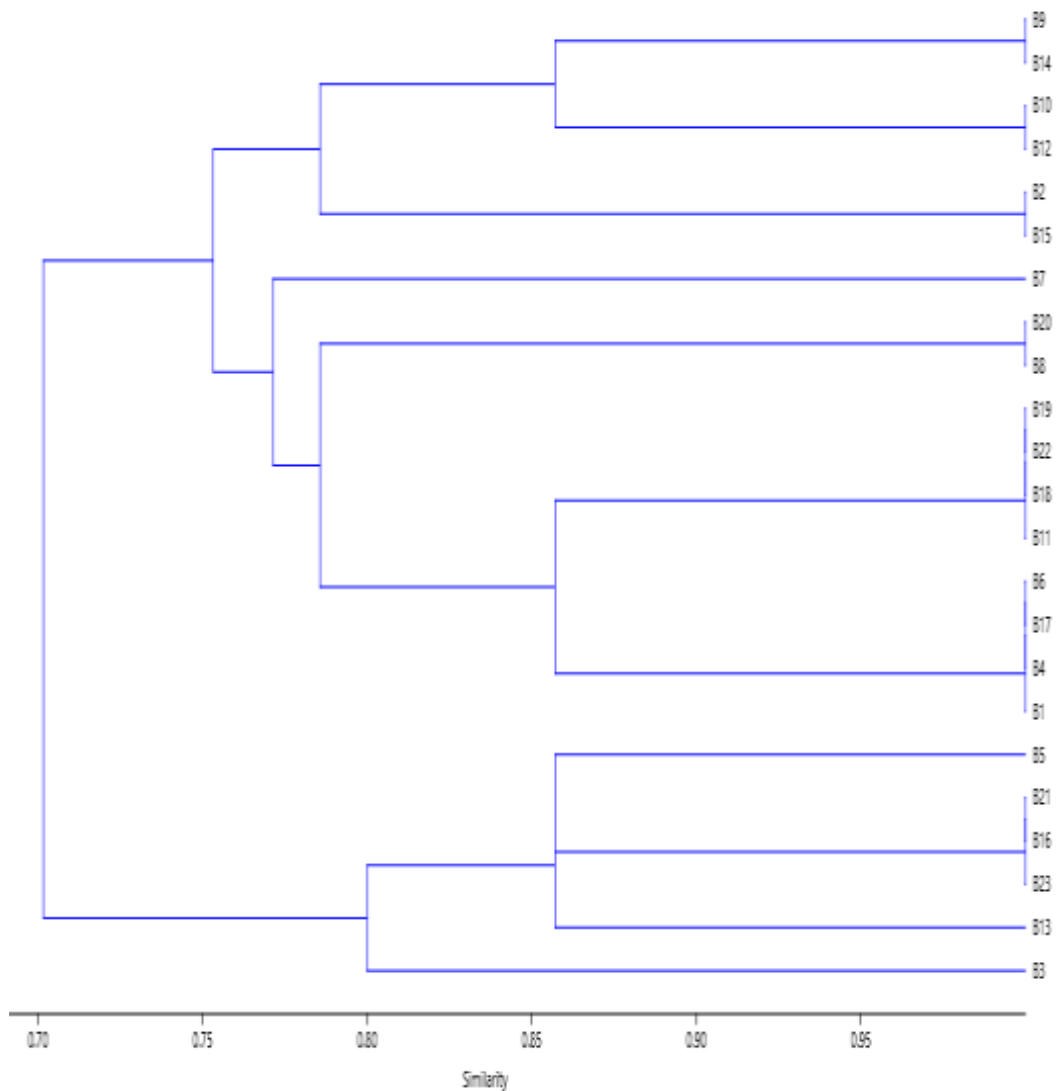


Figura 1. Dendograma de similaridade das características fenotípicas dos vinte e três isolados de bactérias diazotróficas de quatro genótipos de capim-buffel oriundas da parte aérea, raiz e solo rizosférico. Fonte: De autoria própria

O dendograma de similaridade demonstrou a formação de sete grupos de máxima semelhança fenotípica (Figura 1). Três dos isolados apresentaram características distintas dos demais, uma vez que são compostos por apenas um isolado bacteriano. Sendo estes isolados B7, B5 e B3 pertencentes aos genótipos CPATSA 150, West Australian e Biloela, respectivamente. Todos os isolados foram considerados positivos por meio da formação da película em meio BMGM.

3.2 Caracterização molecular dos isolados

3.2.1 Amplificação do gene *nifH*

Todos os vinte e três isolados foram positivos para o gene *nifH*, oriundos de diferentes partes do capim-buffel (colmo, raiz e solo rizosférico) e de quatro genótipos (Biloela, West Australian, CPATSA 79134 e 79150), 15 por meio da reação (POL) e 8 pela reação de nested-PCR.

Os 23 isolados foram submetidos ao método do BOX-PCR, o qual é baseado na amplificação de regiões conservadas no genoma bacteriano (Figura 2). O dendograma de similaridade mostrou uma máxima similaridade entre seis isolados, sendo estes de diferentes partes da planta e genótipos, sendo Biloela (B19 e B22 das raízes), West Australian (B5 e B18 do colmo, B17 da raiz) e CPATSA 79150 (B15 do colmo) e uma diversidade entre as 17 demais bactérias (Figura 3) as quais foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.



Figura 2. Amplificação por meio do Box-PCR dos 23 isolados de capim-buffel. M (marcador molecular). Fonte: De autoria própria

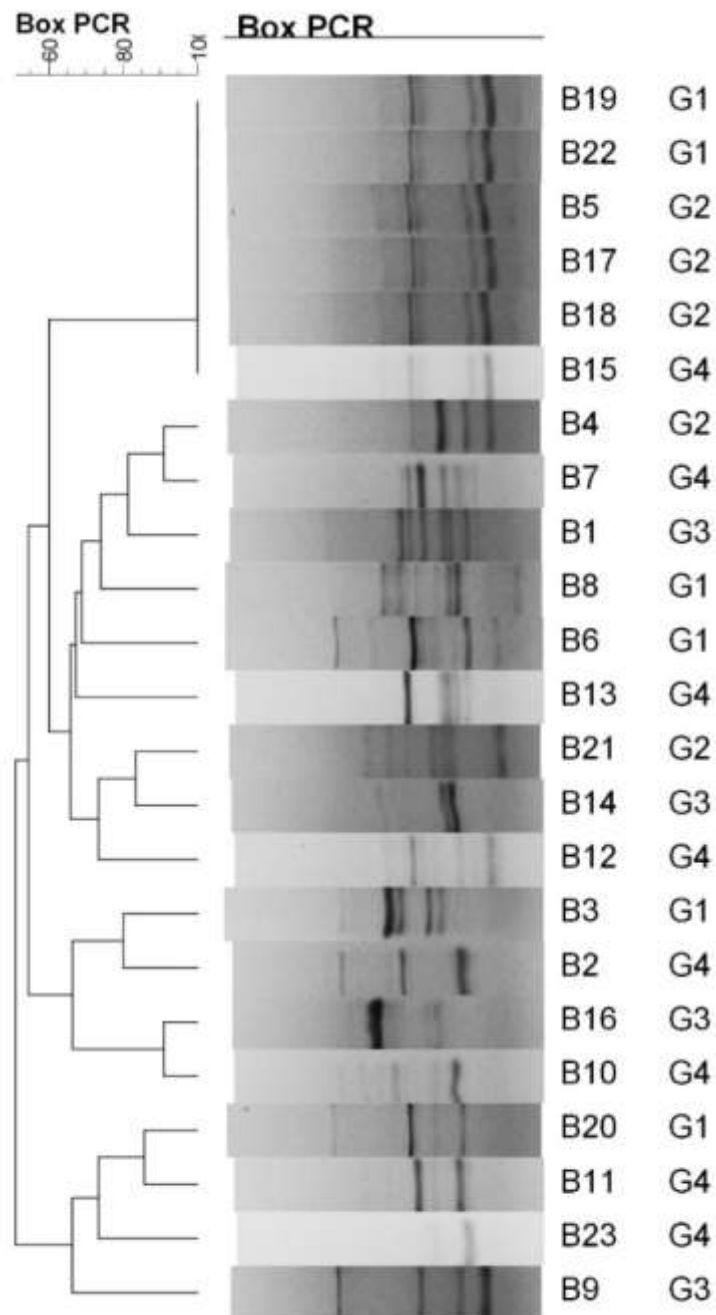


Figura 3. Dendrograma de similaridade BOX-PCR dos 18 isolados bacterianos do capim-buffel (G1:Biloela; G2: West Australian; G3:CPATSA 134 e G4:CPATSA 150). Fonte: De autoria própria.

