

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

**Rizobactérias nativas da Caatinga com potencial para redução dos  
efeitos da seca em soja (*Glycine max* L.)**

**Ana Paula Andrade Braga**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2015**



**Ana Paula Andrade Braga**  
**Licenciada em Ciências Biológicas**

**Rizobactérias nativas da Caatinga com potencial para redução dos efeitos  
adversos da seca em soja (*Glycine max* L.)**

Orientador:  
Prof. Dr. ITAMAR SOARES DE MELO

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba**  
**2015**

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

Braga, Ana Paula Andrade

Rizobactérias nativas da Caatinga com potencial para redução dos efeitos da seca em soja (*Glycine max* L.) / Ana Paula Andrade Braga. - - Piracicaba, 2016.  
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Caatinga 2. Mimosa artemisiana 3. Rizobactérias 4. Promoção de crescimento de plantas 5. Estresse hídrico I. Título

CDD 633.34  
B813r

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

### *Dedico*

*A Deus, por sua fonte infinita de amor,  
sendo sempre, minha inspiração.*

*A minha amada família, por todo amor,  
incentivo e confiança, em todos os  
momentos e etapas da minha vida.*

*Obrigada por existirem. Amo vocês!*

### *Ofereço*

*Ao meu pai amado, Paulo. Pessoa que muito  
contribuiu e se orgulhou para esta nova fase  
profissional e pessoal que estava por vir.*

*Embora tenhas partido deste mundo, em mim tu  
continuas vivo dentro do meu coração, e em meus  
pensamentos. Saudades mil!!!*



## AGRADECIMENTOS

*À Deus, por nos conceber a vida, com sua divina criação;*

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

*Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, pela orientação, oportunidade e paciência, obrigada!*

*À Embrapa Meio Ambiente, por oferecer infraestrutura para o desenvolvimento do projeto de pesquisa;*

*Ao Dr. Armando Cavalcante Franco Dias por me incentivar a entrar no programa de pós-graduação, e pela confiança de me indicar ao Itamar, muito obrigada por tudo!*

*Ao Dr. Rafael L. F. Vasconcellos pela coorientação e auxílio durante desenvolvimento do projeto de pesquisa;*

*A minha amiga, irmã de alma: Carolina Pezzo Kmit. Agradeço imensamente seus conselhos, companheirismo e amizade. Foi um privilégio ter você ao meu lado durante esses anos de estudo. Te amo!;*

*Ao Mestre Stalin Sorango Flores, por colaborar grandemente com as análises estatísticas deste estudo. Muchas gracias, Chico! 'É nós' (haha);*

*Aos meus amigos de lazer e trabalho: Martinha, Carol, Bononi, Maike, Camila (Fofinha), Miroka, Josi, Emiliana, Harold (Malucão), Stalin, Rayza, Tânia (Formiguinha), Rose, Jorge, Juan, Fábio (Barbio tchê), Danilo, Dalton, Cassiano, Lúcio, André (Beterraba), Michelli e Regiane (Figura). Muito obrigada pelas ótimas risadas, momentos de descontração, passeios, festas, churrascos e muito mais. Valeu a pena cada momento, e com certeza ao lado de vocês foi muito mais prazeroso!! Vocês são sensacionais.*

*Aos colegas e funcionários do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) que fizeram parte diariamente dessa minha jornada, e tornaram meus dias, de alguma forma, mais especial: Vanessa (Japinha), Rafael (Vasco), Rodrigo (Taketas), Rodrigo Mendes, Suikinai (Suiki), Wallace, Ana Gabriele, Joane, Clederson, Leonardo (Léo), Tatiana (Tati), Tiago, João (Jãozin), Anamaria (Bonjour), Marcia Parma, Elke (Elkinha), Rosely. Meu sincero agradecimento por todo auxílio, colaboração e paciência;*

*Aos jogadores de tênis de mesa, com os quais me divertia e descontraia diariamente. Obrigada Mendes, César, Sandro, Laurinho, Fernando, Seu Antônio, Jãozinho, Luis Guilherme, Carlos, Carol, Elkinha, e os demais jogadores. Com certeza vocês também fizeram a diferença durante esses anos de estudo, tendo paciência ao me ensinarem a jogar e apreciar esse esporte. Valeu cada risada e jogada!*



*"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer."*

*Mahatma Gandhi*



## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE TABELAS .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	21
1.1 Objetivos e Hipóteses .....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 O risco natural da seca no mundo .....	23
2.1.1 Consumo de água no setor agrícola .....	24
2.2 Bioma Caatinga: aspectos fisionômicos e sua biodiversidade .....	25
2.3 Abordagens técnico-científicas para mitigação do estresse hídrico .....	28
2.3.1 Rizobactérias atuando como inoculantes para mitigação dos efeitos da seca .....	30
2.4 Mecanismos de ação das rizobactérias .....	31
2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico .....	31
2.4.2 Produção de fitohormônios .....	31
2.4.3 Presença da enzima ACC deaminase .....	32
2.4.4 Produção de exopolissacarídeos (EPS) .....	33
2.4.5 Formação de biofilme .....	33
2.4.6 Indução de resistência sistêmica (IRS) .....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3.1 Áreas de estudo e coleta do solo rizosférico da leguminosa <i>M. artemisiana</i> .....	37
3.2 <i>Glycine max</i> como isca para prospecção de diazotróficos .....	37
3.3 Isolamento de bactérias diazotróficas com características xerotolerantes .....	38
3.4 Caracterização genotípica de bactérias isoladas da rizosfera de soja .....	40
3.5 Bioensaio para seleção de bactérias associativas com <i>Glycine max</i> sob estresse hídrico .....	40
3.6 Identificação de rizobactérias promotoras de crescimento por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA .....	41
3.6.1 Análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA .....	42
3.7 Avaliação de bactérias com características de RPCP e tolerância ao estresse hídrico .....	43

3.7.1	Fixação biológica de nitrogênio em meio de cultivo seletivo para bactérias diazotróficas (NFb)	43
3.7.1.1	Bactérias com capacidade de crescimento em meio de cultura com reduzida atividade de água	43
3.7.2	Avaliação quantitativa da produção de ácido-indol-acético (AIA)	44
3.7.3	Formação de biofilme em diferentes condições de estresse	45
3.7.4	Avaliação qualitativa para produção de exopolissacarídeos (EPS)	46
3.7.5	Presença da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase	46
3.7.6	Produção de enzimas indutoras de resistência (IRS)	47
3.8	Promoção de crescimento de <i>Glycine max</i> sob estresse hídrico	48
3.8.1	Processo de desinfestação das sementes de <i>Glycine max</i>	48
3.8.1.1	Microbiolização das sementes de <i>Glycine max</i>	48
3.8.2	Bioensaios em casa de vegetação com <i>Glycine max</i>	48
3.9	Análise estatística	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Isolamento de rizobactérias diazotróficas tolerantes à seca	51
4.2	Caracterização molecular de isolados bacterianos por BOX PCR	52
4.3	Bioensaio para seleção de bactérias associativas com <i>Glycine max</i> em condições de estresse hídrico	54
4.4	Identificação das bactérias com características de RPCP e xerotolerantes por sequenciamento parcial do gene 16S Rrna	55
4.5	Bactérias com características de RPCP e tolerância ao estresse hídrico <i>in vitro</i>	60
4.5.1	Produção de AIA	60
4.5.2	Formação de biofilme	62
4.5.3	Produção de EPS	63
4.5.4	Produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase	65
4.5.5	Indução de Resistência Sistêmica (IRS)	66
4.5.6	Promoção de crescimento em <i>Glycine max</i>	70
5	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	77

## RESUMO

### **Rizobactérias nativas da Caatinga com potencial para redução dos efeitos adversos da seca em soja (*Glycine max* L.)**

No semiárido brasileiro, a vegetação predominante é a Caatinga, bioma ainda pouco explorado, que apresenta plantas e micro-organismos com alta resistência aos períodos de seca imposto pelo clima. Os micro-organismos associados às plantas deste bioma, são capazes de desenvolver mecanismos de proteção celular contra o estresse hídrico, assim como proteção vegetal contra a dessecação. O presente estudo buscou compreender as rizobactérias associadas a *Mimosa artemisiana* a fim de selecionar bactérias tolerantes à seca com características de promover o crescimento de plantas sob condições de estresse hídrico, diminuindo assim, os efeitos adversos impostos pela seca. As amostras de solo rizosférico foram coletadas ao longo da Caatinga, englobando os estados da BA e PE, totalizando quatro pontos de coleta. Com o uso de metodologias dependentes de cultivo, foi isolado bactérias com algumas características de promoção de crescimento de plantas diretos e/ou indiretos, como produção de AIA e fixação de nitrogênio. Além disso, linhagens capazes de crescer em meio com reduzida atividade de água e com mecanismos de proteção contra a dessecação, como, produção de EPS, biofilme, produção da ACC deaminase e indução de resistência sistêmica através das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Uma linhagem de *Paenibacillus* sp. e outra de *Bacillus* sp. foram capazes de promover o crescimento de soja sob condições de estresse hídrico, aumentando alguns parâmetros vegetais como, parte aérea e sistema radicular analisados.

Palavras-chave: Caatinga; *Mimosa artemisiana*; Rizobactérias; Promoção de crescimento de plantas; Estresse hídrico



## ABSTRACT

### **Native of Caatinga rhizobacteria with potential for reducing the adverse effects of drought in soybean (*Glycine max* L.)**

In the Brazilian semi-arid region, the predominant vegetation is the Caatinga biome, still little explored, which features plants and micro-organisms with high resistance to drought periods imposed by the climate. Microorganisms associated with plants in this biome are able to develop mechanisms of cellular protection against water stress, as well as vegetable protection against desiccation. The present study sought to understand the rhizobacteria associated with *Mimosa artemisiana* in order to select drought-tolerant bacteria with characteristics to promote the growth of plants under water stress conditions, thus reducing adverse effects imposed by drought. Rhizospheric soil samples were collected along the Caatinga, encompassing the States of Bahia and Pernambuco, totaling four collection points. With the use of farming-dependent methodologies, bacteria with some features of promotion of growth of direct and/or indirect plants such as AIA production and nitrogen fixation. In addition, able to grow amid strains with reduced water activity and mechanisms of protection against desiccation, such as production of EPS, biofilm, production of ACC deaminase and induction of systemic resistance through peroxidase enzymes and polyphenoloxidase. A strain of *Paenibacillus* sp. and *Bacillus* sp. were able to promote soybean growth under water stress conditions, increasing some parameters like vegetables, shoot and root system.

Keywords: Caatinga; *Mimosa artemisiana*; Rhizobacteria; Promotion of growth plants; Water stress





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Bioma Caatinga, representando os nove estados englobados no semiárido brasileiro.....	26
Figura 2 – Foto de <i>Mimosa artemisiana</i> , árvore comumente encontrada no semiárido brasileiro.....	28
Figura 2.1 – Foto do ramo de <i>Mimosa artemisiana</i> .....	28
Figura 3 - Esquema de resposta das plantas submetidas às condições de estresse abiótico.....	29
Figura 4 - Micrografia de fluorescência. Colonização e formação de biofilme por <i>P. putidas</i> em raiz de cevada .....	34
Figura 4.1- Formação de biofilme após 1 semana da colonização. Micrografia eletrônica.....	34
Figura 5 – Produção de Ácido-indol-acético (AIA). A escala representa uma ordem crescente na intensidade da coloração avermelhada, conforme a produção de AIA.....	44
Figura 6 – Formação de Biofilme. A escala representa uma ordem crescente na intensidade da solubilização do cristal violeta incorporado ao biofilme quantificado.....	45
Figura 7 - Dendograma de similaridade genotípica das bactérias obtidas durante o isolamento.....	53
Figura 8 - Tratamento com linhagem W201 comparado com a testemunha após 72 horas de seca. <i>Screening</i> realizado para seleção de RPCPs com características xerotolerantes.....	55

- Figura 9 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o filo Firmicutes, comparando as linhagens selecionadas no teste de tolerância à seca, com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído utilizando o programa Mega 5, com método de distância Likelihood. A barra indica a distância em nucleotídeos. *Staphylococcus sciuri* foi utilizado como grupo externo.....57
- Figura 10 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o filo Bacteroidetes, comparando as linhagens selecionadas no teste de tolerância à seca, com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído utilizando o programa Mega 5, com método de distância Likelihood. A barra indica a distância em nucleotídeos. *Parapedobacter soli* foi utilizado como grupo externo.....59
- Figura 11 - Formação de AIA por isolados que apresentam característica para tolerância à seca. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para as três repetições. As letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.....61
- Figura 12 - Formação de biofilme por isolados com características para tolerância à seca em meio de cultura TSB (10%) e TSB(10%) + 0,30M de sorbitol. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para as três repetições. As letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.....62
- Figura 13 - Teste qualitativo da produção de EPS. A) Teste em placa com meio de cultura adicionado de sacarose em pH 7,5. B) Confirmação da produção de EPS em álcool etílico, onde o EPS é precipitado e não dissolvido... 64
- Figura 14 - Expressão enzimática de peroxidase (PO) em folhas e raízes de soja sob condições de estresse hídrico. 1ª coleta: dois dias consecutivos de estresse; 2ª coleta: cinco dias de estresse hídrico consecutivos..... 68

- Figura 15 - Expressão enzimática de polifenoloxidase (PPO) em folhas e raízes de soja sob condições de estresse hídrico. 1ª coleta: dois dias consecutivos de estresse; 2ª coleta: cinco dias de estresse hídrico consecutivos.....69
- Figura 16 - Promoção de crescimento de *Glycine max* sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo).....70
- Figura 17- Promoção de crescimento de *Glycine max* sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo).....71
- Figura 18 - Reação de plantas de soja à inoculação de *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. sob estresse hídrico. A) Efeitos da seca em plantas inoculadas com *Bacillus* sp. (W201) (30% da capacidade de campo) comparadas com a planta controle. B) Sistema radicular de soja contendo inóculo de *Paenibacillus* sp. (W610) comparado com o sistema radicular de planta controle.....72



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenada geográfica dos pontos de coleta durante o período de seca na Caatinga do Semiárido Nordestino.....	37
Tabela 2 - Meio de cultivo NFB livre de nitrogênio para isolamentos de bactérias fixadoras de nitrogênio.....	39
Tabela 2.1 - Meio de cultivo livre de nitrogênio: Winogradsky.....	39
Tabela 3 - Lista dos sessenta e oito isolados com capacidade de crescer em condições de estresse hídrico <i>in vitro</i> . Crescimento bacteriano a 28°C com atividade de água correspondente a 0,963 $A_w$ e 0,919 $A_w$ .....	51
Tabela 4 - Linhagens que foram capazes de mitigar os efeitos impostos pela seca em plantas de soja por até 96 horas após estresse.....	54
Tabela 5 - Identificação das bactérias com características de RPCP e xerotolerantes por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	56
Tabela 6 - Caracterização dos isolados quanto à produção de EPS de acordo com o tamanho do halo com aspecto mucoide, sendo + (pouca produção - halo de EPS $\leq$ 10 mm $\emptyset$ ), ++ (média produção - halo de EPS de 10-14 mm $\emptyset$ ) +++ (ótima produção - halo de EPS $\geq$ 14 mm.....	64
Tabela 7 - Isolados que apresentaram crescimento em meio de cultivo contendo Amino-ciclopropano-carboxílico (ACC) como única fonte de nitrogênio, (+) representa o resultado positivo para a enzima.....	65



## 1 INTRODUÇÃO

O mundo enfrenta atualmente uma variedade de crises ecológicas e sociais; a escassez de água alcança mais de 30 países (TUNDISI, 2008). As secas são reconhecidas como uma catástrofe ambiental com maior impacto sobre a vida em todo o planeta, e estão classificadas em primeiro lugar entre os perigos naturais em termos de número de pessoas afetadas (WILHITE, 2000). As regiões áridas e semiáridas, sempre sofreram períodos de degradação devido ao clima seco. As maiores consequências incluem a redução da produção agrícola, degradação do solo, alterações do ecossistema e deficiência na captação de água. A longo prazo, tais fatores agrava o processo de desertificação (MARENGO, BERNASCONI, 2015), causando aumento da demanda de água pelas culturas agrícolas.

