

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Seleção de Bactérias Diazotróficas
Solubilizadoras de Fósforo e seu Efeito no
Desenvolvimento de Plantas de Arroz

German Andres Estrada Bonilla

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO E SEU EFEITO NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE ARROZ

German Andres Estrada Bonilla

Sob a Orientação do Professor

José Ivo Baldani

e Co-orientação da Pesquisadora

Vera Lucia Divan Baldani

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração em Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ

Junho de 2011

633.18

B715s

T

Bonilla, German Andres Estrada,
1986-

Seleção de bactérias
diazotróficas solubilizadoras de
fósforo e seu efeito no
desenvolvimento de plantas de arroz/
German Andrés Estrada Bonilla -
2011.

85 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 48-64.

1. Arroz - Cultivo - Teses. 2.
Nitrogênio - Fixação - Teses. 3.
Adubos e fertilizantes orgânicos -
Teses. 4. Bactérias - Teses. 5.
Indol - Teses. I. Baldani, José
Ivo, 1953-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em
Fitotecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

German Andres Estrada Bonilla

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Fisiologia da Produção, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em Fitotecnia, área de concentração em Fisiologia da Produção.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09 / 06 / 2011

José Ivo Baldani, PhD. UFRRJ.
(Orientador)

Luiz Beja Moreira, PhD. UFRRJ

Eliane Maria Ribeiro da Silva, PhD. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus que me deu a vida e saúde para completar mais uma etapa na vida.

A meus pais, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago e Horacio Antonio Estrada Jaramillo, por seu amor, pelo apoio em todos os momentos, e por mostrar-me o caminho certo ao sucesso: "Simplesmente disciplina, amor e dedicação".

A meus avôs, papá Antonio e mamá Empera um exemplo de vida, muito obrigado por ensinar-me que nada é impossível e que querer é poder.

A toda minha família por mostrar-me a importância de sempre estarmos unidos.

A Paula grande amiga, colega, meu amor, obrigado por sua ajuda, estímulo e companhia, juntos conquistaremos nossas metas.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela acolhida.

Ao curso de Pós-graduação em Fitotecnia, pela oportunidade e o apoio em todas as etapas do trabalho

A EMBRAPA Agrobiologia por oferecer a infraestrutura para realizar os experimentos.

Ao meu orientador Dr. José Ivo Baldani por aceitar-me no grupo e incentivar meu espírito de pesquisa. Suas sugestões sempre foram oportunas.

A Dra. Vera Lucia Divan Baldani por seu apoio e carinho durante estes três últimos anos.

Ao Dr. Segundo Urquiaga por suas sugestões e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

A meus amigos e companheiros de laboratório Sandy e Danilo, muito obrigado pela amizade e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A meus amigos Patty, Carlos, Helma e Olavo por sua companhia nos momentos bons e difíceis.

Aos pesquisadores do laboratório de microbiologia de solos de CORPOICA: Dra. Ruth Bonilla, Maria Fernanda Garrido, Daniel Rojas, e Mauricio Camelo, por contribuir com seu conhecimento.

A meus colegas do laboratório de gramíneas William, Fabricio, Gabriela, Ana Paula, Camila, Cecília, Luiza, Renan, Valfredo e Jailson, por fazer nosso ambiente de trabalho muito agradável.

Aos amigos Lucio, Wilson, Geraldo e Luis Carlos pela prontidão em me ajudar sempre que preciso.

A meus colegas do laboratório de bioquímica Péricles, Helder, Luc, Patricia, Aline, Cleiton, Marcela, Leona, Paulo, Fernando, Rodrigo, Esdras, Mauro, Anita, Viviane, Cristiane e pelos momentos compartilhados.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização de meu trabalho

BIOGRAFIA

German Andres Estrada Bonilla, filho de Horacio Antonio Estrada Jaramillo e Ruth Rebeca Bonilla Buitrago, nasceu em Bogotá, no estado de cundinamarca, Colômbia em 10 de fevereiro de 1986. cursou o segundo grau no Colégio Santa Fe, em Valledupar. Em 2008, concluiu o curso de Microbiologia Industrial na Pontificia Universidad Javeriana. Durante a graduação desenvolveu trabalhos de pesquisas na Unidade Saneamento e Biotecnologia Ambiental (USBA), Pontificia Universidade Javeriana e na Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Em 2008 realizou seu estágio obrigatório e monografia na Embrapa Agrobiologia sob a orientação da pesquisadora Dra Vera Lucia Divan Baldani. Iniciou em 2009 o curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

BONILLA, German Andres Estrada. **Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz.** Seropédica: UFRRJ, 2011. 70 p. (Dissertação, Mestrado em Fitotecnia.)]

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas cultivadas, sendo amplamente consumida nos cinco continentes. Nos últimos anos as pesquisas têm aumentado em relação ao uso de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal (BPCV), como uma possível solução para diminuir o uso de fertilizantes químicos nitrogenados e fosfatados. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial fisiológico e a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (PI) de diferentes estirpes de bactérias diazotróficas oriundas de plantas de arroz cultivadas em diferentes regiões do Brasil e seu papel no desenvolvimento de plantas de arroz. Primeiramente foi padronizado o meio de cultura a ser empregado nos ensaios de solubilização de fosfato inorgânico em placas de petri. Neste estudo foram testadas 49 estirpes em quanto sua capacidade de solubilizar fosfato tricálcico (PTC) nos meios sólidos NBRIP e GL. Em seguida foi quantificado o P solúvel, pH, a população de bactérias e índice de solubilização (IS) das 7 estirpes solubilizadoras de PI em meio líquido NBRIP. As estirpes solubilizadoras de PI também foram testadas quanto à produção de compostos indólicos (AIA) e capacidade de fixar nitrogênio através da atividade de redução e acetileno (ARA). As estirpes foram identificadas através da amplificação e do sequenciamento parcial dos genes 16S RNAr e gene *nifH*. Três destas estirpes foram testadas em condições de casa de vegetação junto com os controles *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 (ZAE94), *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR11281 (PAL5) e *Azotobacter Chroococcum* AC1 quanto à capacidade de aumentar o desenvolvimento e produção de plantas de arroz. Todas as estirpes que solubilizaram PI no meio de cultura NBRIP líquido influenciaram na diminuição do pH do meio enquanto que a população se manteve em torno de 10^8 ufc.ml⁻¹ por até 15 dias. Todas as estirpes apresentaram capacidade de produzir compostos indólicos e foram capazes de reduzir acetileno. A análise parcial do gene 16S RNAr e do gene *nifH* das sete estirpes possibilitou a identificação das espécies *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia vietnamiensis* e *B. kururiensis*. Todas as estirpes promoveram um aumento na produção de massa seca nos grãos entre 33 e 47% quando foi utilizado o PTC e de 18 a 44% quando foi utilizado o fosfato super simples (PSS). Em geral, todas as estirpes estimularam um maior acúmulo de N e P total no grão e um maior índice de colheita. O uso dessas estirpes como bioinoculante é bastante promissor e portanto torna-se necessário testá-las em condições de campo.

Palavras-chave: Compostos indólicos, Fixação biológica de nitrogênio, Bactérias promotoras do crescimento vegetal.

ABSTRACT

BONILLA, German Andres Estrada. **Selection of P solubilizing diazotrophic bacteria and the effect on the development of rice plants.** Seropédica: UFRRJ, 2011. 70 p. (Dissertation, Master of Sciences in Fitotecnia).

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the major world crops, being widely consumed among people from five continents. In recent years research have increased in relation to the use of plant growth promoting diazotrophic bacteria (PGPB) as a possible solution to reduce the use of chemical nitrogen and phosphate fertilizers. Thus, this study aimed to evaluate the physiological potential and inorganic phosphate (IP) solubilization capacity of different diazotrophic strains isolated from rice plants grown in different regions of Brazil as well as to evaluate their role in the development of rice plants. Firstly, the culture media employed to test the phosphate solubilization in petri dishes were standardized. In this study 49 strains were tested for their capability of solubilizing tricalcium phosphate in NBRIP and GL solid media. Afterwards, the soluble P, pH, population and the index of solubilization (IS) were quantified for 7 IP solubilizing strains grown in the NBRIP liquid medium. The IP solubilizing isolates were also tested for the production of indolic compounds (IAA) and the nitrogen fixation capacity through the acetylene reduction activity (ARA). The isolates were taxonomical identified through the amplification and partial sequencing of 16S RNAr and *nifH* genes. Three of these strains and the controls *H. seropedicae* ZAE94, *G diazotrophicus* PAL5 and *A. chroochoocum* AC1 were tested in greenhouse conditions in association with rice plants. All strains that solubilized IP in NBRIP liquid medium decreased the medium pH while the bacterial population remained around 10^8 cfu ml⁻¹ for up to 15 days. All strains were capable to produce indole compounds and reduced acetylene. The partial analysis of 16S RNAr and *nifH* gene indicated the identification of the species *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia vietnamiensis* and *B. kururiensis* species. All strains showed an increase in the range of 33 and 47% in grain yield when tricalcium phosphate (PTC) was applied and between 18 and 44% when PSS (simple superphosphate) was used. In general, all of the strains stimulated an increase of total P in the grain and a greater harvest index. The use of these strains as bioinoculant is promising and therefore it is necessary to test in the field conditions.

Key words: Indolic compounds, Biological nitrogen fixation, Plant growth promoting bacteria.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Processos químicos e fisiológicos que influenciam a disponibilidade e transformação de fósforo na rizosfera.....6
- Figura 2.** Formação do halo de solubilização de fósforo inorgânico no meio GL (pH:5,5) pelas estirpes isoladas de plantas de arroz, crescidas por 8 dias.....21
- Figura 3.** Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ associado com a alteração de pH e a população bacteriana pelas diferentes estirpes durante 14 dias de crescimento das culturas. O pH inicial foi de 6,4. As barras indicam o erro padrão de três repetições.....25
- Figura 4.** Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em meio sólido (I.S) e em meio líquido (fosfato liberado) NBRIP analisados aos 5 dias (fig. 1A) e aos 14 dias (fig. 1B) após inoculação. As barras indicam o erro padrão de três repetições.....25
- Figura 5.** Atividade da nitrogenase (ARA) das estirpes diazotróficas solubilizadoras de P e estirpes padrões utilizadas. Como controle: *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e *Azospirillum brasilense* SP7. Média de três repetições.....27
- Figura 6.** Produção de compostos indólicos em diferentes estágios de cultivo (24, 48 e 72 / horas) em meio DYGS suplementado com $200\mu\text{g ml}^{-1}$ de triptofano, estirpes padrões utilizadas. Como controle: *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e *Azospirillum brasilense* SP7. Média de 3 repetições.....28
- Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de amplificação do gene 16S RNAr utilizando os iniciadores 27f e 1492R. Linhas PM: marcador de peso molecular 1 kb ladder (Invitrogen®); 1: H18; 2: ZA15; 3: AR1121; 4:AR1122; 5: AR1125; 6: AR114; 7:VR2236.....29
- Figura 8.** Árvore filogenética baseada nas Sequências parciais do gene 16S RNAr, incluindo as Sequências das estirpes solubilizadores de PI e outras proteobactérias fixadoras de nitrogênio. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Os números entre parênteses indicam a Sequência de acesso do banco de dados NCBI.30
- Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de amplificação do gene *nifH* utilizando os iniciadores PolR e PolF. Linhas PM: marcador de peso molecular 1 kb ladder (Invitrogen®); 1: H18; 2: ZA15; 3: AR1121; 4:AR1122; 5: AR1125; 6: AR114; 7:VR2236.....31
- Figura 10.** Árvore filogenética baseada nas Sequências parciais do gene *nifH*, incluindo as Sequências das estirpes solubilizadoras de PI e outras proteobactérias fixadoras de nitrogênio. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Os números entre parênteses indicam a Sequência de acesso do banco de dados NCBI.....32
- Figura 11.** Plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (60 DAP). 37

Figura 12. Acúmulo de massa seca total de plantas de arroz da variedade IR42 coletadas no estágio de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Fonte de P: Fosfato tricálcico (PTC) e Fosfato super simples (PSS). Média de 3 repetições. Letras iguais maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.....38

Figura 13. Acúmulo de massa seca total de plantas de arroz da variedade IR42 coletadas no estágio de maturação de grãos (120 DAP) e inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Fonte de P: Fosfato tricálcico (PTC) e Fosfato super simples (PSS). Média de 3 repetições. Letras iguais maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.....40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Origem das estirpes utilizadas neste trabalho.	10
Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene <i>nifH</i> e respectivas Sequências de nucleotídeos.....	15
Tabela 3. Iniciadores utilizados para sequenciamento do gene 16S RNAr das estirpes.	16
Tabela 4. Análise química da terra utilizada no experimento.....	17
Tabela 5. Tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação.....	18
Tabela 6. Índice de solubilização (IS) das estirpes com capacidade de solubilizar fósforo inorgânico e da estirpe tipo <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 nos diferentes meios de cultura, após 8 dias de crescimento.....	21
Tabela 7. Coeficientes de correlação obtidos dos tratamentos utilizados no experimento.....	25
Tabela 8. Resultado da análise de similaridade entre sequências do gene 16s RNAr das estirpes testadas utilizando BLAST.....	29
Tabela 9. Resultado da análise de similaridade entre sequências do gene <i>nifH</i> das estirpes testadas utilizando BLAST.....	31
Tabela 10. Contagem de bactérias diazotróficas presentes na terra utilizada como substrato.....	33
Tabela 11. Contagem realizada nos diferentes inoculantes produzidos e nas sementes inoculadas com as estirpes <i>B. vietnamiensis</i> AR114, <i>H. seropedicae</i> ZA15, <i>H. seropedicae</i> H18, <i>H. seropedicae</i> ZAE94, <i>A.chroochoccum</i> AC1 e a mistura das estirpes, utilizadas no experimento em vasos em casa de vegetação.....	34
Tabela 12. Estimativa do número mais provável (Log do nº células g ⁻¹) de bactérias diazotróficas presentes nas raízes de plantas de arroz, cultivar IR42, inoculadas com as estirpes <i>B. vietnamiensis</i> AR114, <i>H. seropedicae</i> ZA15, <i>H. seropedicae</i> H18, <i>H. seropedicae</i> ZAE94, <i>A.chroochoccum</i> AC1 e a mistura das estirpes. Coletadas nas fases de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e floração (90 DAP).....	35
Tabela 13. Altura e número de perfilhos de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (60 DAP), inoculados com as estirpes <i>B. vietnamiensis</i> AR114, <i>H. seropedicae</i> ZA15, <i>H. seropedicae</i> H18, <i>H. seropedicae</i> ZAE94, <i>A.chroochoccum</i> AC1 e a mistura das estirpes.....	36
Tabela 14. Acúmulo de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de arroz, no estágio vegetativo (60 DAP), inoculadas com as estirpes <i>Herbaspirillum seropedicae</i> H18, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZA15, <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZAE94, <i>Burkholderia vietnamiensis</i> AR114, <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5, <i>Azotobacter chroochoccum</i> AC1, e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.....	39

Tabela 15. Acúmulo de nitrogênio e fósforo na parte aérea de planta de arroz, no estágio de desenvolvimento maturação de grãos (120 DAP), inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.....41

Tabela 16. Relação raiz / parte aérea (respeito ao acúmulo de massa seca), nos estádios de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e maturação de grãos (120 DAP), inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.....42

Tabela 17. Produção de massa seca em g planta⁻¹, peso de 1000 espiguetas, número de panículas, índice de colheita, P total no grão de plantas de arroz, inoculadas com as estirpes *H. Seropedicae* H18, *H. seropedicae* ZA15, *H. seropedicae* ZAE94, *B. vietnamiensis* AR114, *G. diazotrophicus* PAL5, *A. chroococcum* AC1 e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.45

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol acético
ARA	Atividade da Redução de Acetileno
BPCV	Bactérias promotoras de crescimento vegetal
CNPAB	Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
RNAr	RNA ribossomal
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
NMP	Número Mais Provável
Nif	Gene que codifica a nitrogenase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Fósforo inorgânico
rpm	Rotações por minuto
SFI	Solubilização de fósforo inorgânico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Importância da cultura do Arroz	2
2.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal	2
2.2.1. Fixação biológica de nitrogênio em arroz	3
2.2.2. Solubilização de fosfatos inorgânicos	4
2.2.3. Produção de Auxinas	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Estirpes	10
3.2. Seleção de estirpes solubilizadoras de fosfatos inorgânicos	11
3.2.1. Seleção do meio de cultura sólido e avaliação de solubilização de fosfatos em meio de cultura sólido	11
3.2.2. Determinação de fósforo disponível em meio de cultura líquido	12
3.3. Análise de outras características de promoção de crescimento vegetal	13
3.3.1. Atividade de redução de acetileno (ARA)	13
3.3.2. Avaliação da produção de Auxinas	13
3.4. Caracterização molecular das estirpes	14
3.5. Experimento de inoculação em casa de vegetação com estirpes selecionadas	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de PI	20
4.1.1. Seleção do meio de cultura e avaliação de solubilização de fosfatos em meio sólido	20
4.1.2. Quantificação da solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP	22
4.2. Análise de outras características promotoras de crescimento vegetal	26
4.2.1. Atividade de redução de acetileno (ARA)	26
4.2.2. Avaliação das estirpes selecionadas quanto à produção de Auxinas	27
4.3. Caracterização molecular das estirpes	28
4.4. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato e diferentes fontes de fósforo no desenvolvimento de plantas de arroz cultivadas em vasos	32
5. CONCLUSÕES	47
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48
7. ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas no mundo, sendo amplamente consumida nos cinco continentes. A alta explosão demográfica nas últimas décadas fez aumentar sua demanda, fato este considerado durante a revolução verde, como uma possível solução para a obtenção de variedades de arroz com maiores rendimentos. Houve grandes incrementos na produção e conseqüentemente aumentou o uso de fertilizantes químicos, principalmente nitrogenados e fosfatados, que são os maiores fatores limitantes da produção do arroz (DENNIS, 2008). Além disso, o uso desses fertilizantes contribui para a contaminação dos solos e da água, trazendo riscos para a saúde e o meio ambiente, além de sua alta demanda energética na utilização de combustível fóssil (GOVINDARAJAN et al., 2008).

Este fato torna-se preocupante, já que a taxa de crescimento da cultura é inferior ao crescimento da população demográfica mundial, fazendo com que exista a necessidade de produzir maior quantidade de alimento na mesma área de cultivo. Além disso, a demanda para uma produção sustentável e a diminuição de fertilizantes químicos é urgente (FAO, 2010). Diante desta problemática, têm-se intensificado as pesquisas em relação ao uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), como uma possível solução para diminuir o uso dos fertilizantes nitrogenados e fosfatados. Essas bactérias podem interagir de forma assimbiótica e se localizam na rizosfera ou na planta hospedeira de forma endofítica. Na interação planta bactéria, as BPCV são capazes de colonizar a rizosfera, a superfície das raízes ou os espaços intercelulares superficiais das plantas (McCULLEY, 2001).

Os principais mecanismos mediante os quais as BPCV promovem o crescimento das plantas compreendem a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a solubilização de fósforo inorgânico (SFI) e orgânico, o sequestro de ferro por sideróforos, a redução dos níveis do etileno e a produção de fitohormônios tais como auxinas, citoquininas e giberilinas. (LUCY et al., 2004).

Nesta linha de pesquisa, na Embrapa Agrobiologia, nos últimos anos, tem sido feitos trabalhos com a cultura do arroz com o objetivo de isolar e caracterizar bactérias diazotróficas nativas de diferentes estados do Brasil tais como: Maranhão (ARAÚJO, 2008), Goiás e Rio de Janeiro (RODRIGUES, 2003; BRASIL, 2005). Com o resultado destes estudos, uma grande diversidade de bactérias com um amplo potencial biotecnológico foi isolada, porém nem todas as estirpes foram avaliadas em relação ao potencial de uso na associação com a planta para características como solubilização de P. Desta forma, este trabalho teve por objetivo selecionar estirpes diazotróficas solubilizadoras de fósforo inorgânico originárias de arroz, e avaliar o efeito da inoculação em plantas de arroz. No intuito de caracterizar fisiologicamente as estirpes mais promissoras quanto à capacidade de promover o crescimento vegetal foram realizados, testes de produção de auxinas, solubilização de fosfatos e fixação de N₂. As estirpes diazotróficas solubilizadoras de fosfatos foram identificadas por sequenciamento dos fragmentos de 16S RNAr e do gene *nifH* e utilizadas em associação com arroz cultivado em condições de casa de vegetação utilizando fosfato tricálcico e fosfatos super simples como fonte de P.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da cultura do Arroz

O arroz é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo (YOUNG e PELLET, 1994). No ano 2005 o arroz contribuiu com aproximadamente 20% do consumo de energia e o 15% de proteína mundial sendo considerado o produto de maior importância econômica em muitos países em desenvolvimento. (KENNEDY e BURLINGAME, 2003).

Este cereal é um dos mais antigos alimentos produzidos pelo homem, e diversos historiadores e cientistas apontam o sudeste da Ásia como o local de origem desta cultura. As províncias de Bengala e Assam, e Mianmar na Índia têm sido citadas como os lugares de origem da espécie. Duas formas silvestres são citadas como as precursoras do arroz cultivado: a espécie *Oryza rufipogon*, procedente da Ásia, que originou a *O. sativa*; e a *Oryza barthii* (= *Oryza breviligulata*), derivada da África Ocidental, a qual originou a *O. glaberima* (WINCH, 2006).

O arroz é uma espécie hidrófila. Existem dois grandes ecossistemas para o desenvolvimento da cultura, que são as várzeas as quais são irrigadas por inundação controlada, e as terras altas, sem irrigação e o com irrigação suplementar por aspersão. Aproximadamente 90% da produção mundial do arroz é cultivado e consumido na Ásia, que utiliza principalmente o sistema básico irrigado por inundação. No Brasil, cerca de 69% da produção é proveniente do ecossistema de várzeas; este tipo de produção não é tão dependente das condições climáticas como no caso dos cultivos de terras altas (GUIMARÃES et al., 1998). Por apresentar uma fácil adaptação a diferentes condições de solo e clima, alguns autores o consideram como a espécie com maior potencial para o aumento da produção e uma das principais culturas para combater a fome no mundo (AZAMBUJA et al., 2004).

A área aproximada da cultura do arroz é de 158 milhões de hectares sendo o segundo cereal mais cultivado no mundo. Sua produção corresponde a 29 % do total de grãos usados na alimentação humana com cerca de 679 milhões de toneladas de grãos em casca. No Brasil, o arroz ocupa a terceira posição em termos de produção de grãos, sendo antecedido pela soja e pelo milho. Estas culturas representam cerca de 80% da área colhida. A área cultivada com arroz na safra 2009/10 foi de 2.764,8 mil hectares, 5,0% inferior a área cultivada na safra 2008/09; a produção foi de 11,26 milhões toneladas reduzindo 10,7% em relação à safra 2008/09 (CONAB, 2011). O grande aumento na produção deste cereal tem estimulado a procura de alternativas que produzam menor impacto ambiental e aumento no rendimento desta cultura, de forma a reduzir seu custo de produção e aumentar a produtividade (CHOULHURY e KENNEDY, 2004).

2.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Durante a Revolução Verde a seleção de variedades de arroz foi baseada em maior rendimento o qual resultou em grandes aumentos na produção de arroz. Porém, manter esta alta produtividade demanda principalmente grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados e fosforados. O uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados causa contaminação de solos e águas por nitratos, levando a danos à saúde e poluição ambiental. Além disso, a aquisição de fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados, é muito caro para muitos agricultores o que frequentemente torna-se o fator mais limitante da produção de arroz. Uma das soluções viáveis para esta problemática é o uso de biofertilizantes baseados em BPCV, as quais promovem o crescimento vegetal

especificamente através do aumento da disponibilidade de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) ou do acesso aos mesmos pela planta através do incremento da área superficial da raiz (SOMERS et al., 2004).

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias têm sido amplamente estudados, e podem ser influenciados por diversos fatores abióticos como: temperatura, pH, radiação, umidade, íons e elementos minerais e orgânicos do solo; e bióticos, como: características do hospedeiro, presença de patógenos e outros microrganismos associados à planta (BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001; ARAÚJO et al., 2002). O aumento do crescimento vegetal pela influência das bactérias pode ser o resultado tanto de ações diretas (aumento da disponibilidade de nutrientes para a planta e a produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal) (SHISHIDO et al., 1999; STURZ et al., 2000), como de ações indiretas (controle de fitopatógenos por competição, produção de sideróforos, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro) (STURZ et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001). Vários destes mecanismos de ação podem ocorrer simultaneamente.