3.2.2 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado para avaliar o posicionamento taxonômico. 18 isolados oriundos do BOX PCR foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, 14 isolados apresentaram sequências de boa qualidade em ambos sentidos (forward e reverse) para construção da árvore filogenética. Os “contigs” das sequências foram alinhadas com sequências de estipes tipo depositadas no GenBank. Dos isolados, doze foram relacionados ao filo Proteobactéria, em que três mostraram relação mais próxima com o gênero *Enterobacter* (B1, B8 e B21) com 99,85 a 100% de similaridade, três isolados com o gênero *Klebsiella* (B3, B6 e BB20) com 99,63 a 99,85% de similaridade, dois isolados com o gênero *Agrobacterium* (B12 e B15) com 99,92% de similaridade, um isolado com o gênero *Pseudacidovorax* (B2) com 99,78% de similaridade, um isolado com o gênero *Comamonas* (B11) com 99,93% de similaridade, um isolado com o gênero *Pseudoxanthomonas* (B13) com 99,83% de similaridade, e um isolado com o gênero *Azorhizobium* (B14) com 100% de similaridade. Dois isolados foram relacionados ao filo Firmicutes *Bacillus* (B7) com 99,93% de similaridade e *Brevibacillus* (B16) com 99,27% de similaridade (Tabela 4 e Figura 4).

O genótipo CPATSA 79150 apresentou alta diversidade, 7 dos 9 gêneros isolados pertencentes às Proteobactérias (*Agrobacterium*, *Azorhizobium*, *Comamonas*, *Pseudacidovorax* e *Pseudoxanthomonas*) e Firmicutes (*Bacillus* e *Brevibacillus*). Nos demais genótipos houve predominância de Proteobactérias, em que no genótipo Biloela, foram isolados os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, na qual, as três estirpes identificadas no gênero *Klebsiella*, foram isoladas somente do genótipo Biloela. Para os genótipos CPATSA 79134 e West Australian, ambos os isolados identificados para cada um desses genótipos, foram identificados no gênero *Enterobacter* (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 14 bactérias isoladas do colmo, raiz e solo rizosférico de *Cenchrus ciliaris* cultivado no Campo Experimental da Caatinga da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE.

Estirpes	Genótipo/ Planta	Origem	Extensão (pb)	Filo/ Classe	Sequências mais similares – GenBank		
					Espécie	Similaridade (%)	Nº de Acesso
B1	CPATSA 79134	Rizosfera	1373	Proteobactéria/ Gamaproteobactéria	<i>Enterobacter kobei</i> JCM 8580 ^T	100	CP017181
B2	CPATSA 79150	Raiz	1371	Proteobactéria/ Betaproteobactéria	<i>Pseudacidovorax</i> <i>intermedius</i> CC-21 ^T	99.78	NR_044241
B3	Biloela	Raiz	1377	Proteobactéria/ Gamaproteobactéria	<i>Klebsiella pasteurii</i> SPARK 836 C1 ^T	99.85	MN091366
B6	Biloela	Rizosfera	1378	Proteobactéria/ Gamaproteobactéria	<i>Klebsiella</i> <i>quasipneumoniae</i> 01A030 ^T	99.64	CP083633
B7	CPATSA 79150	Colmo	1389	Firmicutes/Bacilli	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 ^T	99.93	MK267098
B8	Biloela	Colmo	1388	Proteobactéria/ Gamaproteobactéria	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 ^T	99.86	CP056776
B11	CPATSA 79150	Raiz	1365	Proteobactéria/ Betaproteobactéria	<i>Comamonas terrigena</i> NBRC 12685 ^T	99.93	NR_113597
B12	CPATSA 79150	Raiz	1325	Proteobactéria/ Alfaproteobactéria	<i>Agrobacterium</i> <i>salinitolerans</i> YIC 5082 ^T	99.92	NR_157010
B13	CPATSA 79150	Rizosfera	1368	Proteobactéria/ Gamaproteobactéria	<i>Pseudoxanthomonas</i> <i>winnipegensis</i> NML 130738 ^T	98.83	MH795530
B14	CPATSA 79150	Colmo	1301	Proteobactéria/Alfapr oteobactéria	<i>Azorhizobium</i> <i>caulinodans</i> ORS 571 ^T	100	NR_074185
B15	CPATSA 79150	Colmo	1210	Proteobactéria/ Alfaproteobactéria	<i>Agrobacterium</i> <i>salinitolerans</i> YIC 5082 ^T	99.92	NR_157010
B16	CPATSA 150	Colmo	1370	Firmicutes/Bacilli	<i>Brevibacillus</i> <i>ginsengisoli</i> Gsoil 3088 ^T	99.27	NR_041376
B20	Biloela	Rizosfera	1364	Proteobactéria/ Gamaproteobactéria	<i>Klebsiella</i> <i>quasipneumoniae</i> 01A030 ^T	99.63	CP083633
B21	West Australian	Raiz	1373	Proteobactéria/ Gamaproteobactéria	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30054 ^T	99.85	CP056776

Fonte: De autoria própria.