O setor agrícola é imprescindível para o abastecimento mundial de alimentos, porém, de acordo com Organização das Nações Unidas (ONU), a agricultura irrigada é a atividade humana que demanda maior quantidade de água. Em escala mundial, estima-se que o uso da água no setor agrícola responda por cerca de 80% das derivações de água. Com este cenário, aumenta-se a preocupação e a busca por alternativas que promovam o crescimento de plantas em regiões com baixa pluviosidade, ou que reduzam o consumo de água pelas culturas.

A evolução, favoreceu a seleção de mecanismos de ação à adaptação e sobrevivência de organismos em ambientes com pouca disponibilidade de água. No semiárido brasileiro por exemplo, a vegetação predominante é a Caatinga, bioma pouco explorado, que apresenta plantas e micro-organismos com alta resistência aos períodos de seca imposto pelo clima. Os micro-organismos apresentam mecanismos de proteção celular contra o estresse hídrico, muitas vezes tendo como efeito secundário a proteção vegetal contra a dessecação.

Deste modo, foi objetivo desse trabalho a obtenção e seleção de rizobactérias do semiárido brasileiro, tolerantes à seca, que sejam capazes de promover o crescimento de plantas de soja sob condições de estresse hídrico.

## 1.1 Objetivos

De acordo com o cenário descrito anteriormente, o estudo teve como objetivo principal, estudar as bactérias associadas à leguminosa *Mimosa artemisiana* nativa da Caatinga, visando aplicação para redução dos efeitos adversos do estresse hídrico. Nesse sentido, os objetivos específicos foram os seguintes:

- Isolar, selecionar e identificar rizobactérias da Caatinga com características para tolerância à seca;
- Verificar os mecanismos de ação dos isolados para tolerância à seca, como: produção de exopolissacarídeos (EPS), biofilme e ACC deaminase;
- Identificar mecanismos de ação para promoção de crescimento de plantas: produção de ácido-indol-acético (AIA) e fixação biológica de nitrogênio
- Determinar a indução de resistência sistêmica pelas rizobactérias selecionadas através das enzimas peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO).

Algumas questões biológicas foram realizadas para se alcançar os objetivos do estudo, sendo elas:

- As bactérias isoladas do semiárido brasileiro possuem características de tolerância à seca?
- As bactérias tolerantes à seca possuem mecanismo diretos e/ou indiretos para promoção de crescimento de plantas?
- As bactérias tolerantes à seca, com mecanismos de promoção de crescimento de plantas, são capazes de promover o crescimento de soja (*Glycine max* L.) sob condições de estresse hídrico?



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O risco natural da seca no mundo

As secas são reconhecidas como a catástrofe ambiental com maior impacto sobre a vida em todo o planeta, e estão classificadas em primeiro lugar entre os perigos naturais em termos de número de pessoas afetadas (WILHITE, 2000). Isso tem chamado a atenção de muitos ambientalistas, pois este fenômeno pode ocorrer em praticamente todas as zonas climáticas. A baixa precipitação pluviométrica, altas temperaturas, ventos fortes e baixa umidade relativa, estão diretamente relacionados à ocorrência das secas (MISHRA; SINGH 2009).

De todos os perigos naturais, as secas tiveram o maior impacto negativo no século XX, e com a intensificação do aquecimento global, muitos estudos têm demonstrado que a seca pode tornar-se mais grave e contínua no século XXI (DAI, 2004). Grandes problemas socioeconômicos devido à seca foram relatados nas últimas décadas. Ao longo dos anos 1980 a 2003 a seca nos Estados Unidos foi responsável por uma perda de aproximadamente 144 bilhões de dólares (ROSS e LOTT, 2003). Nos últimos anos intensivas secas têm sido observadas em todos os continentes, afetando grandes áreas da Europa, África, Ásia, Austrália, América do Sul, América Central e América do Norte (LE COMTE, 2005)

As regiões áridas e semiáridas, sempre sofreram períodos de degradação devido ao clima. As maiores consequências incluem a redução da produção agrícola, degradação do solo, alterações do ecossistema e deficiência na captação de água. A longo prazo, tais fatores agrava o processo de desertificação (MARENGO; BERNASCONI, 2015). Segundo dados do UNIAGUA (2012), o Brasil é o maior depositário natural de águas doces do planeta, e detém cerca de 11,6% de toda água doce superficial do mundo, sendo que 70% da água disponível está localizada na Amazônia, onde se encontra a menor densidade populacional. A região mais afetada é o Nordeste brasileiro, região com altos índices de aridez e mais pobre do Brasil, que concentra cerca de 30% da população do país e dispõe apenas de 5% da água doce (AUGUSTO et al., 2012).

O mau uso dos recursos hídricos, a poluição de mananciais e a escassez de chuvas, estão fazendo com que outras regiões também sejam afetadas, como por exemplo, o Sudeste do Brasil, que enfrenta uma das piores crises hídricas

da história. Após o verão mais quente e seco em sete décadas, os níveis de água dos principais reservatórios que abastecem a região metropolitana de São Paulo, reduziram significativamente. O sistema Cantareira, um dos principais reservatórios da metrópole, chegou a 5% da sua capacidade, o mais baixo desde que foi criado, em 1974 (BBC BRASIL, 2014). Diversas medidas emergenciais estão sendo providenciadas, porém, a situação é alarmante (CORONATO e IMERCIO, 2014).

Estresses abióticos, como as secas, normalmente são os principais fatores responsáveis por reduzir significativamente rendimento em lavouras, restringindo as latitudes e os solos onde culturas de importância comercial podem ser cultivadas. As implicações na agricultura são drásticas, já que não afeta somente os agricultores, mas também toda a sociedade, sendo a ameaça mais crítica para a segurança alimentar mundial (FARIAS et al., 2001). Sabemos que a água desempenha o papel principal de absorver nutrientes do solo e transportá-los para diferentes partes da planta. O primeiro efeito prejudicial da seca ocorre na germinação das sementes (HARRIS et al., 2002). Se o déficit de água se torna mais grave, a maquinaria fotossintética é danificada, há alteração na expressão gênica danificando a síntese proteica, além de falha na abertura estomática, ocasionando o retardo do crescimento e da produção vegetal (SIDDALINGASWAMY et al., 2008).

De acordo com Rosegrant (2002), no ano de 1995, foram retirados 3.906 km<sup>3</sup> de água para fins da segurança alimentar, crescimento industrial e sustentabilidade ambiental em todo o mundo. Estima-se que em 2025 a terra comportará aproximadamente 8 bilhões de pessoas, e o volume da água que será retirada para o uso doméstico, industrial e agropecuária, aumentará aproximadamente 50%.

### **2.1.1 Consumo de água no setor agrícola**

Em escala mundial, estima-se que o uso da água no setor agrícola responda por cerca de 80% das derivações de água. No Brasil, esse valor supera os 70% (SHIKLOMANOV, 2003). A irrigação adequada, exige água de boa qualidade, e implica obras de regularização de vazões, que podem interferir no regime fluvial e no meio ambiente.

O uso da água tem crescido a uma taxa duas vezes maior que o crescimento da população ao longo do último século. De acordo com o Plano Nacional de Recursos Hídricos, a eficiência do uso da água na agricultura irrigada no Brasil é em cerca de 64%, sendo que os 36% restantes da água são perdidos por fenômenos como a evaporação ou má condução por distribuição nas infraestruturas hidráulicas, provocando um grande desperdício no uso da água na agricultura (FERNANDES et al., 2008). Uma redução de 10% no desperdício poderia abastecer o dobro da população mundial (FAO, 2011).

Nas projeções elaboradas pelo Instituto de Gestão das Águas - IWMI, embora o Brasil seja um dos países com maior disponibilidade hídrica média anual por habitante, está inserido na categoria de países com escassez econômica de água. Dispõe de quantidade suficiente de água para atender às suas necessidades, mas possui regiões semiáridas com má distribuição espacial e temporal de precipitações, o que traz a necessidade de investimentos na construção de sistemas de condução, como forma de garantir a utilização da água no seu desenvolvimento sustentável.

## **2.2 O Bioma Caatinga: aspectos fisionômicos e sua biodiversidade**

Ambientes semiáridos são bem distribuídos e chegam a ocupar cerca de 40% de todo o globo, sendo encontrados em todos os continentes. Nesses ambientes, a aridez pode ser por período integral ou sazonal (árido/semiárido). No entanto, mesmo em lugares onde o clima não é considerado seco, micro-nichos podem apresentar tais características, como superfícies rochosas, onde o sol incide durante boa parte do dia (BELNAP, 2012).

O clima semiárido tem por característica, baixa pluviosidade e umidade, além de apresentar temperaturas relativamente elevadas. No Brasil, o representante deste tipo de clima é o bioma Caatinga (AB'SÁBER, 2003). O semiárido nordestino, ocupa aproximadamente 1 milhão de km<sup>2</sup>, cobrindo cerca de 8% de todo território brasileiro. Possui uma população de 20 milhões de habitantes, sendo um dos maiores e mais densamente habitados semiáridos do mundo (SAMPAIO et al., 2008).

A Caatinga é localizada quase exclusivamente no nordeste do Brasil, englobando apenas uma parte de Minas Gerais (Figura 1). Este bioma é

reconhecido por possuir inúmeros ambientes, com heterogeneidade de clima, vegetação e condições edáficas (GIULIETTI et al., 2006).



Figura 1 - Mapa do Bioma Caatinga, representando os nove estados englobados no semiárido brasileiro. Fonte: Agência Nacional de Águas (ANA). 2010

É uma região do globo terrestre bastante influenciada pela incidência do sol e pelos ventos, que acabam sendo a principal causa de erosão, transporte e deposição de sedimentos. No Brasil, os ventos alísios são os principais responsáveis pela característica semiárida, por empurrar massas de ar estáveis para o sudeste (TEIXEIRA et al., 2000)

O semiárido nordestino, é uma região extremamente alterada pela exploração inadequada de seus recursos, obtendo frágeis ecossistemas com grande possibilidade degradadora (ARAUJO E SOUZA, 2011). Apesar de sua grande extensão, a Caatinga é o bioma brasileiro menos estudado, devido à falsa ideia de possuir uma baixa biodiversidade, limitando as pesquisas às principais cidades da região. Além disso, apenas 2% de todo o seu território é coberto por unidades de conservação, sendo assim, o bioma menos preservado e explorado do país (LEAL et al., 2005). Por mais que a Caatinga esteja bastante alterada devido à atuação antrópica, este bioma é bastante rico e variado em relação à sua biodiversidade, com ocorrência de endemismo em várias espécies, principalmente de sua

vegetação, podendo ser encontrado nesse ambiente quantidades expressivas de táxons raros (GIULIETTI et al., 2004).

A Caatinga é uma palavra derivada do tupi (“Kaa” = Mata, “Tinga” = Branca – mata branca) e recebe este nome pela característica de sua vegetação, que em parte do ano, devido à estiagem tem coloração branca. A Caatinga pode ser dividida fitogeograficamente em dois tipos: agreste e sertão (VEBLEN; YOUNG; ORME, 2007).

A região mais próxima ao mar, comporta árvores de 10m ou mais de altura. Esses vegetais acabam sendo mais favorecidos pela umidade proveniente do oceano. Já as regiões mais distantes, possuem o estrato arbóreo relativamente baixo, decíduos na época seca, com plantas de até 5m de altura. Os arbustos e árvores possuem caule fino e espinhoso. A vegetação predominante em áreas mais secas é acentuada, de Caatinga hiperxerófila (SÁ; RICHÉ; FOTIUS, 2003). As famílias botânicas como as cactáceas e leguminosas encontram-se bem representadas neste bioma (QUEIROZ, 2006).

A Caatinga com suas características bastante seletivas, fez com que o semiárido brasileiro se compusesse de vida (flora e fauna) bem adaptada a tais condições. Dessa forma, as principais adaptações sofridas pela flora regional são: folhas transformadas, cobertura de cera, raízes axiais com capacidade perfuração do solo com areia, cascalho e lama, e raízes tuberculadas para armazenamento de energia (FERNANDES; MEDEIROS, 2009). Portanto, este bioma é composto por uma vegetação xerófita, caducifólia e plantas espinhosas (FERNANDES; BEZERRA, 1998).

De toda a vegetação encontrada na Caatinga, a família mais numerosa em relação ao endemismo é a Leguminosae, composta por 80 espécies. Essa família, mais representada no bioma, compreende três subfamílias, sendo: Faboideae, Caesalpioidae e Mimosoidae (QUEIROZ, 2006). As Figuras 2 e 2.1 ilustram uma espécie de leguminosa bem abundante nesse ambiente: *Mimosa artemisiana*, conhecida popularmente como Jurema branca.



Figura 2 - *Mimosa artemisiana*



Figura 2.1 - Ramo de *Mimosa artemisiana*

O gênero *Mimosa* possui mais de 540 espécies, que podem ser encontradas em diferentes ambientes, desde florestas até áreas mais abertas de savanas, Caatinga e até em regiões desérticas do México (SIMON et al., 2011). Os seus principais centros de diversidade localizam-se na América do Sul. No Brasil, o gênero é representado por 323 espécies (DUTRA; MORIM, 2010), das quais 38 ocorrem na Caatinga (QUEIROZ, 2006).