2.2.1. Fixação biológica de nitrogênio em arroz

O nitrogênio é um nutriente que limita a produção das culturas do arroz pela sua carência na maioria dos solos já que a principal reserva de nitrogênio na biosfera é o nitrogênio molecular da atmosfera. Porém, este não pode ser diretamente assimilado pelas plantas, mas torna-se disponível através do processo de FBN que somente células procariontas têm desenvolvido (FRANCHE et al., 2009).

Parte do nitrogênio atmosférico incorpora-se à matéria viva através da FBN. Este processo constitui a principal via de incorporação do nitrogênio ao ecossistema solo, o qual é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos que decompõem a matéria orgânica no solo. A transformação do nitrogênio não é exclusivamente biológica: os relâmpagos representam 10% da contribuição global; a indústria dos fertilizantes contribui com 25%, e a fixação biológica de nitrogênio contribui com aproximadamente 60% (BACA et al., 2000).

Processos biológicos de incorporação de N ao sistema solo-planta, como a FBN, tem sido amplamente estudados para avaliar o potencial de sua utilização nos sistemas de produção agrícola e resultados de campo sugerem que cerca de 150 kg de N. ha⁻¹ são incorporados aos tecidos da cana de açúcar via FBN (BODDEY et al., 1995).

A cultura de arroz precisa de 1 kg de nitrogênio para produzir entre 15 e 20 kg de grãos. Nos trópicos, o rendimento da cultura do arroz inundado é de 2 a 3,5 Mg ha⁻¹ usando o N₂ disponível naturalmente da FBN por bactérias de vida livre e diazotróficas e da mineralização do N₂ do solo (LADHA e REDDY, 2003).

A interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico, pela possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados, e indiretamente, diminuição do impacto ambiental, tudo isto mantendo ou aumentando a produtividade das culturas. A capacidade de fixar nitrogênio das bactérias diazotróficas foi verificada inicialmente entre as plantas leguminosas, onde se conseguiu em culturas como a soja a redução de até 100% da fertilização nitrogenada (ALVES et al., 2003). Experimentos recentes têm demonstrado que plantas de arroz apresentam potencial significativo, respondendo com aumento na produção quando as plantas são inoculadas com bactérias dos gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum amazonense* (BRASIL, 2005; RODRIGUES, 2003; ARAUJO, 2008).

Burkholderia vietnamiensis descrita por Gillis et al. (1995) tem mostrado efeitos positivos sobre a cultura do arroz conforme demonstrado por Trân van et al. (2000) que observaram incrementos de 13 a 22% na produção de grãos quando plantas crescidas em condições de campo foram inoculadas com a estirpe *B. vietnamiensis* TVV75. Os autores calcularam que a inoculação respondeu por cerca de 25 a 30 kg de N presente nos tecidos. A inoculação da espécie proposta *B. brasilensis* aumentou em 69 % a biomassa das plantas e contribuiu com 31 % do total de nitrogênio da planta enquanto que a estirpe *B. vietnamiensis* contribuiu com 19 % do N acumulado na planta (BALDANI et al., 2000).

Herbaspirillum seropedicae é um endófito diazotrófico que foi isolado pela primeira vez em Seropédica, Rio de Janeiro (BALDANI et al., 1986). Estudos realizados por Baldani et al. (2000) em condições gnotobióticas calcularam que a contribuição de N derivado da FBN é de 31% e 54%, respectivamente quando as plantas de arroz foram inoculadas com as estirpes *H. seropedicae* ZAE94 e ZAE67. Guimarães et al. (2003) verificaram que a inoculação em plantas de arroz de sequeiro da variedade Guarani promoveu aumentos na produção de grãos de até 50% com a estirpe *H. seropedicae* ZAE94 e 38% quando inoculado com a estirpe *B. brasilensis* M130. A adição de molibdênio, componente estrutural das molibdoenzimas redutase, essenciais no processo de FBN, promoveu aumentos de 88 e 57% na produção de grãos das cultivares IR42 e IAC4440, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2007). Já Ferreira (2010) não encontrou diferença estatística entre os tratamentos inoculado e não inoculado para os parâmetros massa seca e o N-total dos grãos quando as variedades de arroz IR42 e IAC4440, crescidas em casa de vegetação, foram inoculadas com as estirpes *H. seropedicae* ZAE94, *Burkholderia sp.* M130, e *A. brasilense* Sp109.

Estudos realizados com *Azospirillum amazonense*, espécie que foi inicialmente isolada de gramíneas forrageiras e plantas pertencentes à família Palmaceae (MAGALHÃES et al., 1983), mostraram que a inoculação da estirpe *Azospirillum amazonense* Y2, em arroz cultivado em casa de vegetação, aumentou de 7 a 11,6% o acúmulo de massa seca dos grãos, de 3 a 18,6% o número de panículas, e a acumulação de nitrogênio na maturação aumenta de 3,5 a 18,5%, enquanto a contribuição da FBN foi de 27% (RODRIGUES et al., 2008). A associação natural de *Gluconacetobacter diazotrophicus* com plantas de arroz é conhecida (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005), e estudos em laboratório demonstram a capacidade de colonização de plântulas de arroz por essa bactéria (ROUWS et al., 2010). Experimentos de inoculação de plantas de arroz cultivadas no campo com um inoculante misto contendo as estirpes *G. diazotrophicus* LMG7603, *H. seropedicae* LMG6513, *A. lipoferum* 4B LMG4348, e *B. vietnamiensis* LMG10929 levou a aumentos do rendimento de 9,5 a 23,6% (GOVINDARAJAN et al., 2008).

A inoculação de *Azotobacter* spp, espécie diazotrófica de vida livre, em arroz crescido sob condições de campo, aumentou a produtividade de 0,4 a 0,9 t ha⁻¹ (7 a 20%) e de 11 a 15 Kg no acúmulo de N na parte aérea (YANNI e EL-FATTAH, 1999).

Recentemente algumas bactérias diazotróficas têm mostrado que a FBN não é o único mecanismo envolvido na promoção de crescimento vegetal (DARDANELLI et al., 2010). *Azospirillum* spp bactéria diazotrófica produz hormônios vegetais que aumentam o número de raízes e de pelos radiculares, este incremento na superfície de contato com o solo melhora a absorção de nutrientes e água pela planta. O aumento da captação de P pela planta também é favorecida, através da solubilização de fosfatos pela liberação de prótons e ácidos orgânicos (DOBBELAERE et al., 2001; BASHAN et al., 2004).

2.2.2. Solubilização de fosfatos inorgânicos

O fósforo (P) é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Está presente em níveis de 400 a 1200 mg kg⁻¹ de solo (JONES, 2000) Seu ciclo pode ser descrito como “aberto” ou “sedimentário”, porque não existe troca com a atmosfera. Este ciclo ocorre por meio da oxidação e redução cíclica dos compostos do fósforo, onde a transferência dos elétrons se dá entre estados de oxidação mais baixos da fosfina (-3) até o fosfato (+5). Apesar dos solos geralmente apresentarem uma grande quantidade de P total, apenas uma pequena parte está imediatamente disponível para absorção pelas plantas (geralmente 1-5 µM; BIELESKI, 1973), a maioria é imobilizada e torna-se indisponível para a absorção pelas plantas formando complexos com cátions de Ca²⁺ em solos com pH altos e com Fe³⁺ e Al³⁺ em solos com pH ácidos (GOLDSTEIN, 1986). As plantas só o absorvem em forma de ânions ortofosfatados (predominantemente HPO₄²⁻ e H₂PO₄⁻ a partir da solução do solo) (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

O P tem papel indispensável na biosfera já que faz parte dos ácidos nucleicos, os quais armazenam o código genético. Muitas das substâncias intermediárias da fotossíntese e da respiração celular estão combinadas com fósforo, além disso, este faz parte da moeda energética da vida, o ATP (BRADY et al., 2004).

As rochas fosfáticas (27-38% de P₂O₅) são a principal fonte empregada para produzir os diferentes tipos de adubos fosfatados. Os fosfatos têm como origem principal as rochas sedimentares, e em menor quantidade rochas ígneas. Independente da sua origem pertence ao grupo das apatitas, e as variantes mais comuns encontradas são fluorapatita e francolita (IGUAL e RODRIGUEZ, 2007). Embora os depósitos de rocha fosfática sejam encontrados em mais de 30 países em todo o mundo, atualmente cerca de dois terços da demanda global de P são produzidos pelos três principais produtores, ou seja, EUA, China e Marrocos (EFMA, 2002).

A solubilização de PI e orgânico é uma característica exibida por muitas bactérias do solo em associação com a rizosfera de diferentes espécies de plantas. Estas bactérias são conhecidas como bactérias solubilizadoras de fosfato e possuem um importante papel ecofisiológico, disponibilizando PI insolúveis na sua matriz mineral para a planta. Esses microrganismos efetuam processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do P a partir de formas pouco disponíveis de fósforo inorgânico como as rochas fosfáticas e o orgânico como a matéria orgânica. Vários microrganismos estão envolvidos nesses processos, mas as bactérias se destacam com o maior potencial para obtenção de fosfatos solúveis, sendo cerca de 40% das bactérias rizosféricas são capazes de solubilizar P (RICHARDSON et al., 2001). Alguns gêneros de bactérias promotoras de crescimento vegetal tais como *Azospirillum lipoferum* e *brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* fixam nitrogênio e são também capazes de solubilizar os fosfatos inorgânicos (RODRIGUEZ et al., 2004; KUNDU e GAUR, 1980, SARAVANAN et al., 2008; HALDER e CHAKRABARTTY, 1993; SURANGE e KUMAR, 1993).

Os microrganismos são uma parte essencial no ciclo do P no solo ajudando na transferência do P da matriz solo para as raízes das plantas. Por conseguinte, desde o início do século passado tem existido um grande interesse na utilização de microrganismos rizosféricos com a finalidade de melhorar a nutrição fosfatada nas plantas, e com isto aumentar a eficiência global no uso do P em sistemas agrícolas (JAKOBSEN et al., 2005). Os microrganismos rizosféricos influenciam diretamente a capacidade das plantas em adquirir P através de uma série de mecanismos estruturais conforme ilustrado na figura 1. Estes incluem: (i) aumento na área superficial das raízes, seja pelo aumento na extensão do sistema radicular (associações com micorrizas) ou pelo aumento das ramificações da raiz e

dos pelos radiculares (estimulação do crescimento através de hormônios vegetais); (ii) pela mudança do equilíbrio de sorção, o que resulta no aumento da transferência de íons fosfato na solução do solo ou no aumento da mobilidade de formas orgânicas de P e, (iii) por processos metabólicos que atuam diretamente na solubilização e mineralização de P de formas pouco disponíveis orgânicas e inorgânicas (RICHARDSON, 2007).

Os processos metabólicos envolvidos na solubilização e mineralização de P incluem a excreção de íons de hidrogênio, a liberação de ânions orgânicos, a produção de sideróforos e produção de enzimas fosfatase que são capazes de hidrolisar o P orgânico do solo. Em particular, os ânions orgânicos e prótons associados são efetivos na solubilização do PI precipitado (por exemplo, Fe-P e Al-P em solos ácidos, Ca-P em solos alcalinos), os íons quelantes de metais podem associar-se com formas complexadas de P ou podem facilitar a liberação do P adsorvido através de reações de câmbio de ligações.

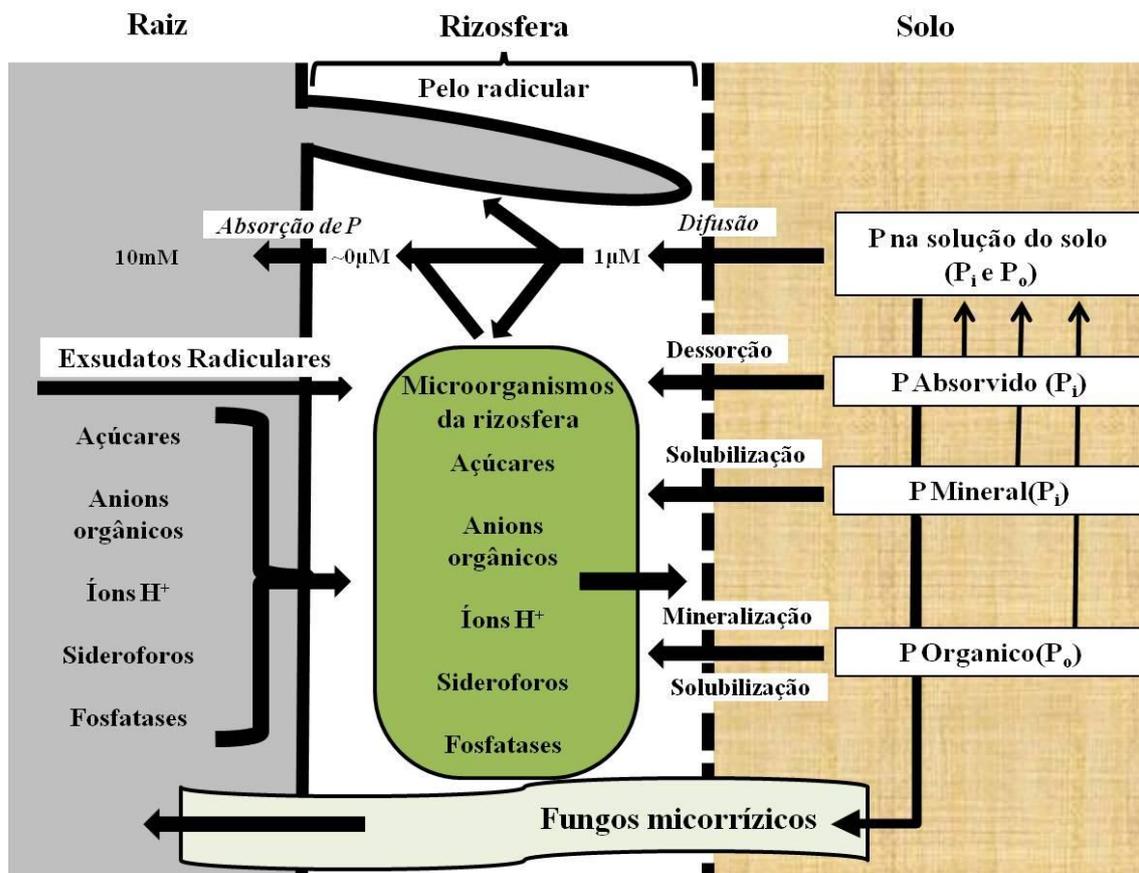


Figura 1. Processos químicos e fisiológicos que influenciam a disponibilidade e transformação de fósforo na rizosfera. (Adaptado de Richardson, 2001)

A solubilização de PI pode ocorrer através da liberação de ácidos orgânicos, como ácido láctico, glicólico, cítrico, acético, glucônico, málico, oxálico, succínico e tartárico, dentre outros (KUCEY et al., 1989), que acidificam o solo e liberam íons solúveis monobásicos (H₂PO₄⁻) e dibásicos (HPO₄²⁻). Com a geração destes íons, aumenta a forma disponível de fósforo para as plantas, e conseqüentemente amplia a sua captação pelas mesmas (GYANESHWAR et al., 2002). O tipo e a quantidade do ácido orgânico produzido por rizobactérias dependem da fonte de carbono disponível na rizosfera. Tem sido demonstrado que a capacidade de solubilização de PI está relacionada com a natureza do

ácido orgânico e que o tipo de mineral fosfatado também influencia o tipo e a quantidade de ácido orgânico requerido (KPOMBLEKOU e TABATABAI, 1994)

Em bactérias Gram-negativas, o ácido glucônico e o ácido 2-cetoglucônico são os principais ácidos implicados na solubilização de PI (GOLDSTEIN, 1995). O ácido glucônico é produzido pela oxidação direta da glicose através da enzima glicose desidrogenase (GDH-PQQ) do inglês “glucose dehydrogenase”), uma quinoproteína de membrana. A enzima GDH-PQQ apresenta ampla especificidade de substrato, em alguns organismos além de glicose, também pode utilizar como substrato açúcares aldose, tais como a xilose, galactose e maltose, formando seus correspondentes ácidos aldônicos, que também podem solubilizar PI (SHARMA et al., 2005). Gyaneshwar et al. (1999) demonstrou que ao submeter o microorganismo *Enterobacter asburiae* a deficiência de P resultou na indução da enzima GDH-PQQ.

A acidificação também é comumente associada à liberação de ânions orgânicos, os quais são produzidos por diversos microorganismos (exemplos destes são o citrato, oxalato, lactato e gluconato) (DEUBEL e MERBACH, 2005). Ânions orgânicos podem aumentar a mobilização de determinadas formas de P pouco solúveis como Al-P e Fe-P por reações de quelação (WHITELAW, 2000).

2.2.3. Produção de Auxinas

Vários fitohormônios são sintetizados pelas plantas e atuam como mensageiros químicos para regular o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação das células e tecidos, assim, quando a concentração dos hormônios é alterada ocorrem mudanças no crescimento e desenvolvimento da planta, podendo ter resultados positivos ou negativos (SPAEPEN et al., 2009).

As auxinas são uma classe importante de fitormônios. Elas regulam a embriogênese, a diferenciação de órgãos, arquitetura de raízes parte aérea, a dominância apical e as respostas trópicas (TEALE et al., 2006). Elas exercem uma importante função na regulação do crescimento de plantas, aumentando o crescimento radicular e melhorando a absorção de nutrientes (LAMBRECHT et al., 2000).

O ácido indol-acético (AIA) é a auxina mais abundante dentre os fitohormônios (BARTEL, 1997) e já está provado que além das plantas a mesma pode ser sintetizada por diversos microrganismos (SPAEPEN et al., 2007). Estima-se que cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA, indicando um possível papel destas na interação com a planta (KHALID et al., 2004). Até agora não foi achada a sua função na célula microbiana, a produção de AIA pode ser resultado da evolução da interação de bactéria-planta (PATEN e GLICK, 2002b) e pode ser influenciada pelo genótipo, tanto do hospedeiro quanto do microrganismo (JAIN e PATRIQUIN, 1985). O AIA pode aumentar o número, o crescimento das raízes e a longitude das mesmas, e está associado com a proliferação e o alongamento dos pêlos radiculares. Além deste hormônio, algumas bactérias promovem o crescimento das plantas através da produção de giberelinas e/ou citocininas (DE SALAMONE et al., 2001).

A diversidade de funções que tem o AIA nas plantas é refletida pela complexidade de sua biossíntese, transporte e vias de sinalização. É sintetizado a partir do triptofano através, pelo menos, de duas vias: as rotas via triptamida (TAM) e indol-3-piruvato (IPA) (STRADER e BARTEL, 2008). Já nas bactérias, as rotas predominantes são: a via indol-3-acetamida (IAM) e indol-3-piruvato (IPA), por esta razão são as mais estudadas (SPAEPEN, 2009).

Na via IAM o triptofano é, primeiro, transformado a IAM pela enzima Triptofano-2-monoxigenase, codificada pelo gene *iaaM*. Logo o IAM é transformado a AIA pela enzima

IAM hidrolase, codificada pelo gene *iaaH*. Os genes *iaaM* e *iaaH* foram clonados de várias bactérias e caracterizados, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (CLARK et al., 1993; MORRIS, 1995; SEKINE et al., 1989; THEUNIS et al., 2004). Genes relacionados com a via IAM foram detectados no cromossomo de diferentes espécies de *Pseudomonas*, e em plasmídeos como o pPath de *Pantoea agglomerans* (GLICKMANN et al., 1998; MANULIS et al., 1998).

Na via IPA, o triptofano é inicialmente convertido a IPA por uma aminotransferase (transaminação), em seguida, é descarboxilado através da indol-3-piruvato descarboxilase a indol-3-acetaldeído (IAAld) após isso é oxidado a AIA pela IAAld desidrogenase. Esta via foi identificada em diversas bactérias, tais como *Pantoea agglomerans*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*, e *Pseudomonas* (BRANDL e LINDOW, 1996; COSTACURTA et al., 1994; KOGA et al., 1991; PATTEN e GLICK, 2002a; 2002b).

Existem duas rotas diferentes às descritas anteriormente – via triptamina (TAM) e indol-3-acetonitrila (IAN). Na primeira, o triptofano é descarboxilado a TAM e subsequentemente convertido a IAAld por uma amino-oxidase (HARTMANN et al., 1983) enquanto que na segunda, as enzimas nitrilases catalisam a conversão de IAN a AIA (KOBAYASHI, 1993; NAGASAWA et al., 1990). Em bactérias, a via triptamina (TAM) foi identificada em *Bacillus cereus*, através da atividade da enzima triptofano descarboxilase (PERLEY e STOWE, 1966) e em *Azospirillum* pela conversão de triptamina exógena em AIA (HARTMANN et al., 1983). Já a via indol-3-acetonitrila foi identificada em *Agrobacterium* spp e *Rhizobium*, nos quais foi observada a atividade das enzimas nitrila hidratase e amidase (KOBAYASHI et al., 1995).

Diversas bactérias produtoras de AIA relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal tais como *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas stutzeri* entre outras tem sido descritas na literatura e ocorrem em associação com plantas (COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995; PATTEN e GLICK, 2002c; LATA et al., 2006). A presença de auxinas determina o aumento do comprimento da raiz e do número de pelos e raízes laterais (alterações morfológicas), sendo conhecida por estimular tanto respostas rápidas (aumento do alongamento celular) como respostas lentas (divisão e diferenciação celular) nas planta (TAIZ e ZEIGER, 2006). Dada a importância das bactérias sintetizadoras de AIA, tem-se buscado isolados capazes de produzir este hormônio, visando uma possível aplicação das bactérias em diversas culturas. Estudos têm revelado grande variabilidade entre as estirpes quanto à capacidade de produzir grandes quantidades de auxinas em condições gnotobióticas. Estas estirpes quando inoculadas em plantas promovem o aumento do crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (ASGHAR et al., 2002; KHALIQ et al., 2004).

O mais importante fitormônio produzido por *Azospirillum* é a auxina ácido 3-indolacético (AIA) conforme descrito por Dobbelaere et al. (2003). As alterações radiculares detectadas em plantas inoculadas com *Azospirillum* podem explicar a melhor absorção de minerais pela planta. Apesar da grande produção de AIA em culturas puras, não se conhece ainda como ocorre o processo no interior das plantas ou na região rizosférica (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Muitas estirpes de *Azospirillum* são encontradas no interior das raízes de *Poaceae* e o crescimento verificado nestas pode ser devido à produção e excreção de auxinas (LODEWYCKX et al., 2002).

A produção de auxinas por rizobactérias é uma característica generalizada, os efeitos das bactérias produtoras de AIA na planta têm sido difíceis de avaliar. A geração de bactérias

mutantes quanto à produção de AIA, e o uso de plantas mutantes resistentes às auxinas, confirmaram o papel destas na interação planta-microorganismo. Apesar de as bactérias produtoras de AIA alterarem o alongamento e arquitetura da raiz, não está claro se seus efeitos no crescimento da parte aérea são por causa da sinalização direta de longa distância do AIA, ou efeitos indiretos na captação de água e nutrientes pela alteração da raiz. Outras investigações são necessárias sobre o papel da degradação do AIA na rizosfera por bactérias como um mecanismo potencial de interação planta-microorganismo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estirpes

Neste trabalho foram utilizadas 49 estirpes da coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia (CNPAB, RJ, Brasil), previamente isoladas e parcialmente identificadas em trabalhos anteriores como *Herbaspirillum* spp e *Azospirillum* spp (Tabela 1). As estirpes foram isoladas de plantas de arroz cultivadas em solos coletados nos estados de Rio de Janeiro, Maranhão e Goiás.

Tabela 1. Origem das estirpes utilizadas neste trabalho.

Identificação BR	Identificação comum	Solo	Parte da Planta	Referencia
BR11962	H64	RJ (CNPAB)	Colmo	BRASIL
BR12051	H2	RJ (CNPAB)	Raiz	, 2005
BR12054	H7	RJ (CNPAB)	Colmo	
BR12058	H14	RJ (CNPAB)	Colmo	
BR12059	H15	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12061	H17	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12062	H18	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12064	H21	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12068	H29	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12070	H33	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12072	H37	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12073	H38	RJ (CNPAB)	Colmo	
BR12074	H39	RJ (CNPAB)	Colmo	
BR12075	H52	RJ (CNPAB)	Colmo	
BR12076	H53	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12077	H54	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12078	H56	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12082	H61	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12083	H62	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12084	H63	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12091	H49	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12092	H13	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12096	H27	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12146	H51	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12143	H4	RJ (CNPAB)	Raiz	
BR12146	H51	RJ (CNPAB)	Folha	
BR12147	H57	RJ (CNPAB)	Folha	
BR11760	ZA3	Goiás	Raiz	RODRIGUES
BR11761	ZA5	Goiás	Parte aérea	, 2003
BR11762	ZA6	RJ	Raiz	
BR11763	ZA7	RJ	Parte aérea	

BR11764	ZA8	RJ	Parte aérea	
BR11768	ZA11	RJ	Raiz	
BR11770	ZA13	RJ	Parte aérea	
BR11772	ZA15	RJ	Raiz	
BR11774	ZA18	Goiás	Raiz	
BR11787	ZA155	Goiás	Raiz	
-	AR1121	Arari, MA	Raiz	ARAUJO
-	AR1122	Arari, MA	Raiz	, 2008
-	AR1124	Arari, MA	Raiz	
-	AR1125	Arari, MA	Raiz	
-	AR114	Arari, MA	Raiz	
-	AR215	Arari, MA	Raiz	
-	VF227	Vitoria do Mearim, MA	Parte aérea	
-	VR2236	Vitoria do Mearim, MA	Parte aérea	
-	VR1139	Arari, MA	Raiz	
-	AR2141	Arari, MA	Raiz	
-	VR2111	Vitoria do Mearim, MA	Raiz	
-	AR2117	Vitoria do Mearim, MA	Raiz	

- Estirpes sem código BR.