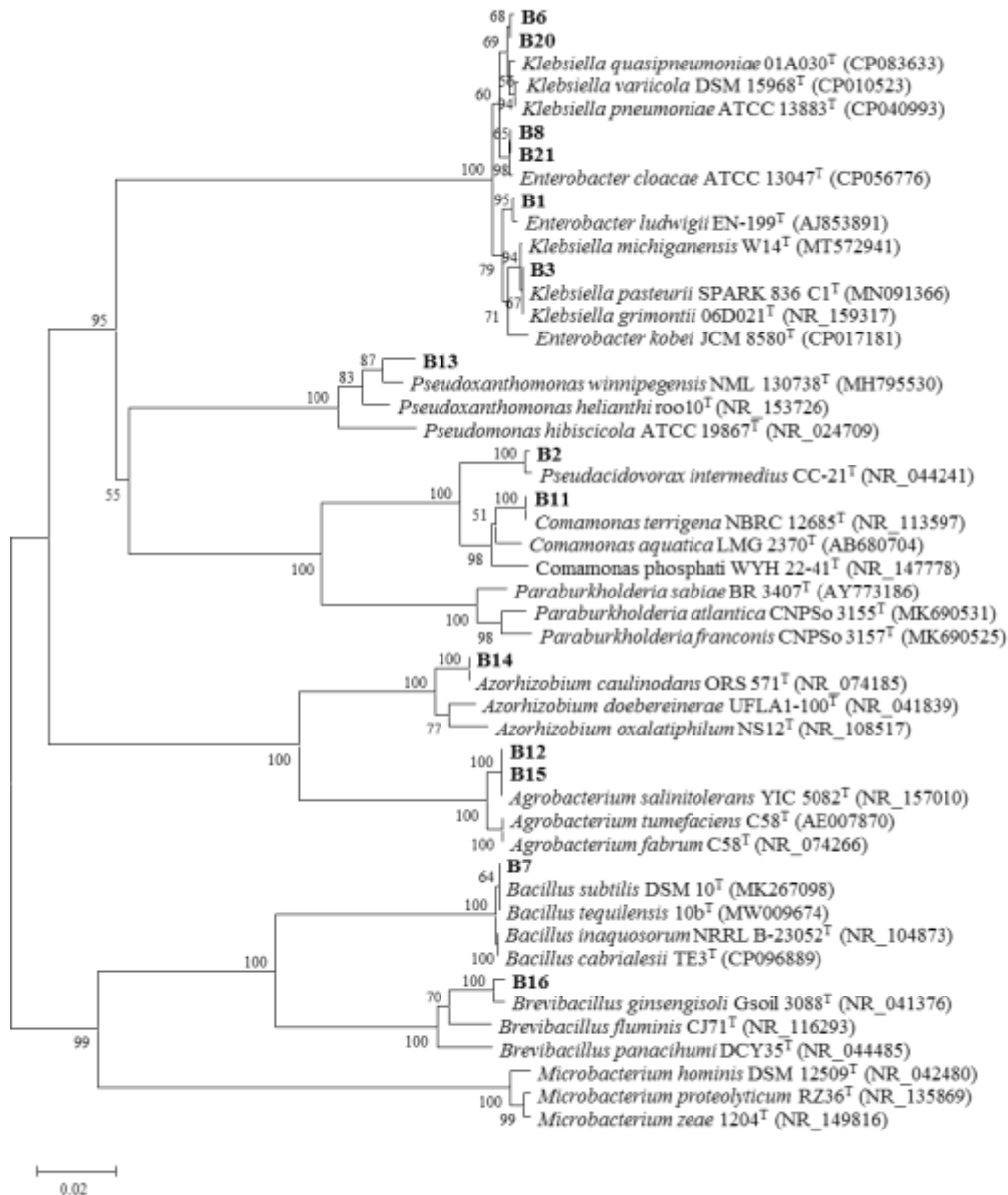


Figura 4. Árvore filogenética de Neighbor-Joining das sequências do gene 16S rRNA de 14 estirpes bacterianas isoladas de *Cenchrus ciliaris* e estirpes tipo (1165 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética. Fonte: De autoria própria.

3.3 Avaliação da produção de ácido-indolacético, sideróforos e biofilme

Os 23 isolados foram submetidos às análises quanto à capacidade de produção de fitohormônios, em relação à produção de ácido indolacético (AIA) com a suplementação de triptofano. Os isolados do capim-buffel foram capazes de produzir AIA nas mais diversas concentrações. A variação na produção foi de 18,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do isolado B4 (*Enterobacter* sp.) a 260,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do isolado B3 (*Klebsiella* sp.). A maior produção foi pela bactéria de referência. Os isolados (B3, B10, B7, B21 e B18) apresentaram as maiores concentrações entre os isolados (260, 236, 167, 139 e 121 $\mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente (Tabela 5). Em relação ao AIA sem a suplementação do triptofano, todas as estirpes apresentaram capacidade de produção de AIA na ausência de triptofano, entretanto, essa produção foi baixa em comparação à produção na presença de triptofano (Tabela 5).

Em relação à produção de sideróforos, apenas um isolado foi considerado positivo, B20 (*Klebsiella* sp.), genótipo Biloela, por meio da mudança de coloração de azul para alaranjado. Quanto à produção de biofilme, foi observada variabilidade de produção entre os isolados, 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B14 (*Azorhizobium* sp.) a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B2 (*Pseudacidovorax* sp.), respectivamente, sendo o isolado B2 o que apresentou maior produção, e quanto à variação por genótipo e parte da planta, além do isolado B2 com maior produção os isolados B12, B15, B8, B1 e B21 apresentaram maiores concentrações, entre os demais, para a formação de biofilme (Tabela 5) em que foi observado a produção por diferentes genótipos, gêneros e parte da planta, Biloela (B8 ;*Enterobacter* sp.; colmo), West Australian (B21 ;*Enterobacter* sp.; raiz), CPATSA 79134 (B1 ;*Enterobacter* sp.; rizosfera) e CPATSA 79150 (B12 e B15 ; *Agrobacterium* sp. ; raiz e colmo) respectivamente (Tabela 4).

Tabela 5. Produção de Ácido Indolacético com triptofano (AIACT) e sem triptofano (AIAST), sideróforos (SDRF), biofilme (BIO) e solubilização de fosfato de cálcio (SF) por bactérias diazotróficas do colmo, raiz e solo rizosférico de capim-buffel cultivado no campo experimental da Embrapa Semiárido Petrolina – PE.

Estirpes	Origem	AIACT $\mu\text{g mL}^{-1}$	AIAST $\mu\text{g mL}^{-1}$	BIO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SF Índice de solubilização (IS)
B1	Rizosfera	26,98 ⁱ	0,08 ^c	3,10 ^b	NS
B2	Raiz	79,20 ^g	0,07 ^d	7,36 ^a	NS
B3	Raiz	260,18 ^b	0,075 ^d	1,80 ^c	0,34
B4	Colmo	18,93 ⁱ	0,08 ^c	-	NS
B5	Colmo	29,06 ⁱ	0,07 ^d	-	NS
B6	Rizosfera	51,15 ^h	0,06 ^e	1,72 ^c	NS
B7	Colmo	167,26 ^d	0,09 ^c	1,47 ^c	NS
B8	Colmo	102,95 ^f	0,08 ^c	3,78 ^b	NS
B9	Colmo	19,90 ⁱ	0,05 ^e	-	0,43
B10	Raiz	236,15 ^c	0,07 ^d	-	NS
B11	Raiz	76,01 ^g	0,06 ^e	2,51 ^c	NS
B12	Raiz	100,31 ^f	0,06 ^e	4,48 ^b	NS
B13	Rizosfera	65,73 ^g	0,11 ^b	0,82 ^d	NS
B14	Colmo	73,65 ^g	0,08 ^c	0,01 ^d	NS
B15	Colmo	72,26 ^g	0,05 ^e	4,86 ^b	NS
B16	Colmo	89,90 ^g	0,07 ^d	0,68 ^d	NS
B17	Raiz	52,95 ^h	0,06 ^e	-	NS
B18	Colmo	121,29 ^e	0,07 ^d	-	NS
B19	Raiz	54,90 ^h	0,07 ^d	-	NS
B20	Rizosfera	86,98 ^g	0,11 ^b	2,12 ^c	0,55
B21	Raiz	139,76 ^e	0,05 ^e	3,63 ^b	NS
B22	Raiz	70,59 ^g	0,08 ^c	-	NS
B23	Rizosfera	46,98 ^h	0,06 ^e	-	0,83
Ab-V5	-	292,12 ^a	0,18 ^a	-	-

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste scott-knott ($p < 0,05$). NS (não solubilizou). Fonte: De autoria própria

3.4 Solubilização de fosfato de cálcio

Dos 23 isolados, 4 foram considerados positivos para solubilização de fosfato de cálcio em meio GL por meio da presença de um halo transparente ao redor da colônia (Tabela 5 e Figura 5). Sendo estes isolados B3 (*Klebsiella pasteurii*), B9 (*Pseudomonas hibiscicola*), B20 (*Klebsiella quasipneumoniae*) e B23 (*Agrobacterium salinitolerans*). As estirpes B9 e B23, não foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA (Tabela 5). Quanto aos genótipos, foi observado isolados pertencentes ao Biloela, CPATSA 134 e CPATSA 150, além de variação dos isolados do colmo, raiz e solo rizosférico (Tabela 4).

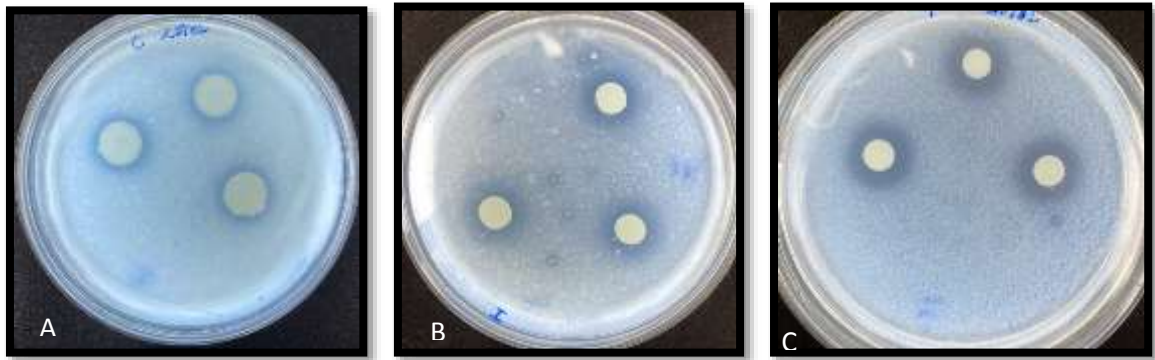


Figura 5. Halo de solubilização de bactérias isoladas de capim-buffel. A:B3; B:B9; C:B20.
Fonte: De autoria própria

3.5 Promoção de crescimento

Vinte e dois tratamentos foram avaliados, sendo dezoito bactérias isoladas anteriormente na primeira etapa da pesquisa, dois tratamentos nitrogenados (50 e 100% de N), um controle inoculado (Ab-V5) e uma testemunha (sem inoculação e sem adubação nitrogenada).