### 2.3 Abordagens técnico-científicas para mitigação do estresse hídrico

A seca é o estresse ambiental mais preocupante nos últimos tempos, e tem exigido muitos esforços de ambientalistas, na busca de novas técnicas e estratégias para a melhoria na produtividade agrícola sob condições de escassez hídrica (TODAKA; SHINOZAKI; YAMAGUCHI, 2015). O tempo evolutivo, naturalmente favoreceu a seleção de mecanismos de adaptação e sobrevivência de organismos que vivem em ambientes com pouca disponibilidade de água. O estudo desse processo natural foi fundamental para a pesquisa científica, proporcionando ganhos significativos na compreensão das respostas fisiológicas e moleculares de plantas tolerantes (CATTIVELLI et al., 2008).

Os estresses abióticos, de acordo com Fritsche-Neto et al. (2011), podem acarretar respostas nas plantas a partir de alterações da expressão gênica e do metabolismo celular. A severidade, duração e tempo de exposição com que um estresse é imposto, influenciam a resposta das plantas ao estresse hídrico; os tecidos afetados, a fase de desenvolvimento e o genótipo vegetal também podem influenciar (Figura 3). Como consequência do estresse, há uma série de respostas com relação ao crescimento e desenvolvimento das plantas, como redução da

fotossíntese, da área foliar, da clorofila, da massa seca e outros vários processos fisiológicos que acabam por reduzir a produção agrícola de muitas culturas (BEZERRA et al., 2003).

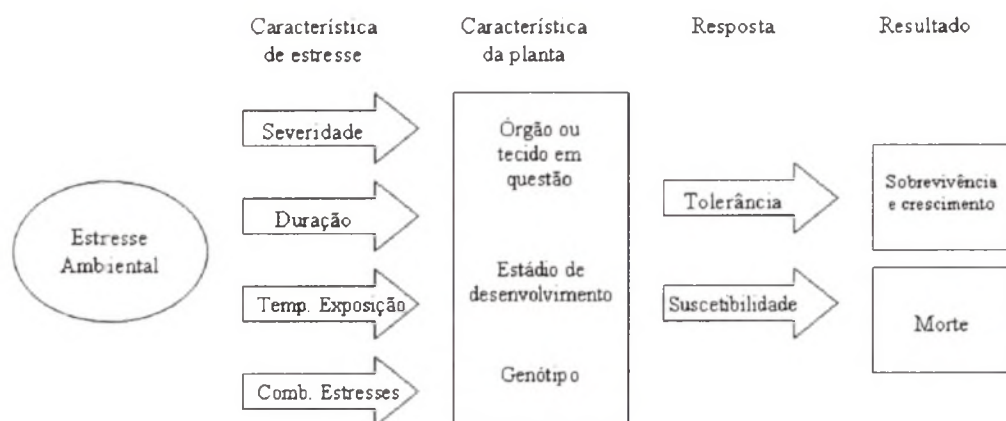


Figura 3 - Esquema de resposta das plantas submetidas a condições de estresse abiótico

Fonte: Fritsche-Neto et al. (2011)

Os programas de melhoramento genético em plantas, buscam reunir em um único cultivar, diversas características favoráveis que o destaquem das já existentes no mercado. Diante disso, os melhoristas de plantas, utilizam o material genético disponível de interesse para o melhoramento mais eficiente no desenvolvimento de novas cultivares para o setor produtivo e sustentável de culturas (NEPOMUCENO et al., 2011). A proposta inicial dos programas de melhoramento genético em plantas, está sempre relacionada a altas produtividades e resistência a fatores bióticos e abióticos, entre outros atributos. O resultado de melhoramento genético é obtido através da alteração na constituição genética da mesma, sendo acompanhada na maioria das vezes por uma alteração nas propriedades fisiológicas e frequentemente por mudanças na sua morfologia, anatomia e bioquímica (WINKLER, 2006).

### 2.3.1 Rizobactérias atuando como inoculantes para mitigação dos efeitos da seca

Outra abordagem que vem sendo considerada relevante para a mitigação dos efeitos adversos da seca, é o uso de micro-organismos tolerantes ao estresse hídrico. O uso de micro-organismos em conjunto as plantas, é uma estratégia relativamente barata, podendo ser utilizada para a recuperação de regiões áridas e semiáridas. De acordo com Vessey (2003), as espécies de bactérias que se proliferam na rizosfera, estimulam o crescimento vegetal por diversos mecanismos, e são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de planta (RPCP). As rizobactérias são essenciais na reciclagem de nutrientes e, conseqüentemente, cruciais para a fertilidade do solo (GLICK, 2012); são comumente usadas como biofertilizantes para melhorar o crescimento, a produtividade agrícola e até mesmo auxiliar a planta em condições estressantes (GHEVARIYA; DESAI, 2014) mitigando efeitos negativos impostos por diversos tipos de estresse ambiental (KUMAR et al., 2012).

Biofertilizantes são definidos como produtos que contêm células vivas ou latentes de estirpes eficientes na fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fosfato, ou micro-organismos celulolíticos. Quando aplicados nas sementes ou no solo, aumentam o número de micro-organismos benéficos e a taxa de processos microbianos, disponibilizando grandes quantidades de nutrientes que podem ser facilmente assimiláveis pelas plantas, proporcionando também tolerância ao estresse hídrico de plantas que se desenvolvem em ambientes áridos, com pouca disponibilidade de água (MARULANDA et al., 2009).

Inoculantes bacterianos já são comercializados, e apresentam grande eficiência agrônômica; porém, poucos estudos mostram a inoculação de rizobactérias que conferiram a tolerância à seca em plantas. Timmusk e Wagner (1999) foram os primeiros a mostrar a inoculação de *Paenibacillus polymyxa* em plantas de *Arabidopsis thaliana*, em que ocorreu a indução de genes ligados a tolerância à seca. De acordo com Marulanda et al. (2009), a inoculação de *Pseudomonas putida* e *Bacillus megaterium* em plantas de *Trifolium repens* sob condições de estresse hídrico foi benéfica, sendo observado aumento significativo na biomassa e sistema radicular das planta, aumentando também o teor de água, tendo um efeito promissor, principalmente para a aplicação em plantas cultivadas em solos com limitação de água. Outros trabalhos podem ser citados, como o de



Kavamura et al (2013), em que houve isolamento, a partir da rizosfera de plantas da Caatinga de uma linhagem de *Bacillus* sp. capaz de mitigar os efeitos da seca impostos em plantas de milho, aumentando significativamente sua biomassa, área foliar e tamanho da haste. Os autores apontam que as bactérias isoladas de ambientes secos, são mais tolerantes ao tipo de estresse, e nos mostram que são capazes de aumentar o teor de água na planta sob estresse hídrico, promovendo também seu crescimento, devido a alguns mecanismos de ação encontrados nos isolados.

## 2.4 Mecanismos de ação das rizobactérias

### 2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico

O nitrogênio é o nutriente mais limitante para o crescimento e produtividade das plantas. No entanto, o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) não pode ser assimilado desta forma pelos organismos, é necessário a conversão do N<sub>2</sub> à amônia, podendo assim, ser assimilado pelas plantas. A conversão mais eficiente, é através da fixação biológica do nitrogênio (FBN), que é realizada por grupos específicos de bactérias que possuem a enzima nitrogenase (BISWAS; GRESSHOFF, 2014). A fixação biológica do nitrogênio, geralmente é categorizada como uma relação simbiótica entre a bactéria e a planta, como por exemplo a simbiose entre bactérias do gênero *Rhizobium* com plantas leguminosas. Porém, a fixação biológica do N, também pode ocorrer em plantas não-leguminosas de forma assimiótica, com bactérias de vida livre no solo, como por exemplo as do gênero *Azospirillum*, *Azobacter*, *Gluconoacetobacter* entre outros. A fixação biológica de nitrogênio é um tanto complexa, sendo necessários vários genes *nif* (*nifH*, *nifD*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*) na genética dos micro-organismos para a síntese da nitrogenase (FRANCHE et al., 2009).

### 2.4.2 Produção de fitohormônios

A principal auxina nas plantas é o ácido indol-3-acético (AIA), hormônio vegetal capaz de realizar processos celulares e de desenvolvimento dos vegetais (KENDE; ZEEVART, 1997). As bactérias presentes no solo também são capazes de

produzir este hormônio, de modo a estabelecer um elo de comunicação com a planta hospedeira (BIANCO et al., 2006). Os micro-organismos que produzem AIA, são muito interessantes, pois podem auxiliar a planta em seu desenvolvimento, quando as condições para isso se encontram desfavoráveis. Algumas bactérias são conhecidas por produzirem AIA, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular por meio do aumento da absorção de nutrientes essenciais para o crescimento de plantas (LAMBRECHT et al., 2000). Kavamura et al. (2013) isolaram bactérias associadas às plantas do semiárido brasileiro capazes de produzirem AIA, auxiliando assim, o desenvolvimento vegetal. Entre os isolados, bactérias do gênero *Pantoea*, *Arthrobacter* e *Bacillus* produziram quantidades significativas deste hormônio.

#### 2.4.3 Presença da enzima ACC deaminase

O etileno é uma molécula orgânica produzida espontaneamente pelos vegetais, sendo necessário ao desenvolvimento normal de plantas. Essa molécula tem como função atuar como regulador de crescimento, quando em baixas concentrações (GLICK, 2005). A produção de etileno pode ser aumentada em condições estressantes podendo levar a inibição do crescimento radicular, sendo assim, prejudicial quanto em altas concentrações (JACKSON, 1991). Algumas RPCPs possuem uma enzima denominada de ACC deaminase, capaz de clivar o composto 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), que é o precursor imediato de etileno, reduzindo assim os níveis elevado desse composto, consequentemente reduzindo os efeitos negativos às plantas (GLICK, 1995).

Shaharoon et al. (2006), ao isolarem bactérias da rizosfera de milho em meio de cultivo contendo ACC como única fonte de nitrogênio, observaram uma correlação positiva entre a produção de ACC deaminase e o alongamento radicular quando realizaram testes de promoção de crescimento em milho sob condições axênicas. Com isso, concluíram que a seleção de bactérias pela presença da enzima ACC deaminase é uma ferramenta eficiente na escolha de RPCPs, podendo ser utilizadas como biofertilizante para auxiliar no crescimento vegetal.

#### 2.4.4 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

A grande maioria dos micro-organismos possuem habilidade de sintetizar polissacarídeos e excretar polímeros para fora das células, com várias funções. Os exopolissacarídeos são definidos como polissacarídeos extracelulares, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou excretados para o meio (SEESURIYACHAN et al., 2012).

A produção de EPS pelos micro-organismos, interagindo com as plantas, podem auxiliar na sobrevivência do vegetal em diferentes estresses ambientais, como por exemplo, estresse hídrico, salino, variação de temperatura, entre outros (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Esse composto, também possibilita a bactéria, aderência e colonização às superfícies sólidas onde há o acúmulo de nutrientes, ressaltando ainda que o EPS envolve as membranas das células protegendo-as do dessecação e ajudando na fixação de minerais e nutrientes próximos a bactéria (BARRETO et al., 2011; LIU et al., 2013).

Chang et al. (2007), sugeriram que uma linhagem de *Pseudomonas putida* pode produzir um EPS denominado de alginato, capaz de influenciar o desenvolvimento de biofilme e respostas a condições limitantes de água. Estas respostas, facilitam a manutenção de um microambiente hidratado, protegendo a comunidade contra a desidratação. Pensando na exploração desses micro-organismos, principalmente as RPCPs, novos compostos de importância comercial, podem ajudar no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas na agricultura (SILVI et al., 2013).

#### 2.4.5 Formação de biofilme

O biofilme pode ser definido como comunidades microbianas que estão aderentes umas às outras ou a uma superfície, sendo composta por carboidratos extracelulares, proteína ou até mesmo DNA (BRANDA et al., 2005). Sua formação pode incluir uma única espécie ou várias espécies microbianas, podendo se formar em uma variedade de superfícies bióticas e abióticas. Os biofilmes, além de auxiliar no suporte contra as forças físicas, ajudam na sobrevivência a várias condições de estresse (PARSEK; FUQUA, 2004), como por exemplo, resistência a antibióticos,

proteção contra fitopatógenos, proteção contra a dessecação e agentes estressantes antimicrobianos (MONIER; LINDOW, 2003).

Quando há condições externas desfavoráveis, a formação de biofilme é desencadeada, modificando a expressão gênica. O biofilme quando formado, altera o microambiente dos seus habitantes alterando a expressão de vários genes, levando à maturação do biofilme (JEFFERSON, 2004).

Timmusk et al. (2005) observaram através de microscopia de fluorescência (Figura 4A) e microscopia de varredura (Figura 4B), a colonização e formação de biofilme por *Paenibacillus polymyxa* em raízes de plantas.

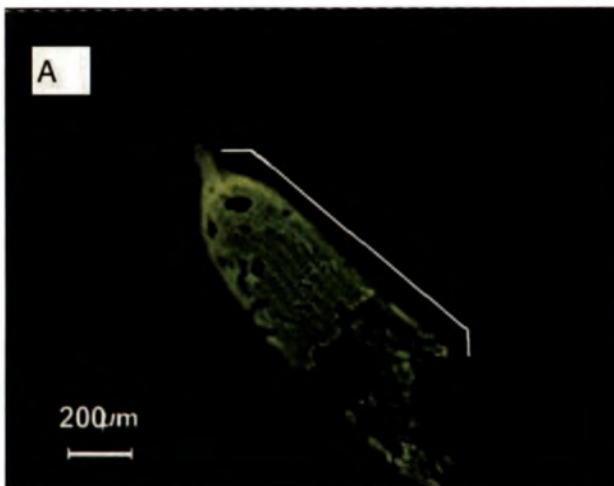


Figura 4 - A) Micrografia de fluorescência. Colonização e formação de biofilme por *P. putidas* em raiz de cevada

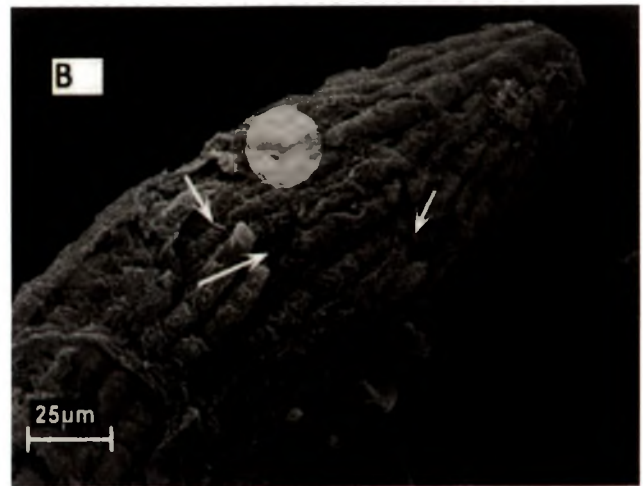


Figura 4 - B) Formação de biofilme após 1 semana da colonização. Micrografia eletrônica  
Fonte: Timmusk et al. (2005)

#### 2.4.6 Indução de resistência sistêmica (IRS)

Rizobactérias promotoras de crescimento de planta, não são usadas somente para promover o crescimento vegetal, mas também, para induzir a resistência sistêmica de plantas (IRS), contra vários fitopatógenos e estresses ambientais (ZHANG et al., 2010).