As estirpes foram reativadas em meio de cultura DYGS líquido sob agitação de 150 rpm por 24 horas a 30°C, e riscadas em meio sólido batata para a observação de sua morfologia típica e pureza. Posteriormente as estirpes foram cultivadas em meios de cultura semi-sólidos JNFB, NFB e LGI, semi-específicos, para os gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Azospirillum amazonense*, respectivamente. Os frascos foram incubados a temperatura de 30°C para a verificação da formação da película, característica das bactérias diazotróficas, segundo descrito por Döbereiner et al. (1995).

3.2. Seleção de estirpes solubilizadoras de fosfatos inorgânicos

3.2.1. Seleção do meio de cultura sólido e avaliação de solubilização de fosfatos em meio de cultura sólido

Primeiramente foram realizados ajustes metodológicos para a padronização do meio a ser utilizado nos ensaios *in vitro*. Para tal, foi utilizado um desenho experimental inteiramente casualizado com 4 repetições, tendo como tratamentos 25 bactérias isoladas de arroz e as estirpes padrões *Azospirillum brasilense* SP7 (BR11001), *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 (BR11335), *Herbaspirillum frisingense* GSF30 (BR11790), *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417), *Azospirillum lipoferum* SP59 (BR11080), a estirpe *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (BR11281), utilizada como controle positivo. Os meios de cultivo testados foram: NBRIP (National Botanical Research Institute) (NAUTIYAL, 1999), SMRS₁ (SUNDARAO-RAO e SINHA, 1963), GL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), GL (pH ajustado para 5,5), o meio NFB e o meio NFB modificado com glicose como fonte de carbono. Em todos os meios foi adicionado o

indicador púrpura de bromocresol (0,1%), a fim de melhorar a visualização do halo formado pela solubilização de fosfato. Os meios de cultura foram autoclavados e em seguida 10 ml de K_2HPO_4 (10%) e 20 ml de $CaCl_2$ (10%) foram acrescentados a 200 ml de cada meio, com a formação do precipitado de $CaHPO_4$ pouco solúvel. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições.

Uma colônia característica de cada estirpe de interesse foi cultivada em meio líquido DYGS (RODRIGUEZ, 1986) sob agitação a 150 rpm a 30°C por 48 horas para *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 e 24 horas para as bactérias restantes. Posteriormente, a concentração celular foi ajustada para a D.O.₆₀₀=0,9-1 com solução salina e 20µl foram inoculados em placas de Petri contendo os meios de cultura. As placas contendo as culturas inoculadas ficaram abertas em capela de fluxo laminar por 15 minutos a temperatura ambiente do laboratório em torno de 25°C. O halo de solubilização foi medido diariamente até 15 dias após a inoculação. O critério de comparação usado foi o índice de solubilização (IS) descrito por Kumar e Narula (1999):

$$IS=A/B$$

Onde: A= Diâmetro total (Diâmetro da colônia + diâmetro do halo) e B= Diâmetro da colônia.

Em seguida foi testada a capacidade de solubilizar PI das 49 estirpes e o controle positivo *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 no qual estudos prévios já havia comprovados o fenótipo (MAHESHKUMAR et al., 1999). Utilizou-se o meio GL modificado (pH 5,5) selecionado anteriormente por favorecer a seleção de um maior número de estirpes e o meio definido NBRIP com pH de 7 e com $(NH_4)_2SO_4$ como única fonte de N. Foram complementados com 0,5% de $Ca_3(PO_4)_2$. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições.

As estirpes foram inoculadas em meio DYGS líquido com pH de 6,8 por 48 horas, a temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm. Posteriormente as células foram lavadas com água destilada e sua D.O.₆₀₀ foi ajustada a 0,9-1. Em seguida foi inoculada uma alíquota de 20µl, em forma de gota, na superfície dos meios sólidos GL modificado e NBRIP. As placas contendo as culturas inoculadas permaneceram abertas por 15 minutos a temperatura ambiente e depois foram incubadas a 30°C por 15 dias. Após este período, a capacidade em solubilização de PI foi avaliada por meio da formação de halos.

3.2.2. Determinação de fósforo disponível em meio de cultura líquido

Neste experimento foram usadas as estirpes AR1121, AR1122, AR1125, AR114, VR2236, previamente selecionadas por sua capacidade de formar halo nos meios sólidos GL e NBRIP e as estirpes ZA15 e H18 pela capacidade de formar halo nos meios sólidos GL. Além destas, *G. diazotrophicus* PAL5 foi utilizada como controle positivo de bactérias diazotróficas solubilizadoras de PI. As bactérias foram multiplicadas em tubos contendo meio de cultura DYGS por 24 horas a 30°C sob agitação de 150 rpm; em seguida as células foram lavadas com solução salina e sua D.O.₆₀₀ foi ajustada a 0,9 – 1. A seguir 5 ml foram inoculadas em erlenmeyers de 250 ml contendo 45 ml do meio NBRIP com 0,05 % de $Ca_3(PO_4)_2$ como fonte de P. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições.

A quantificação do fosfato solúvel foi feita utilizando-se a técnica de azul de fosfomolibdeno de acordo com Chen et al. (2006). As análises foram realizadas empregando o kit SPECTROQUANT® FÓSFORO (PMB) MERCK em culturas com 2, 5, 8, 11 e 14 dias de idade. As alíquotas (1 ml) foram centrifugadas a 2039 g por 5 minutos. Em um tubo de vidro, foram adicionados 2,25 ml de água Milli-Q, 0,25 ml do sobrenadante, 75 µl do reagente 1 (íons molibdato em solução sulfúrica) e 50 mg do

reagente 2 (ácido ascórbico). Depois de 5 minutos do início da reação foram feitas leituras da absorbância no espectrofotômetro SP 2000 Bel Photonics em comprimento de onda de 712 nm. As leituras foram normatizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida a partir de concentrações conhecidas de H_2PO_4 . A determinação do pH no meio de cultura foi feita durante todo o período para verificar a variação do mesmo. A contagem da população bacteriana foi feita pela técnica de microgota (SPENCER e RAGOUT, 2001). Foi retirado 1 ml de cada erlenmeyer e diluído seriadamente em tubos com 9 ml de solução salina até a diluição 10^{-7} . Em seguida, 4 gotas (20 μ l cada) dos 4 tubos mais diluídos foram aplicados em placas de Petri contendo os meios JMV, JNFB, LGI-P para as estirpes dos gêneros *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, respectivamente. As placas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas. Paralelamente foi conduzido um experimento de solubilização em Placas com o Meio NBRIP sólido contendo $Ca_3(PO_4)_2$ para determinar o IS no meio, segundo o descrito no item 3,2,1.

3.3. Análise de outras características de promoção de crescimento vegetal

3.3.1. Atividade de redução de acetileno (ARA)

As bactérias solubilizadoras de PI, selecionadas anteriormente, foram avaliadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio através da atividade de redução de acetileno (ARA). Além destes, *Azospirillum brasilense* SP7 e *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 foram utilizadas como controles positivo. Uma alíquota de 20 μ l da cultura bacteriana foi transferida para frascos de 10 ml contendo 5 ml dos meios semi-sólidos sem indicador JNFB, JMV e NFb, semi-seletivos para *Herbaspirillum* sp, *Burkholderia* sp e *Azospirillum* sp, respectivamente. Estes frascos foram incubados por 48 a 72 horas a 30°C até que a formação de película característica de bactérias diazotróficas foi observada. Os frascos foram fechados com rolhas de borracha esterilizada e injetados 10% de sua fase gasosa com gás acetileno seguido de incubação por 1 hora a 30°C. Posteriormente, 0,5 ml da fase gasosa foi retirada do frasco e injetado no cromatografo de gás com ionização de chama, Perkin Elmer modelo F11, utilizando uma coluna Poropak N de 50 cm a 40°C para a leitura do etileno formado (VIDEIRA, 2008).

Para a determinação de proteína foi utilizada a metodologia descrita por Bradford et al. (1976) e modificada por Guimarães, 2010. Em seguida, para a determinação da ARA, as películas foram misturadas com o meio de cultura e retirada uma alíquota de 20 μ l de amostra, 30 μ l de água destilada estéril e 50 μ l de NaOH 1M, logo foram colocadas em banho Maria a 100 °C, por 5 minutos para favorecer a ruptura celular. Posteriormente, foram adicionados 900 μ l do reagente de Bradford, em seguida os tubos foram agitados no vortex e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente e após incubação foi feita a leitura de absorbância a 595 nm utilizando o espectrofotômetro (Labsystems iEMS Reader MF). Como controle foram utilizadas as mesmas amostras de meio de cultivo. As leituras foram normatizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de soro-albumina bovina (BSA).

3.3.2. Avaliação da produção de Auxinas

As estirpes selecionadas foram testadas quanto à capacidade de produzir compostos indólicos. A quantificação dos compostos indólicos foi feita conforme o método desenvolvido por Gordon e Weber (1950) com modificação (RODRIGUES, 2008). Uma colônia característica de cada estirpe foi cultivada em meio líquido DYGS sob agitação a 150 rpm por 24 a 30°C até atingir D.O.600=0,9-1. Posteriormente, 1 μ l de cultura

bacteriana foi inoculada em 6 ml de meio DYGS suplementado com L-triptofano na concentração final de $200\mu\text{g ml}^{-1}$. Os tubos foram mantidos no escuro sob agitação de 150 rpm em uma temperatura de 30°C e foram realizadas medições após o crescimento das culturas pelo período de 24, 48 e 72 horas. Para cada avaliação, alíquotas de 1 ml foram centrifugadas a 2039 g por 15 minutos. Em microplacas, $150\mu\text{l}$ do sobrenadante foi misturado a $100\mu\text{l}$ do reagente de Salkowski, sendo as mesmas incubadas no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período foram realizadas leituras utilizando-se espectrofotômetro (Labsystems iEMS Reader MF) e os dados de absorbância foram processados pelo programa Ascent Software for iEMS Reader MF. As estirpes *Azospirillum brasilense* SP7 e *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 foram utilizados como controles positivos. As leituras foram normatizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de ácido 3-indol-acético.

3.4. Caracterização molecular das estirpes:

a) Extração do DNA

A extração do DNA total foi realizada com auxílio do kit para extração de DNA genômico WIZARD Genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, USA). O DNA extraído foi analisado segundo Sambrook e Russell (2001) e quantificado em gel de agarose 1%. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo ($10\mu\text{g.ml}^{-1}$), descorado em água destilada por 30 minutos e, em seguida, fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®).

b) Amplificação do gene 16S RNAr

Para a amplificação do gene 16S RNAr foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os iniciadores 27f e 1492R descritos por Osborne et al. (2005) (Tabela 3). Cada reação de amplificação teve um volume final de $50\mu\text{l}$ e foi composta de 50 ng de DNA genômico; tampão 1X; Tween 20 %; 3 mM de MgCl_2 ; 200 mM de cada dNTP; 2 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e $10\mu\text{M}$ de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). Os ciclos de amplificação constituíram de uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 58°C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final de 35 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos.

c) Amplificação do gene *nifH*.

Para a amplificação do fragmento referente ao gene *nifH*, foi utilizada a combinação de iniciadores descritos por Poly et al. (2001) (Tabela 2). Na reação de PCR com volume final de $50\mu\text{l}$, foram utilizados 50 ng de DNA bacteriano; tampão de reação 1X; 3 mM MgCl_2 ; 200 mM de cada dNTP; $1,5\text{ U}$ de Taq DNA polimerase (Fermentas) e $1\mu\text{M}$ de cada iniciador. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research) com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a temperatura de 56°C por 45 s e extensão a 72°C por 45 s, e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene *nifH* e respectivas Sequências de nucleotídeos.

Iniciador	Sequência 5'→3'	Referência
Pol F	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	POLY et al., 2001
Pol R	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	

Ao final da reação, os produtos dos genes 16S RNAr e *nifH* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% segundo Sambrook e Russell (2001). Foram submetidos 5 µl de cada amostra, juntamente com 2 µl de tampão da amostra e submetidos a uma voltagem de 90 volts por 1 hora em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg ml⁻¹) e visualizado sob a luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®) para avaliação do produto amplificado com relação ao sucesso da reação, tamanho e concentração.

d) Purificação do produto da amplificação

Para a purificação dos fragmentos amplificados 32 µl de produto de PCR foi misturado a 0,1 volume de acetato de sódio (CH₃COONa) 3M (pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol 99,8% gelado. A mistura foi incubada a 20° C durante a noite. Posteriormente a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 15996 g a 4 °C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 300 µl de etanol 70% gelado e a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 15996 g a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi mantido a temperatura ambiente até secar completamente, sendo posteriormente ressuscitado em 20 µl de H₂O para PCR (SAMBROOK et al., 1989)

e) Sequenciamento dos fragmentos

O Sequenciamento do gene 16S RNAr das estirpes foi realizado pelo Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia. Para o sequenciamento do gene 16S RNAr foram utilizados os iniciadores relacionados na Tabela 3 e para o *nifH* foram usados os primers descritos na tabela 2. Para a reação de sequenciamento foi utilizado 200 ng dos produtos de PCR purificados, 1 µl de cada iniciador 5,0 µM, 4,0 µl do kit “TE Dynamics Kit”(GE Healthcare) e água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen Co.) para o volume final de 10 µl. As condições para a reação de sequenciamento foram: 25 ciclos de desnaturação anelamento e extensão de 95 °C por 25 seg., 58 °C por 15 seg.; 60 °C por 1 min, respectivamente. Após a reação de marcação, as amostras foram precipitadas adicionando 1,0 µl de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µl de etanol e foram incubadas a 4 °C por uma noite, após a incubação foram centrifugadas a 3220 g por 45 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100 µl de etanol 70% e novamente centrifugado 3220 g por 10 minutos a 4 °C. As amostras foram secas ao ar, e ressuscitadas em 7,5 µl de tampão de sequenciamento para Mega BACE (“loading”) e analisadas em sequenciador automático MegaBACE1000 (GE Healthcare). As Sequências contíguas foram montadas a partir das Sequências diretas e reversas utilizando-se os programas PHRED/PHRAP (EWING et al., 1998; EWING e GREEN, 1998) ou CAP3/CONSED (GORDON et al., 1998; HUANG e MADAN, 1999) em ambiente Linux pelo setor de bioinformática da Embrapa Agrobiologia.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para sequenciamento do gene 16S RNAr das estirpes.

Iniciador	Sequência (5'→3')	Referência
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	OSBORNE et al., 2005
1492R	GGY TAC CTT GTT ACGA CTT	OSBORNE et al., 2005
362F	CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTT GGG	MENNA et al., 2006
786F	CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA GG	MENNA et al., 2006
RU6	ATG GCT GTC GTC AGC TCG	WANG et al., 1996
U3	GWA TTA CCG CGG CKG CTG	WANG et al., 1996
U2	TGC TGC CTC CCG TAG GAG	WANG et al., 1996
1110R	TTA GCA AGT AAG GAT ATG GGT	CHO et al., 2006

f) Análise de similaridade e filogenia

A pesquisa por similaridade foi realizada pelo programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com as Sequências contíguas possuindo em média 1500 pares de base para o gene 16S RNAr e 360 pares de base para o gene *nifH*. O programa MegaBLAST (ZHANG et al., 2000), cuja comparação se dá pela pesquisa contra o banco de dados de nucleotídeos NCBI, foi utilizado para fazer as comparações. Para a construção da árvore filogenética, as Sequências foram alinhadas usando o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A árvore foi construída usando o método *Neighbor-Joining* baseada na comparação de aproximadamente 1400 pb (SAITOU e NEI, 1987). O método de *bootstrap* com 1000 repetições foi usado para avaliar a topologia da árvore filogenética (FELSENSTEIN, 1985). A distância evolucionária foi computada usando o método *Kimura 2-parameter* (KIMURA, 1980) e a análise filogenética foi conduzida no programa MEGA5.

3.5. Experimento de inoculação em casa de vegetação com estirpes selecionadas

a) Estirpes e preparo do inoculante.

Foram utilizadas as estirpes selecionadas pelas características de solubilizar P *in vitro*, produção de AIA e redução de acetileno: *H. seropedicae* H18, *H. seropedicae* ZA15 e *B. vietnamiensis* AR114. Além das estirpes de referência *H. seropedicae* ZAE94, *G. diazotrophicus* PAL5 e *A. chroochoccum* AC1. As estirpes foram reativadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio DYGS, a 30° C sob agitação a 150 rpm por 48 horas para *G. diazotrophicus* e 24 horas para as demais estirpes. Em seguida foram semeadas em placas com meio semi-específico, NFb 3x para as pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, LGI-P para *G. diazotrophicus* PAL5 (DÖBEREINER et al., 1995) e ASHBY para *A. chroochoccum* AC1 (BONILLA et al., 2000). Após a verificação da pureza, as estirpes foram multiplicadas em tubos contendo meio DYGS nas condições citadas anteriormente. As células foram lavadas com solução salina e a D.O.₆₀₀ foi ajustada para 0,9-1. 5 ml foi inoculado em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio DYGS a 30° C sob agitação a 150 rpm por 48 horas para *G. diazotrophicus* PAL5 e 24 horas para o restante das estirpes. O número de células viáveis foi determinado pelo método de microplaca, no respectivo meio para cada bactéria (SPENCER e RAGOUT, 2001), segundo o descrito no

item 3.2.2. 15 ml do caldo bacteriano foram adicionados em sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa para produzir o inoculante utilizado. Este foi homogeneizado e incubado a 30°C por um período de 24 horas (fase de maturação).

b) Caracterização do material turfoso utilizado, solo e cultivar de arroz utilizado

A análise da turfa utilizada como veículo de inoculação apresentou as seguintes características: pH 3,4 (em H₂O), teores de Al 8,5 (cmolc/dm³), Ca 7,1 (cmolc/dm³), Mg 6,9 (cmolc/dm³), P 22 (mg/dm³), K 47 (mg/dm³) e Matéria Orgânica (MO) de 72 (g de MO. kg⁻¹ de massa seca). Neste estudo foi usada a cultivar de arroz IR42, que tem um alto potencial para a fixação biológica de nitrogênio (OLIVEIRA, 1994; KUNDU e LADHA, 1995). A terra utilizada oriunda do Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia foi coletada nos primeiros 20 cm do horizonte A de um Argissolo Vermelho Amarelo, Série Itaguaí. A partir da análise química do solo (Tabela 4), o pH, foi corrigido com 3,75 g Kg⁻¹ (7,50 Kg ha⁻¹) de calcário agrícola dolomítico. 100 mg de P Kg⁻¹ (200 Kg ha⁻¹) na forma de fosfato super simples e PTC. Como fonte de micronutrientes foi aplicado FTE-BR12 na quantidade de 0,3 g kg⁻¹ (0,6 Kg ha⁻¹) de solo. A adubação nitrogenada foi parcelada três vezes aplicando-se 15 mg de N kg⁻¹ no plantio, 15 mg kg⁻¹ no estágio vegetativo e 30 mg kg⁻¹ na floração na forma de sulfato de amônio, utilizando em total 60 mg de N Kg⁻¹ (120 Kg ha⁻¹). Para o tratamento completo (Alto N) foi aplicado 30 mg kg⁻¹ no plantio 35 mg kg⁻¹ no estágio vegetativo e 70 mg kg⁻¹ na floração, utilizando em total 135 mg de N Kg⁻¹ (270 Kg ha⁻¹).

Tabela 4. Análise química da terra utilizada no experimento.

pH em H ₂ O	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	N	M.O.
	cmol _c dm ⁻³				mg dm ⁻³		%	
5,10	0,00	2,30	1,50	0,70	*	31,00	0,12	1,69

*Resultado abaixo de 5 mg dm⁻³

c) Preparo e controle de qualidade do inoculante utilizado.

As sementes de arroz foram umidecidas com água estéril e misturadas com a turfa numa proporção de 250 g de inoculante para cada 20 kg de sementes de arroz (FERREIRA, 2004). Em seguida as sementes inoculadas foram colocadas para secar à sombra. Para a preparação do inoculante com a mistura das seis estirpes foram tomados 20 g de cada inoculante e misturados uniformemente para depois ser utilizado. Foi realizada a contagem do número mais provável das células dos inoculantes e da população aderida às sementes de acordo com (DÖBEREINER et al., 1995), excetuando-se o inoculante e as sementes inoculadas com a estirpe AC1 de *A. chroococcum* onde se utilizou a técnica de contagem em microgota no meio ASHBY sólido segundo Spencer e Ragout 2001.

d) Plantio e delineamento experimental

O experimento foi realizado em 22 de outubro de 2010 e instalado em vasos com capacidade para 6 kg e contendo 4 kg de solo não estéril. O plantio foi feito com 4 sementes por vaso, sendo feito desbaste deixando-se 2 plantas/vaso realizada aos 25 dias após o plantio (DAP). Os vasos foram inundados aos 30 dias sendo mantida uma lâmina de água de 2 cm sempre na mesma altura durante a realização do experimento. O experimento

foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ e o delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições, em arranjo fatorial 9 x 2 com 9 manejos diferentes (Tabela 5), 2 fontes de P (fosfato tricálcico e super fosfato simples) e 2 épocas de coleta (Estádio vegetativo e maturação de grãos), totalizando 160 vasos.

Tabela 5. Tratamentos utilizados no experimento em casa de vegetação.

Número	Tratamentos
1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> H18
2	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZA15
3	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZAE94
4	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> AR114
5	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5
6	<i>Azotobacter chroococcum</i> AC1
7	Mistura das estirpes
8	Não inoculado (60 mg de N Kg ⁻¹ de solo)
9	Alto N (135 mg de N Kg ⁻¹ de solo)

e) Determinações

Estimativa do número mais provável (NMP)

Foi utilizada a técnica do NMP de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995). A contagem foi feita em duas épocas, no período vegetativo (60 DAP) e no florescimento (90 DAP). Foram trituradas 5 g de raiz lavada no liquidificador, na presença de 45 ml de água destilada estéril e em seguida foram diluídos seriadamente até 10⁻⁶. Logo após, 100µl das 4 mais diluídas foram colocados em frascos com 5 ml dos meios LGI-P, JMV, e JNFB. A contagem foi feita de 7-10 dias de incubação.

Acúmulo de biomassa e nutrientes

A colheita do material vegetal foi feita em duas épocas, no período vegetativo (60 DAP) e maturação do grão (120 DAP). Os parâmetros agrônômicos analisados foram matéria seca, teores de N e P, a relação massa seca raiz/parte aérea, produção de massa seca dos grãos, peso de 1000 espiguetas e o índice de colheita. Adicionalmente na primeira colheita foi analisado o número de perfis por planta e comprimento das plantas enquanto que na segunda colheita foi analisado o número de panículas por planta. O índice de colheita foi obtido pela relação entre a massa seca dos grãos e a parte aérea.

Para a quantificação do teor de nitrogênio, foi seguida a metodologia proposta por Silva e Queiroz (2002), pelo método de Kjeldahl. Nos mesmos extratos mineralizados, foram determinados os teores de P, pelo método colorimétrico vanadato-molibdato (TEDESCO et al., 1995). Os acúmulos de N, P foram obtidos pelo produto entre a massa seca e os teores dos nutrientes em cada parte do vegetal.

Análise estatística dos dados

Foi testada a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet) dos dados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983). Logo, foram feitas análises de variância usando o programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003) e

comparação de médias pelo teste Scott-Knott (SCOTT e KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de PI

4.1.1. Seleção do meio de cultura e avaliação de solubilização de fosfatos em meio sólido

Nenhuma das estirpes proporcionou formação de halo no meio NFB modificado - suplementado com 0,5% de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fonte de P (Tabela 6). Este resultado indica que o ácido málico não é uma boa fonte de carbono para selecionar microrganismos solubilizadores de PI, conforme as condições utilizadas no experimento. Resultado semelhante foi obtido por Alikhani et al. (2006) que utilizou manitol como fonte de carbono para a seleção de rizóbios e concluiu que o uso de manitol não é apropriado para observar a atividade de solubilização de P orgânico e inorgânico nas estirpes avaliadas. Nos demais meios foi empregada a glicose como fonte de carbono. Segundo Silva Filho e Vidor (2000), o fator que tem maior efeito sobre a solubilização de fosfatos em meios sólidos é a fonte de carbono utilizada, e geralmente os maiores halos de solubilização são obtidos com a glicose.