Foram utilizadas duas cultivares de capim-buffel (Áridus e CPATSA 7754) em quatro repetições, duas repetições para avaliação por parte da planta (colmo, folha verde, seca e raiz), duas repetições para planta inteira, para as variáveis de massa verde e seca da parte aérea e raiz, bem como análise química (matéria seca, matéria mineral, matéria orgânica, proteína bruta e nitrogênio).

Na avaliação por parte da planta, a cultivar Áridus, não foi observada diferença estatística para massa seca do colmo, folha verde e relação folha colmo. Já para folha morta, houve maior produção nos dois tratamentos nitrogenados de 50 e 100% de N. Na produção de massa seca da parte aérea, a aplicação das duas doses de nitrogênio, proporcionou maior teor de produção de massa seca, tanto em relação ao tratamento controle, quanto aos tratamentos inoculados. Quanto a raiz, houve maior produção de massa seca, para os dois tratamentos nitrogenados e seis inoculados (B1, B2, B3, B8, B15 e B23), sendo estes superiores ao tratamento controle (Tabela 6).

Tabela 6. Massa seca da parte aérea e raiz do cultivar Áridus inoculado com 18 bactérias diazotróficas isoladas do capim-buffel, 1 isolado (Ab-V5) e 2 tratamentos nitrogenados.

Estirpe	Colmo	Folha Verde	Tecido morto	RFC	Massa da parte aérea	Massa da raiz
	g/vaso	g/vaso	g/vaso	g/vaso	g/vaso	g/vaso
B1	3,05 ^a	2,40 ^a	0,25 ^c	0,79 ^a	7,68 ^c	9,83 ^a
B2	4,15 ^a	2,70 ^a	0,70 ^c	0,66 ^a	6,53 ^c	10,60 ^a
B3	3,25 ^a	2,10 ^a	0,35 ^c	0,65 ^a	8,38 ^c	10,25 ^a
B4	2,45 ^a	2,05 ^a	0,05 ^c	0,89 ^a	4,43 ^d	7,37 ^b
B6	1,90 ^a	2,35 ^a	0,15 ^c	1,25 ^a	3,73 ^d	7,05 ^b
B7	1,90 ^a	1,65 ^a	0,05 ^c	0,87 ^a	3,50 ^d	5,83 ^b
B8	2,35 ^a	2,00 ^a	0,25 ^c	0,94 ^a	5,33 ^d	10,10 ^a
B9	2,15 ^a	1,80 ^a	0,05 ^c	0,83 ^a	4,20 ^d	7,10 ^b
B10	1,75 ^a	1,40 ^a	0,05 ^c	0,83 ^a	3,40 ^d	5,68 ^b
B11	3,00 ^a	2,80 ^a	0,55 ^c	0,97 ^a	5,50 ^d	8,20 ^b
B12	2,90 ^a	2,00 ^a	0,60 ^c	0,69 ^a	4,90 ^d	8,30 ^b
B13	1,85 ^a	1,70 ^a	0,65 ^c	1,00 ^a	4,48 ^d	6,18 ^b
B14	2,50 ^a	1,70 ^a	0,20 ^c	0,79 ^a	4,73 ^d	6,13 ^b
B15	2,15 ^a	1,65 ^a	0,20 ^c	0,77 ^a	4,13 ^d	10,63 ^a
B16	1,95 ^a	1,95 ^a	0,88 ^c	1,04 ^a	3,78 ^d	6,88 ^b
B20	3,85 ^a	1,70 ^a	1,30 ^c	0,63 ^a	6,95 ^c	7,28 ^b
B21	3,05 ^a	2,15 ^a	0,15 ^c	0,82 ^a	5,55 ^d	8,33 ^b
B23	2,55 ^a	1,75 ^a	0,30 ^c	0,69 ^a	4,75 ^d	10,55 ^a
Ab-V5	4,35 ^a	1,55 ^a	1,85 ^c	0,87 ^a	6,93 ^c	8,63 ^b
T 100%	5,65 ^a	2,20 ^a	5,05 ^a	0,39 ^a	13,95 ^a	13,85 ^a
T 50%	6,15 ^a	2,05 ^a	3,15 ^b	0,35 ^a	10,93 ^b	14,15 ^a
Controle	3,35 ^a	2,85 ^a	0,55 ^c	0,91 ^a	7,50 ^c	8,98 ^b
EPM	1,08	0,33	0,49	0,23	0,98	1,65

Médias acompanhadas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de scott-knot ($p < 0,05$). MV (massa verde), MS (massa seca), RFC (relação folha-colmo), EPM (erro padrão da média). Fonte: De autoria própria

No cultivar CPATSA 7754, na avaliação por parte da planta, não foram observadas diferenças estatísticas para colmo, folha verde e na relação folha colmo, tanto para massa verde quanto seca. Já em relação a folha morta, houve maior produção para os tratamentos nitrogenados (100 e 50%) bem como, o inoculado B1 em relação ao grupo controle. Na massa seca da parte aérea, a aplicação da dosagem de 100% de nitrogênio, proporcionou o maior teor de massa seca que os demais tratamentos. Em relação aos inoculados, a estirpe B9 e B12, apresentou produção semelhante a aplicação da dosagem de 50% de nitrogênio, além de ser superior ao tratamento controle. Não houve diferença estatística para produção de seca para as raízes (Tabela 7).

Tabela 7. Massa seca da parte aérea e raiz do cultivar CPATSA 7754 inoculado com 18 bactérias diazotróficas isoladas do capim-buffel, 1 isolado (Ab-V5) e 2 tratamentos nitrogenados.

Estirpe	Colmo	Folha Verde	Folha Morta	RFC	Massa da parte aérea	Massa da raiz
	g/vaso	g/vaso	g/vaso	g/vaso	g/vaso	g/vaso
B1	3,950 ^a	2,050 ^a	1,700 ^c	0,61 ^a	6,20 ^c	7,75 ^a
B2	1,600 ^a	1,300 ^a	1,150 ^d	0,80 ^a	4,05 ^c	6,08 ^a
B3	1,850 ^a	1,000 ^a	0,900 ^d	0,63 ^a	3,83 ^c	8,00 ^a
B4	1,500 ^a	0,900 ^a	1,050 ^d	0,68 ^a	3,73 ^c	6,35 ^a
B6	2,100 ^a	0,950 ^a	0,850 ^d	0,54 ^a	5,95 ^c	5,50 ^a
B7	2,650 ^a	1,800 ^a	1,600 ^d	0,91 ^a	5,93 ^c	5,48 ^a
B8	1,300 ^a	1,000 ^a	1,150 ^d	0,78 ^a	2,90 ^c	4,83 ^a
B9	2,050 ^a	1,700 ^a	1,700 ^d	0,81 ^a	7,38 ^b	10,68 ^a
B10	2,250 ^a	1,100 ^a	1,350 ^d	0,58 ^a	3,80 ^c	5,85 ^a
B11	1,950 ^a	1,250 ^a	0,650 ^d	0,65 ^a	3,98 ^c	7,35 ^a
B12	3,450 ^a	1,800 ^a	1,050 ^d	0,69 ^a	7,17 ^b	7,67 ^a
B13	1,350 ^a	1,500 ^a	0,950 ^d	1,13 ^a	4,28 ^c	4,28 ^a
B14	2,150 ^a	1,550 ^a	0,750 ^d	1,05 ^a	4,13 ^c	6,08 ^a
B15	2,700 ^a	1,300 ^a	1,000 ^d	0,52 ^a	5,50 ^c	6,60 ^a
B16	1,250 ^a	1,100 ^a	0,700 ^d	0,89 ^a	3,70 ^c	6,78 ^a
B20	1,750 ^a	1,000 ^a	1,250 ^d	0,58 ^a	4,33 ^c	4,45 ^a
B21	1,400 ^a	1,450 ^a	1,150 ^d	1,05 ^a	4,18 ^c	7,13 ^a
B23	0,850 ^a	0,650 ^a	0,800 ^d	0,99 ^a	3,83 ^c	5,00 ^a
Ab-V5	2,350 ^a	1,550 ^a	1,050 ^d	0,94 ^a	4,40 ^c	6,53 ^a
T 100%	4,700 ^a	1,950 ^a	3,700 ^a	0,42 ^a	11,13 ^a	9,63 ^a
T 50%	3,300 ^a	2,050 ^a	2,350 ^b	0,62 ^a	8,33 ^b	9,53 ^a
Controle	1,050 ^a	1,150 ^a	1,150 ^d	1,07 ^a	3,28 ^c	4,90 ^a
EPM	0,83	0,31	0,38	0,28	0,91	1,30