As plantas são capazes de proteger-se contra fitopatógenos e agentes estressantes, produzindo uma ampla gama de compostos antimicrobianos e enzimas de redução oxidativa, as quais estão diretamente relacionadas com a defesa. Enzimas tais como, peroxidases (PO) e polifenol oxidase (PPO), têm sido implicadas

na resistência e proteção celular (AMIL-RUIZ et al., 2011). Peroxidases estão diretamente envolvidas na degradação de níveis citotóxicos de peróxido de hidrogênio, gerado em tecidos vegetais como resultado de agentes estressantes. Já a polifenol oxidase, catalisa a oxidação de compostos fenólicos altamente tóxicos em quinonas, que desempenham um papel importante na resistência de plantas (RICHTER et al., 2012).

Segundo Thakker, Patel e Dhandhukia (2013), a biossíntese de peroxidases e polifenol oxidases por RPCPs, assim como outras enzimas relacionadas a indução de resistência sistêmica, desempenham um papel crucial no grau de determinação da resistência do hospedeiro.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Áreas de estudo e coleta de solos rizosféricos da leguminosa *Mimosa artemisiana*

As amostras foram coletadas em quatro pontos diferentes do semiárido brasileiro no período de seca (abril de 2014). Os locais de coleta de solo rizosférico de *Mimosa artemisiana* (Jurema branca) foram delimitados ao longo da vegetação do bioma Caatinga, englobando os estados da Bahia (BA) e Pernambuco (PE), totalizando quatro pontos de coleta (Tabela 1). Todas as amostras foram coletadas em quintuplicatas, totalizando 60 amostras.

Tabela 1 - Coordenada geográfica dos pontos de coleta durante o período de seca na Caatinga do Semiárido Nordestino

PONTOS Cidade/Estado	COORDENADAS		ALTITUDE	SOLO	TEMP SOLO	LOCAL
	S	W				
1- Juazeiro/BA	09°23' 36,6"	40°22'32,8"	382m	Vertissolo Hidromórfico	35°C	Estação experimental de Mandacaru EMBRAPA
2- Jutai/PE	08°36' 13,1"	40°13' 4,1"	395m	Vertissolo Hidromórfico	39°C	Propriedade particular
3- Petrolina/PE	09°03' 35,6"	40°18'41,8"	375m	Argiloso amarelo	36°C	Campo experimental da Caatinga Embrapa
4- Petrolina/PE	09°08' 19,9"	40°18'13,3"	369m	Argiloso amarelo	41°C	Campo experimental de Bebedouro EMBRAPA

Depois de coletadas, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos e posteriormente transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

#### 3.2 *Glycine max* como isca para prospecção de diazotróficos

O bioensaio foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Meio Ambiente em vasos de 1 litro de capacidade, cedidos pela Seção de Campos Experimentais (SCE) da Embrapa. Foi utilizado como substrato, o solo rizosférico

coletado ao longo do semiárido nordestino, a fim de recrutar bactérias diazotróficas compatíveis com a cultura de soja (*Glycine max*). Após 60 dias em casa de vegetação, o solo rizosférico foi coletado para o isolamento de possíveis rizobactérias xerotolerantes e com mecanismos de promoção de crescimento de plantas.

### **3.3 Isolamento de bactérias diazotróficas com características xerotolerantes**

Para o isolamento de bactérias rizosféricas, cerca de 1g de solo foi pesado e adicionado em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%). Essas soluções foram submetidas ao ultrassom (Ultracleaner 1400A) por 1 minuto e posteriormente vortexadas por 10 minutos, onde foi realizada a técnica de diluição seriada ( $10^{-1}$  até  $10^{-5}$ ). Aliquotas de 100  $\mu$ l das diluições ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) foram pipetadas nos respectivos meios de cultura: NFB (Tabela 2) e Winogradsky (Tabela 2.1), com e sem adição de sorbitol, ambos continham duas concentrações diferentes de sorbitol ( $285 \text{ g.L}^{-1}$  e  $405 \text{ g.L}^{-1}$ ) produzindo valores de  $A_w$  correspondentes a 0,957 e 0,919 respectivamente. O sorbitol foi adicionado aos meios de cultura de modo a selecionar bactérias que crescem em meio com reduzida atividade de água. Após incubação a  $28^\circ\text{C}$ , e crescimento bacteriano, os isolados foram purificados e armazenados em glicerol 20% no freezer  $-80^\circ\text{C}$  (KAVAMURA et al., 2013).



Tabela 2 - Meio de cultura NFB livre de nitrogênio para isolamentos de bactérias fixadores de nitrogênio

Constituintes	NFB
Ácido málico (g.L)	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L)	0,5
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (g.L)	0,2
NaCl (g.L)	1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g.L)	0,02
KOH (g.L)	4,5
Solução de micronutrientes (mL)	
0,04% CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	
0,012% ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	
0,014% H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2
0,01% Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	
0,1175% MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	
Azul de Bromotimol (mL, solução 0,5%)	
1,1222% KOH	2
0,5% azul de bromotimol	
FeEDTA (mL, solução aquosa 1,64%)	
0,7011% FeSO <sub>4</sub>	4
0,939% EDTA	
Solução de vitaminas (mL)	
0,01% biotina	1
0,02% piridoxol- HCl	
Agar (g.L)- semissólido	1,8
Ph	6,5-6,8

Tabela 2.1 - Meio de cultura livre de nitrogênio: Winogradsky

Constituintes	Winogradsky
CaCO <sub>3</sub> (g.L)	0,005
Glicose (mL)	10
Solução de sais: (mL)	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g.L)	50
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (g.L)	0,25
NaCl (g.L)	25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L)	1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (g.L)	0,1

Após seis dias da incubação, os frascos que apresentaram crescimento com características de bactérias diazotróficas foram transferidas novamente para novos meios para garantir o processo. Após os isolados serem transferidos por três vezes consecutivas, foram estriados em placas de petri com os respectivos meios: NFB e Winogradsky sólidos.

### 3.4 Caracterização genotípica de bactérias isoladas da rizosfera de soja

A caracterização genotípica foi realizada pela técnica do BOX-PCR de acordo com a metodologia de Rademaker et al. (1997). Preparou-se uma suspensão bacteriana com cada isolado bacteriano com 24 h de crescimento em meio de cultura BDA (39 g L<sup>-1</sup> de BDA; pH 6,8), coletou-se na ponta de uma haste de madeira de 6 cm autoclavada a biomassa do isolado, a qual foi misturada em 100 µl de água *Milli-Q* autoclavada dentro de um tubo do tipo eppendorf de 1,5 ml de capacidade, até obter uma suspensão turva.

Para gerar os perfis BOX-PCR, a reação de PCR foi realizada com o primer BOX 1AR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994) e foram feitas reações de amplificação do DNA num volume final de 25 µl, contendo: 13,45 µl de água *Milli-Q* autoclavada, 1,0 µl de primer BOX A1R (10 µM), 1,25 µl de dNTPs (25 mM cada), 0,40 µl 40 de BSA (10 mg/ml), 2,5 µl de DMSO 100%, 5 µl de tampão Gistchier 5X [para 200 ml: 16,6 ml de 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 ml de 1M Tris-HCl pH 8,8, 6,7 ml de 1M MgCl<sub>2</sub>, 1,3 ml de uma diluição 1:100 de 0,5M EDTA pH 8,8, 2,08 ml de β-mercaptoethanol (14,4M – solução a 99%), 0,4 µl de Taq polimerase (5 U/µl), 1 µl da amostra (suspensão bacteriana). A amplificação foi realizada com termociclador programável por 7 min a 95°C de desnaturação inicial (um ciclo), desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento 40°C por 1 min e extensão 65°C por 8 min (35 ciclos). Foi programado um ciclo de extensão final a 65°C por 16 min e manutenção a 4°C.

A visualização das bandas foi feita em gel de agarose 1,5% (p/v) de 10 cm de comprimento em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA), corado com *Gel Red (Biotium®)* e 10X *Loading Buffer (Invitrogen®)*; a eletroforese foi corrida a 80 V durante 100 min a temperatura ambiente. Foi usado o marcador molecular 1 kb *Plus DNA Ladder™ (Invitrogen®)* para normalização. As bandas foram visualizadas em transiluminador UV de 254 nm de comprimento de onda.

### 3.5 Bioensaio para seleção de bactérias associativas com *Glycine max* sob estresse hídrico

A partir do isolamento seletivo para as bactérias tolerantes à seca *in vitro*, foi testado também, de acordo com as linhagens mais promissoras, seu

potencial *in vivo*. O bioensaio foi realizado na casa experimental de vegetação da Embrapa Meio Ambiente. Utilizou-se vasos de 500ml de capacidade de forma casualizada, com as bactérias que cresceram em meio com baixa atividade de água no meio seletivo para fixação de nitrogênio. O experimento foi realizado em triplicata, com sessenta e oito bactérias, onde duas inoculações de 1mL com a concentração de células ajustadas ( $10^{-8}$  UFC.mL<sup>-1</sup>) das linhagens foram inoculadas no solo próximo a raiz das plantas durante o experimento. A primeira inoculação foi após sete dias da germinação da semente, e a segunda após quinze dias; durante esse período, os tratamentos foram estabelecidos com fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo). Posteriormente, as plantas foram submetidas ao estresse hídrico, onde foi cessado totalmente a irrigação de todos tratamentos.

O bioensaio foi analisado diariamente após o início do estresse osmótico, e os tratamentos foram comparados entre si e com as plantas não inoculadas. Ao decorrer de quatro dias consecutivos ao estresse hídrico, foi possível selecionar seis isolados capazes de protegerem as plantas dos efeitos adversos da seca na cultura de soja. Plantas não inoculadas tiveram seus pontos de murcha permanente após 48 horas.

### **3.6 Identificação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA**

A extração de DNA foi realizada com as seis bactérias que apresentaram um resultado promissor em casa de vegetação. Utilizou-se o kit Invitrogen (Purelink) para extração de DNA genômico bacteriano. Os isolados foram crescidos em 5 mL de TSB (10%) a 28°C por 24 horas. Para a obtenção do "pellet", foi coletado 1,5 mL do meio de cultura e pipetado em tubos do tipo eppendorf, onde foram submetidos a centrifugação 14000 x g por 5 minutos. O pellet foi ressuspenso em 200 µl de lisozima e incubado por 30 minutos a 37°C. A partir deste processo, foi seguido o protocolo com as seguintes etapas da extração de acordo com às instruções do kit.

Após a obtenção do DNA de boa qualidade, foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA, com o auxílio dos oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3') e 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT - 3'). As reações de PCR continham: 1 µl de DNA molde (10 a 20 ng), 2,5 µl de

tampão para PCR 10x, 1,25 µl de solução de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl dNTPs (25 mM), 0,175 µl do *primer* 27F (10 µM), 0,175 µl do *primer* 1492R (10 µM), 1,25 µl de DMSO 5%, 0,15 µl de *Taq* polimerase 5 U/µl e 18 µl de água (*Milli-Q*) autoclavada, para um volume final de 25 µl da reação. As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador (Applied Biosystems), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação de 30 segundos a 95°C, anelamento dos *primers* a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final por 10 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA já amplificados, foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, com o marcador de peso molecular 1kb DNA *Ladder* para a observação do fragmento que contém aproximadamente 1500 pb.

De cada isolado bacteriano foi realizada a purificação do produto de PCR utilizando-se isopropanol 100% e etanol 80%. O produto da PCR foi transferido para tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL. A estes tubos, adicionou-se 1mL de isopropanol gelado e a homogeneização da solução foi em vórtex por 5 segundo, seguido de centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perturbar o “pellet” formado. Posteriormente, foram adicionados 125 µl de etanol 80% gelado, onde foram homogeneizados por inversão e levados a centrífuga 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Foi descartado o sobrenadante e os tubos foram secos em temperatura ambiente até não se observar vestígios de etanol. Após a secagem, foram adicionados 20 µl de água *Milli-Q* autoclavada para que o pellet fosse ressuscitado. As amostras purificadas foram quantificadas em gel de agarose 1,0% a 80V por 40 minutos. As bandas foram visualizadas em transluminador UV de 254nm de comprimento de onda.

Para o sequenciamento de DNA a partir do produto de PCR foi utilizado o *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems). As amostras foram enviadas para o centro de pesquisa de Biociências da USP. As reações de sequenciamento são feitas utilizando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. As sequências são analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando o *Base Caller KB*.

### 3.6.1 Análise do sequenciamento parcial do gene 16S Rrna

As sequências obtidas do sequenciador em formato *ab1* foram processadas no *CLCbio*® (*CLCbio, DENMARK*) onde foram retiradas regiões de baixa

qualidade. Após o processamento, as sequências foram comparadas com o banco de dados EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) (KIM et al., 2012). Para a construção da árvore filogenética, as sequências foram alinhadas com referências encontradas no banco de dados *NCBI*. O alinhamento múltiplo foi realizado com o programa *MEGA 5.0* (TAMURA et al., 2013), com o auxílio da ferramenta *CLUSTALW*. As análises filogenéticas foram realizadas por Inferência Bayesiana utilizando o programa *MrBayes* (RONQUIST et al., 2011).

### **3.7 Avaliação de bactérias com características de RPCP e tolerância ao estresse hídrico**

#### **3.7.1 Fixação biológica de nitrogênio em meio de cultivo seletivo para bactérias diazotróficas (NFb)**

Todas linhagens de bactérias foram testadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio de modo assimbiótico em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb) (DÖBEREINER, 1989). Tubos de penicilina com 05 mL do meio NFb foram inoculados em triplicata com 100 µl de inoculo bacteriano ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> DO<sub>550</sub>=0,1). Após 7 dias de incubação, foram novamente repicadas para novos meios para a confirmação do crescimento bacteriano em meio livre de nitrogênio. As bactérias que apresentaram uma película visível de crescimento abaixo da superfície do meio, foram consideradas positivas.