As estirpes AR114 e *G. diazotrophicus* PAL5 (controle positivo) formaram halo em torno da colônia nos meios em placa LG, LG (pH:5,5), NBRIP, SRSM1 e NFB modificado quando avaliados 8 dias após a incubação a 30°C, o que indica sua capacidade de solubilizar fosfato em diferentes condições. A estirpe AR1121 proporcionou formação de halo nos meios sólidos NBRIP, NFB modificado e GL (pH 5,8) enquanto que a estirpe AR1122 formou halo nos meios anteriores e o meio GL (Figura 2).

O maior índice de solubilização foi observado no meio NFB modificado pela estirpe AR114 seguida de *G. diazotrophicus* PAL5 no meio GL (pH: 5,5) (Tabela 6). No meio GL e NFB modificado, 16 dentre as 25 estirpes cresceram, mas não formaram halo de solubilização, semelhante à estirpe padrão *H. seropedicae* HRC 54 conforme mostrada na figura 2. Resultados semelhantes foram obtidos por Nautiyal (1999) que comparou os halos formados em placas de meios NBRIP e Pikovskaya por oito bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Entre as bactérias testadas, *P. aerogenes* não produziu halo nos meios testados, enquanto *Pseudomonas* sp. 1 não produziu halo nas placas do meio Pikovskaya.

A estirpe H18 previamente caracterizada como *Herbaspirillum* sp apresentou formação de halo apenas no meio GL com o pH ajustado para 5,5 (Figura 2 e Tabela 6). Este resultado mostra que o meio GL modificado permite observar a atividade de solubilização de fosfato em placa para um maior número de estirpes diazotróficas, incluindo estirpes que ainda não se havia observado este fenótipo, como por exemplo, *Herbaspirillum* sp.

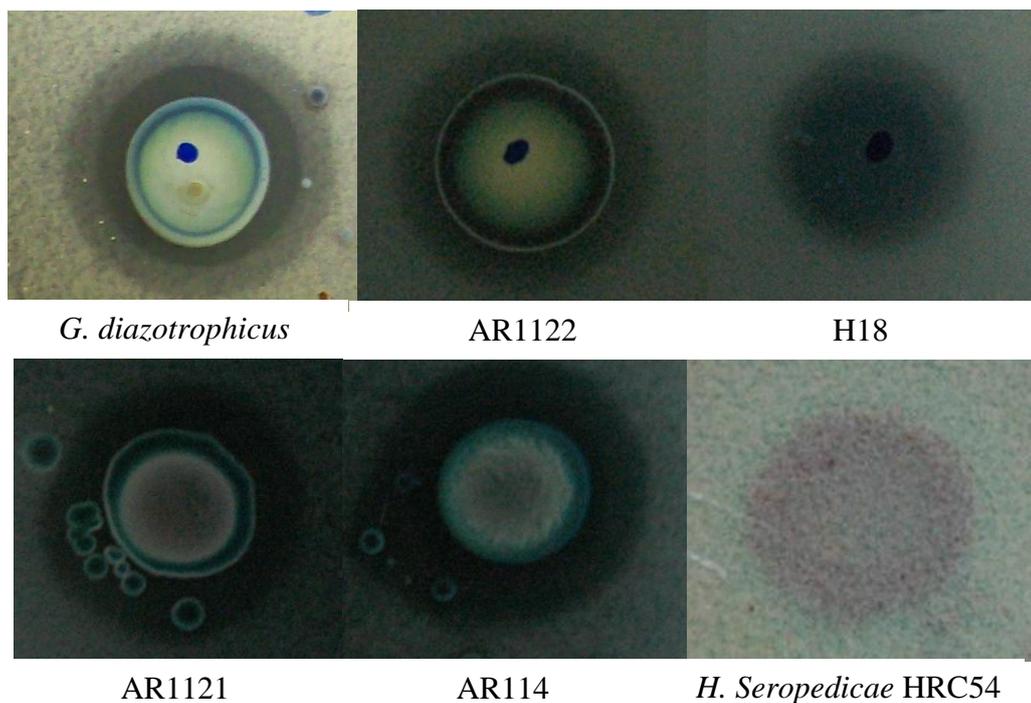


Figura 2. Formação do halo de solubilização de fósforo inorgânico no meio GL (pH:5,5) pelas estirpes isoladas de plantas de arroz, crescidas por 8 dias.

Tabela 6. Índice de solubilização (IS) das estirpes com capacidade de solubilizar fósforo inorgânico e da estirpe tipo *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 nos diferentes meios de cultura, após 8 dias de crescimento.

Meio de cultivo	Estirpes				
	AR1121	AR1122	H18	PAL5	AR114
NFB	-	-	-	-	-
NFB glicose	1,50 ± 0,18	2,18 ± 0,32	-	2,08 ± 0,18	3,16 ± 0,14
SRSM1	-	-	-	1,38 ± 0,16	1,29 ± 0,20
GL (pH 5,8)	-	1,53 ± 0,06	-	2,92 ± 0,43	1,71 ± 0,05
GL (pH 5,5)	1,34 ± 0,07	1,84 ± 0,32	1,67 ± 0,18	2,07 ± 0,08	1,72 ± 0,1
NBRIP	1,40 ± 0,08	1,52 ± 0,08	-	1,61 ± 0,14	1,30 ± 0,13

- Não houve formação de halo

Os resultados do experimento de seleção de estirpes com capacidade de solubilizar PI nos meios sólidos NBRIP e GL (pH:5,5) mostraram que as estirpes H18 e ZA15 solubilizaram PI no meio GL, mas não no meio NBRIP. As estirpes AR1121, AR1122, AR1125, AR114, VR2236 e o controle *G. diazotrophicus* PAL5 apresentaram atividade nos meios GL e NBRIP. Por outro lado, as estirpes restantes apresentaram crescimento sem a formação de halo, indicativo de sua incapacidade em solubilizar fosfatos nas condições do experimento (Figura 2).

Das 49 estirpes estudadas, 14% solubilizaram PI no meio GL e 10% no meio NBRIP. Alikhani et al. (2006) testaram 446 estirpes de rizóbios quanto à sua capacidade em mobilizar PI, dos quais 44% formaram halo no meio basal Sperber suplementado com fosfato tricálcico. Já Antoun et al. (1998) testaram 266 cepas de rizóbios obtidas de

laboratórios da Austrália, Colômbia, Egito e América do Norte e constataram que 144 (54%) solubilizaram fosfato bicálcico em meio sólido Goldstein suplementado com vitaminas.

A variação nos resultados pode ser explicada pela fonte de N dos meios, o meio GL contém levedura como fonte de N e o meio NBRIP contém $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de N. Trabalhos realizados por Nautiyal (1999) mostraram que a presença de extrato de levedura no meio Pikovskaya não favoreceu a solubilização do fosfato pela estirpe *Pseudomonas* sp2. Entretanto, quando usou KNO_3 como única fonte de nitrogênio, os autores verificaram a diminuição da solubilização em 27,1% quando comparado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. No entanto, Halder e Chakrabartty (1993) observaram que a atividade de solubilização de PI de algumas estirpes do gênero *Rhizobium* foi maior em um meio sem NH_4 , mas, contendo $0,4 \text{ g l}^{-1}$ de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

4.1.2. Quantificação da solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP

Foi realizada a quantificação de P liberado em meio líquido NBRIP nas 7 estirpes que apresentaram formação de halo nos meios sólidos NBRIP e GL com pH de 5,5 juntamente com a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5 usada como controle positivo. Não foi empregado o meio GL (pH: 5,5) por apresentar uma grande quantidade de P solúvel no meio após esterilização provavelmente por apresentar um decréscimo do pH inicial de 5,5 para 4,6. Já o pH no meio NBRIP diminuiu de 7,0 para 6,4.

Os resultados mostram que todas as estirpes avaliadas solubilizaram PI e acidificaram o meio líquido NBRIP (Figura 4). As estirpes pertencentes ao gênero *Burkholderia* e a estirpe PAL5 apresentaram seu pico máximo de solubilização no quinto dia após o crescimento. A estirpe que solubilizou maior quantidade de fosfato no quinto dia foi *G. diazotrophicus* PAL5 com $239,2 \text{ mg.l}^{-1}$, seguida pelas estirpes do gênero *Burkholderia* AR114, AR1125, VR2236, AR1121 e AR1122 com 229,7; 225,9; 205,9; 204,7; $189,8 \text{ mg.l}^{-1}$, respectivamente. Após o quinto dia, todas as estirpes apresentaram um decréscimo na quantidade de P no meio.

A estirpe *G. diazotrophicus* PAL5 apresentou uma alta relação entre o pH e a solubilização de PI. No quinto dia houve maior solubilização de PI já que o pH diminuiu de 6,4 para 4,3 porém foi observado um maior número de células (Figura 3). É provável que no estágio exponencial ocorra um intenso metabolismo aeróbico com o consumo da glicose pela ação da enzima GDH-PQQ produzindo o ácido glucônico, resultando assim em uma redução do pH e desta forma sugerindo ser este o principal mecanismo de solubilização de PI desta estirpe. Estudos realizados por Intorne et al. (2009) com mutantes de *G. diazotrophicus* defectivos na solubilização de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ e Zn em placas mostraram que o principal mecanismo envolvido na solubilização de P é a produção de ácido glucônico via oxidação direta da glicose pela GDH-PQQ. Resultados similares foram obtidos por Crespo et al. (2011) com *G. diazotrophicus* PAL5 que utilizaram o meio NBRIP suplementado com hidroxiapatita como única fonte de P. Os autores mostraram aumento do fósforo solúvel com o aumento do ácido glucônico e a diminuição do pH no meio até 80 horas após a inoculação. Este estudo também corroborou como o principal mecanismo de solubilização a produção de ácido glucônico via PQQ-GDH. Uma alcalinização do meio foi observado após o quinto dia, possivelmente pela degradação do ácido glucônico e ocasionando uma reprecipitação do P e uma diminuição da população (Figura 3). O ácido glucônico é uma importante fonte de carbono para a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5 (STEPHAN et al., 1991). Crespo et al. (2011) determinaram que para o crescimento celular *G. diazotrophicus* PAL5 emprega de $10\text{-}15 \text{ mg.l}^{-1}$ de fósforo, descartando a possibilidade da diminuição na concentração de P por autoconsumo.

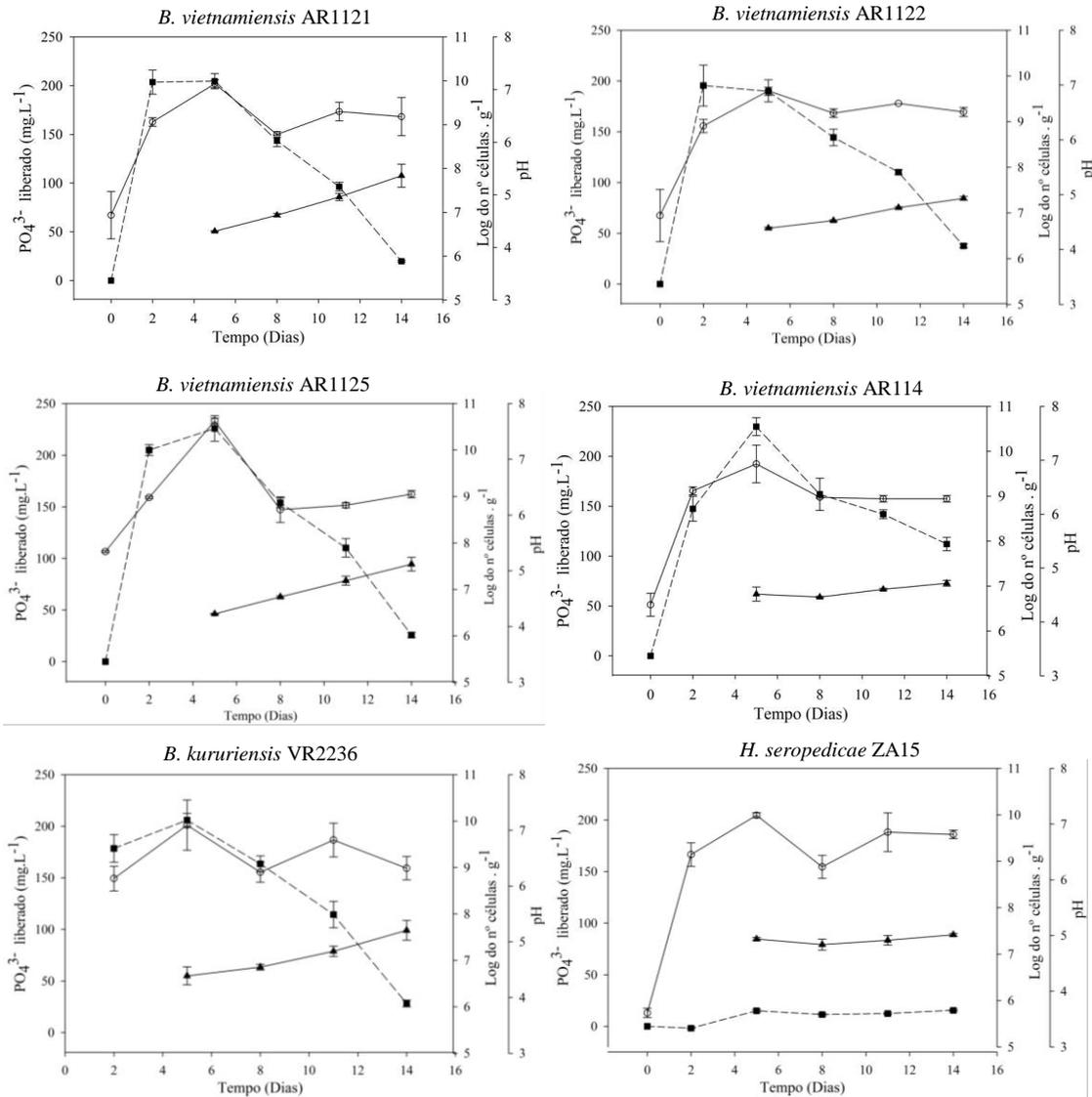
As estirpes AR1121, AR1122, AR1125, caracterizadas como *Burkholderia vietnamiensis* e a estirpe VR2236 caracterizada como *Burkholderia kururiensis* tiveram um comportamento similar no decorrer do experimento (Figura 3). Até o quinto dia as estirpes liberam fosfato no meio, ao mesmo tempo em que se observa uma redução significativa no pH do meio de cultura, sugerindo que a secreção de ácidos orgânicos pelas bactérias é um dos mecanismos para solubilizar o fosfato tricálcico no meio. Resultados similares foram observados por Park et al. (2010) utilizando a estirpe *Burkholderia vietnamiensis* M6, que solubilizou diferentes fontes de fosfato. A concentração de ácido glucônico e ácido 2-cetoglucônico no meio de cultura aumentou com a idade da cultura, atingindo o máximo em 30 h quando houve uma maior acidificação no meio de cultura. A quebra também por ácido glucônico e 2-cetoglucônico foi descrita por Park et al. (2010) como um dos mecanismos de solubilização por *B. vietnamiensis*. Estudos com a estirpe *Burkholderia cepacia* CC-A174 demonstraram que o principal mecanismo de solubilização de PI é a acidificação (liberação de prótons) pela produção do ácido glucônico (LIN et al., 2006).

A partir do sexto dia até o final do experimento foi observado uma redução na concentração de fosfato no meio de 90, 80, 84, 52 e 87% para as estirpes AR1121, AR1122, AR1125, AR114 e VR2236, respectivamente. A diminuição da concentração de fosfato a partir do quinto dia pode ser explicada pelo aumento do pH, possivelmente pela degradação dos ácidos orgânicos produzidos previamente, levando a um aumento no pH (Figura 4). Lin et al. (2006) observaram maior solubilização no quinto dia com *Burkholderia cepacia* CC-A174, e logo uma diminuição na quantidade de fosfato solúvel. O autor afirmou que a diminuição na quantidade de fosfato pode estar relacionada com a ligação do fosfato aos metais (Fe, Ca, Mn, Mg, K) presentes no meio líquido resultando assim em formas insolúveis. A estirpe *Burkholderia vietnamiensis* AR114 apresentou uma maior eficiência de solubilização de PTC após 14 dias, provavelmente porque manteve seu pH baixo durante o período do experimento. Resultados diferentes foram mostrados por Alikhani et al. (2006) que, observaram que o P solúvel liberado pelas estirpes *Mesorhizobium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizobium leguminosarum* crescidas em meio Sperber, aumentou de forma significativa ($P < 0,05$) durante o período de avaliação de 15 dias.

As estirpes ZA15 (*Herbaspirillum* sp.) e a estirpe H18 (*Herbaspirillum seropedicae*) apresentaram crescimento similar com acidificação do meio e solubilização de fosfato (Figura 3). A capacidade de solubilização foi menor quando comparada com as outras estirpes. A partir do quinto dia a quantidade de P solúvel no meio se manteve estável, atingindo uma concentração de 15, 47 e 17,03 mg.l⁻¹ no dia 14 (Figura 4). O pH diminuiu no quinto dia porém foi mantido entre 4,8 e 5 até o final do experimento. A população foi superior a 10⁹ UFC ml⁻¹ no dia 14, indicando que inicialmente ocorreu uma rápida multiplicação e a partir do segundo dia se manteve em fase estacionária.

A menor solubilização de fosfato observada com as estirpes ZA15 e H18 pode ser explicada por uma menor produção de ácidos e, portanto menor diminuição do pH. Outra possibilidade seria a já exposta por Rodriguez et al. (2000) com *Azospirillum brasilense* e que se refere ao auto-consumo do fosfato solúvel para o crescimento e manutenção de uma alta população bacteriana. Assim, uma maior quantidade de fosfato foi provavelmente solubilizada durante a fase exponencial e logo utilizada para manutenção celular. Baixas quantidades de fosfato também já foram quantificadas por Rodriguez et al. (2004) em *A. brasilense* e *A. lipoferum*, o mesmo autor quantificou ácido glucônico no meio de cultura e o associou como um possível mecanismo de solubilização de Ca₃(PO₄)₂. Este é o primeiro resultado sobre a solubilização de P em *Herbaspirillum* spp o qual evidencia que este pode ser outro mecanismo envolvido na promoção de crescimento nas relações rizosféricas da bactéria com a planta.

As estirpes do gênero *Herbaspirillum* não formaram halo em placas do meio NBRIP (Figura 4), entretanto apresentaram capacidade de dissolver PI na forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em meio líquido NBRIP. O método de solubilização em placa produziu resultados contraditórios em relação ao método de solubilização em meio líquido, sugerindo que a seleção de cepas por meio da metodologia em placa pode subestimar a quantidade de estirpes com capacidade de solubilizar P. No entanto, Rodriguez e Fraga (1999) recomendam o uso desta metodologia para o isolamento e caracterização preliminar de bactérias solubilizadoras de PI. Não foi encontrada relação entre o I.S. e a quantidade de P solubilizado pelas estirpes em meio líquido, sendo esta apenas uma análise qualitativa da capacidade de solubilizar PI (Tabela 7).



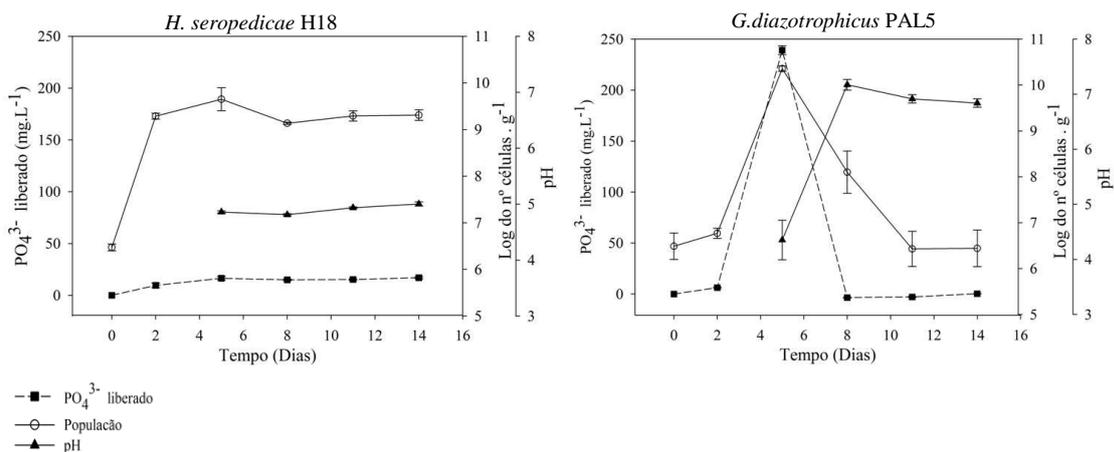


Figura 3. Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ associado com a alteração de pH e a população bacteriana pelas diferentes estirpes durante 14 dias de crescimento das culturas. O pH inicial foi de 6,4. As barras indicam o erro padrão de três repetições.

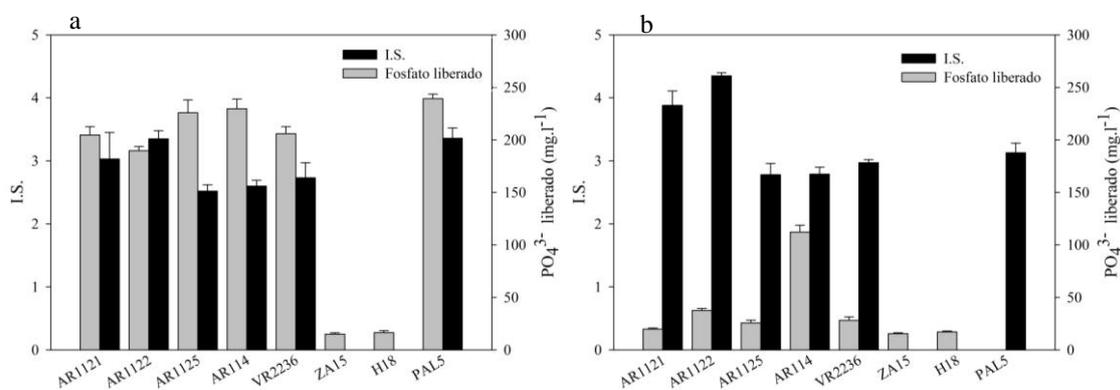


Figura 4. Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em meio sólido (I.S) e em meio líquido (fosfato liberado) NBRIP analisados aos 5 dias (Figura 1a) e aos 14 dias (figura 1b) após inoculação. As barras indicam o erro padrão de três repetições.

Os valores do coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 7) apresentaram uma associação fraca positiva e significativa entre a população bacteriana e a solubilização de P, indicando que um maior número de células aumenta a quantidade de P solubilizado. A solubilização de PI e a população bacteriana mostraram uma relação moderada negativa e significativa com o pH no meio líquido NBRIP. Desta forma, podemos inferir que o pH influencia a solubilização de Pi e a população bacteriana.

Tabela 7. Coeficientes de correlação obtidos dos tratamentos utilizados no experimento.

Correlação de Pearson			
	pH	População bacteriana	Solubilização de P
pH	-	-0.761 **	-0.667**
População Bacteriana	-	-	-0.416**
Índice de Solubilização	-	-	-,343

** Significativo ao $p < 0.01$ (n=40)

Na natureza existe uma grande variação no tipo e quantidade dos açúcares presentes nos exsudatos radiculares das plantas. Os açúcares mais frequentes e abundantes detectados em raízes de plantas de arroz são a glicose, arabinose, galactose, manose e ácido glucurônico (BACILO-JIMENEZ et al., 2003). Estes aspectos sugerem que a capacidade da estirpe de solubilizar PI na presença de diferentes fontes de carbono presentes nos exsudatos devem ser usados como critério de seleção de estirpes para inoculação de arroz.

É conhecido que a capacidade tampão dos solos pode limitar a capacidade de solubilizar P dos microorganismos rizosféricos (WHITELAW, 2000). Outro fato que deve ser considerado em futuros trabalhos é o emprego de tampões como o EDTA no meio de cultura líquido para reproduzir melhor as condições do solo e desta forma obter microorganismos com maior potencial de solubilização de P.