Médias acompanhadas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de scott-knot ($p < 0,05$). MV (massa verde), MS (massa seca), RFC (relação folha-colmo), EPM (erro padrão da média). Fonte: De autoria própria

Na avaliação de composição química, a análise fatorial das duas cultivares (Áridus e CPATSA 7754) mostrou que, quanto ao teor de matéria seca (MS) os inoculados (B7, B8, B12 e B13) tiveram maior teor para a cultivar CPATSA 7754, em relação a Áridus, bem como o teor de minerais totais (MM), onde o tratamento controle da cultivar CPATSA 7754 também foi superior. Já em relação ao teor de matéria orgânica (MO), o inoculado B4, na cultivar Áridus, foi superior.

Quanto ao teor de nitrogênio (N) e proteína bruta (PB), o inoculado B2, o tratamento nitrogenado 50% bem como controle, na cultivar CPATSA foram superiores em relação a cultivar Áridus. Para avaliação do teor de nitrogênio acumulado na parte aérea, a análise de interação mostrou que na inoculação das cepas B8 e B12, a cultivar CPATSA 7754, foi superior a cultivar Áridus (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de interação para as cultivares Áridus e CPATSA 7754, inoculado com 18 bactérias diazotróficas isoladas do capim-buffel, 1 isolado (Ab-V5) e 2 tratamentos nitrogenados, para avaliação de matéria seca (MS), minerais totais (MM), proteína bruta (PB), nitrogênio (N) e nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA).

Bactéria	Cultivar	MS g.kg	MM g.kg	MO g.kg	PB g.kg	N g.kg	NAPA g.kg
B1	Áridus	298,70	82,80	917,20	58,67	9,37	27,59
	CPATSA	347,15	100,37	899,62	76,77	12,27	42,03
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,04	7,49
P-valor		0,329	0,108	0,537	0,062	0,062	0,175
B2	Áridus	354,73	90,16	909,83	55,06a	8,80b	31,05
	CPATSA	325,53	110,46	889,53	95,33b	15,26a	48,76
EPM		40,39	8,87	23,21	7,86	1,25	8,65
P-valor		0,610	0,108	0,537	0,0004	0,0004	0,150
B3	Áridus	274,35	90,03	909,22	70,35	11,25	30,73
	CPATSA	322,26	90,77	909,96	80,20	12,83	41,58
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,17	8,09
P-valor		0,371	0,949	0,980	0,345	0,343	0,345
B4	Áridus	276,30	99,20	900,80b	79,25	12,65	35,97
	CPATSA	311,10	77,27	797,72a	86,17	13,80	43,26
EPM		42,85	9,40	24,62	8,34	1,33	9,17
P-valor		0,566	0,102	0,0037	0,558	0,543	0,575
B6	Áridus	246,70	103,67	896,32	80,20	12,82	32,28
	CPATSA	331,97	85,22	914,77	84,40	13,50	44,34
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,087	0,092	0,5177	0,663	0,662	0,257
B7	Áridus	203,86a	111,53	888,46	81,46	13,06	26,82
	CPATSA	318,37b	88,50	911,50	89,80	14,35	44,43
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,17	8,09
P-valor		0,034	0,052	0,4548	0,424	0,442	0,126
B8	Áridus	281,40a	98,23	901,76	79,66	12,73	35,65a
	CPATSA	406,7b	118,73	881,26	97,70	15,63	66,79b
EPM		40,39	8,87	23,21	7,86	1,25	8,65
P-valor		0,030	0,105	0,533	0,107	0,106	0,012
B9	Áridus	265,62	90,22	909,77	74,10	11,85	31,45
	CPATSA	326,12	82,77	917,22	78,70	12,57	40,89
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,223	0,494	0,793	0,633	0,639	0,374
B10	Áridus	235,45	88,43	891,92	84,65	12,16	32,72
	CPATSA	289,93	108,07	911,56	76,20	13,52	35,54
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,17	8,09
P-valor		0,310	0,096	0,523	0,418	0,416	0,805
B11	Áridus	256,43	88,97	905,30	85,10	13,63	35,55
	CPATSA	316,55	94,70	911,02	83,45	13,35	42,11
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,1	8,09
P-valor		0,263	0,626	0,852	0,874	0,865	0,567
B12	Áridus	248,17a	89,40	905,90	73,12	11,72	28,87a
	CPATSA	530,46b	94,10	910,60	75,20	12,06	67,46b
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,17	8,09

P-valor		0,0000	0,689	0,878	0,842	0,837	0,001
B13	Áridus	226,20a	93,50	906,50	84,77	13,57	30,61
	CPATSA	327,82b	89,12	910,87	85,27	13,67	44,96
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,042	0,687	0,878	0,958	0,948	0,177
B14	Áridus	269,12	93,20	906,80	66,30	10,60	29,14
	CPATSA	295,36	100,80	899,20	75,60	12,06	34,78
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,17	8,09
P-valor		0,624	0,518	0,805	0,373	0,380	0,622
B15	Áridus	281,53	90,80	909,20	66,36	10,63	30,07
	CPATSA	331,30	84,23	915,76	74,13	11,86	38,82
EPM		40,39	8,87	23,21	7,86	1,25	8,65
P-valor		0,385	0,601	0,841	0,486	0,489	0,475
B16	Áridus	211,25	99,17	900,82	71,57	11,45	24,75
	CPATSA	291,57	97,95	902,05	84,30	13,47	39,39
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,107	0,910	0,965	0,189	0,191	0,169
B20	Áridus	276,70	81,65	918,35	67,35	10,75	29,68
	CPATSA	343,30	75,75	924,25	76,65	12,22	41,87
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,180	0,588	0,836	0,336	0,340	0,251
B21	Áridus	247,35	95,85	904,15	73,02	11,70	28,97
	CPATSA	348,06	90,80	909,20	75,80	12,13	42,34
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,17	8,09
P-valor		0,062	0,667	0,869	0,790	0,795	0,244
B23	Áridus	236,07	94,27	905,72	68,27	10,92	25,97
	CPATSA	288,03	100,23	899,76	83,13	13,26	38,11
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,17	8,09
P-valor		0,333	0,612	0,846	0,155	0,162	0,290
Ab-V5	Áridus	308,05	88,03	907,97	76,20	12,20	37,57
	CPATSA	338,26	92,02	911,96	90,63	14,53	48,81
EPM		37,79	8,29	21,71	7,35	1,1	8,09
P-valor	P-valor	0,572	0,734	0,896	0,168	0,163	0,327
T100%	Áridus	310,30	87,72	912,27	104,70	16,75	51,95
	CPATSA	334,75	63,05	936,95	110,35	17,65	59,10
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,622	0,025	0,387	0,558	0,560	0,501
T50%	Áridus	286,72	79,17	920,82	69,72a	11,15a	31,98
	CPATSA	329,62	68,22	931,77	99,97b	16,00b	52,80
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,387	0,315	0,7009	0,0021	0,0021	0,051
CONT	Áridus	302,85	85,30a	914,70	65,50 ^a	10,47 ^a	31,73 ^a
	CPATSA	318,77	108,70b	891,30	105,97b	16,95b	53,82b
EPM		34,98	7,68	20,10	6,81	1,09	7,49
P-valor		0,748	0,033	0,412	0,0001	0,0001	0,038

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Fonte: De autoria própria

4. Discussão

4.1 Caracterização fenotípica

A formação dos sete grupos fenotípicos mostrou diversidade entre os isolados. Com relação a coloração a diferença foi observado em relação a origem do isolado, uma vez que, a maioria das estirpes com cor branca, foram obtidos de isolados das raízes do genótipo Biloela, já as estirpes de cor creme, das raízes e colmo de West Australian e CPATSA 79150, respectivamente, e as estirpes de cor amarela, foram mais abundantes no colmo do genótipo CPATSA 79150. Bem como, o tamanho das colônias, onde a maioria dos isolados apresentaram tamanho maior que 2 mm, de isolados tanto da raiz como do colmo de diferentes genótipos (CPATSA 79150 e 79134) respectivamente. A maior parte dos isolados produziram pouco muco, dos quais, houve variação da origem dos isolados (raiz e colmo), assim como o genótipo, sendo estes, West Australian, CPATSA 79134 e 79150.