#### **3.7.1.1 Bactérias com capacidade de crescimento em meio de cultura com reduzida atividade de água**

Todas bactérias que cresceram durante o isolamento em meio de cultura com reduzida atividade de água, foram repicadas em meio de cultura TSA (10%) com sorbitol (405 g.L<sup>-1</sup>) a uma temperatura de 40° C, produzindo valores de *Aw* correspondentes a 0,919. O teste foi realizado a fim de verificar a capacidade de crescimento bacteriano em alta temperatura e com baixa disponibilidade de água fornecida no meio (KAVAMURA et al., 2013).

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

A produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). Tubos de ensaio com 10 mL do meio TSB (10%) suplementado com 5 mM de L-triptofano foram inoculados em triplicata com 100 µl de inoculo bacteriano ( $10^{-8}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, DO<sub>550nm</sub>=0,1). As culturas foram mantidas a 28°C no escuro, sob agitação constante durante 24 horas. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos, para obtenção do sobrenadante. A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada por meio da mistura de 750 µl do reagente de Salkowski (50 mL de ácido perclórico a 35% e 1 mL de FeCl<sub>3</sub> a 0,5M) com 750 µl do sobrenadante, seguido da leitura da (DO a 530 nm) em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu), após 30 minutos de incubação no escuro (HARTMANN et al., 1983). Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela formação de uma coloração rósea (Figura 5). A concentração de AIA no meio de cultura (y) foi determinada pela comparação com uma curva padrão, utilizando-se AIA comercial, por meio da equação  $y=34,507x^2+43,802x+0,843$ , onde x equivale aos valores de absorbância obtidos.



Figura 5 - A escala representa uma ordem crescente na intensidade da coloração avermelhada, conforme a produção de AIA

### 3.7.3 Formação de biofilme em diferentes condições de estresse

Foram inoculados 100  $\mu\text{L}$  dos isolados bacterianos crescidos em meio TSB(10%) com a concentração de células ajustada para ( $10^8$  UFC.  $\text{mL}^{-1}$ ) em tubos de eppendorf contendo 900  $\mu\text{L}$  de meio TSB(10%) e TSB(10%) + Sorbitol(0,30M), em triplicata. Os tubos foram incubados por 96 horas a  $40^\circ\text{C}$ . Foi verificado o crescimento dos isolados por absorbância em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) a 600 nm. As células planctônicas foram removidas e os tubos lavados com água destilada por três vezes. Para coloração do biofilme, foi adicionado 1000  $\mu\text{L}$  de solução de cristal violeta (0,1%) e após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, os tubos foram novamente lavados com água destilada por três vezes.

A formação de biofilme foi quantificada mediante a adição de 1000  $\mu\text{L}$  de álcool etílico (95%) em cada tubo para a solubilização do cristal violeta incorporada a parede do eppendorf (Figura 6). A densidade óptica (DO) do corante solubilizado é determinada em espectrofotômetro á  $\text{DO}_{560\text{nm}}$ .



Figura 6 - A escala representa uma ordem crescente na intensidade da solubilização do cristal violeta incorporado ao biofilme quantificado a ( $\text{DO}_{560\text{nm}}$ )

### 3.7.4 Avaliação qualitativa para produção de exopolissacarídeos (EPS)

A avaliação para produção de EPS foi feita de acordo com Paulo (2010). Foram inoculados 5 µl dos isolados bacterianos crescidos em meio Tryptone Soya Broth (TSB 10%) em discos de 5 mmØ esterilizados, em meio de cultura modificado de Guimarães et al. (1999) (2% de extrato de levedura; 1,5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,02% MgSO<sub>4</sub>; 0,0015% MnSO<sub>4</sub>; 0,0015% FeSO<sub>4</sub>; 0,003% CaCl<sub>2</sub>; 0,0015% NaCl; 1,5% ágar) adicionado de 10% de duas diferentes fontes de carbono: sacarose e sorbitol, a um valor de pH de 7,5. Os meios foram submetidos ao crescimento bacteriano a uma temperatura de 40°C. A produção de EPS foi caracterizada visualmente mediante a medida do halo do EPS produzido, sendo + (pouca produção - halo de EPS ≤ 10 mmØ), ++ (média produção - halo de EPS de 10-14 mmØ) e +++ (ótima produção - halo de EPS ≥ 14 mmØ). A confirmação da produção de EPS foi realizada pelo método químico, misturando uma alça de platina impregnada com a colônia em 2 mL de álcool etílico. Confirmando a produção de EPS pelos isolados.

### 3.7.5 Presença da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

A atividade da enzima ACC deaminase pelos isolados, foi determinada de acordo com Glick et al.(1995). Cerca de 5 µl de cada isolado cultivado em meio líquido TSB (10%) foram inoculados em placas com meio de cultura contendo ACC como única fonte de nitrogênio (0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,02% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01% SO<sub>4</sub>Fe.7H<sub>2</sub>O; 0,1% CaCO<sub>3</sub>; 0,02% NaCl; 0,0005% NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 1% glicose; 0,03% ACC (adicionado por filtração); 1,5% ágar). As placas foram incubadas a 28°C e observadas diariamente para formação de colônia até 4 dias. As colônias que apresentaram crescimento, foram então re-inoculadas e incubadas nas mesmas condições anteriores para a confirmação do processo. O teste é baseado no fato de que as bactérias que possuem a enzima ACC deaminase são capazes de crescer no meio com ACC como única fonte de nitrogênio.





### 3.7.6 Produção de enzimas indutoras de resistência (IRS)

Para a determinação de enzimas indutoras de resistência sistêmica, foram coletadas amostras de folha e raiz de soja (*Glycine max*) de cada tratamento, durante o bioensaio de promoção de crescimento sob estresse hídrico em casa de vegetação. Duas coletas foram realizadas em dois tempos diferentes. A primeira coleta foi após dois dias intensos de seca, onde as plantas já não estavam mais sendo irrigadas com nenhuma quantia de água. A segunda coleta foi após cinco dias consecutivos de estresse hídrico. Durante a coleta as amostras de folha e raiz foram mantidas em baixa temperatura, e posteriormente congeladas no freezer (-80°C) até o preparo de extratos vegetais.

Para o preparo dos extratos, as amostras de folha e raiz, foram pesadas separadamente (0,5 – 0,9g) e trituradas em almofariz com nitrogênio líquido. Após este processo, adicionou-se 6mL de solução tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,5 com polivinilpirrolidona 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM (PMSF). A solução foi centrifugada a 2000 rpm, a 4°C por 20 minutos, onde o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer (-80°C) até a realização das análises.

Foram analisados o efeito dos tratamentos na expressão das enzimas: Peroxidases (PO) e Polifenoloxidasas (PPO). A atividade de PO foi determinada pela reação de 30 µl do extrato da folha e para a raiz 10 µl em, 90 µl de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,5), 90 µl de peróxido de hidrogênio 3mmol L<sup>-1</sup> e 90 µl guaiacol 15 mmol L<sup>-1</sup>, com leitura de absorbância a 470 nm no programa Magellan, com a leitura de 10 em 10 segundos, até 200 segundos, a 30°C (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). Os resultados foram expressos em unidades de PO. mg<sup>-1</sup> tecido. min<sup>-1</sup>, sendo que, uma unidade foi definida como incremento de absorbância de 0,01 por minuto de reação por mg de tecido (HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

A atividade de PPO foi determinada utilizando-se 200 µl de pirocatequina a 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,8 e 20 µl de extrato tanto de folha quanto de raiz. A leitura de absorbância foi realizada no programa Magellan a 420 nm, de 1 em 1 minuto até 10 minutos, a 30°C. A diferença entre a primeira e a última leitura foi utilizada para o cálculo da atividade, expressa em unidades de PPO. mg<sup>-1</sup> tecido. min<sup>-1</sup>, sendo que, uma unidade foi definida como

um incremento de absorvância de 0,001 por minuto de reação por mg de tecido (DUANGMAL; APENTEN, 1999).

### 3.8 Promoção de crescimento de *Glycine max* sob estresse hídrico

#### 3.8.1 Processo de desinfestação das sementes de *Glycine max*.

Antes do plantio em casa de vegetação, as sementes de soja (*Glycine max*) foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2% (30 segundos), álcool 70% (1 minuto), posteriormente, foram lavadas por três vezes com água destilada esterilizada. A água da última lavagem foi plaqueada em meio TSA(10%) para conferir o processo da desinfestação.

##### 3.8.1.1 Microbiolização das sementes de *Glycine max*.

Para a microbiolização das sementes de soja, as bactérias selecionadas para o teste de promoção de crescimento foram inoculadas separadamente em Erlenmeyers com meio de cultura TSB (10%) e submetidas à agitação por um período de 24 horas. Após o período de incubação, as concentrações de células bacterianas foram ajustadas para  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (DO<sub>550</sub>=0,1) com solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. As sementes de soja desinfestadas foram imersas por uma hora nas suspensões bacterianas. As sementes do tratamento controle, sem bactéria, foram imersas pelo mesmo período somente em solução salina a 0,85% esterilizada.

#### 3.8.2 Bioensaios em casa de vegetação com *Glycine max*.

O experimento de plantio foi realizado de forma casualizada em casa de vegetação da Embrapa Meio Ambiente. O bioensaio foi montado com cinco repetições, onde utilizou-se vasos de 1 litro de capacidade cedidos pela Seção de Campos Experimentais da Embrapa. O experimento em casa de vegetação foi testado com as seis bactérias que aparentemente mitigaram os efeitos da seca *in vivo* juntamente com os efeitos *in vitro*.

Foram semeadas 10 sementes por vaso, porém, após a germinação as plântulas foram desbastadas, mantendo cinco plantas por vaso, totalizando vinte e cinco plantas por cada tratamento. As condições de irrigação foram estabelecidas da seguinte maneira: fornecimento adequado de água (80% da capacidade de campo) e fornecimento reduzido de água, onde pode simular uma condição de estresse hídrico ca cultura (30% da capacidade de campo).

Para o controle positivo, utilizou-se uma bactéria do gênero *Bacillus*, que de acordo com Kavamura et al. (2013) é capaz de promover o crescimento em plantas de milho sob condições de estresse hídrico. Como controle negativo, foram utilizadas plantas sem inóculo bacteriano (testemunha). Totalizando oito tratamentos no bioensaio.

A promoção de crescimento em plantas de soja pelas rizobactérias foi avaliada de acordo com o peso seco do sistema radicular e peso seco da parte aérea. Decorrido os sessenta dias, os experimentos com 30% e 80% da capacidade de campo foram desmontados, onde a parte aérea e as raízes foram retiradas e acondicionadas em sacos de papel, secos em estufa a 60°C até obtenção de peso seco constante. O peso da massa da matéria seca foi determinado em balança analítica. Todas as cinco plantas mantidas no vaso foram avaliadas, sendo que, a medida das plantas de cada unidade foi considerada uma repetição. Ambos experimentos, foram comparados com o tratamento controle (testemunha).

### 3.9 Análise estatística

Os dados obtidos pelos experimentos foram submetidos à análise de variância One-Way Anova, seguida de uma classificação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, de modo a comparar os tratamentos com a testemunha.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento de rizobactérias diazotróficas tolerantes à seca

O isolamento foi realizado em dois meios seletivos para bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo eles: Nfb e Winogradsky, com e sem adição de sorbitol. Os meios de cultura que não contêm nitrogênio, são eficientes para o isolamento de bactérias diazotróficas (DÖBEREINER et al., 1995).

Foram obtidos, duzentos e vinte e três isolados de ambos os meios de cultura, sendo 36% proveniente do meio Nfb e 64% do meio Winogradsky. Cerca de 30% das rizobactérias obtidas no isolamento foram capazes de crescer em meios de cultura com baixa atividade de água (Tabela 3). Isolados do meio Nfb não foram capazes de crescer na concentração mais alta (40,5%) de sorbitol .

Tabela 3 - Lista dos sessenta e oito isolados com capacidade de crescer em condições de estresse hídrico *in vitro*. Crescimento bacteriano a 28°C com atividade de água correspondente à 0,963  $A_w$  e 0,919  $A_w$

Isolados NFB / 0,963 $A_w$ (28,5% Sorbitol)	Isolados Winogradsky 0,919 $A_w$ (40,5% Sorbitol)	Isolados Winogradsky 0,963 $A_w$ (28,5% Sorbitol)
N202	W201	T2.01 T8.30
N403	W202	T3.02 T8.31
Nev04	W303	T3.04 T8.32
N806	W405	T3.05 T9.33
N807	W406	T4.07 T10.34
N909	W6.08	T4.08 T10.35
N910	W6.09	T4.10 T12.36
N911	W6.10	T4.12 T13.37
N915	W6.11	T4.13 T14.38
N917	W6.12	T5.14 T14.39
N918	W6.13	T6.19 T14.40
N919	W7.14	T6.20 T14.41
N920	W7.15	T7.22 T14.42
N921	W7.16	T7.23
N14.24	W14.17	Tev7.24
N14.26		Tev7.25
N14.30		Tev7.26
N14.33		Tev7.27
N14.34		Tev7.29
N14.35		T14.43

A água é imprescindível para o desenvolvimento de todos os organismos vivos, pois dependem da mesma para a manutenção de suas atividades

fisiológicas, e até hoje, nenhum grupo de organismo foi capaz de se desenvolver e sobreviver sem água (POTTS 1994). Para as bactérias consideradas xerotolerantes, são definidos valores mínimos de  $A_w$ , sendo que a grande maioria é capaz de crescer na faixa de até 0,900  $A_w$  (GRANT, 2004). No presente estudo, as bactérias que apresentaram crescimento em meio de cultura com baixa atividade de  $A_w$  (0,919 e 0,963) podem ser consideradas xerotolerantes.

#### **4.2 Caracterização molecular de isolados bacterianos por BOX-PCR**

Para a caracterização molecular através do BOX-PCR, todos os duzentos e vinte e três isolados obtidos durante o isolamento foram caracterizados por meio desta técnica (Figura 7).