4.2. Análise de outras características promotoras de crescimento vegetal

4.2.1. Atividade de redução de acetileno (ARA)

Todas as estirpes apresentaram a capacidade de reduzir o acetileno a etileno (Figura 5). Os resultados mostraram que houve grande variabilidade na quantidade de etileno produzido pelas diferentes estirpes, apresentando valores entre 4,2 e 43,7 nmol de etileno por mg de proteína total. Rodrigues (2003) também encontraram grande variabilidade na atividade da nitrogenase entre estirpes do gênero *Herbaspirillum* obtidos de arroz. Trabalhos desenvolvidos por Perin (2007) com estirpes do gênero *Burkholderia* isoladas de cana de açúcar e Videira (2008) com estirpes do gênero *Sphingomonas* isoladas de arroz também apresentaram uma alta variabilidade na atividade da nitrogenase entre estirpes. A bactéria que apresentou a maior atividade de redução de acetileno foi *Azospirillum brasilense* SP7, usada como controle, seguida pelas estirpes *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e *Herbaspirillum seropedicae* H18. As estirpes que apresentaram a menor ARA foram a AR1122 e AR1121.

A redução de acetileno é usada para estimar indiretamente a capacidade do complexo nitrogenase para realizar a redução de nitrogênio molecular a duas moléculas de amônia, isto, porque o acetileno tem uma estrutura semelhante ao nitrogênio molecular, em particular no número de ligações entre os átomos C e N das moléculas, respectivamente (LEIGH, 2002). A fixação de nitrogênio tem sido amplamente divulgada por seu importante papel no aumento da disponibilidade de nitrogênio para absorção pelas plantas (SEVILLA e KENNEDY, 2000). Isto porque, em alguns solos este elemento é limitante para alcançar ou manter uma alta produtividade, pois o conteúdo de N é muitas vezes limitante para o crescimento das plantas, adicionado a isto é sabido que a adubação química agravou os problemas de poluição que atualmente vão contra as novas tendências da agricultura sustentável (DI e CAMERON, 2002). Os resultados obtidos em laboratório evidenciaram que a estirpe H18 e em menor grau a estirpe ZA15 podem ser possíveis alternativas para serem utilizadas em inoculantes, pois mostraram uma maior capacidade em reduzir o nitrogênio atmosférico. No entanto, estes resultados devem ser corroborados com estudos em condições de campo onde a fixação de nitrogênio pode ser alterada por uma ampla gama de fatores bióticos e abióticos (COCKING, 2002).

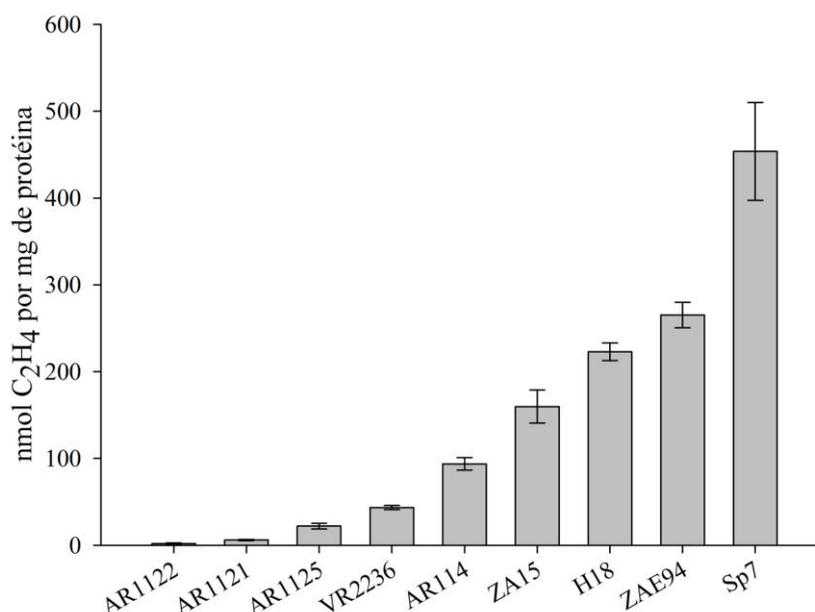


Figura 5. Atividade da nitrogenase (ARA) das estirpes diazotróficas solubilizadoras de P e estirpes padrões utilizadas. Como controle: *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e *Azospirillum brasilense* SP7. Média de três repetições.

4.2.2. Avaliação das estirpes selecionadas quanto à produção de Auxinas

Os resultados mostraram que todas as estirpes possuem a capacidade de produzir compostos indólicos. As estirpes AR114, ZA15 e H18 apresentaram produção máxima de compostos indólicos após 48h de cultivo (Figura 6). Entretanto, as estirpes produziram uma quantidade menor de índoles após 72 h de cultivo quando comparados às estirpes padrões utilizadas como controle positivo.

Às 48 h a estirpe H18 mostrou-se a melhor com uma produção de aproximadamente 25 mg/ml de índoles, seguido pelas estirpes ZA15 e ZAE94. No entanto, as estirpes ZA15 e H18 apresentaram uma diminuição significativa na concentração dos compostos indólicos após 72 h de incubação. O restante das estirpes apresentaram um aumento na síntese de auxinas diretamente associados com os tempos de incubação. As auxinas, em particular o ácido indol acético pode chegar a intermediar a proliferação de raízes, com o conseqüente aumento da capacidade para extrair tanto água quanto nutrientes do solo (YUWONO et al. 2005). A maioria das bactérias associadas à raiz que mostram um efeito benéfico sobre as plantas tem demonstrado serem capazes de produzir ácido-3-indolacético (AIA), e sua inoculação sobre diferentes cultivos tem resultado em um incremento no crescimento da raiz e/ou no aumento na formação de raízes laterais e pelos radiculares (PATTEN e GLICK, 2002b; RAJKUMAR et al., 2005). Deve-se destacar que a síntese de auxinas nas plantas ocorre na parte aérea, são transportadas basipetalmente e se dirigem até as extremidades das raízes, de modo que o efeito bacteriano resulta ser direto sobre o desenvolvimento da planta (MARTIN e ELLIOTT, 1984). No entanto, a disponibilidade de intermediários para a síntese de AIA, provenientes dos exsudatos radiculares da planta, especialmente L-triptofano, geralmente é limitante para a promoção devido a este fitohormônio (DIMKPA et al., 2009). Em algumas ocasiões uma alta concentração de AIA nas raízes poderia gerar uma inibição em seu desenvolvimento, devido à relação que este tipo de composto pode exercer direta ou indiretamente sobre a síntese de etileno (GLICK et al., 2007; ELIASSON et al., 1989). Este experimento

permitiu evidenciar um efeito de diminuição no conteúdo de compostos indólicos entre o segundo e terceiro dia de incubação. Este efeito já havia sido observado em estudos anteriores, que demonstraram que certos organismos podem ser capazes de degradar o AIA (LEVEAU e GERARDS, 2008).

Além disso, alguns trabalhos evidenciam que outros hormônios vegetais podem ser clivados pela atividade microbiana chegando a ter um efeito positivo sobre o desenvolvimento da planta, mesmo em presença de estresses abióticos (DODD et al., 2010). Desta forma, as estirpes ZA15, H18 e AR114 mostraram uma redução equivalente a 90, 45 e 13% no terceiro dia em relação ao dia anterior. Apesar de poucas pesquisas focadas neste tema, acredita-se que no solo esta atividade, pode ter um importante papel na interação entre os microorganismos e a planta (PII et al., 2007; SPAEPEN et al., 2007). Tem se sugerido que i) as bactérias produtoras e degradadoras de índoles podem interagir na rizosfera para estabelecer uma concentração específica de AIA no exterior e no interior da planta, ou ii) a planta poderia regular a composição da comunidade rizosférica através da secreção de AIA na rizosfera (DODD et al., 2010). Adicionalmente, o efeito evidenciado neste estudo onde a mesma bactéria produziu e degradou índoles já foi reportado por Egebo et al. (1991) e Leveau e Lindow (2005).

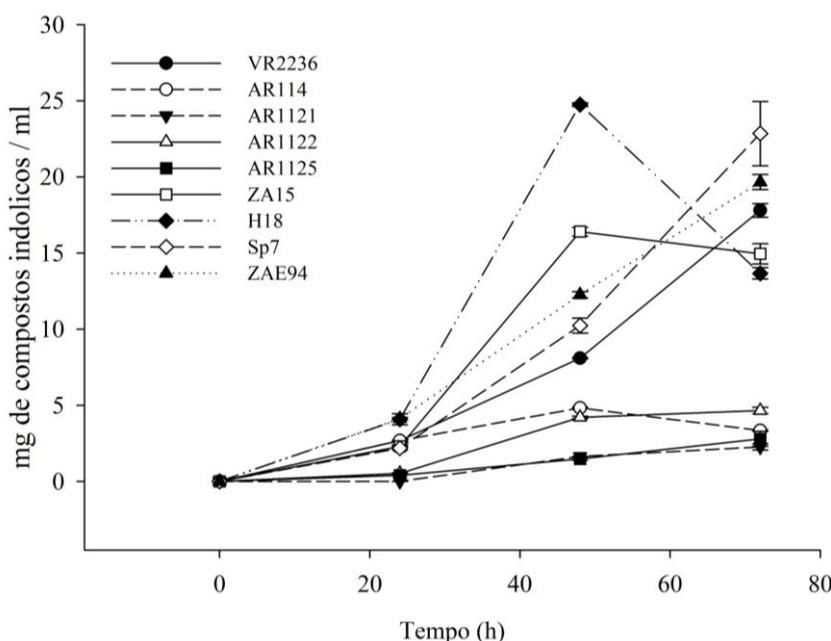


Figura 6. Produção de compostos indólicos em diferentes estágios de cultivo (24, 48 e 72 / horas) em meio DYGS suplementado com $200\mu\text{g ml}^{-1}$ de triptofano, estirpes padrões utilizadas. Como controle: *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e *Azospirillum brasilense* SP7. Média de 3 repetições.

4.3. Caracterização molecular das estirpes

a) Análise do gene 16S RNAr

A combinação dos iniciadores 27F/1492R permitiram amplificar um fragmento de tamanho esperado, ou seja, de aproximadamente 1500 pb de todas as 8 estirpes que apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato (Figura 7).

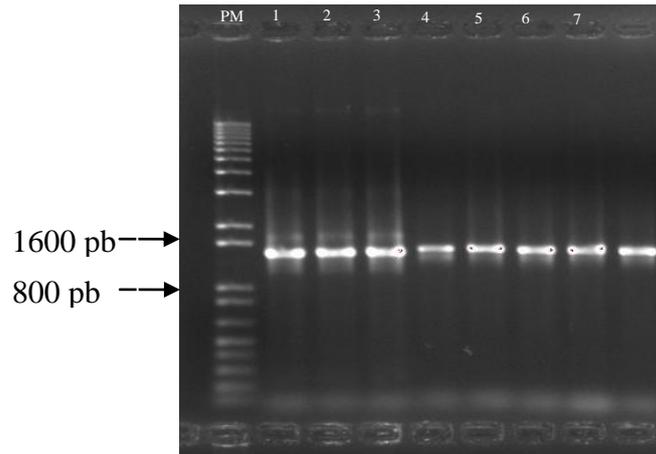


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de amplificação do gene 16S RNAr utilizando os iniciadores 27f e 1492R. Linhas PM: marcador de peso molecular 1 kb ladder (Invitrogen®); 1: H18; 2: ZA15; 3: AR1121; 4: AR1122; 5: AR1125; 6: AR114; 7: VR2236.

As Sequências obtidas a partir do produto de PCR foram submetidas às análises comparativas no banco de dados do NCBI, usando a ferramenta BLAST, para que pudessem ser identificadas e classificadas (Tabela 8). Todas as estirpes apresentaram um alto índice de similaridade, variando entre 98 e 100%, com Sequências depositadas no banco de dados. As estirpes solubilizadoras de fosfato AR1125, AR114, AR1121 e AR1122 apresentaram elevado grau de similaridade com Sequências do gene 16S RNAr de *Burkholderia vietnamiensis* enquanto que a estirpe VR2236 apresentou alta similaridade com *Burkholderia kururiensis* (KP23), a estirpe ZA15 com *Herbaspirillum* sp e a estirpe H18 com *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94).

Tabela 8. Resultado da análise de similaridade entre sequências do gene 16s RNAr das estirpes testadas utilizando BLAST.

Estirpe	Numero de acesso	Descrição	Similaridade
ZA15	AB049133.1	<i>Herbaspirillum</i> sp.	99%
H18	NR_029329.1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	99%
VR2236	NR_024721.1	<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23	99%
AR1125	CP000614.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	99%
AR114	EF114409.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	98%
AR1122	CP000614.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	100%
AR1121	CP000614.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	99%

Baseado na análise de filogenia do gene 16S RNAr foi observado que as estirpes AR1125, AR1121 e AR1122 apresentam grande similaridade com *B. vietnamiensis* formando um grupo distinto enquanto que a estirpe AR114 possui uma menor similaridade e formou um ramo separado. A estirpe VR2236 apresentou maior similaridade com a estirpe padrão *B. kururiensis* e forma um grupo junto com as espécies *B. tropica* e *B. silvatlantica*. A estirpe H18 apresenta uma maior similaridade que a ZA15 com a estirpe tipo Z67 de *H. seropedicae*, confirmando os dados do blast (Figura 8). Ambas formaram um grupo distinto contendo as espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

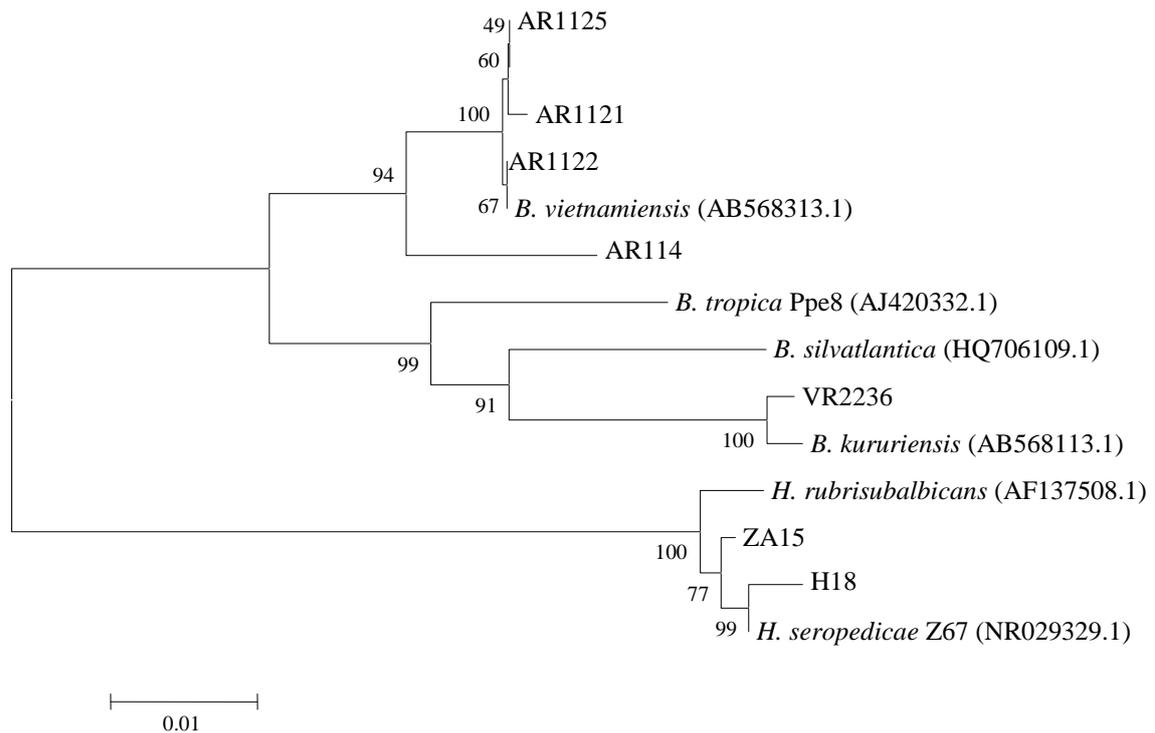


Figura 8. Árvore filogenética baseada nas Sequências parciais do gene 16S RNAr, incluindo as Sequências das estirpes solubilizadores de PI e outras proteobactérias fixadoras de nitrogênio. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Os números entre parênteses indicam a Sequência de acesso do banco de dados NCBI.

b) Análise do gene *nifH*

Todos as estirpes amplificaram o fragmento referente ao gene *nifH* (que codifica para a Fe-proteína da nitrogenase), com tamanho esperado de aproximadamente 360 pb (Figura 9). Este resultado mostra que as estirpes possuem a enzima nitrogenase, sendo, portanto potenciais diazotróficos.

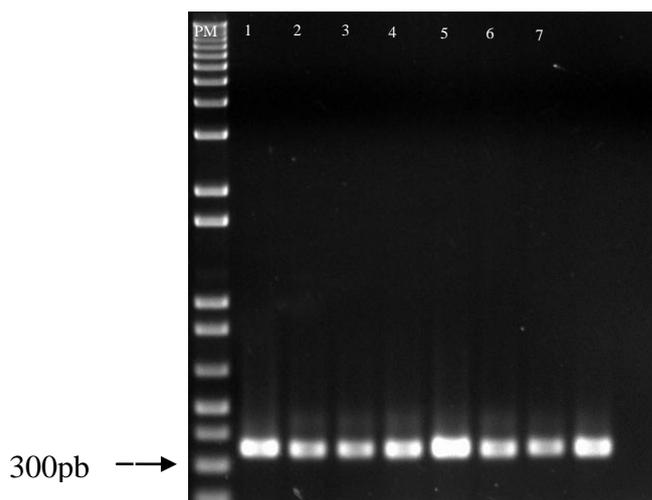


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose (1%) do produto de amplificação do gene *nifH* utilizando os iniciadores PolR e PolF. Linhas PM: marcador de peso molecular 1 kb ladder (Invitrogen®); 1: H18; 2: ZA15; 3: AR1121; 4:AR1122; 5: AR1125; 6: AR114; 7:VR2236.

As Sequências obtidas foram submetidas às análises comparativas no banco de dados do NCBI, usando a ferramenta BLAST (Tabela 9). Todas as estirpes apresentaram um alto índice de similaridade, variando entre 94 e 100%, com Sequências de diazotróficos depositadas no banco de dados. As estirpes solubilizadoras de fosfato AR1125, AR114, AR1121, e AR1122 apresentaram elevado grau de similaridade com Sequências do gene 16S rRNA de *Burkholderia vietnamiensis* (G4); a estirpe VR2236 com *Burkholderia kururiensis* (KP23) enquanto que as estirpes ZA15 e H18 apresentaram alta similaridade com *Herbaspirillum* sp (Tabela 8).

Tabela 9. Resultado da análise de similaridade entre sequencias do gene *nifH* das estirpes testadas utilizando BLAST.

Estirpe	Numero de acesso	Descrição	Similaridade
ZA15	AB196476.1	<i>Herbaspirillum</i> sp.	98%
H18	AB196476.1	<i>Herbaspirillum</i> sp.	97%
VR2236	AY098590.1	<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23	98%
AR1125	EF158392.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> JC4	99%
AR114	EF158392.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> JC5	94%
AR1122	EF158392.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	99%
AR1121	EF158392.1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	100%

A análise da árvore filogenética do gene *nifH* foi altamente consistente com a filogenia do gene 16S RNAr. Baseado na análise de filogenia do *nifH* as estirpes AR1121 e AR1122 possuem uma alta similaridade com a *B. vietnamiensis* similar à análise do gene 16S RNAr. A estirpe VR2236 formou um grupo separado com uma alta similaridade com *B. kururiensis* KP23. As estirpes H18 e ZA15 apresentaram maior similaridade com a *H. seropedicae* e mais distante da espécies *H. rubrisubalbicans*, confirmando os dados do BLAST (Figura 10).

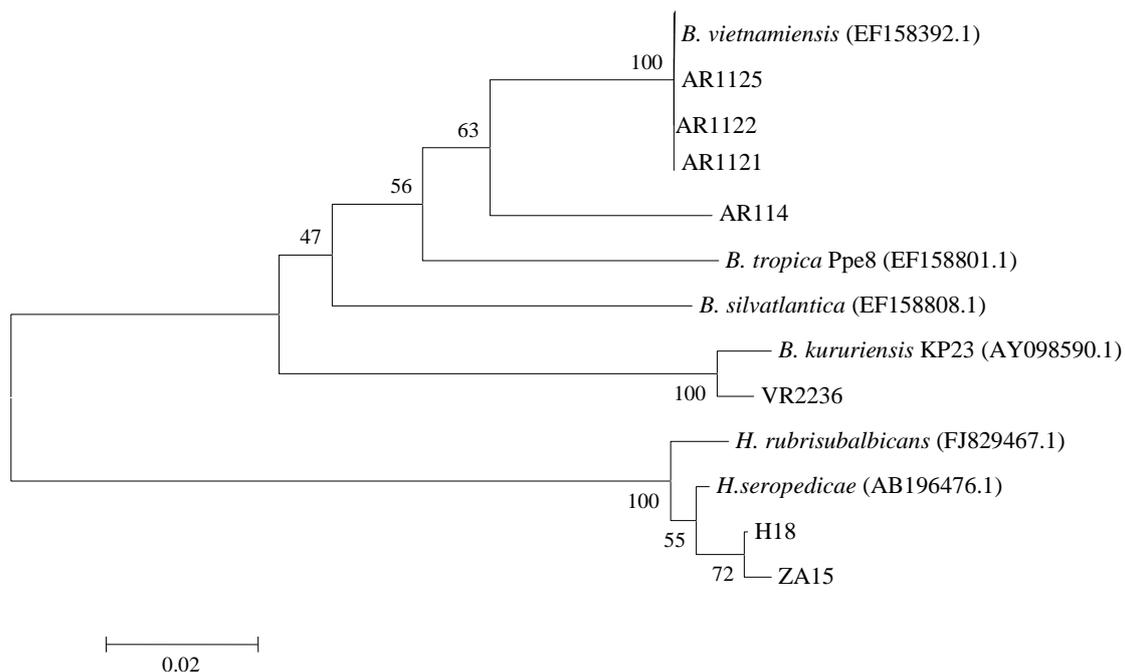


Figura 10. Árvore filogenética baseada nas Sequências parciais do gene *nifH*, incluindo as Sequências das estirpes solubilizadoras de PI e outras proteobactérias fixadoras de nitrogênio. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Os números entre parênteses indicam a Sequência de acesso do banco de dados NCBI.

A comparação da filogenia de *nifH* com genes 16S rRNA de microrganismos conhecidos, onde ambas as Sequências são avaliadas, permite examinar a existência de transferência lateral do gene *nifH* (SULLIVAN et al., 1995). Observando as filogenias de 16S rRNA e *nifH* das estirpes estudadas, não se percebe evidências que podem ser explicadas pela hipótese de transferência lateral de genes, visto que as árvores filogenéticas obtidas para o gene 16S rRNA e *nifH* estão relacionadas e seus dados estão bem congruentes entre si.

4.4. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato e diferentes fontes de fósforo no desenvolvimento de plantas de arroz cultivadas em vasos.

A população de bactérias diazotróficas presentes na terra utilizada como substrato para a implantação do experimento variou de acordo com o meio de cultivo utilizado para a contagem (Tabela 10). Pode-se verificar que a maior população bacteriana foi recuperada em meio ASBHY, semi-específico para *Azotobacter* spp. e outros diazotróficos de vida livre. O meio de cultivo utilizado JMV, semi-seletivo para bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* spp., apresentou valores populacionais similares ao ASBHY enquanto que a população nos meios LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e JNFb (*Herbaspirillum* spp.) foram menores, mas semelhantes entre si.

A diversidade de bactérias no solo é enorme, um grama de solo pode conter de 10^3 a 10^6 células de uma única espécie de bactéria (GANS et al., 2005; TRINGE et al., 2005).

A população de microorganismos, especialmente bactérias, é maior na rizosfera do que no solo, a população bacteriana na rizosfera é 100-1000 vezes superior à do solo, e até 15% da superfície da raiz é coberta por micro-colônias de diversas espécies bacterianas (GRAY e SMITH, 2005). O efeito da rizosfera é devido ao fato de que uma quantidade de carbono fixado pela planta como fotossintatos (5-21%) é excretada na rizosfera principalmente nos exsudatos da raiz e podem ser utilizados como nutrientes pelas populações bacterianas (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009).

Tabela 10. Contagem de bactérias diazotróficas presentes na terra utilizada como substrato.