4.2 Caracterização molecular e bioquímica dos isolados

A atividade da enzima nitrogenase, em especial o gene *nifH*, é responsável pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (WANG et al., 2021). O sequenciamento do gene 16S rRNA revelou diferentes gêneros entre os isolados dos quatro genótipos de capim-buffel. O uso do marcador para o gene 16S rRNA é tido como universal por apresentar características evolutivamente conservadas.

A maior diversidade de gêneros foi encontrado no genótipo CPATSA 79150, o qual é um cultivar de porte baixo, foi implementado desde 1977 no Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido (CPATSA), o banco Ativo de Germoplasma (BAG) de plantas forrageiras, desenvolve estudos para a região semiárida nordestina, visando obter melhor uso dos recursos forrageiros da vegetação nativa, bem como, forrageiras exóticas (SILVA; OLIVEIRA; SOARES, 1984).

Dois filos foram encontrados neste genótipo, o filo Firmicutes e Proteobactérias. Dos Firmicutes, os gêneros (*Bacillus* sp. e *Brevibacillus* sp.) *Bacillus* sp. é descrito como de maior resistência e abundância, visto a capacidade de formação de endósporos (PAIVA et al., 2020), produção de fitormônios e enzimas hidrolíticas (MAZZUCHELLI et al., 2014). Em gramíneas, Antunes et al. (2019) descreve

diferentes bactérias diazotróficas isolados de capim-buffel, sorgo e tifton 85, em que, *Bacillus* sp, *Agrobacterium* sp. e *Stenotrophomonas* sp. mostram potencial de promoção de crescimento em gramíneas no semiárido brasileiro.

Fernandes-Júnior et al. (2015) descreve a presença de *Bacillus* sp. colonizando raízes de gramíneas de *Tripogon spicatus* na caatinga com características de promoção de crescimento vegetal. A presença do gênero também é relatada em solo rizosférico de *Urochloa brizantha* em sistemas integrados de lavoura-pecuária e perene de isolados com características de promoção de crescimento vegetal, como a produção de fitormônios (COELHO, CASEIRO, ARAUJO, 2021). No presente estudo, *Bacillus* sp., demonstrou características positivas a produção de fitormônios, como o ácido indolacético (AIA), tanto na presença como na ausência do triptofano.

Brevibacillus sp. também apresenta a produção de endósporos, além de potencial na promoção de crescimento de plantas, Biocontrole, e biorremediação do solo (RAY et al., 2020). Não há relatos de isolados em capim-buffel, no entanto, a presença do gênero é descrita em isolados de folhas de cana-de-açúcar na Paraíba, as quais apresentaram características de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal (ANTUNES et al., 2022). No presente estudo, *Brevibacillus ginsengisoli* Gsoil, isolado do colmo, apresentou similaridade com os isolados de solo, na Coreia do sul, a qual foi descrita como uma nova espécie do gênero *Brevibacillus* (BAEK et al., 2006). Bem como, em isolados de solo rizosférico de arroz na China, com capacidade de tolerar elevadas concentrações de sal (SONG et al., 2017).

Em relação as Proteobactérias, o gênero *Agrobacterium* sp. apresenta mecanismos relacionados a promoção de crescimento (EGAMBERDIYEVA, 2005). Os achados neste estudo são semelhantes aos relatados por Antunes et al. (2019), que ao isolar raízes de capim-buffel e sorgo, obtiveram o gênero *Agrobacterium*, com potencial características de promoção de crescimento, sendo o primeiro relato de tal gênero como promotor de crescimento no capim-buffel. Além da característica de fixação biológica de nitrogênio, no presente estudo os isolados deste gênero também foram positivos a produção de biofilme, tanto de isolados presentes no colmo como na raiz da planta. A produção do biofilme confere aos microrganismos proteção contra estresse e/ou situações deletérias por meio de compostos como os exopolissacarídeos (NOCELLI et al., 2016). Os exopolissacarídeos são altamente

hidratados retendo grande quantidade de água no interior das moléculas, que ao estar presente em regiões da rizosfera confere maior proteção às raízes (ROLLI et al., 2015).

O gênero *Pseudacidovorax* sp. isolado da raiz, também demonstrou característica positiva a produção de biofilme pelos isolados. É um gênero de bactérias gram-negativas, pertence à ordem *Burkholderiales*, e a família *Comamonadaceae* (BAHULIKAR et al., 2021). Em gramíneas, há relatos de isolados deste gênero com potencial de fixação de nitrogênio, onde foi demonstrado a existência de uma diversidade de isolados diazotróficos associados às raízes de *Panicum virgatum* L. em que o gênero *Pseudacidovorax* sp. foi o segundo táxon mais dominante expressando o *nifH* (BAHULIKAR et al., 2021).

A presença deste gênero, também é descrita em grãos, onde os isolados das raízes de sorgo, melhorou as características de crescimento de mudas em situação de estresse hídrico (UMAPATHI et al., 2022). É relatado, isolados com capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) oriundo de solos, onde é descrito o potencial de FBN dos isolados de amostras de solo de uma região de Taiwan (KÄMPFER et al., 2008). Bem como de fixadores marinhos, ou seja, isolados de sedimentos superficiais do mar da China, foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudacidovorax*, a fim de avaliar a atividade da enzima nitrogenase (ZHANG; CHEN, 2012).

O gênero *Comamonas* sp. quando associado à fixação biológica de nitrogênio, é reportado na literatura de isolados de amostras de solo, no presente estudo, o gênero positivo à presença no gene *nifH*, foi isolada da raiz da planta, além disso, não há relatos de isolados deste gênero no capim-buffel. Khanghahi et al. (2021), descreve o primeiro relato da presença do gênero *Comamonas* sp., isolado de amostras de solo de uma plantação de trigo, associado à fixação biológica de nitrogênio. *Pseudoxanthomonas* sp. pertence ao grupo de Gamaproteobacteria, isolados de águas, materiais vegetais e solos contaminados (BERNARD et al., 2020). Assim como é descrito na literatura, a presença do gênero nos achados deste estudo, foram isolados de solo rizosférico. Poucos estudos são relatados quanto à presença e associação deste gênero a mecanismos de promoção de crescimento em plantas. Em gramíneas, a presença deste gênero foi presente entre os isolados de plantas de milho, provenientes de sistema de produção agroecológico por (SANTOS et al., 2007), os quais foram positivos às características de promoção de crescimento no milho.

Azorhizobium caulinodans é capaz de fixar nitrogênio tanto em bactérias aeróbicas de vida livre como simbióticos (RYU et al., 2021).

Tanto no genótipo CPATSA 134 quanto West Australian, foi isolado apenas o gênero *Enterobacter* sp. (rizosfera e raiz), sucessivamente. O genótipo CPATSA 134, é uma gramínea de porte alto e apresenta moderada resistência a seca, colmos finos e pouca folhosidade. Já West Australian, é um cultivar de porte baixo, florescimento precoce, ocorre em áreas de pouca chuva e apresenta elevada capacidade de resistência a períodos de seca (SILVA; OLIVEIRA; SOARES, 1984). Além da presença do *nif*, o gênero *Enterobacter* sp. no presente estudo, foi positivo a produção de fitormônio, o isolado da raiz (B21) de West Australian demonstrou característica positiva a produção do ácido indolacético na presença de triptofano. Bem como, foram observadas produções consideráveis de biofilme pelos isolados nos dois genótipos.