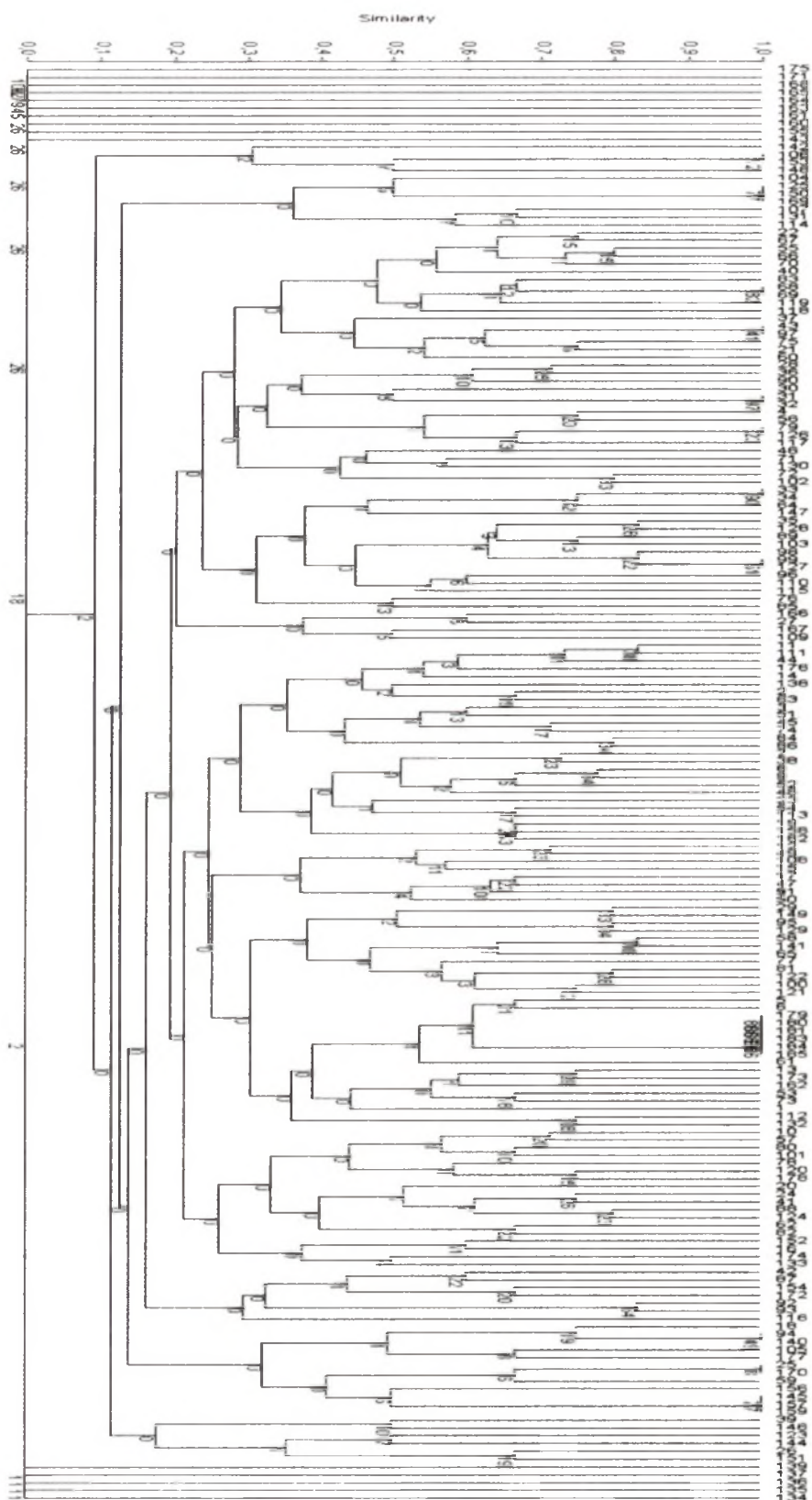


Figura 7 - Dendrograma de similaridade genotípica das bactérias obtidas no isolamento em meio Nfb e Winogradsky

Analisando o dendograma gerado a partir dos perfis de bandas dos fragmentos de DNA através do BOX-PCR, evidenciou-se a disposição de 137 grupos com 70% de similaridade, o que nos indicou uma alta riqueza bacteriana.

#### 4.3 Bioensaio para seleção de bactérias associativas com *Glycine max* em condições de estresse hídrico

O bioensaio foi realizado de modo a proporcionar um *screening* dos isolados em relação à interação planta/micro-organismo. Todas as sessenta e oito bactérias que apresentaram características xerotolerantes *in vitro*, crescendo em meio com reduzida atividade de água, foram testadas em casa de vegetação (Figura 8B).

Dezoito dias após a germinação das sementes, as plantas foram submetidas a estresse hídrico contínuo. A partir de então, os tratamentos foram analisados diariamente e, comparados visualmente com os tratamentos não inoculados (testemunha). As plantas começaram a apresentar os sintomas de estresse 24 horas após o início das condições de déficit hídrico. Seis bactérias foram capazes de mitigar os efeitos impostos pela seca em soja por até 96 horas (Tabela 4). Os demais tratamentos, incluindo a testemunha, apresentaram murcha permanente após 48 horas de estresse hídrico contínuo.

Tabela 4 – Isolados capazes de mitigar os efeitos impostos pela seca induzida em plantas de soja por até 96 horas de estresse hídrico

Linhagem	PERÍODO DE SECA		
	48hrs	72hrs	96hrs
W201	++	+	+
W608	++	+	+
W610	++	+	+
W714	+	+	-
W14.17	+	-	-
N920	+	-	-



As bactérias foram selecionadas mediante o seu efeito no desenvolvimento das plantas sob condições de estresse hídrico, quando comparadas com o desenvolvimento da planta testemunha (Figura 8A).

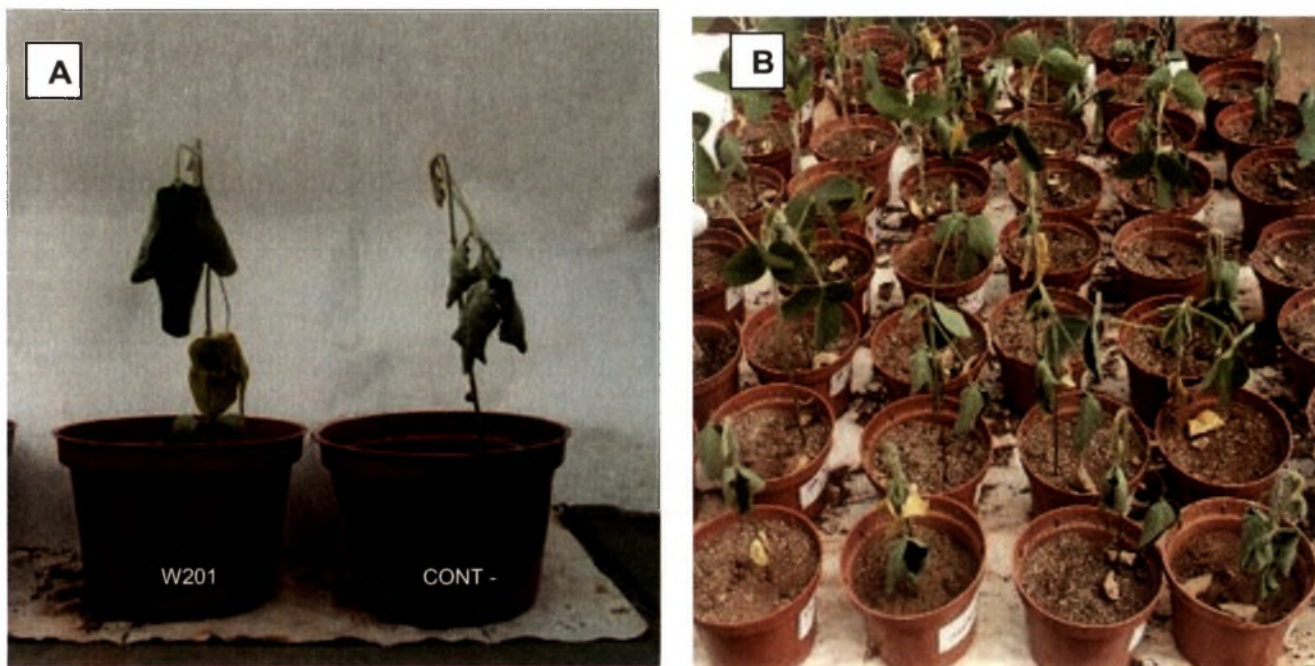


Figura 8 - Tratamento com linhagem W201 comparado com a testemunha após 72 horas (A) de seca. *Screening* realizado para seleção de RPCPs com características xerotolerantes (B)

#### 4.4 Identificação das bactérias com características de RPCP (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Planta) e xerotolerantes por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

No presente estudo, a comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com o banco de dados *NCBI* mostrou que os isolados tiveram afiliação taxonômica aos filos: Firmicutes (*Bacillus* e *Paenibacillus*) e Bacteroidetes (*Sphingobacterium*) (Tabela 5).

Tabela 5 - Identificação das bactérias com características de RPCP e xerotolerantes por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Linhagem	Família	16s rRNA		
		Espécie mais próxima	Similaridade	nt/dif total
<b>W201</b>	Bacillaceae	<i>Bacillus anthracis</i>	99.8%	1/549
<b>W608</b>	N.I	-	-	-
<b>W610</b>	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	98.03%	8/406
<b>W714</b>	N.I	-	-	-
<b>W14.17</b>	Bacillaceae	<i>Bacillus siamensis</i>	99.60%	2/504
<b>N920</b>	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	98.96%	7/672

N.I - Não identificado

Nt/dif total – Número de nucleotídeos diferentes pelo número de nucleotídeos totais

Não foi possível identificar os isolados correspondentes aos códigos W608 e W714, pois não obtivemos êxito durante a extração de DNA dos mesmos.

A fim de verificar a relação entre as linhagens com características para promoção de crescimento de plantas e tolerância à seca, foram construídas duas árvores filogenéticas, uma para o filo Firmicutes (Figura 9), e outra para o filo Bacteroidetes (Figura 10);

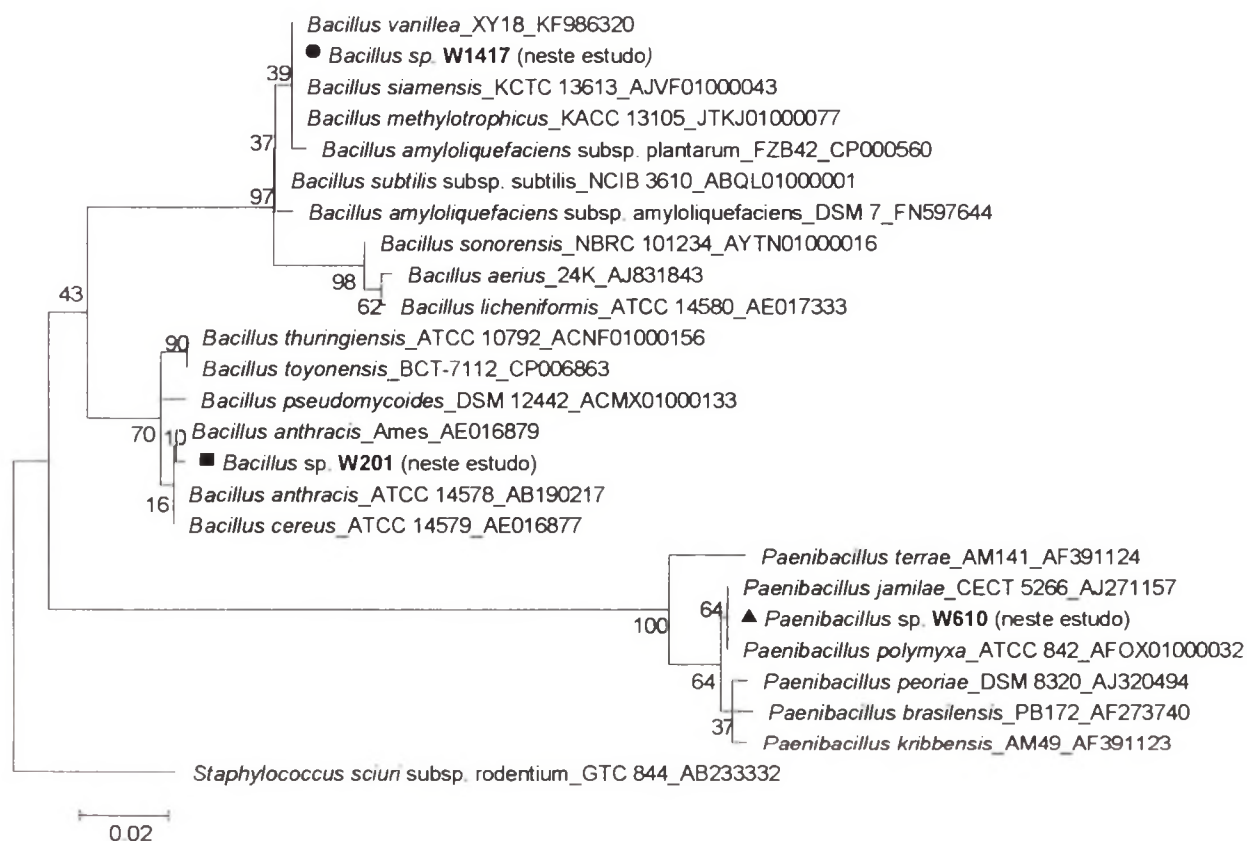


Figura 9 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o filo Firmicutes, comparando as linhagens selecionadas no teste de tolerância à seca, com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído utilizando o programa Mega 5, com método de distância Likelihood. A barra indica a distância em nucleotídeos. *Staphylococcus sciuri* foi utilizado como grupo externo

As análises filogenéticas para o filo Firmicutes, revelaram que nove linhagens foram agrupadas com o isolado correspondente ao código W1417; Esta linhagem pode ser pertencente ao grupo de *Bacillus siamensis*, com similaridade variando entre 98,41% a 99,60%, correspondendo a 2 nucleotídeos (nt) de diferença em um total de 504. Para o isolado correspondente ao código W201, agruparam-se no total seis linhagens, inserindo-a ao grupo de *Bacillus anthracis*, com similaridade variando entre 99,27% a 99,82%, correspondendo a 1 nucleotídeo (nt) de diferença em um total de 549. Em relação ao isolado correspondente ao código W610, seis linhagens foram agrupadas e, provavelmente este isolado é pertencente ao grupo de

*Paenibacillus kribbensis*, com similaridade variando entre 94,58% a 98,03%. Como proposto por Stackebrandt e Elbers (2006), valores de similaridade abaixo de 98,7% podem ser usados para delinear uma nova espécie procariótica. No entanto, será necessário utilizar outras abordagens polifásicas para caracterizar essa linhagem.

Bactérias do gênero *Bacillus* spp. são comumente relacionadas à promoção de crescimento de plantas e, a tolerância a estresses abióticos. Recentemente Gagné-Bourque et al. (2015) estudaram os efeitos de *Bacillus subtilis* em todo o ciclo de vida de *Brachypodium distachyon* submetida ao estresse hídrico. Os resultados demonstraram uma relação íntima e benéfica entre *B. subtilis* e *B. distachyon*, onde a bactéria foi capaz de aumentar a altura da planta, promover um crescimento radicular de até 180% em relação as testemunhas e também, ativar genes em resposta à seca.