Solo	Log do nº células g ⁻¹ de solo			
	JNFB	JMV	LGI-P	ASBHY
Sem N	< 3,00	4,98	< 3,00	5,43
60 mg de N Kg ⁻¹	< 3,00	4,98	< 3,00	6,22
135 mg de N Kg ⁻¹	< 3,00	5,65	< 3,00	5,43

A contagem do número de células viáveis presentes nos inoculantes mostrou uma população acima de 10⁸ g⁻¹ e a ausência de contaminantes (Tabela 11). Alguns trabalhos realizados na Embrapa Agrobiologia, com o intuito de selecionar o veículo de inoculação utilizando as estirpes *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. mostraram que o número de células viáveis se mantém acima de 10⁸ g⁻¹ por um período de até 180 dias após a produção (FERREIRA et al., 2003; FERREIRA, 2004; FERREIRA et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2003; ESTRADA et al., 2009). Bashan (1998) recomenda que a população no inoculante seja superior a 10⁸ células g⁻¹ para se obter uma inoculação bem sucedida. Por outro lado, a contagem do número de células presentes nas sementes peletizadas mostrou uma população ao redor de 10⁶ células g⁻¹ na semente. É importante introduzir no solo um número suficiente de células para garantir uma população com a capacidade de competir com os microorganismos nativos e sobreviver às condições adversas no solo (HUNGRIA et al., 2005).

Tabela 11. Contagem realizada nos diferentes inoculantes produzidos e nas sementes inoculadas com as estirpes *B. vietnamiensis* AR114, *H. seropedicae* ZA15, *H. seropedicae* H18, *H. seropedicae* ZAE94, *A. chroochoccum* AC1 e a mistura das estirpes, utilizadas no experimento em vasos em casa de vegetação.

Tratamentos	Meios de cultura	Log do n° células g ⁻¹	
		Inoculante	Semente inoculada
ZA15	JNFB*	9,65	6,30
H18	JNFB	9,65	5,95
ZAE94	JNFB	9,04	5,00
PAL5	LGI-P	8,40	6,18
AR114	JMV	10,04	8,04
AC1	ASHBY	10,24	8,43
Mistura	JNFB	9,04	6,48
	JMV	8,15	8,04
	LGI P	8,15	6,30
	ASHBY	8,91	7,37

*meio JNFB (semi seletivo para *Herbaspirillum* spp.), LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter* spp.), JMV (semi seletivo para *Burkholderia* spp.), ASHBY (semi seletivo para *Azotobacter* spp.).

A análise sobre o número de bactérias diazotróficas presentes nas raízes lavadas, avaliadas durante o estágio de desenvolvimento vegetativo e floração, mostrou a presença de bactérias diazotróficas em todos os tratamentos inoculados assim como nos tratamentos controle (não inoculados) (Tabela 12). Porém, não houve diferença significativa entre a população de bactérias dos tratamentos inoculados e não inoculados. Em todos os tratamentos e épocas de coleta se verificaram concentrações de bactérias diazotróficas maiores que 10⁵ UFC g⁻¹. Punschke et al. (2005), encontraram resultados similares quando quantificaram bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz cultivadas no Uruguai, onde 69% das amostras de raízes apresentaram concentrações maiores que 10⁵ UFC g⁻¹. Por outro lado, Sabino (2007) não encontrou diferença no número de células entre os tratamentos inoculados com *B. brasilense* e *H. seropedicae* e os não inoculados em plantas de arroz avaliadas nos estádios de florescimento e maturação de grãos.

Dentre os microorganismos com capacidade de fixar nitrogênio existem diferentes procariontes, como arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Dentro da microbiota do solo, particularmente na rizosfera, está uma grande parte das bactérias diazotróficas (POLY et al., 2001; WAKELIN et al., 2009). Baldani (1996) sugere que em sistemas com solo, o controle não inoculado possui populações nativas de bactérias diazotróficas que alcançam o mesmo número que as inoculadas. Estes resultados mostram que as populações submetidas às mesmas condições tendem a estabilizar-se no solo. No entanto a presença de bactérias diazotróficas não necessariamente significa que a planta se beneficie da FBN ou outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

Não foi observada diferença acentuada na população de bactérias diazotróficas entre as épocas de coleta para as raízes lavadas da cultivar IR-42 sob as condições testadas (Tabela 12). Observou-se da mesma forma que as fontes de fósforo empregadas também

não proporcionaram diferença nos estádios avaliados. Sampaio (2009) também não encontrou uma tendência definida a respeito do comportamento das estirpes *H. seropedicae* ZAE94, *S. azotifigens* e *S. trueperi* testadas durante o ciclo da cultivar de arroz BRS Talento. Experimentos de inoculação de arroz com e sem adubação nitrogenada mostraram que o número de bactérias diminuiu com a idade da planta, atingindo o equilíbrio no estágio de maturação, o que corresponde à fase final do ciclo da cultura (BALDANI, 1996; GUIMARÃES, 2001; FERREIRA, 2004). Os resultados da contagem não são conclusivos já que os meios semi-seletivos mostram somente uma aproximação da população com capacidade de desenvolver-se nas condições do meio utilizado. É necessário o emprego de técnicas de biologia molecular como o DGGE para detectar a presença dos microorganismos inoculados.

Tabela 12. Estimativa do número mais provável (Log do nº células g⁻¹) de bactérias diazotróficas presentes nas raízes de plantas de arroz, cultivar IR42, inoculadas com as estirpes *B. vietnamiensis* AR114, *H. seropedicae* ZA15, *H. seropedicae* H18, *H. seropedicae* ZAE94, *A. chroochoocum* AC1 e a mistura das estirpes. Coletadas nas fases de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e floração (90 DAP).

Tratamento	Meio de Cultura ^{***}	Vegetativo		Floração	
		PTC [*]	PSS [*]	PTC [*]	PSS [*]
Não inoculado	JNFB	6.40 ± 0.00 ^{**}	6.86 ± 0.19	6,46 ± 0,50	5,65 ± 0,00
	JMV	5.48 ± 0.73	6.00 ± 0.90	6,53 ± 0,13	6,62 ± 0,43
	LGI-P	5.44 ± 0.24	5.36 ± 0.34	5,61 ± 0,43	5,35 ± 0,69
H18	JNFB	6.57 ± 0.15	6.14 ± 0.65	6,36 ± 0,86	5,59 ± 0,33
ZA15	JNFB	6.61 ± 0.55	6.82 ± 0.28	5,92 ± 0,50	5,90 ± 0,66
ZAE94	JNFB	6.45 ± 0.35	6.32 ± 0.13	4,81 ± 0,36	6,56 ± 0,54
AR114	JMV	6.29 ± 0.32	5.99 ± 0.58	6,41 ± 0,24	7,04 ± 0,00
PAL5	LGI-P	5,96 ± 0,58	5,95 ± 0,51	>6,15	>7,15
Mistura	JNFB	6.80 ± 0.30	6.42 ± 0.54	6,35 ± 0,72	5,92 ± 0,50
	JMV	5.49 ± 0.73	6.12 ± 0.50	>7,15	>7,15
	LGI-P	6.69 ± 0.58	5.78 ± 1.07	>6,15	>6,15
Alto N	JNFB	6.40 ± 0.00	6.86 ± 0.19	>7,15	5,33 ± 0,32
	JMV	5.48 ± 0.73	6.00 ± 0.90	>7,15	6,51 ± 0,53
	LGI-P	5.44 ± 0.24	5.36 ± 0.34	>6,15	6,03 ± 0,37

* PTC (fosfato tricálcico), PSS (super fosfato simples)

** Média ± desvio padrão (n=3)

*** Meio JNFB (semi seletivo para *Herbaspirillum* spp.), LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter* spp.) e JMV (semi seletivo para *Burkholderia* spp.).

Não foram observadas diferenças significativas na altura da parte aérea de plantas inoculadas com as bactérias diazotróficas solubilizadoras de P e o tratamento não inoculado durante a avaliação do estágio de desenvolvimento vegetativo (Tabela 13). Didonet et al. (2003) inocularam dez linhagens de arroz de Terras Altas com *A. brasilense* e *A. lipoferum* e observaram que algumas linhagens não responderam à inoculação em relação ao aumento da altura enquanto que, em uma dessas linhagens a inoculação com *A. brasilense* o efeito foi negativo. Experimentos de inoculação conduzidos por Valazco e Castro (1999) mostraram que a inoculação de arroz com *A. brasilense*, crescido em casa de

vegetação, aumentou a altura das plantas até a fase de iniciação das panículas, porém o efeito desapareceu no final do ciclo da cultura.

A análise do número de perfilhos mostrou que a inoculação com a estirpe ZA15 foi significativamente superior ao tratamento não inoculado e não diferiu da testemunha nitrogenada quando as plantas foram crescidas em solo utilizando PSS como fonte de P (Tabela 13, Figura 11). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle não inoculado. Da mesma forma, não foi observado diferença significativa quando as plantas foram crescidas em solo com P na forma de PTC. Esses estudos são corroborados por Govindarajan et al. (2008) que observaram um aumento médio de 28% no perfilhamento de arroz aos 60 dias após a inoculação com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas em experimentos de campo.

Tabela 13. Altura e número de perfilhos de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (60 DAP), inoculados com as estirpes *B. vietnamiensis* AR114, *H. seropedicae* ZA15, *H. seropedicae* H18, *H. seropedicae* ZAE94, *A. chroococcum* AC1 e a mistura das estirpes.

Tratamento	Altura (cm planta ⁻¹)		Número de perfilhos planta ⁻¹	
	PTC*	PSS*	PTC*	PSS*
Não inoculado	48,02 Aa**	51,32 Aa	11,64 Aa	13,19 Ba
H18	50,99 Aa	53,28 Aa	11,93 Aa	12,38 Ba
ZA15	50,35 Aa	48,80 Aa	11,00 Ab	13,71 Aa
ZAE94	47,50 Aa	51,23 Aa	11,44 Aa	12,31 Ba
AR114	49,32 Aa	50,05 Aa	11,00 Aa	12,21 Ba
PAL5	47,53 Aa	52,15 Aa	09,98 Ab	12,81 Ba
AC1	49,23 Aa	52,39 Aa	10,93 Ab	12,69 Ba
Mistura	46,28 Ab	53,60 Aa	09,94 Ab	11,81 Ba
Alto N	54,83 Aa	51,18 Aa	12,38 Ab	15,14 Aa
Médias	49,34 b	51,56 a	11,14 b	12,92 a
C.V.	10,17		14,48	

*PTC(fosfato tricálcico), PSS(super fosfato simples)

** Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Figura 11. Plantas de arroz da variedade IR42, no estágio de desenvolvimento vegetativo (60 DAP).

O acúmulo de massa seca das plantas com 60 DAP crescidas em PTC como fonte de P incrementou significativamente quando inoculadas com as estirpes *B. vietnamiensis* AR114, *H. seropedicae* ZA15, *H. seropedicae* H18, *H. seropedicae* ZAE94, *A.chroochoccum* AC1 e a mistura das estirpes (Figura 12). Os aumentos foram da ordem de 160, 91, 88, 74, 49 e 40%, respectivamente em relação ao controle sem inoculação. Resultados similares foram obtidos no acúmulo de P onde aumentos de 45, 67, 56, 102, 47 e 68% foram observados com a inoculação das estirpes H18, ZA15, ZAE94, AR114, AC1 e a mistura, respectivamente (Tabela 14). Da mesma forma, foram observados aumentos significativos no acúmulo total de N de 31, 29,37, 77, e 46% com a inoculação das estirpes H18, ZA15, ZAE94, AR114 e a mistura das estirpes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hameeda et al. 2008 em experimento realizado em casa de vegetação quando utilizaram rocha fosfática como fonte de P. Os autores observaram incrementos de 99 e 94% em relação ao controle no acúmulo de biomassa em plantas de milho com a inoculação das estirpes SFI *Serratia marcescens* EB 67 e *Pseudomonas* sp. CDB 35. Já em experimento de campo, avaliados aos 48 e 96 dias após semeadura, foram observados aumentos na biomassa de 66% e 50% com a inoculação das estirpes *S. marcescens* e 51% e 18% com *Pseudomonas* spp, enquanto que a produção de grãos aumentou 85% e 64%, respectivamente. Leungvutiviroj et al. (2010) inocularam milho com uma mistura dos microorganismos *Azotobacter tropicalis*, *Burkholderia unamae*, e *Bacillus subtilis* e observaram incrementos 2 vezes superior no acúmulo de massa seca quando comparado com o controle não inoculado.

Com PSS como fonte de P, aumentos significativos de 17, 29 e 26%, respectivamente foram observados no acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas crescidas na presença de PSS quando inoculadas com as estirpes *H. seropedicae* ZA15, *G. diazotrophicus* PAL5 e *A.chroochoccum* AC1 (Figura 12). Por outro lado, não houve diferença significativa no acúmulo total de N embora todos os tratamentos apresentaram valores superiores ao controle não inoculado (Tabela 14). Em contraste, foram observados aumentos significativos de 50, 45, 34 e 55% com a inoculação das estirpes H18, ZA15, AR114, e AC1, respectivamente no acúmulo total de P em relação ao controle não

inoculado na presença de PSS. Govindarajan et al. (2008) observaram que o uso de inóculo misto (*B. vietnamiensis*, *H. seropedicae*, *A. lipoferum*, *G. diazotrophicus*) promoveu um aumento significativo da parte aérea e biomassa radicular em relação ao tratamento não inoculado de 38,4 e 83,0%, respectivamente quando as plantas foram crescidas no campo e avaliadas aos 60 dias após a inoculação.

De uma maneira geral foi observada uma resposta diferenciada à inoculação com as duas fontes fosfatadas durante o estágio de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) (Tabela 13, 14; Figura 12). As plantas com PTC apresentaram menor acúmulo de massa seca, exceto no tratamento inoculado com *B. vietnamiensis* AR114. O efeito das estirpes é mais marcante com PTC como fonte de P, provavelmente em função da capacidade de solubilizar P e/ou pelo presumível aumento da captação de P por mudanças estruturais nas raízes. Já quando a fonte de P é PSS observou-se maior desenvolvimento das plantas e é possível que a ação das estirpes no crescimento das plantas de arroz ocorra por outros mecanismos diferentes à SFI, como o aumento do N produto da FBN, ou mudanças morfológicas pela produção de fitohormônios ou o estímulo do desenvolvimento da raiz, os quais levam a uma maior absorção de nutrientes e água. BPCV podem afetar diretamente as concentrações de hormônios na rizosfera, seja pela utilização dos hormônios e de seus precursores como fontes de carbono e nitrogênio; ou pela síntese dos mesmos (DODD, 2005). Existem evidências crescentes de que BPCV afetam as concentrações hormonais de raízes, e também podem alterar a sinalização de longa distância entre a raiz e a parte aérea (BELIMOV et al., 2009) mediando a concentração do hormônio na parte aérea.

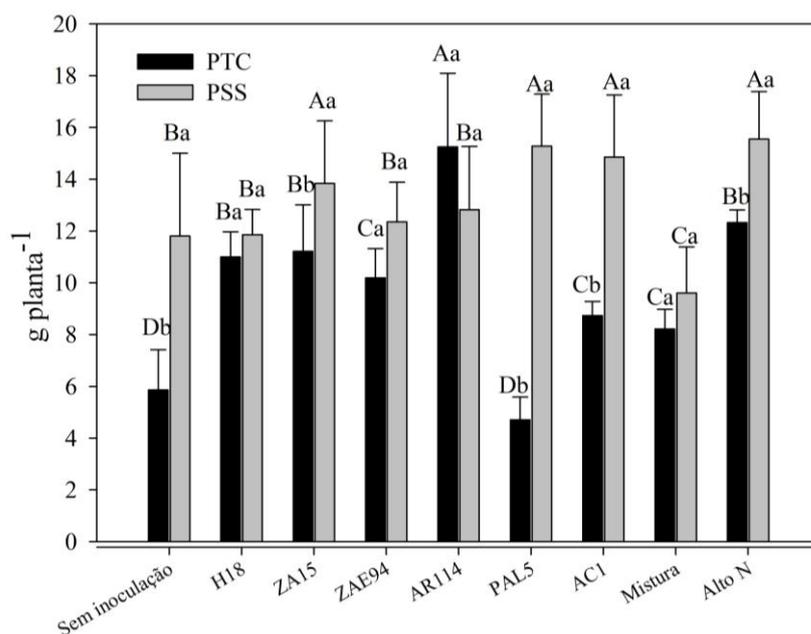


Figura 12. Acúmulo de massa seca total de plantas de arroz da variedade IR42 coletadas no estágio de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Fonte de P: Fosfato tricálcico (PTC) e Fosfato super simples (PSS). Média de 3 repetições. Letras iguais maiúsculas para tratamentos e

minúsculas para fonte de P não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 14. Acúmulo de nitrogênio e fósforo na parte aérea de plantas de arroz, no estágio vegetativo (60 DAP), inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroochoccum* AC1, e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.

Tratamentos	N-TOTAL (mg planta ⁻¹)		P-TOTAL (mg planta ⁻¹)	
	PTC	PSS	PTC	PSS
Sem inoculação	39,73 Ca *	55,14 Ba	7,78 Bb	13,09 Ba
H18	52,21 Bb	76,11 Ba	11,31 Ab	19,70 Aa
ZA15	51,36 Ba	65,18 Ba	12,96 Ab	19,11 Aa
ZAE94	54,19 Ba	57,48 Ba	12,13 Aa	11,41 Ba
AR114	70,14 Aa	76,67 Ba	15,69 Aa	16,13 Aa
PAL5	33,43 Cd	68,95 Ba	7,52 Bb	17,49 Aa
AC1	41,66 Cd	68,81 Ba	11,45 Ab	20,30 Aa
Mistura	58,16 Ba	60,33 Ba	13,04 Aa	12,22 Ba
Alto N	79,55 Ab	95,56Aa	13,92 Ab	19,49 Aa
Média	53,38 b	73,81 ^a	11,76 b	16,54 a
C.V. (%)	17,93		22,61	

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Não foi observada diferença significativa na massa seca total da parte aérea entre as plantas inoculadas e o controle, quando crescidas na presença de PTC como fonte de P e avaliadas durante o estágio de maturação de grãos (Figura 13). Por outro lado, o uso de PSS como fonte de P promoveu um incremento de 15, 8 e 13 %, respectivamente quando as plantas foram inoculadas com as estirpes *H. seropedicae* ZA15, *H. seropedicae* ZAE94, *A. chroochoccum* AC1. Já em relação ao acúmulo de N (Tabela 15) foi observado aumentos no N total das plantas crescidas na presença de PTC como fonte de P e inoculadas, sendo o efeito significativo para os tratamentos inoculados com as estirpes PAL5, AC1 e a mistura em 29, 75, 49%, respectivamente. Já com PSS como fonte de P, as estirpes ZA15, PAL5 e AC1 alcançaram incrementos de 52, 75, 59%, respectivamente sobre o controle não inoculado porém não apresentaram diferença para a testemunha nitrogenada. Por outro lado, não foram observadas diferença significativa no acúmulo de P entre os tratamentos inoculados e não inoculados.

Estudos mostram o efeito da acidificação da rizosfera sobre a solubilização de fosfatos naturais. Resultados encontrados por Marschner (1991), citados por Novais (2007) mostram que as plantas supridas com N amoniacal apresentam valores de pH da rizosfera até duas unidades inferiores ao do solo não rizosférico. Com fosfato natural de Gafsa em 44 dias de equilíbrio tem se obtido dissolução de até 95% do P com um pH de 4,5 (ROBINSON e SYERS, 1990). A diminuição dos efeitos observados no estágio de enchimento de grãos da cultura foi possivelmente devido as aplicações de sulfato de amônio (45 mg por vaso depois da primeira colheita), o qual pode ter promovido a redução

do pH da rizosfera e desta forma solubilizado o PTC tornando-o disponível para a planta. Possivelmente esse aspecto pode ter contribuído para as diferenças marcantes da inoculação na solubilização de P observadas no período vegetativo quando comparado com a maturação de grãos. Guimarães (2006) em experimentos de inoculação com arroz verificou diferenças no pH da rizosfera quando utilizou sulfato de amônio e nitrato de amônio como fonte de N. O autor observou menores valores nos tratamentos que continham sulfato de amônio enquanto que os valores de pH com o nitrato de amônio foram próximos aos valores obtidos quando não se aplicou adubação.

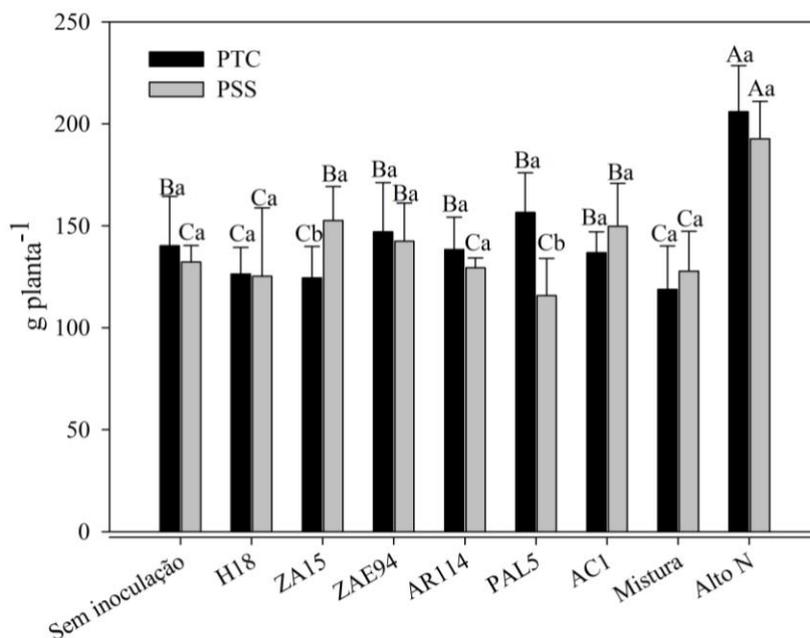


Figura 13. Acúmulo de massa seca total de plantas de arroz da variedade IR42 coletadas no estágio de maturação de grãos (120 DAP) e inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Fonte de P: Fosfato tricálcico (PTC) e Fosfato super simples (PSS). Média de 3 repetições. Letras iguais maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 15. Acúmulo de nitrogênio e fósforo na parte aérea de planta de arroz, no estágio de desenvolvimento maturação de grãos (120 DAP), inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.

Tratamentos	N-TOTAL		P-TOTAL	
	(mg planta ⁻¹)		(mg planta ⁻¹)	
	PTC	PSS	PTC	PSS
Sem inoculação	89,87 Ba*	80,12 Ba	37,43 Aa	31,46 Aa
H18	90,99 Ba	77,34 Ba	27,39 Aa	33,94 Aa
ZA15	109,16 Ba	122,17 Aa	27,88 Aa	46,59 Aa
ZAE94	92,93 Ba	84,94 Ba	24,75 Aa	25,88 Aa
AR114	74,10 Ba	95,69 Ba	38,14 Aa	38,01 Aa
PAL5	115,79 Aa	140,34 Aa	38,75 Aa	45,27 Aa
AC1	157,66 Aa	127,71 Aa	41,12 Aa	37,34 Aa
Mistura	125,38 Aa	95,67 Ba	31,78 Aa	38,67 Aa
Alto N	134,12 Aa	140,77 Aa	23,93 Aa	46,26 Aa
Média	107,19 a	110,00 a	32,80 a	36,79 a
C.V. (%)	30,97		35,15	

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Neste estudo foi demonstrada a produção de compostos indólicos pelas diferentes bactérias diazotróficas selecionadas para a inoculação. Estudos prévios já demonstraram esta capacidade nas estirpes *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azotobacter chroococcum* (BASTIAN et al., 1998; BROWN e BURLINGHAM, 1968). A relação raiz/parte aérea em respeito ao acúmulo de massa seca (Tabela 16) mostrou que um maior acúmulo de massa seca na raiz não significou maior acúmulo de biomassa total, de N total e P total nas plantas inoculadas. Neste estudo a síntese de AIA e outros fitohormônios pelas estirpes utilizadas (Figura 6) puderam alterar o alongamento da raiz e sua arquitetura, aumentando assim o volume de solo explorado pela planta e como consequência aumentou a nutrição das plantas inoculadas. Mudanças na arquitetura de raízes de trigo pela inoculação de *Azospirillum* spp (pela síntese de AIA principalmente) estão associadas ao aumento de pêlos radiculares, e raízes laterais, o qual aumenta a eficiência com que as raízes exploram a rizosfera para a absorção de P (DOBBELAERE et al., 2003). Em *Azospirillum* spp. a produção de fitohormônios pode afetar as funções da raiz de duas maneiras principais (a) aumentando a eficiência da raiz para absorver água e nutrientes (diminui a relação raiz/parte aérea) e/ou (b) aumentando a massa das raízes em detrimento da massa da parte aérea (aumento relação raiz/parte aérea)(BASHAN, 2004). Em contraste, Rodrigues et al. (2008) encontrou que a inoculação de *A. amazonense* em condições gnotobióticas reduziu o crescimento da raiz e parte aérea, quando comparado ao controle, mostrando efeitos negativos do excesso de AIA no meio. Em estudos desenvolvidos por Radwan et al. (2004) foi demonstrado que *Herbaspirillum* spp. tem um caminho metabólico diferente ou menos eficiente para a produção de indóis que o apresentado por

Azospirillum spp, resultando em uma produção menor de auxinas, porém induziu a formação de raízes com maior número de pêlos radiculares e maior massa e superfície. Já no estágio de maturação de grãos foram observadas maiores variações entre os diferentes tratamentos no acúmulo de massa seca nas raízes. Tais bactérias, além de sua capacidade de produzir fitohormônios também demonstraram habilidade em fixar nitrogênio e solubilizar PI, disponibilizando diretamente N e P para a planta.