O genótipo Biloela apresentou tanto o gênero *Enterobacter* sp. como *Klebsiella* sp. isolados do colmo raiz e solo rizosférico. É um cultivar de porte alto, bastante difundida e utilizada, apresenta raízes profundas, é adaptada a solos bem drenados, além de ser bem aceito pelos animais (SILVA; OLIVEIRA; SOARES, 1984). Além da característica de fixação de nitrogênio, *Klebsiella* sp. foi o único isolado positivo a produção de sideróforos. Os quais são moléculas orgânicas de baixo peso molecular que captam o ferro presente no ambiente (AGUIAR, 2012). Os isolados que produzem sideróforos acabam por desenvolver vantagem competitiva no ambiente. A presença de bactérias que produzem sideróforos impossibilitam o desenvolvimento de patógenos por haver maior competição destes pelo ferro ali presente (BATISTA et al., 2018).

O gênero se destaca também como isolado capaz de solubilizar fosfato de cálcio. Onde foram isolados tanto do solo rizosférico como da raiz. E visto que microrganismos do solo e associados às plantas tem um papel fundamental na ciclagem de P, ou seja na conversão de formas inorgânicas para orgânicas, tornando assimilável para a planta (OLIVEIRA et al., 2018).

Foi positivo também a produção do ácido indolacético, tanto na presença como na ausência do triptofano. O ácido Indolacético (AIA), tem atuação direta no crescimento da planta por meio do sistema radicular (TERRA et al., 2019). O triptofano é tido como um precursor da síntese do ácido indolacético, assim quando presente, há um aumento desta síntese (RAMOS et al., 2021). Na ausência de

triptofano, foi observado cepas positivas para produção de AIA, demonstrando assim a existência de vias independentes para produção.

4.3 Promoção de crescimento

As cultivares CPATSA 7754 e Áridus, são classificados como porte médio (0,75 a 1,00 m de altura), colmos finos, folhagens mais densas e sistema radicular profundo e bem desenvolvido. A cultivar Áridus demonstra excelente adaptação as condições edafoclimáticas da região semiárida, resistente ao superpastejo e elevada preferência, especialmente caprinos e ovinos. Apresenta produção anual de 4 a 6 toneladas de matéria seca por hectare, teor médio de 8,5% de proteína bruta e 43,5% de digestibilidade *in vitro* da matéria seca. CPATSA 7754 apresenta uma produtividade de 5.196 kg/há⁻¹ de matéria seca com teor médio de proteína bruta, na matéria seca de 11,6% na época chuvosa (SOUSA; ARAÚJO FILHO, 2007).

As variáveis morfogênicas e estruturais da planta, são importantes para a determinação das condições de pasto (MOREIRA et al., 2015). No presente estudo não foram observadas diferenças nos valores da relação folha/colmo entre as duas cultivares. Essa relação é uma importante variável morfogênica a respeito da estrutura do dossel forrageiro (MOREIRA et al., 2015). Quanto maior a relação folha/colmo, maior o valor nutritivo, uma vez que, as folhas representam a fração da planta forrageira de maior digestibilidade, ou seja, maior teor de proteína bruta e menor teor de fibra e conseqüentemente maior consumo (RODRIGUES et al., 2008).

Foi possível observar que, a inoculação no cultivar Áridus, proporcionou maior teor de massa seca na raiz, onde as estirpes (B1, B2, B3 B8, B15 e B23) foram semelhantes a aplicação dos tratamentos nitrogenados e foram superiores em comparação ao tratamento controle. Estes isolados, pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Agrobacterium* e *Pseudacidovorax*, tem sido associado na literatura a mecanismos de promoção de crescimento vegetal. No presente estudo, estes gêneros, foram positivos a produção de fitormônios, em especial o ácido indolacético, produção de biofilme e fixação biológica de nitrogênio (positivos a presença do gene *nifH*).

Já para o cultivar CPATSA 7754, o efeito da inoculação foi observado no teor de massa seca da parte aérea, em que a inoculação das estirpes (B9 e B12), pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, foram estatisticamente semelhantes a aplicação do tratamento nitrogenado na dose de 50%, e superiores ao tratamento controle. Além da capacidade de fixação biológica de nitrogênio, o gênero foi positivo a produção de ácido indolacético e biofilme, os quais são mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal (SINGH et al., 2017).

O maior teor de proteína bruta e conseqüentemente o teor de nitrogênio, foi encontrado na cultivar CPATSA 7754, tanto pela inoculação da cepa B2, quanto pela adubação nitrogenada no teor de 50%, e também o controle. A presença do gênero inoculado (*Pseudacidovorax* sp.), tem sido associado a promoção de crescimento vegetal, pela presença do gene *nifH*, relacionando assim, a fixação biológica de nitrogênio (BAHULIKAR et al., 2021), corroborando assim com os achados no presente estudo, associando a presença deste gênero ao maior teor na cultivar CPATSA 7754.

A adubação nitrogenada tem efeito direto no teor de proteína bruta da planta. Para o teor de matéria seca, a inoculação das estirpes (B7, B8, B12 e B13) mostraram valores mais elevados de produção que os demais tratamentos, bem como em relação ao controle. Sendo estes valores obtidos para a cultivar CPATSA 7754, bem como quanto ao teor de minerais totais. A composição química das forrageiras variam quanto a idade, parte da planta, época do ano, cultivar e fertilidade do solo (ANDRADE et al., 2003).

5. Conclusão

Os gêneros identificados no presente trabalho, são descritos na literatura associados a promoção do crescimento em plantas. As estipes B3, B20, B12 e B21, pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* se destacaram para as características bioquímicas (AIA, sideróforos, biofilme e solubilização de fosfato de cálcio) as quais são associadas a promoção de crescimento vegetal por tais bactérias.

Há diversidade de gêneros de bactérias diazotróficas entre diferentes genótipos de capim-buffel, no qual, o genótipo CPATSA 79150 apresentou maior diversidade de gêneros isolados no presente estudo.

A inoculação teve efeito positivo quanto a promoção de crescimento nas duas cultivares. Na cultivar, Áridus, na produção de massa seca da raiz, pelas estirpes B1, B2, B3 B8, B15 e B23. Para o cultivar CPATSA 7754, na parte aérea, ou seja, no teor de massa seca, pelas estipes B9 e B12. Além disso, a análise de interação das duas cultivares para a composição química, demonstrou maiores teores de matéria seca, minerais totais e proteína bruta e nitrogênio para a cultivar CPATSA 7754.

Assim, a região semiárida de Pernambuco apresenta bactérias diazotróficas isoladas de capim-buffel com potencial de promoção de crescimento de gramínea forrageira.