Segundo Sukweenadhi et al. (2015) plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com uma estirpe de *Paenibacillus yonginensis*, possibilitaram maior resistência à planta em condições de estresse salino, seca e contaminação por metais pesados em relação as plantas controle. Estudos moleculares da bactéria, revelaram genes responsáveis pela tolerância à salinidade e seca. Além da tolerância aos estresses abióticos, *P. yonginensis* melhorou as taxas de germinação e parâmetros de crescimento em sementes de arroz. Uma abordagem mais ampla para o filo Firmicutes será descrita ao decorrer dos resultados.

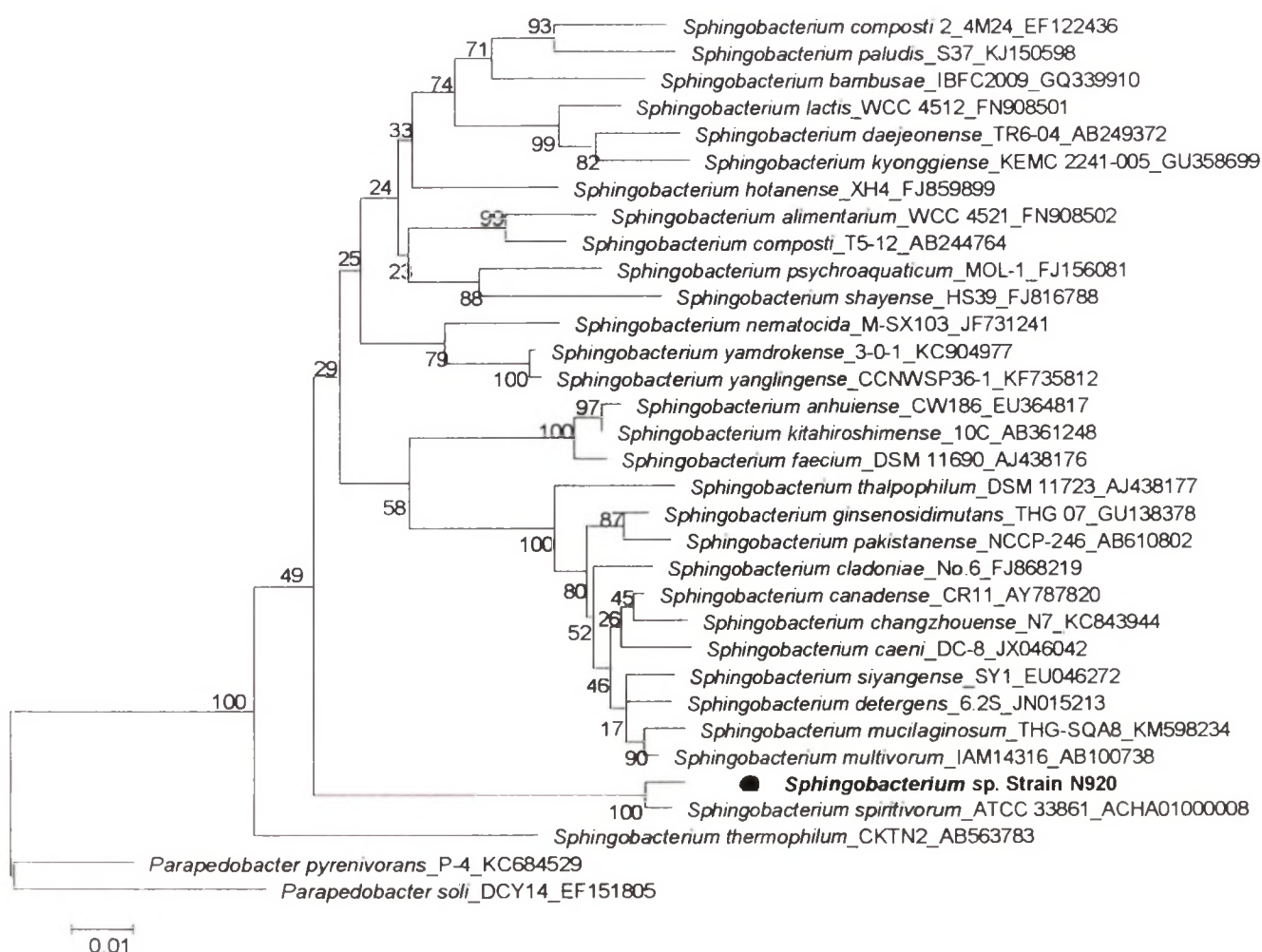


Figura 10 - Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, para o filo Bacteroidetes, comparando as linhagens selecionadas no teste de tolerância à seca, com as linhagens obtidas no banco de dados do EzTaxon. O alinhamento foi construído utilizando o programa Mega 5, com método de distância Likelihood. A barra indica a distância em nucleotídeos. *Parapedobacter solii* foi utilizado como grupo externo

As análises filogenéticas para o filo Bacteroidetes, revelaram que trinta e três linhagens foram agrupadas com o isolado correspondente ao código N920, esta linhagem pode ser pertencente ao grupo de *Shingobacterium spiritivorum*, com similaridade variando entre 89,99% a 98,96%, correspondendo a 7 nucleotídeos (nt) de diferença em um total de 672.

Marques et al. (2010) mostraram o potencial das bactérias desse gênero na promoção de crescimento de plantas verificando a capacidade da produção de ácido indol acético, cianeto de hidrogênio, amônia, e sideróforo por *Sphingobacterium* spp.. Quando a bactéria foi inoculada em plantas de milho, houve um aumento significativo da biomassa, alongamento da raiz e aumento nos níveis de

N e P nas plantas. Os autores relataram a influência benéfica da inoculação de *Sphingobacterium* sp. nas plantas e, o possível potencial do isolado em aumentar o rendimento da colheita nas plantas de milho. Além disso, de acordo com Ali et al (2015) uma estirpe de *Sphingobacterium* sp isolada da rizosfera de grão-de-bico, obteve grande potencial para produção de AIA, amônia e solubilização de fosfato. Segundo os autores, as bactérias do gênero *Sphingobacterium* spp, são eficientes na promoção de crescimento de plantas, podendo ser utilizadas como biofertilizantes para estimular o crescimento e produtividade em grão-de-bico.

Recentemente, uma nova bactéria foi isolada a partir de amostras de solo do deserto ocidental da China, o isolado apresentou características para tolerância à seca e representa uma nova espécie do gênero *Sphingobacterium*. Seu genoma completo foi sequenciado, e diversos genes em resposta à seca foram detectados. Os autores acreditam que é através da expressão desses genes que esta e outras espécies deste gênero conseguem se adaptar facilmente em ambiente árido e semiárido. A nova espécie foi nomeada como *Sphingobacterium deserti* (TENG et al., 2015).

#### **4.5 Bactérias com características de RPCP e tolerância ao estresse hídrico *in vitro***

##### **4.5.1 Produção de AIA**

Dentre as seis bactérias obtidas durante o *screening* em casa de vegetação com possíveis características xerotolerantes, todas mostraram habilidade em sintetizar AIA ( $> 1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na presença do precursor L-triptofano. Obtendo entre os isolados, moderada, alta e elevada produção desta auxina. De acordo com a concentração de AIA detectada, temos:  $< 1\mu\text{g.mL}^{-1}$  (baixa produção);  $1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (média produção);  $11-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (alta produção) e  $> 51 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (elevada produção) (KAVAMURA et al., 2013).

O isolado W610 pertencente ao gênero *Paenibacillus* sp. apresentou uma elevada produção ( $130 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) deste fitohormônio, produzindo significativamente mais AIA do que os demais isolados. W201-*Bacillus* sp. ( $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), W608 ( $28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), W714 sp. ( $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e W1417-*Bacillus* sp ( $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$

<sup>1)</sup> produziram alta concentração de AIA, e apenas o isolado: N920-*Sphingobacterium* ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obteve média produção do fitohormônio. (Figura 11)

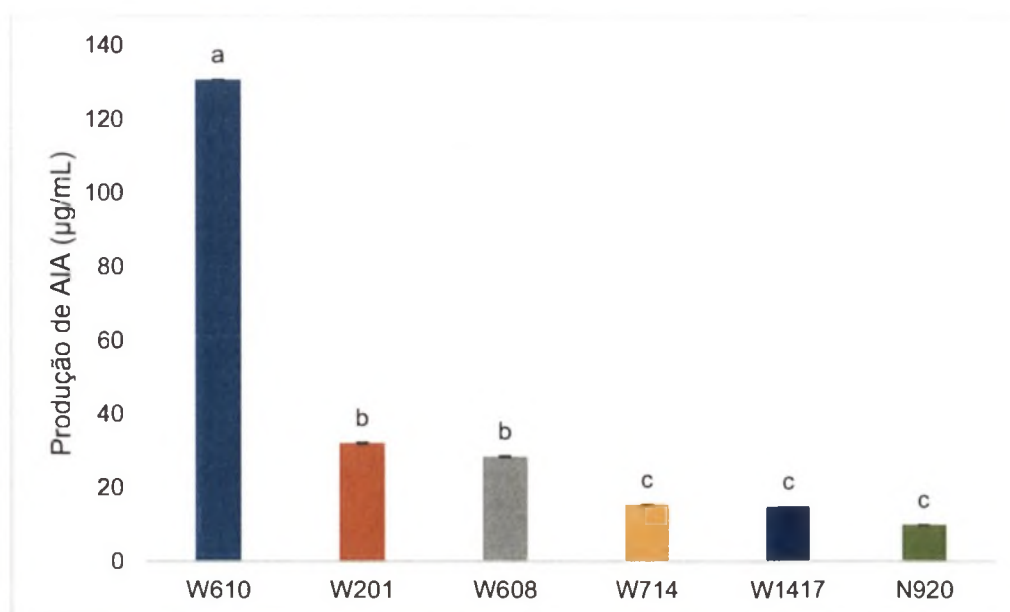


Figura 11 - Formação de AIA por isolados que apresentam característica para tolerância à seca. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para as três repetições. As letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Segundo Mirza et al. (2001), a síntese desta auxina pode ser influenciada pelas condições de cultura, estágio de crescimento e disponibilidade de substrato. Isso pode explicar a variação na síntese de AIA por linhagens pertencentes ao mesmo gênero.

Os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* são bem conhecidos por promoverem o crescimento de planta, principalmente pela produção de fitohormônios vegetais, citocinas e auxinas (KARADENIZ et al., 2006). Como mostrado, a linhagem pertencente ao gênero *Paenibacillus* sp. (W610) produziu elevada concentração de AIA. Essa capacidade é relatada por vários autores como Lebuhn et al. (1997) que isolaram *P. polymyxa* de raízes de trigo, capaz de produzir elevadas concentrações de AIA com e sem adição do precursor L-triptofano. Bent et al. (2001) inocularam cepas de *P. polymyxa* com elevada produção de AIA ( $111 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) em plântulas de *Pinus elliottii* e verificaram um aumento significativo no sistema radicular das plantas.

De acordo com Ali et al. (2010), resultados positivos também foram obtidos com linhagens do gênero *Bacillus*, onde foi possível verificar que *B. pumilus*,

*B. subtilis* e *B. megaterium* propiciam o crescimento de *Vigna radiata*. Segundo os autores, esta promoção de crescimento na planta pode ter sido consequente à produção de auxinas, como AIA.

#### 4.5.2 Formação de biofilme

Todos os isolados testados foram capazes de produzir biofilme em meio TSB (10%) e TSB (10%+ 0,30M de sorbitol). Porém, houve uma maior formação em meio TSB (10%). Em meio TSB (10%), sem adição de sorbitol, o isolado N920-*Sphingobacterium* sp. obteve maior formação de biofilme. Entretanto, em condições mais estressantes, no meio TSB (10%+ 0,30M de sorbitol), o isolado W201 identificado como *Bacillus* sp. foi o que formou maior quantidade de biofilme, cuja absorbância foi de 0,631. O isolado N920-*Sphingobacterium* também formou biofilme em condições estressantes (absorbância equivalente a 0,600) (Figura 12).

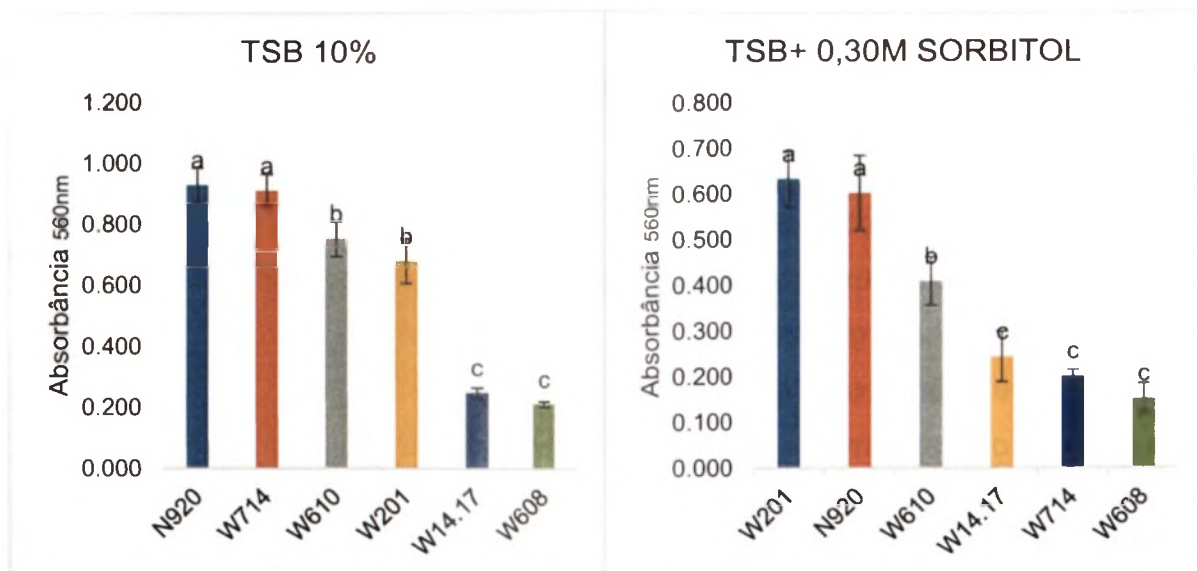


Figura 12 - Formação de biofilme por isolados com características para tolerância à seca em meio de cultura TSB(10%) e TSB(10%) + 0,30M de sorbitol. As barras representam os desvios padrões das médias obtidas para as três repetições. As letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Muitos autores relatam a formação de biofilme por bactérias do gênero *Bacillus* spp. Kavamura et al. (2013) observaram uma alta formação de biofilme em condições estressantes por bactérias do gênero *Bacillus*, isolado de cactáceas do semiárido brasileiro. Outros gêneros como *Paenibacillus* também são capazes de colonizar raízes de plantas e formar biofilme (TIMMUSK, 2005).