Tabela 16. Relação raiz/parte aérea (respeito ao acúmulo de massa seca), nos estádios de desenvolvimento vegetativo (60 DAP) e maturação de grãos (120 DAP), inoculadas com as estirpes *Herbaspirillum seropedicae* H18, *Herbaspirillum seropedicae* ZA15, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94, *Burkholderia vietnamiensis* AR114, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azotobacter chroococcum* AC1, e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.

Tratamentos	Vegetativa			Maturação		
	PTC	PSS	Média	PTC	PSS	Média
Sem inoculação	1,36 Aa*	1,74 Aa	1,55 A	2,22 Aa	2,26 A	2,24 B
H18	1,74 Aa	1,01 Bb	1,38 A	2,08 Aa	1,96 Ba	2,02 B
ZA15	1,62 Aa	1,43 Ba	1,53 A	1,86 Aa	2,32 Aa	2,09 B
ZAE94	1,21 Ab	2,01 Aa	1,65 A	2,31 Aa	2,32 Aa	2,32 B
AR114	1,56 Aa	1,45 Ba	1,51 A	2,30 Aa	1,72 Bb	2,01 B
PAL5	1,24 Aa	1,43 Ba	1,33 A	2,42 Aa	1,57 Bb	2,00 B
AC1	1,52 Aa	1,35 Ba	1,43 A	2,31 Aa	2,21 Aa	2,26 B
Mistura	0,94 Aa	1,29 Ba	1,11 A	2,04 Aa	2,01 Ba	2,02 B
Alto N	1,24 Aa	1,20 Ba	1,22 A	2,65 Aa	2,77 Aa	2,71 A
Média	1,38 a	1,44 a	1,41 b	2,12 a	2,24 a	2,18 a
C.V. (%)	20,77					

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados na tabela 17 mostraram que a fonte de P não influenciou a produção, peso de 1000 espiguetas e o índice de colheita. Nos tratamentos que foram adubados com PTC como fonte de P, a inoculação das estirpes *H. seropedicae* H18, ZA15 e ZAE94, *B. vietnamiensis* AR114, *G. diazotrophicus* PAL5 e *A. chroococcum* AC1 aumentaram em 40, 34, 43, 47, 33 e 35%, respectivamente a produção de massa seca nos grãos em relação ao controle sem inoculação. O tratamento não inoculado produziu um número maior de panículas, porém isto não significou uma maior produção ou qualidade do grão. Quando foi usado PSS como fonte de P apenas a estirpe *A. chroococcum* AC1 proporcionou incremento significativo de 42% em contraste com a inoculação das estirpes H18, ZA15, ZAE94 de *H. seropedicae*, *B. vietnamiensis* AR114, *G. diazotrophicus* PAL5 e a mistura que produziram incrementos de 19, 24, 34, 33, 18 e 23% respectivamente, porém não significativos. Todos os tratamentos inoculados apresentaram um maior peso de grão, índice de colheita e acúmulo total de P quando comparados com o controle não inoculado.

A inoculação com *G. diazotrophicus* PAL5 proporcionou acúmulo de massa seca total similar ao controle não inoculado quando as plantas foram crescidas na presença de

PTC como fonte de P e avaliadas no período vegetativo (60DAP) (Figura 12). Em contraste, foi observado um aumento significativo quando a fonte de P usada foi PSS. A associação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* com plantas de arroz é conhecida e estudos já demonstraram a capacidade de colonização de plântulas de arroz por essa bactéria (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005; ROUWS et al., 2010). Não foi observada diferença na população de microorganismos diazotróficos presente nas raízes lavadas de plantas não inoculadas e o tratamento inoculado com *G. diazotrophicus* PAL5 (Tabela 12), sugerindo que a deficiência de P (quando utilizado PTC como fonte de P), possivelmente dificulta a capacidade de colonização e/ou diminui a capacidade da estirpe em fixar nitrogênio atmosférico. A literatura tem mostrado que um incremento na disponibilidade de P pode aumentar a fixação biológica de N (GILLER, 2001; ZAIDI et al., 2004). Em *G. diazotrophicus* PAL5, a solubilização de PI pode ser um efeito do metabolismo da bactéria e não uma característica de promoção de crescimento (Figura 12). Com o aumento da disponibilidade de P após o estágio vegetativo (60DAP) *G. diazotrophicus* PAL5 incrementou significativamente a produção, peso de 1000 espiguetas, o índice de colheita e o acúmulo total de P com PTC como fonte de P (Tabela 17). Govindarajan et al. (2008) inocularam *G. diazotrophicus* LMG7603 e obtiveram diferença no acúmulo de massa seca na parte aérea e raiz em relação ao tratamento não inoculado quando avaliado no estágio vegetativo (60 DAP), porém o efeito sobre o acúmulo de N foi inconsistente.

Vários estudos têm mostrado que a inoculação de *Azotobacter chroococcum* no solo melhora o crescimento das plantas por diversos mecanismos tais como a fixação de nitrogênio (BONILLA et al., 2000), a excreção de amônia (NARULA et al., 1980), a produção do hormônios de crescimento vegetal (LOPEZ et al., 2010), produção de substâncias antifúngicas (LAKSHMINARAYANA et al., 1992), sideróforos (SUNEJA et al., 1994) e solubilização de fosfato (CABALLERO et al., 2007). No entanto, poucos estudos foram feitos sobre a inoculação utilizando fontes insolúveis de P. Em nosso estudo a estirpe *A. Chroococcum* AC1 apresentou um incremento de 42% na produção de massa seca grãos quando foi usado PSS como fonte de P, sendo esta percentagem maior que para as outras bactérias avaliadas. O acúmulo total de P foi aumentado significativamente, entretanto no peso de 1000 espiguetas e no índice de colheita não se observou diferença significativa, porém todos foram maiores que o controle. A estirpe *A. chroococcum* incrementou a produção de massa seca nos grãos e proporcionou diferença significativa no peso de 1000 espiguetas, no índice de colheita e acúmulo total de P quando comparada com o controle não inoculado quando foi utilizado PTC como fonte de P. Estudos de inoculação de *Azotobacter* spp em arroz crescido sob condições de campo mostraram aumentos na produtividade de 7 a 20% e de 11 a 15 Kg no acúmulo de N na parte aérea (YANNI e EL-FATTAH, 1999). A inoculação da estirpe *A. chroococcum* com capacidade de solubilizar P e produzir AIA em plantas de trigo crescidas sob condições de casa de vegetação aumentou em 14% a produtividade e 11,4% a biomassa da raiz (KUMAR et al., 2001).

Experimentos de inoculação com a estirpe *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 conduzidos no CNPAB tem mostrado aumentos no rendimento e acúmulo de N em arroz. Baldani et al. (2000), em experimentos de inoculação em plantas de arroz com as estirpes M130 e M209 de *Burkholderia* spp e *H. seropedicae* ZAE94 não observaram aumentos na produção, porém observaram diferenças de 11 a 20% no acúmulo de massa seca na parte aérea nos tratamentos inoculados. Já nos experimentos de inoculação conduzidos por Guimarães et al. (2003), em casa de vegetação com as estirpes *Burkholderia* spp M130 e *H. seropedicae* ZAE94, foram observados aumentos de 19 e 25% no acúmulo de N nos grãos. Ferreira (2008) demonstrou que a inoculação da estirpe *H. seropedicae* ZAE94 nas variedades de arroz IR42 e IAC444 representou acúmulos de N e proteína no grão

estatisticamente igual aos tratamentos que receberam 20, e 50 kg de N há⁻¹, respectivamente. Nas condições experimentais aqui realizadas, a inoculação da estirpe *H. seropedicae* ZAE94 apresentou um maior incremento na produção de massa seca nos grãos, peso de 1000 espiguetas e índice de colheita quando comparada com as estirpes selecionados ZA15 e H18 (Tabela 17). Com as duas fontes de P todas as estirpes do gênero *Herbaspirillum* proporcionaram aumentos significativos no acúmulo total de P no grão.

Quando a fonte de P foi na forma de PTC, as estirpes inoculadas do gênero *Herbaspirillum* spp. apresentaram incrementos significativos na produção de massa seca nos grãos e no índice de colheita quando comparados com o controle, enquanto que o peso de 1000 espiguetas não diferiu significativamente. Por outro lado, com o uso de PSS como fonte de P a inoculação das estirpes não proporcionou aumentos significativos na produção e índice de colheita, mas foram superiores ao controle. O peso de 1000 espiguetas nos tratamentos inoculados com as estirpes ZAE94 e ZA15 foram significativamente superiores. Os tratamentos com as estirpes do gênero *Herbaspirillum* aumentaram o acúmulo de P 60 DAP (Tabela 14) quando foi usado PTC como fonte de P, indicativo de sua capacidade de aumentar a disponibilidade ou captação dos mesmos.

A estirpe diazotrófica *B. vietnamiensis* AR114, foi selecionada por sua capacidade de solubilizar PTC, fixar N e Produzir AIA (Figuras 4, 5, 6). A inoculação em plantas de arroz crescidas em solo com PTC como fonte de P representou maior acúmulo de biomassa, nitrogênio e fósforo no estágio vegetativo (60DAP) quando comparada com os demais tratamentos e quando comparada com PSS como fonte de P (Figura 12; Tabela13). Os experimentos de solubilização de PI *in vitro* mostraram que a estirpe AR114 foi a mais efetiva após 14 dias de crescimento em meio líquido (Figura 4). A inoculação da estirpe AR114 aumentou em 47% o peso seco dos grãos, aumentou o peso de 1000 espiguetas, e aumentou o índice de colheita com PTC (Tabela 17). Maiores índices de colheita sugerem uma maior translocação de biomassa para o grão em detrimento da parte aérea (Tabela 17). A inoculação da estirpe AR114 em plantas de arroz crescidas em solo com PSS como fonte de P também promoveu incrementos na produção, qualidade do grão e índice de colheita em relação ao controle sem inoculação (Tabela 17). Independente da fonte de P a estirpe AR114 proporcionou o maior acúmulo de P total no grão, indicando seu efeito no aumento da nutrição fosfatada. Trân van (2000) inoculou em arroz a estirpe *B. vietnamiensis* TVV75 e obteve um efeito significativo equivalente a 44 Kg/ha de N em condições de casa de vegetação antes do transplante em campo, resultando em um aumento de 13 a 22% no rendimento final de grãos

A inoculação da mistura das estirpes não promoveu incrementos significativos na produção de massa seca nos grãos, peso de 1000 espiguetas, no P total do grão e no índice de colheita. É possível que os microorganismos empregados tenham competido por nutrientes e espaço na rizosfera inibindo ou diminuindo sua ação na planta. Pedraza et al. (2009) observaram resultados similares, em experimentos de arroz de sequeiro quando inoculou individualmente as estirpes de *A. brasilense* S1 e S2. Os autores obtiveram maiores produção de grãos e um maior acúmulo de N no grão, do que quando inoculou sua mistura. Por outro lado, a inoculação com o produto Bioagro, um inoculante composto por *Pseudomonas* spp, *Candida* spp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, promoveu aumentos de 240 Kg ha⁻¹ em relação ao controle não inoculado (CONG et al., 2009).

Tabela 17. Produção de massa seca em g planta⁻¹, peso de 1000 espiguetas, número de panículas, índice de colheita, P total no grão de plantas de arroz, inoculadas com as estirpes *H. Seropedicae* H18, *H. seropedicae* ZA15, *H. seropedicae* ZAE94, *B. vietnamiensis* AR114, *G. diazotrophicus* PAL5, *A. chroochoccum* AC1 e sua mistura. Utilizando fosfato tricálcico (PTC) e super fosfato simples (PSS) como fonte de P.

Tratamentos	Produção (g planta ⁻¹)		Peso de 1000 espiguetas (g)		Número de panículas Planta ⁻¹		Índice de Colheita (%)		P total no grão (mg planta ⁻¹)	
	PTC	PSS	PTC	PSS	PTC	PSS	PTC	PSS	PTC	PSS
Sem inoculação	11,53 Ba*	12,59 Ba	17,92 Ba	17,18 Ba	14,38 Aa	12,33 Ba	26,51 Ba	30,89 Aa	43,62 Ba	45,55 Ba
H18	16,14 Aa	14,98 Ba	18,33 Ba	19,83 Ba	10,38 Ba	10,75 Ba	38,90 Aa	35,11 Aa	60,85 Aa	66,37 Aa
ZA15	15,40 Aa	15,65 Ba	19,49 Ba	23,92 Aa	11,38 Ba	11,88 Ba	35,41 Aa	34,31 Aa	60,11 Aa	55,92 Ba
ZAE94	16,47 Aa	16,91 Ba	19,69 Ba	23,86 Aa	12,00 Ba	10,33 Ba	37,06 Aa	39,61 Aa	62,49 Aa	74,87 Aa
AR114	16,87 Aa	16,73 Ba	23,59 Aa	25,25 Aa	11,50 Ba	11,88 Ba	40,20 Aa	34,90 Aa	78,14 Aa	75,36 Aa
PAL5	15,36 Aa	14,81 Ba	22,33 Aa	23,35 Aa	11,75 Bb	14,83 Aa	33,45 Aa	32,88 Aa	65,44 Aa	50,33 Ba
AC1	14,43 Ab	17,92 Aa	24,09 Aa	18,90 Bb	11,13 Ba	12,50 Ba	35,26 Aa	38,98 Aa	57,68 Aa	74,44 Aa
Mistura	11,79 Bb	15,43 Ba	24,05 Aa	18,98 Bb	10,00 Ba	11,88 Ba	30,21 Ba	36,22 Aa	47,64 Ba	45,78 Ba
Alto N	19,16 Aa	21,25 Aa	18,36 Ba	17,63 Ba	11,88 Ba	13,13 Aa	33,99 Aa	41,48 Aa	50,73 Bb	74,43 Aa
Média	15,24 a	16,25 a	20,87 a	20,99 a	11,60 a	12,17 a	34,55 a	36,04 a	58,52 a	61,81 a
C.V. (%)	15,32		16,45		12,86		15,15		5,84	

* Médias seguidas por letras iguais (maiúsculas para tratamentos e minúsculas para fonte de P) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Existem poucos estudos que avaliem o efeito da inoculação de estirpes diazotróficas e solubilizadoras de fosfato quando é utilizada uma fonte pouco solúvel como o PTC. O estudo mostrou o efeito positivo das diferentes estirpes diazotróficas quando o fósforo está indisponível no solo (até os 60 DAP), mostrando que nestas condições o efeito da inoculação das estirpes é mais marcante na captação de P do solo pela planta, aumentando o acúmulo de biomassa, o N e P total na parte aérea. Os resultados mostraram um incremento na produção, aumento na qualidade de grãos e um efeito direto sobre a nutrição fosfatada quando as diferentes estirpes previamente selecionadas “in vitro” foram inoculadas individualmente. A co-inoculação não diferiu significativamente do controle nos parâmetros de produção e qualidade dos grãos. Em trabalhos futuros é importante selecionar as possíveis misturas pelo emprego de testes de antagonismos “in vitro” e realizar previamente testes em condições gnotobióticas com plântulas de arroz.

Segundo Gyaneshwar et al. (2002) o insucesso das respostas às inoculações com microorganismos solubilizadores de PI é devido (1) a sobrevivência insuficiente e não colonização das estirpes inoculadas, (2) a competição com os microorganismos nativos, (3) a natureza e propriedades dos solos e variedades de plantas, (4) a falta de nutrientes na rizosfera para produzir quantidades suficientes de ácidos orgânicos para solubilizar o PI do solo e (5) incapacidade de microorganismos solubilizadores de PI de solubilizar fosfatos do solo.

Com o estudo não foi possível estabelecer o principal mecanismo de ação pelo qual as diferentes estirpes aumentam o crescimento vegetal. Um sinergismo entre a capacidade de disponibilizar P e as mudanças estruturais nas raízes pela produção de AIA, provavelmente aumentaram a disponibilidade e/ou a captação de P. Compreender a interação entre os microorganismos empregados nos diferentes inoculantes e a planta abrirá o caminho para melhor aproveitar os diferentes mecanismos pelos quais as bactérias aumentam o crescimento da planta e/ou o rendimento.

Independente dos resultados obtidos em casa de vegetação torna-se necessário avaliar o potencial das estirpes em experimentos de campo levando em consideração os aspectos de P disponível, tipo de solo, fonte de nitrogênio e manejo da cultura (inundado ou sequeiro). A inoculação das estirpes selecionadas em arroz mostra-se como uma possível alternativa para melhorar a eficiência dos fertilizantes fosfatados, visando o uso de fontes de P menos solúveis como as rochas fosfáticas e adubos orgânicos. O uso da tecnologia diminuiria a dependência de fertilizantes químicos como o PSS os quais consomem grandes quantidades de energia não renovável e produzem grandes quantidades de subprodutos tóxicos em sua produção.

5. CONCLUSÕES

- A formação de zonas claras e da diminuição do pH (uso de indicador) em placas contendo o meio de cultivo NBRIP foram diferentes dos resultados obtidos em meio líquido.
- O P solúvel liberado no meio de cultura líquido varia de acordo com a estirpe e o tempo de cultivo do microorganismo.
- A inoculação da estirpe de *B. vietnamiensis* AR114 resultou em maior produção de massa seca nos grãos assim como melhorou o acúmulo total de N e P, e o índice de colheita na presença de PTC como fonte de P.
- A inoculação com as estirpes de bactérias diazotróficas solubilizadoras de PI, independente da fonte de P utilizadas aumentaram a produção de grãos e a sua qualidade.
- Todas as estirpes utilizadas em condições de casa de vegetação apresentaram potencial de uso como biofertilizantes para experimentação e seleção a campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIKHANI, H.A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, v. 287, p.35–41, 2006.

ALVES, J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and soil**, v. 252, p. 1-9, 2003.

ANTOUN, H. A.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v.204, p.57–67, 1998.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xilella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental of Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002.

ARAÚJO, A. S. **Caracterização e uso de bacterias diazotróficas isoladas de diferentes cultivares de arroz originárias do estado do maranhão**. Seropedica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia, Agroecologia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia. Tese de doutorado.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.

AZAMBUJA, I.H.V., VERNETTI Jr., F.J., MAGALHÃES Jr., A. M. Arroz irrigado no sul do Brasil. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. Embrapa Informação **Tecnológica**, p.23-44, 2004.

BACA, B.; SOTO, L.; PARDO, M. Fijación biológica de nitrógeno. **Elementos**, v.1, p. 39–49, 2000.

BACILO-JIMENEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; VENTURA-ZAPATA, E.; PEREZ-CAMPOS, E.; BOUQUELET, S.; ZENTENO, E. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. **Plant and Soil**, v.249, p.271–277, 2003.

BALANDREAU, J. Microbiology of the association. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.851–859, 1983.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86–93, 1986.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da Inoculação de *Herbaspirillum* spp.. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de**

uma nova bactéria diazotrófica. 1996. 238 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.485-491, 2000.

BARTEL, B. Auxin biosynthesis. Annual Review in Plant Physiology and PLANT Molecular Biology, v.48, p.51-66, 1997.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729-77, 1998.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: agricultural, physiological, molecular and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal Microbiology**, v.50, p.521-5, 2004.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n.1, p.7-11, 1998.

BELIMOV, A.A.; DODD, I.C.; HONTZEAS, N.; THEOBALD, J.C.; SAFRONOVA, V.I.; DAVIES, W.J. Rhizosphere bacteria containing ACC deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. **New Phytologist**, v.181, p.413-423, 2009.

BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p.225-252, 1973.

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

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. D.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; D., BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p.195-209, 1995.

BONILLA, R.; NOVO, R.; VENEGAS, N.; GALVIS, A.M.; MARTÍNEZ, M.M.; PARRA, D.; VANEGAS, O. Generación de Tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de la fertilización. Programa Regional de Investigación Agrícola CORPOICA-Regional v.3, p.12-30, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRADY, N.; WEIL, R. 2004. **Elements of the nature and properties of soils.** Segunda edição. Editorial Prentice Hall. 606 p.

BRANDL, M.T.; LINDOW, S. E. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4121-4128, 1996.

BRASIL, M. **Ocorrência e Diversidade Genética de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Variedades de Arroz RJ**. 2005. 105 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BROWN, M. E.; BURLINGHAM, S. W. Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococcum*. **Journal of General Microbiology**, v.53, p.135-144, 1968.

CABALLERO, T.; CAMELO, M.; BONILLA, R.; MARTÍNEZ, M. Determinación de Actividad Fosfatossolubilizadora por bacterias aisladas a partir de suelos algodoneros en los Departamentos del Cesar y Meta. **Suelos Ecuatoriales**, 37(1): 94-100, 2007.

CHEN, Y.; REKHA, P.; ARUN, A.; SHEN, F.; LAI, W.; YOUNG C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil ecology**, v.34, p33-41, 2006.

CHO, J. C.; VERGIN, K. L.; MORRIS, R. M.; GIOVANNONI, S. J. *Lentisphaera araneosa* gen. nov., sp. nov., a transparent exopolymer producing marine bacterium, and the description of a novel bacterial phylum, *Lentisphaerae*. **Environmental Microbiology**, v.6, p.611-621, 2004.

CHOUDHURY, A. T. M. A.; KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, n 4, p.219-227, 2004.

CLARK, E.; MANULIS, S.; OPHIR, Y.; BARASH, I.; GAFNI, Y. Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar *gyssophilae*. **Phytopathology**, v.83, p.234-240, 1993.

COCKING, E.C. Concerted action for cereal and other non-legume crop nitrogen fixation, enhanced growth and yield. in: KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A. (Eds.). **Biofertilizers in Action**, Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, p. 1-3, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quinto levantamento, fevereiro 2011. Disponível em http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4graos_07.01.10.pdf. Acesso em: 15 de fevereiro de 2011.

CONG, P.T.; DUNGA, T.D.; HIEN, T.M.; HIEN, N.T.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M.L.; KENNEDY, I.R. Inoculant plant growthpromoting microorganisms enhance utilization of urea-N and grain yield of paddy rice in southern Vietnam. **European Journal of soil biology**, v.45, p.52-61, 2009.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Molecular and General Genetics**, v.243, p.463–472, 1994

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995.

CRESPO, J. M.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. **Agricultural Sciences**, v.2, p.16-22, 2011.

DARDANELLI, M.S.; CARLETTI, S.M.; PAULUCCI, N.S.; MEDEOT, D.B.; CÁCERES, E.A.R.; VITA, F.A.; BUENO, M.; FUMERO, M.V.; GARCIA, M.B. Benefits of plant growth-promoting rhizobacteria and rhizobia in agriculture. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.). **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p.1-20, 2010.

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

DENNIS, N. Reinventing rice to feed the world. **SCIENCE**, v.321, p.330-333, 2008.

DEUBEL, A.; MERBACH, W. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. in: BUSCOT, F. VARMA, A. (Eds.). **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions**. Springer, Berlin, p. 177–191, 2005.

DI, H.J.; CAMERON, K.C. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.64 ,n.3, p.237–256, 2002.

DIDONET, A. D.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; GOMES, G. F. Avaliação de linhagens de arroz de terras altas inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *Azospirillum brasilense* Sp24. Comunicado Técnico EMBRAPA, n. 69, dez. 2003.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell e Environment**, v. 32, n.12, p.1682-1694, 2009.

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

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; ANGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal Plant Physiology**, v.28, p.871–879, 2001.

DOBBELAERE S, V.; ANDELEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.22: p.107-149, 2003.

DODD, I.C. Root-to-shoot signalling: assessing the roles of “up” in the up and down world of long-distance signalling in planta. **Plant and Soil**, v.274, p.251–270, 2005.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N.Y.; SAFRONOVA, V.I.; BELIMOV, A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n.3, p.361-379, 2010.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v.8, p.175-185, 1998.

EWING, B. GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p.186-194, 1998.

EGEBO, L.A.; NIELSEN, S.V.S.; JOCHIMSEN, B.U. Oxygen-dependent catabolism of indole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 4897–4901, 1991.

ELIASSON, L.; BERTEL, G.; BOLANDER, E. Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. **Plant Physiology**, v.91, p.310–314, 1989.

ESTRADA, G. A.; BONILLA, R. R.; DIVAN BALDANI, V. L. Efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la calidad de bioinoculantes turbosos. **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuarias**, v.10, n.2, p. 205-213, 2009.