Referências bibliográficas

- AGUIAR, K. P. Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos. CCTA. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Guimarães, p. 101, 2012.
- ALVES, P. C., JÚNIOR, C. B., ROCHA, P. K. A., VIEIRA, M. M. S. D., EUGÊNIO, S. D., LEITE, V. M. L.M. Respostas morfofisiológicas das plantas forrageiras sob manejo de cultivo e pastejo: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. 10610615405, 2021.
- ANDRADE, A. C., FONSECA, D. M., QUEIROZ, D. S., SALGADO, L. T., CECON, P. R. Elephant grass nitrogen and potassium fertilization (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência agrotecnica**, v. edição esp, n. November, p. 1643–1651, 2003.
- ANTONIO, R. P., JÚNIOR, P. M. R., LIRA, I. C. D. S. A., NERY, L. P. C., SILVA, J. C. L., BARBOSA, B. D. R., SANTOS COSTA, B. Reação de acessos de *Cenchrus a Pyricularia grisea* no semiárido brasileiro. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 6, n. 4, p. 396–402, 2021.
- ANTUNES, G. R., SANTANA, S. R. A., ESCOBAR, I. E. C., SILVA BRASIL, M., ARAÚJO, G. G. L., VOLTOLINI, T. V., FERNANDES-JÚNIOR, P. I Associative diazotrophic bacteria from forage grasses in the Brazilian semi-arid region are effective plant growth promoters. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 10, p. 899–907, 2019.
- BAEK, S. H., IM, W. T., OH, H. W., LEE, J. S., OH, H. M., LEE, S. T. *Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 2665–2669, 2006.
- BAHULIKAR, R. A., CHALUVADI, S. R., TORRES-JEREZ, I., MOSALI, J., BENNETZEN, J. L., UDVARDI, M. Nitrogen fertilization reduces nitrogen fixation activity of diverse diazotrophs in switchgrass roots. **Phytobiomes Journal**, v. 5, n. 1, p. 80–87, 2021.
- BATISTA, F. D. C., FERNANDES, T. A., ABREU, C. S., OLIVEIRA, M. C., RIBEIRO, V. P., GOMES, E. A., OLIVEIRA-PAIVA, C. A. Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 166, p. 23, 2018.
- BERNARD, K. A., VACHON, A., PACHECO, A. L., BURDZ, T., WIEBE, D., BENIAC, D. R., BERNIER, A. M. *Pseudoxanthomonas winnipegensis* sp. nov., derived from human clinical materials and recovered from cystic fibrosis and other patient types in canada, and emendation of *pseudoxanthomonas spadix* Young et al. 2007. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 6313–6322, 2020.
- BRUNO, L. R. G. P.; ANTONIO, R. P.; ASSIS, J. G. D. A.; MOREIRA, J. N.; LIRA, I. C. D. S. A. BUFFEL GRASS MORPHOAGRONOMIC CHARACTERIZATION FROM *Cenchrus* GERMLASM ACTIVE BANK. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 2, p. 487–495,

2017.

COELHO, M. I. S.; CASEIRO, V. A. P.; ARAUJO, F. F. Diversidade de bacillus sp. em rizosfera de urochloa brizantha na integração lavoura-pecuária. In: A valorização da ciência, saúde e sociedade na pandemia, XXI, 2021, São Paulo. Anais do ENEPE. São Paulo: UNOESTE, p. 1531-1540, 2021.

COLMÁN RIBELATTO, P. J.; MARQUES GENÚ, A.; CAMPOS LUSTOSA, S. B.; POTT, C. A. Atributos químicos do solo e produção de Urochloa brizantha cv. Marandu. **Investigación Agraria**, v. 21, n. 2, p. 108–116, 2019.

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**, v. 168, n. 1, p. 94–99, 2005.

FERNANDES JÚNIOR, P. I., AIDAR, S. D. T., MORGANTE, C. V., GAVA, C. A. T., ZILLI, J. É., SOUZA, L. S. B. D., MARTINS, L. M. V. The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 993-1002, 2015.

FERNANDES JÚNIOR, P. I., AIDAR, S. D. T., GAVA, C. A. T., ZILLI, J. É., MARTINS, L. M. V. Caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas associadas a *Tripogon spicatus* no Bioma Caatinga. Petrolina: Embrapa Semiárido; 2012.

KÄMPFER, P., THUMMES, K., CHU, H. I., TAN, C. C., ARUN, A. B., CHEN, W. M., YOUNG, C. C. *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 491–495, 2008.

KHANGHAHI, M. Y.; STRAFELLA, S.; ALLEGRETTA, I.; CRECCHIO, C. Isolation of bacteria with potential plant-promoting traits and optimization of their growth conditions. **Current Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 464-478, 2021

MAZZUCHELLI, R. C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAUJO, F. F.. INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO. **Colloquium Agrariae**, v. 10, n. 2, p. 40–47, 2014.

MOREIRA, S. J. A., FAGUNDES, J. L., MISTURA, C., LEMOS, N. L. S., MOREIRA, J. N., BACKES, A. A., MOREIRA, A. L. Características morfogênicas, estruturais e produtivas de acessos de capim-buffel. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 391–400, 2015.

NOCELLI, N., BOGINO, P. C., BANCHIO, E., GIORDANO, W. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. **Materials**, v. 9, n. 6, p. 418, 2016.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A., MARRIEL, I. E., GOMES, E. A., COTA, L. V., SANTOS, F. C., SOUSA, S. M., VASCO JUNIOR, R. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho. **Embrapa**, p. 19, 2020.

OLIVEIRA, J. T., SILVA, G. T., SILVA DINIZ, W. P., FIGUEREDO, E. F., SANTOS, I. B., LIMA, D. R. M., FREIRE, F. J. Diazotrophic bacteria isolated from *Brachiaria* spp.: Genetic and physiological diversity. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 45, n. 3, p.

277–289, 2018.

RAMOS, P. D. P., MELLONI, R., SILVA, N. L. P., MELLONI, E. G. P., FERREIRA, G. M. D. R., SILVA, L. F. D. O. D., SILVA, T. A. C. D. Isolation, characterization of rhizobacteria and analysis of indole acetic acid production aiming at the rooting of olive (*Olea europaea* L.) cuttings. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 1612-1630, 2021.

RAY, S.; PATEL, N.; AMIN, D. *Brevibacillus*. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi**, p. 149–167, 2020.

RODRIGUES, R. C., MOURÃO, G. B., BRENNECKE, K., LUZ, P. H. D. C., HERLING, V. R. Produção de massa seca, relação folha/colmo e alguns índices de crescimento do *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés cultivado com a combinação de doses de nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 394-400, 2008.

ROLLI, E., MARASCO, R., VIGANI, G., ETTOUMI, B., MAPELLI, F., DEANGELIS, M. L., DAFFONCHIO, D. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 2, p. 316-331, 2015.

RYU, M. H., ZHANG, J., TOTH, T., KHOKHANI, D., GEDDES, B. A., MUS, F., VOIGT, C. A. Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. **Nature microbiology**, v. 5, n. 2, p. 314-330, 2020.

SANTOS, D.; FAGOTTI, L.; CERZINI, P.; RENATA, J. DELAMUTA, M.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico. , , n. 1, p. 1–4, 2007.

SILVA, C. D. S., OLIVEIRA, M. C., SOARES, J. G. G. Avaliação de forrageiras nativas e exóticas para a região semi-árida do Nordeste. **Embrapa Semiárido- Documentos (INFOTECA-E)**, 1984.

SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 35, p. 359-371, 2011.

SINGH, S.; SINGH, V.; PAL, K. Importance of micro organisms in agriculture. **Climate and Environmental Changes: Impact, Challenges and Solutions**, , n. February, p. 93–117, 2017.

SONG, J., WANG, Y., SONG, Y., ZHAO, B., WANG, H., ZHOU, S., YAN, Y. *Brevibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil of a paddy field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 772–777, 2017.

SOUSA, F. B.; ARAUJO FILHO, J. A. Capim búfel (*Cenchrus ciliaris* L.): uma opção para ovinos e caprinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

TERRA, A. B. C.; COSTA SOUZA, F. R.; MANTOVANI, J. R.; REZENDE, A. V.; FLORENTINO, L. A. Physiological characterization of diazotrophic bacteria isolated from *Brachiaria brizantha* rhizosphere. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 3, p. 658–666, 2019.

UMAPATHI, M., CHANDRASEKHAR, C. N., SENTHIL, A., KALAISELVI, T., SANTHI, R., RAVIKESAVAN, R. Isolation, characterization and plant growth-promoting effects of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) moench] root-associated rhizobacteria and their potential role in drought mitigation. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 6, 2022. Springer Berlin Heidelberg.

WANG, Y., CHEN, Y., XUE, Q., XIANG, Q., ZHAO, K., YU, X., GU, Y. The Abundance of the *nifH* Gene Became Higher and the *nifH*-Containing Diazotrophic Bacterial Communities Changed During Primary Succession in the Hailuoguo Glacier Chronosequence, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. May, p. 1–10, 2021.

ZHANG, L. HONG; CHEN, S. FENG. *Pseudacidovorax intermedius* NH-1, a novel marine nitrogen-fixing bacterium isolated from the South China Sea. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 2839–2847, 2012.