EUCLYDES, R. F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 59p.

EUROPEAN FERTILIZER MANUFACTURER ASSOCIATION (EFMA). Phosphorus Essential Element for Food Production. Disponível em: [http://www.efma.org/documents/file/publications/Understanding%20Phosphorus%20and%20its%20Use%20in%20Agriculture%20\(2000\).pdf](http://www.efma.org/documents/file/publications/Understanding%20Phosphorus%20and%20its%20Use%20in%20Agriculture%20(2000).pdf). Acesso em 10 de janeiro de 2011.

FAO. FAOSTAT Database. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

FENGLEROWA, W. Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. **Acta Microbiologica Polonica**, v.14, n.21, p.203, 1965.

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

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, 2003. p.255-258.

FERREIRA, J.S.; SABINO, D.C.C.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**, v.37, n.02, p.6-12, 2003.

FERREIRA, J.S. **Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado**. 2004. 44p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FERREIRA, J.S. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado**. 2008. 83p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FERREIRA, J.S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, n.1, p.179-185, 2010.

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

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computation improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v.309, p.1387–139, 2005.

GILLER, K. (2001): **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. CABI Publishing, Wallingford, UK, 423p.

GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Poly phasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to a amended description of the genus and proposition o *Burkholderia vietmaniensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.274–289, 1995.

GLICK, B.R.; CHENG, Z.; CZARNY, J.; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p.329–339, 2007.

GLICKMANN, E.; GARDAN, L.; JACQUET, S.; HUSSAIN, S.; ELASRI, M.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant–Microbe Interaction**, v.11, p.156–162, 1998.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**, v.1, p.51–57, 1986.

GOLDSTEIN, A.H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. **Biology, Agriculture and Horticulture**, v.12, p.185–193, 1995.

GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indol acetic acid. **Plant Physiology**, v.26: p.192-195, 1950.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S.; WEON, H.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. **Microbial Ecology**, v.55, p.21-37, 2008.

GRAY, E.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions, in the plant bacterium signaling process. **Soil biology and soil biochemistry**, v.37, p.395-412, 2005.

GUIMARÃES, C.M.; DOS SANTOS, A.B.; JÚNIOR, A.M.M.; STONE, L.F. Sistemas de cultivo. In: SANTOS, A.B.; STONE, L.F.; VIEIRA, N.R.R. (Eds.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa-CNPAP, p.53-96, 1998.

GUIMARÃES, S. L. **seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. 2001. 52p. Dissertação (mestrado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GUIMARÃES, S.L., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v37, n.2, p.25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. 2006. 52p Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2007.

GUIMARÃES, A. P. Bases bioquímicas do fracionamento isotópico de ^{15}N na fixação biológica de nitrogênio e da eficiência energética do processo em diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. 79p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campus, RJ, 2010.

GYANESHWAR, P.; PAREKH, L. J.; ARCHANA, G.; PODLE, P. S.; COLLINS, M. D.; HUTSON R. A.; NARESH. K. G. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. **FEMS Microbiology Letter**, v.171, p.223-229, 1999.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245, p.83-93, 2002.

HALDER, A.; CHAKRABARTTY, P. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. **Folia Microbiologica**, v.38, p.325-330, 1993.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O.P.; WANI, S.P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v.163, p.234–24, 2008.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian journal microbiology** .v.29, p.916–923, 1983.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, p.868-877, 1999.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.F.; MENDES, I.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM P.H. Inoculant preparation, production and application, In: WERNER, D.; NEWTON W.E. (Eds.). **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment**, Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 223–254, 2005,

IGUAL JM, RODRIGUEZ-BARRUECO C. Fertilizers, food and environment. In: VELAZQUEZ, E.; RODRIGUEZBARRUECO, C. (Eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Dordrecht: **Developments in Plant and Soil Science**, v.102, p.199–202, 2007.

INTORNE, A.C.; DE OLIVEIRA, M.V.; LIMA, M.L.; DA SILVA, J.F.; OLIVARES, F.L.; DE SOUZA FILHO, G.A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Archives of Microbiology**, v.191, p.477-483, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912comentarios.pdf. Acesso em: 20 de janeiro de 2010.

JAIN, D.K.; PATRIQUIN, D.G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching on wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 206-210, 1985.

JAKOBSEN, I.; LEGGETT, M.E.; RICHARDSON, A.E. Rhizosphere microorganisms and plant phosphorus uptake. In: SIMS, J.T.; SHARPLEY, A.N. (Eds.). **Phosphorus, Agriculture and the Environment**. American Society for Agronomy, Madison, p.437–494, 2005.

JONES, R. D. Phosphorus cycle. In: LEDERBERG, J (ed.). **Encyclopedia of Microbiology**, Academic, San Diego, v.3, 2. edn. . p. 614–617, 2000.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data of rice from a plant genetic resource perspective. **Food Chemistry**, v.80, n.4, p.589-596, 2003.

KHALID, A.; ARSHAD, M. e ZAHIR, Z. A. Growth and yield response of wheat to inoculation with auxin producing PGPR. **Pakistan Journal of Botany**, v.35, p.483-498, 2004.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 473 – 480, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

KOBAYASHI, M.; IZUI, H.; NAGASAWA, T.; YAMADA H. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile – cloning of the *Alcaligenes* gene and sitedirected mutagenesis of cysteine residues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.247–251, 1993.

KOBAYASHI, M.; SUZUKI, T.; FUJITA, T.; MASUDA, M.; SHIMIZU, S. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.92, p.714–718 1995.

KOGA, J.; ADACHI T.; HIDAKA H. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.226, p.10–16, 1991.

KPOMBLEKOU, K.; TABATABAI, M. Effects of organic acids on release of phosphorous from rock phosphate. **Soil Sciences**, v.158, p.442–453, 1994.

KUCEY, R. M. N.; JANZEN H. H.; LEGGETT M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, v.42, p.199-227, 1989.

KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergent of wheat as affected by *Azotobacter chroococum* mutants. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.301-305, 1999.

KUMAR, V.; BEHL, R.K.; NARULA, N. Establishment of phosphate solubilizing strains of *Azotobacter chroococum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions, **Microbiological Research**, v.156, p.87–93, 2001.

KUNDU, B.; GAUR, A. Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. **Plant and Soil**, v.57, p.223-230, 1980.

KUNDU, D.K., LADHA, J.K. Engancing soil nitrogen use and biological nitrogen fixation em wetland rice. **Experimental Agriculture**, v. 31, n.3, p.261-278, 1995.

LADHA, J.; REDDY, P. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, v.252, p.151–167, 2003.

LAKSHMINARAYANA, K.; NARULA, N.; HOODA, I. S.; FARODA, A. S. Nitrogen economy in wheat (*Triticum aestivum* L.) through use of *Azotobacter chroococum*. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.62, p.75–76, 1992.

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

LATA, H.; LI, X.C.; SILVA, B. Identification of IAA producing endophytic bacteria from micropropagated echinacea plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.85, p.353–359, 2006.

LEAUNGVUTIVIROJ, C.; RUANGPHISARN, P.; HANSANIMITKUL, P.; SHINKAWA, H.; SASAKI, K. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.74, n.5, p.1098-1101, 2010.

LEIGH, G. J. Dinitrogen chemistry. In: LEIGH, G.L., (ed.). **Nitrogen Fixation at the Millennium**. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, p.299-327, 2002.

LEVEAU, J.H.J.; LINDOW, S.E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2365–2371, 2005.

LEVEAU, J.H.J.; GERARDS, S. Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. **FEMS Microbiology Ecology**, v.65, p.238–250, 2008.

LIN, T. F.; HUANG, H. I.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, v.97, p.957–960, 2006.

LODEWYCKX, C. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.583-606, 2002.

LOPEZ, M.; ESTRADA, G. A.; CAMELO, M.; BALDANI, V.L.; BONILLA, R.R.B. Determination of physiological potential in phosphate solubilizing and mineralizing by nitrogen fixing bacteria. In: 12th International symposium on biological nitrogen fixation with non-legumes, Búzios, 2010.

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

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p.541-556, 2009.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Academia Brasileira de Ciências**, v.55, p.417–430, 1983.

MAGALHÃES, C. L.; DE SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2375-2379, 2001.

MAHESHKUMAR, K.S.; KRISHNARAJ, P.U; ALAGWADI, A.R. Mineral solubilising activity of *Acetobacter diazotrophicus*, a bacterium associated with sugarcane. **Current Science**, v.76, p.874-875, 1999.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESSNER, A.; BRANDL, M.T.; LINDOW, S.E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 11, p. 634-642, 1998.

MARSCHNER, H. Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A. e KAFKAFI, V. (Eds.). **Plants roots: The hidden half**. New York, Marcel Dekker, p.503-528, 1991.

MARTIN, H.V.; ELLIOTT, M.C.; Ontogenetic Changes in the Transport of Indol-3yl-acetic Acid into Maize Roots from the Shoot and Caryopsis. **Plant Physiology**, v.74, n.4, p.971-974, 1984.

McCULLY, M. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Aust. Journal of Plant Physiology**. v.28, p.983-990, 2001.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, FG.; BANGEL, E.V.; HESS, PN.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY**, v.29, p.315-33, 2006.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2a ed. UFLA, Lavras, Brasil. 2006, 729 p.

MORRIS, R. O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. In Davies, P.J. (ed.), **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**, Kluwer Academic Publishers, p.318-339, 1995.

MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; GUM, K.U.; PARK, K.D.; SON, C.Y.; SA, T.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.277-286, 2005.

NAGASAWA, T.; MAUGER, J. e YAMADA, H. A novel nitrilase, arylacetone nitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. Purification and characterization. **European Journal of Biochemistry**, v.194, p.765-772, 1990.

NARULA, N.; LAKSHMINARAYANA, K; TAURO, P. Ammonia excretion by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnolog Science**. v. 23, p. 467-470, 1980.

NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, J. T.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F, VENEGAS, V. H. A.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F; CANTARUTTI, R.B JÚLIO.; NEVES, C.L. (Eds.). **Fertilidade do Solo**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 471-550, 2007.

OLIVEIRA, E. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa* L.) inundado**. 1994. 135p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. PCRgenerated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v.248, p.183–187, 2005.

PARK, K.H.; LEE, O.M.; JUNG, H.I.; JEONG, J.H.; JEON, Y.D.; HWANG, D.Y.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.947–95, 2010.

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

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3795-3801, 2002b.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3795-3801, 2002c.

PEDRAZA, R.O.; BELLONE, C.H.; DE BELLONE, S.; BOA SORTE, P.M.B.; TEIXEIRA, K.R.D. Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.36-43, 2009.

PERIN, L. **Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Burkholderia* em Associação com Cana-de-açúcar e Descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 120 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

PERLEY, J.W.; STOWE, B.B. On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. **Plant Physiology**, v.41, p.234–237, 1966.

PII, Y.; CRIMI, M.; CREMONESE, G.; SPENA, A.; PANDOLFINI, T. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. **BMC Plant Biology**, v.7, p.1–11, 2007.

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

PUNSCHKE, K.; CARLOMAGNO, M.; LABANDERA, C. Potencial agronómico de bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas de arroz. In: V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina e el Caribe: Actas Uruguay, 2005.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de trigo e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.987–99, 2004.

RAJKUMAR, M.; LEE, K.J.; LEE, W.H.; BANU, J.R. Growth of *Brassica juncea* under chromium stress: Influence of siderophores and indole 3 acetic acid producing rhizosphere bacteria. **Journal of Environmental Biology**, v.26, n.4, p.693–699, 2005.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal Plant Physiology**, v.28, p.897–906, 2001.

RICHARDSON, A. E. Making microorganisms mobilize soil phosphorus. In: VALÁZQUEZ, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. (Eds.). First international meeting on microbial phosphate solubilization, Dordrecht: **Developments in Plant and Soil Science**, v.102, p.85–90, 2007.

ROBINSON, J .S.; SYERS, J .K. A critical evaluation of the factors influencing the dissolution of Gafsa phosphate rock. **Journal of soil science**, v.41, p.597-605, 1990.

RODRIGUES, L. S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciências do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

RODRIGUES, E. P. **Isolamento e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na produção de auxinas**. 2008. 142p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

RODRIGUES, E.; RODRIGUES, L.; DE OLIVEIRA, A.; BALDANI, V.; TEIXEIRA, K.; URQUIAGA, S.; REIS, V. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v.302, p.249–261, 2008.

RODRIGUEZ, N, **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v.17, p.319-339, 1999.

RODRIGUEZ ,H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal Biotechnology**, v.84, p.155–161, 2000.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552–555, 2004.

ROUWS, L.F.M.; MENESES, C.H.S.G.; GUEDES, H.V.; VIDAL, M.S.; BALDANI J.I.; SCHWAB S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, p. 325–330, 2010.

SABINO, Daniele Cristina Costa. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. 2007. 71p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2da ed., 3. vol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989, 253p.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001, 99p.

SARAVANAN, V.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; AS T. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, v.55, p.130–140, 2008.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n.2, p. 507-512, 1974.

SEKINE, A.; FUJIWARA, M. e NARUMIYA, S. Asparagine residue in the *rho* gene product is the modification site for botulinum ADP ribosyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.8602-8605, 1989.

SEVILLA, M.; KENNEDY, C. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.), **Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process**. Horizon Scientific Press, Wymondham, p. 737–760, 2000.

SHARMA, V.; KUMAR, V.; ARCHANA, G.; NARESH KUMAR, G. Substrate specificity of glucose dehydrogenase (GDH) of *Enterobacter asburiae* PSI3 and rock phosphate solubilization with GDH substrates as C sources. **Canadian Journal Microbiology**, v.51, p.477–482, 2005.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by growth-promotion rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191- 196, 1999.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Phosphate solubilization by microorganisms in the presence of different carbon sources. **Revista Brasileira de ciências do solo**, v.24, p.311–319, 2000.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p.205-240, 2004.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.425–448, 2007.

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

SPENCER, J.; RAGOUT, A. **Métodos microbiológicos**. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA, 2001, 335 p.

STEENHOUDT O.; VANDERLEYDEN J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, v.24, p.487–506, 2000.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.77, p.67–72, 1991.

STRADER, L.C. E BARTEL, B. A new path to auxin. **Natural Chemical Biology**, v.4, p.337–339, 2008.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

SULLIVAN, J. T.; PATRICK, H. N.; LOWTHER, W. L.; SCOTT, D. B.; RONSON, C. W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 8985-8989, 1995.

SUNDARAO-RAO, W.; SINHA, M. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and Rhizosphere. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.33, p.272-278, 1963.

SUNEJA, S.; LAKSHMINARAYANA, K.; NARULA, N. Optimization of cultural conditions for hydroxamate type of siderophore production of *Azotobacter chroococcum*. **Microbiology Research**, v. 149, p. 385–390, 1994.

SURANGE, S.; KUMAR, N. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.31, p.855-857, 1993.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na amazônia. **Acta Amazonica**, v.12, p.15-22, 1982.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRG, Departamento de Solos/Faculdade de Agronomia, 1995. 174p. (Boletim Técnico; 5).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Auxin: The Growth Hormone. In: **Plant physiology**, 2nd edn. Sinauer Associates Inc, Sunderland, p. 725–75, 2006.

TAMURA, K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

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

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

TRÂN VAN, V.; BERGE, O.; NGO KE, S.; BALANDREAU, J. HEULIN, T. Repeated beneficial effect of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, v.218, p.273–284, 2000.

TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v.308: p.554–557, 2005

WAKELIN, S. A.; GREGG, A. L.; SIMPSON, R. J.; LI, G. D.; RILEY, I. T.; MCKAY A.C. Pasture management directly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. **Pedobiologia**, v.52, p.237–251, 2009.

WANG, R.F.; CAO, W. W.; Cerniglia, C. E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.341–34, 1996.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi, **Advances in Agronomy**, v.69, p. 99–151, 2000.

WINCH, T. **Growing food a guide to food production**. Netherlands, Springer, p. 128-135, 2006.

VALAZCO, A., CASTRO, R. Estudio de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (variedad A'82) en condiciones de macetas. **Cultivos Tropicalis**, v. 20, n. 1, p. 5-9, 1999.

VIDEIRA, S. S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. 2008. 126p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo). - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

YANNI, Y.G.; EL-FATTAH FKA. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile delta. **Symbiosis**, v.27, p.319–331, 1999.

YOUNG, V.R.;PELLET, P.L. Plant proteins in relation to human protein and amino-acid nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.14, n.4, p.1203-1212, 1994.

YUWONO, T.; HANDAYANI, D.; SOEDARSONO, J. The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.715–721, 2005.

ZAIDI, A., KHAN, M. S., AAMIL, M. Bioassociative effect of rhizospheric microorganisms on growth, yield and nutrient uptake of greengram. **Journal of Plant Nutrition**. v.27, p.599–610, 2004.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, p.203-214, 2000.

6. ANEXOS

A. Meios de cultivo.

Meio JMV (BALDANI, 1996)

Manitol		5g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	6 ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	18 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
Extrato de levedura		100 mg

Ajustar o pH para 5,0 – 5,4.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,6 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 25 g l⁻¹ para sólido.

Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio (1,87g/l) (indicador opcional).

Meio LGI (MAGALHÃES et al., 1983)

Açúcar cristal (sacarose)		5g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	2 ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	6 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1 %	2 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0.1 %	2 ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1 %	1 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml

Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com solução de H₂SO₄ a 5 %

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

Adicionar 1,4 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 15 g l⁻¹ para sólido.

Meio LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995)

Açúcar Cristal (sacarose)		100 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	2 ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	6 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1 %	2 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0.1 %	2 ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1 %	1 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml

Ajustar o pH para 5,5 com solução de ácido acético a 1%.

Completar para 1000ml com água destilada.
Adicionar 1,3 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 25 g l⁻¹ para sólido.

Meio JNFb (DÖBEREINER et al., 1995)

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10 %	6 ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10 %	18 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		20 mg

Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%.
Completar para 1000 ml com água destilada.
Adicionar 1,7 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 17 g l⁻¹ para sólido.

Meio ASHBY (FENGLEROWA, 1965.)

Manitol	5g
Fosfato monobásico de potássio	0.2g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0.2g
Cloreto de sódio	0.2g
Sulfato de cálcio	0.1g
Carbonato de cálcio	5g

Ajustar o pH para 7.2.
Adicionar 15 g l⁻¹ para meio sólido
Completar com água destilada para 1000 ml.

Meio DYGS (RODRIGUEZ, 1986.)

Glicose	2 g
Ácido málico	2 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%:
pH 6,0 para *Herbaspirillum*.
pH 6,0 para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico).
pH 6,8 para *Azospirillum*.
Completar para 1000 ml com H₂O destilada.
Adicionar 15g l⁻¹ de agar para meio sólido.

Meio Batata-P (DÖBEREINER et al., 1995)

Batata cozida	200 g
Açúcar cristal	100 g
Solução de micronutrientes	2 ml
Solução de vitaminas	1 ml

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos. Paralelamente o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH. Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 ml. Adicionar e ajustar o pH com ácido acético até atingir pH 5,5.

Adicionar 25g l⁻¹ de agar para sólido.

Meios de cultura empregados no experimento de padronização de meios de cultura e seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato**Meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999)**

Glicose	10 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g

Ajustar o pH para 7

Para a formação do precipitado adicionar 100 ml K₂HPO₄ (10%), 50 ml CaCl₂ (10%) ou 5g l⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂.

Adicionar 15g l⁻¹ de agar para meio sólido.

Completar com água destilada para 1000 ml.

Meio SMRS1 (SUNDRA-RAO e SINHA, 1963)

NH ₄ (SO ₄) ₂	0,5 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,004 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,002 g
NaCl	0,2 g
Glicose	10 g
Extrato de levedura	0,5 g

Ajustar o pH para 7

Para a formação do precipitado adicionar 100 ml K₂HPO₄ (10%), 50 ml CaCl₂ (10%) ou 5g l⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂.

Adicionar 15g l⁻¹ de agar para meio sólido.

Completar com água destilada para 1000 ml.

Meio GL (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) e GL modificado

Glicose	10g
Extr. Lev	2g

Ajustar o pH para 5,8 e para GL modificado 5,5

Para a formação do precipitado adicionar 100 ml K_2HPO_4 (10%), 50 ml $CaCl_2$ (10%) ou $5g\ l^{-1}$ de $Ca_3(PO_4)_2$.

Adicionar $15g\ l^{-1}$ de agar para meio sólido.

Completar com água destilada para 1000 ml.

Meio NFB (DÖBEREINER et al., 1995) e NFB modificado

Ácido Málico		5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	sol 10%	2ml
NaCl	sol 10%	1ml
FeEDTA	sol 1,64%	4ml
Sol. Micronutrientes		2ml
Vitaminas		1ml
KOH		4,5g
Agar		15g
Extrc. Lev		50mg

Para o meio NFB modificado utilizar Glicose em lugar de Ácido málico

Ajustar o pH para 6,5

Para a formação do precipitado adicionar 100 ml K_2HPO_4 (10%), 50 ml $CaCl_2$ (10%) ou $5g\ l^{-1}$ de $Ca_3(PO_4)_2$.

Adicionar $15g\ l^{-1}$ de agar para meio sólido.

Completar com água destilada para 1000 ml.

B. Soluções

Solução salina para diluição seriada

K_2HPO_4	sol. 10 %	1 ml
$MgSO_4$	sol. 10 %	0,5 ml
NaCl	sol. 10 %	0,2 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	sol. 10 %	0,5 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	1 ml
Sol.De micronutrientes para meio de cultura		0,5 ml

Ajustar o pH para 6,5 com solução de H_2SO_4 a 5 %,

Completar com água destilada para 1000 ml.

Solução de micronutrientes para meio de cultura

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,200g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,235g
H_3BO_3	0,280g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,008g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,024g

Completar o volume para 200 ml com água destilada.

Solução de vitaminas

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 ml com água destilada,

Manter a solução em geladeira.

Reagente de Bradford (BRADFORD et al., 1976)

Coomassie blue G-90 diluído	111 mg
Etanol 95%	100 ml
ácido fosfórico 85%	100 ml

Adicionar todos os componentes e completar o volume a 1000 ml com água Mill-Q

C. Resultados da quantificação da solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP.

Tabela. Efeito das bactérias diazotróficas sobre a liberação de fosfato em meio líquido NBRIP e o índice de solubilização (IS) em meio sólido NBRIP.

Estirpe	2 dias		5 dias		8 dias		11 dias		14 dias	
	PO ₄ ³⁻ liberado (mg.l ⁻¹)	I.S.	PO ₄ ³⁻ liberado (mg.l ⁻¹)	I.S.	PO ₄ ³⁻ liberado (mg.l ⁻¹)	I.S.	PO ₄ ³⁻ liberado (mg.l ⁻¹)	I.S.	PO ₄ ³⁻ liberado (mg.l ⁻¹)	I.S.
ZA15	-1.86 ± 0.16*	-	15.04 ± 1.18	-	11.39 ± 1.17	-	12.38 ± 0.83	-	15.47 ± 0.81	-
H18	9.60 ± 2.19	-	16.49 ± 1.80	-	14.91 ± 0.78	-	15.23 ± 0.67	-	17.03 ± 0.96	-
AR1121	203.64 ± 12.32	-	204.68 ± 7.81	3.03 ± 0.42	143.39 ± 5.92	3.53 ± 0.38	96.34 ± 4.54	3.59 ± 0.37	19.81 ± 0.94	3.88 ± 0.23
AR1122	195.48 ± 20.20	2.29 ± 0.12	189.75 ± 3.98	3.35 ± 0.13	144.43 ± 8.14	3.47 ± 0.32	110.23 ± 2.35	4.05 ± 0.05	37.61 ± 1.79	4.35 ± 0.05
AR1125	205.03 ± 5.22	-	225.87 ± 12.29	2.52 ± 0.10	153.98 ± 4.67	2.88 ± 0.10	110.23 ± 8.98	2.88 ± 0.05	25.77 ± 2.53	2.78 ± 0.18
AR114	147.39 ± 12.50	-	229.69 ± 9.04	2.60 ± 0.09	161.97 ± 16.20	3.06 ± 0.13	141.92 ± 4.43	2.99 ± 0.21	112.14 ± 6.64	2.79 ± 0.11
VR2236	178.47 ± 13.36	-	205.90 ± 6.60	2.73 ± 0.24	163.53 ± 7.67	3.07 ± 0.21	114.40 ± 12.86	2.98 ± 0.18	28.17 ± 3.26	2.97 ± 0.05
PAL5	6.27 ± 0.63	2.69 ± 0.09	239.23 ± 4.34	3.36 ± 0.16	-3.51 ± 0.39	3.43 ± 0.36	-2.87 ± 0.34	3.26 ± 0.22	0.33 ± 0.05	3.13 ± 0.15

*Media ± desvio padrão (n=3)

-Ausência de halo