Durante o crescimento vegetal, o biofilme pode auxiliar na colonização radicular (RAMEY et al., 2004) assim como, proteger as células da privação de nutrientes, fagocitose, antibióticos alterações no pH (JEFFERSON, 2004) e também de condições limitantes de água (CHANG et al., 2007).

A produção de EPS é um mecanismo que oferece proteção celular contra diferentes condições ambientais, além de contribuir para a formação de biofilme. Segundo Semiara et al. (2012) a produção de EPS é essencial para o espalhamento do biofilme em *B. subtilis*. Muitos exopolissacarídeos são conhecidos por serem altamente hidratados devido à incorporação de água em sua estrutura, motivo pelo qual se pode prevenir a dessecação em biofilmes (FLEMMING; WINGENDER; MAYER, 2000). Portanto, é interessante a verificação da formação de biofilme pelos isolados no presente estudo, pois podem atuar de modo benéfico para o crescimento da planta e aumentar a tolerância à dessecação.

#### 4.5.3 Produção de EPS

De modo a verificar a produção de exopolissacarídeos, as seis bactérias com características de promoção de crescimento sob estresse hídrico foram testadas quanto à capacidade de produção de EPS a 40°C em duas diferentes fontes de carbono (sacarose e sorbitol) em pH 7,5. Dos seis isolados testados, apenas a linhagem W714 não foi capaz de produzir EPS em nenhuma fonte de carbono (Tabela 6). Houve maior produção de EPS no meio contendo sacarose como fonte de carbono para todas as linhagens produtoras a uma temperatura de 40°C.

O teste foi realizado pelo método de discos, sendo possível visualizar a produção de EPS por meio da formação de uma substância mucoide ao redor do disco (Figura 13A). A confirmação foi verificada em álcool etílico, onde linhagens não produtoras de EPS, ao serem misturadas em álcool ficam em suspensão, deixando o meio turvo. Já as linhagens produtoras de EPS, ao serem misturadas são precipitadas e as células não são dissolvidas (Figura 13B).

Tabela 6 - Caracterização dos isolados como: positivo ou negativo para a produção de EPS de acordo com o tamanho do halo com aspecto mucoide, sendo + (pouca produção - halo de EPS  $\leq$  10 mm $\emptyset$ ), ++ (média produção - halo de EPS de 10-14 mm $\emptyset$ ) e +++ (ótima produção - halo de EPS  $\geq$  14 mm)

Linhagens	Produção de EPS	
	Sacarose	Sorbitol
W201 ( <i>Bacillus</i> sp.)	++	-
W608	++	-
W610 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	++	-
W714	-	-
W1417 ( <i>Bacillus</i> sp.)	+	+
N920 ( <i>Sphingobacterium</i> sp.)	+	+

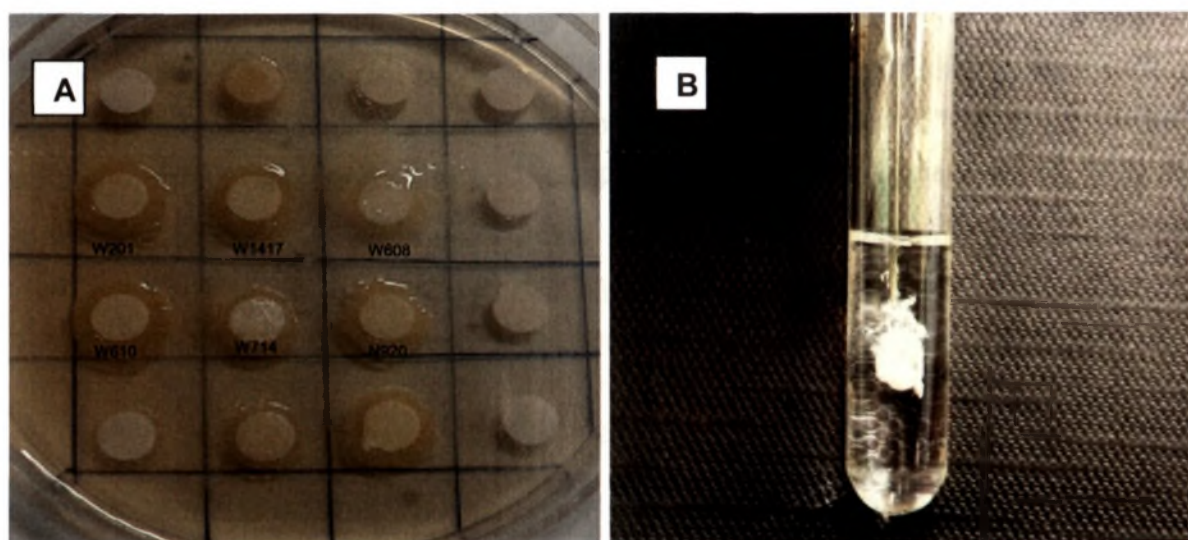


Figura 13 - Teste qualitativo da produção de EPS. A) Teste em placa com meio de cultura adicionado de sacarose em pH 7,5. B) Confirmação da produção de EPS em álcool etílico, onde o EPS é precipitado e não dissolvido

Como observado, no presente estudo, os isolados caracterizados como *Bacillus* sp, (W201), W608 e *Paenibacillus* sp, (W610) obtiveram uma média produção de EPS à 40°C. A produção de EPS por espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, tais como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* já é bastante relatada (CHOWDHURY et al., 2011; KUMAR et al., 2004; ZHAO; ZHOU; WU, 2010). *Paenibacillus jamilae* também é uma espécie conhecida por produzir EPS (AGUILERA et al., 2001).

Resultados similares são encontradas no estudo de Kavamura et al (2013) que observaram a produção de EPS por bactérias isoladas do semiárido nordestino, onde foi constatado a produção por bactérias dos gêneros de *Bacillus* spp., *Brevibacillus* sp., *Paenibacillus* sp.

O uso de exopolissacarídeos têm sido associados à mecanismos de adaptação ao estresse ambiental, tais como solos salinos, variação de temperatura e

estresse hídrico (CORONADO et al., 1996). Estudos mostram que uma linhagem de *Pseudomonas putida* capaz de produzir um EPS denominado de alginato, é capaz de influenciar o desenvolvimento de biofilme, sendo que as propriedades físico-químicas do próprio EPS influenciam em resposta a condições limitantes de água, facilitando na manutenção de um microambiente mais hidratado, protegendo os micro-organismos contra a dessecação (CHANG et al., 2007).

#### 4.5.4 Produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

Com relação à produção de ACC deaminase, quatro dos seis isolados foram capazes de crescer em meio de cultura contendo ACC como única fonte de nitrogênio (Tabela 7), indicando que provavelmente os isolados possuem a enzima ACC deaminase, a qual é responsável por clivar o composto ACC, precursor imediato de etileno.

Tabela 7 - Isolados que apresentaram crescimento em meio de cultura contendo ACC como única fonte de nitrogênio, (+) representa o resultado positivo para a enzima

<b>Linhagens</b>	<b>ACC deaminase</b>
W201 ( <i>Bacillus</i> sp.)	+
W608	+
W610 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	+
W714	-
W1417 ( <i>Bacillus</i> sp.)	+
N920 ( <i>Sphingobacterium</i> sp.)	-

A bactéria produtora de ACC deaminase é de extrema importância quando se trata de características de tolerância à seca, pois, grande quantidade de etileno é produzido pelas plantas quando submetidas a condições de estresse (GLICK et al., 2005). Diferentes tipos de estresse podem induzir a produção de etileno, como por exemplo, altas temperaturas, escassez de água, luz ultravioleta, injúrias e produtos químicos (GLICK et al., 2005). O fitohormônio etileno quando produzido em altas concentrações, tende a ser negativo causando efeito deletério nas plantas, como senescência precoce, inibição do alongamento radicular e apodrecimento dos frutos (SALEH-LAKHA et al., 2004). Para que a planta consiga voltar a se desenvolver, é necessário que haja a redução nos níveis de etileno (GAMALERO; GLICK, 2012). O uso de bactérias produtoras de ACC deaminase na

melhora do estresse causado por fatores abióticos tem aumentado devido aos benefícios concedidos às plantas. As bactérias com atividade de ACC deaminase ao se ligarem com o tegumento da semente de uma plântula, podem diminuir os níveis de etileno de modo que não se tornem elevados prejudicando o desenvolvimento vegetal (GLICK, 2005).

Muitos trabalhos relatam o efeito de bactérias produtoras da ACC deaminase na melhora do desempenho de plantas submetidas a vários tipos de estresse, como o estresse hídrico (ARSHAD; SHAHAROONA; MAHMOOD, 2008), estresse salino (WU et al., 2012), excesso de água (GRICHKO; GLICK, 2001) e contaminação por metais pesados (STEARNS et al., 2005).

Foi constatada a presença da enzima ACC deaminase em vários gêneros comuns ao presente estudo, como *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* sp. (KAVAMURA et al., 2013).

#### 4.5.5 Indução de Resistência Sistêmica (IRS)

Os mecanismos de resistência relacionados à IRS mediada por RPCP, podem ser estruturais ou bioquímicos (ROMEIRO; GARCIA, 2003), como o aumento da lignificação da parede celular, dificultando a entrada e a colonização de patógenos pela liberação de enzimas hidrolíticas (PASCHOLATI; LEITE, 1994). A atuação da IRS pode ser localizada ou sistêmica, variando de acordo com a idade da planta, os fatores ambientais, condições de cultivo, o estado nutricional da planta e os diferentes cultivares em relação ao indutor de resistência (BONALDO et al., 2005).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ocorrem normalmente no metabolismo celular; porém, em condições de estresse biótico e abiótico, como o estresse hídrico, podem ter produção aumentada e, tornarem-se citotóxicas ao reagirem com outras moléculas, causando sérios danos ao metabolismo vegetal, por meio de reações oxidativas a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (HERNANDEZ et al., 2001). Quando há a produção em excesso de EROs, devido à condição de estresse, ocorre o fenômeno conhecido como “explosão oxidativa” (MATAMOROS et al., 2006).

As plantas com maior atividade de enzimas antioxidativas mostram-se mais tolerantes a diferentes tipos de estresse, as rizobactérias podem induzir o aumento da atividade destas enzimas antioxidativas, como por exemplo, peroxidase, catalase, polifenoloxidase e superóxido dismutase (LAMBAIS et al., 2003; ARFAOUI et al., 2007).

No presente estudo houve indução de resistência sistêmica para as duas enzimas analisadas: peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO). Nota-se uma expressão de atividade maior em ambas enzimas na 2ª coleta do experimento, onde as plantas estavam passando pelo período mais estressante, com cinco dias consecutivos sem serem irrigadas.

Os isolados W714 e N920 (*Sphingobacterium* sp.), foram capazes de induzir a expressão enzimática de PO em folhas de soja, quando comparados com o controle negativo a 30% e 80% da capacidade de campo. Não houve IRS nas raízes para nenhum dos isolados (Figura 14).

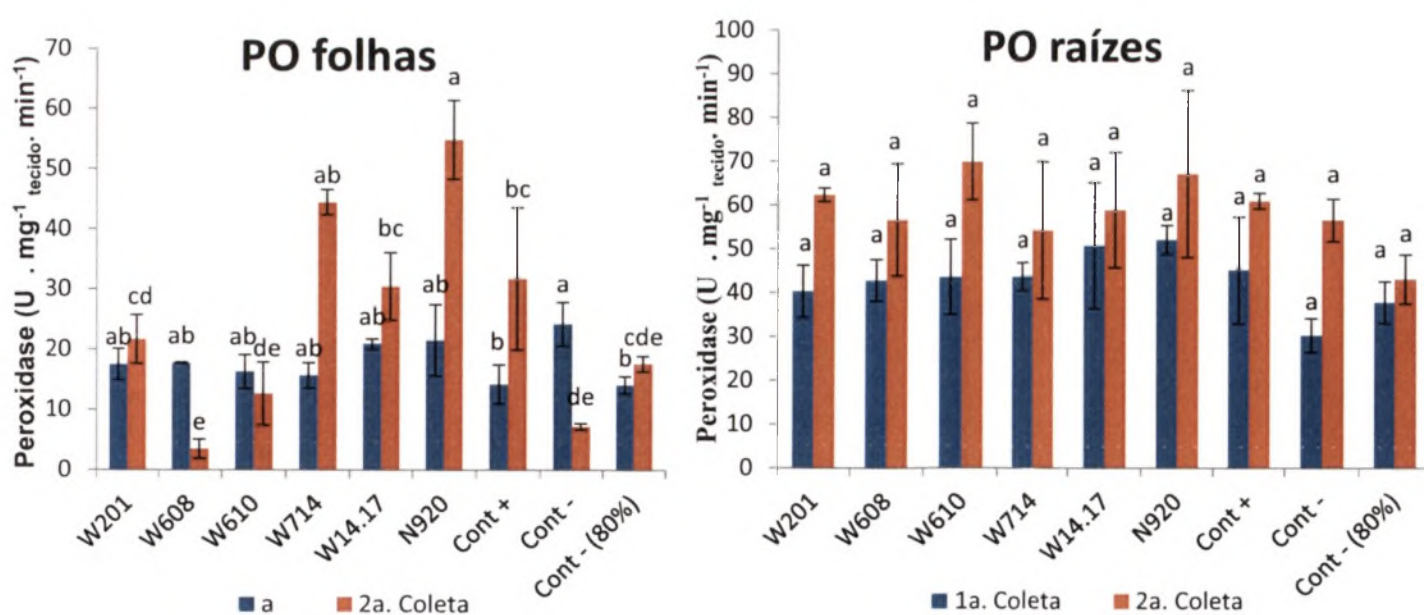


Figura 14 - Expressão enzimática de peroxidase em folhas e raízes de soja sob condições de estresse hídrico. 1ª coleta: dois dias consecutivos de estresse; 2ª coleta: cinco dias de estresse hídrico consecutivos. Análise estatística foi efetuada por comparação entre os

tratamentos para cada coleta em separado, com 3 repetições por amostra e teste de Tukey a 5% de probabilidade

O resultado sugere que o estresse hídrico submetido as plantas, pode induzir mecanismos de resistência à temperatura e possíveis fitopatógenos, uma vez que aumentou a expressão da enzima PO. Kohler et al. (2009) submeteram folhas de *Lactuca sativa* L. a diferentes níveis de estresse salino e, constataram o aumento da expressão de PO quando inoculadas com uma estirpe de *Pseudomonas* sp.

Em relação à expressão enzimática de PPO, houve indução de resistência sistêmica apenas pelo isolado W714, em folhas de soja (*Glycine max* L.) também na 2ª coleta do experimento. Assim como PO, não houve expressão enzimática de PPO nas raízes (Figura 15).

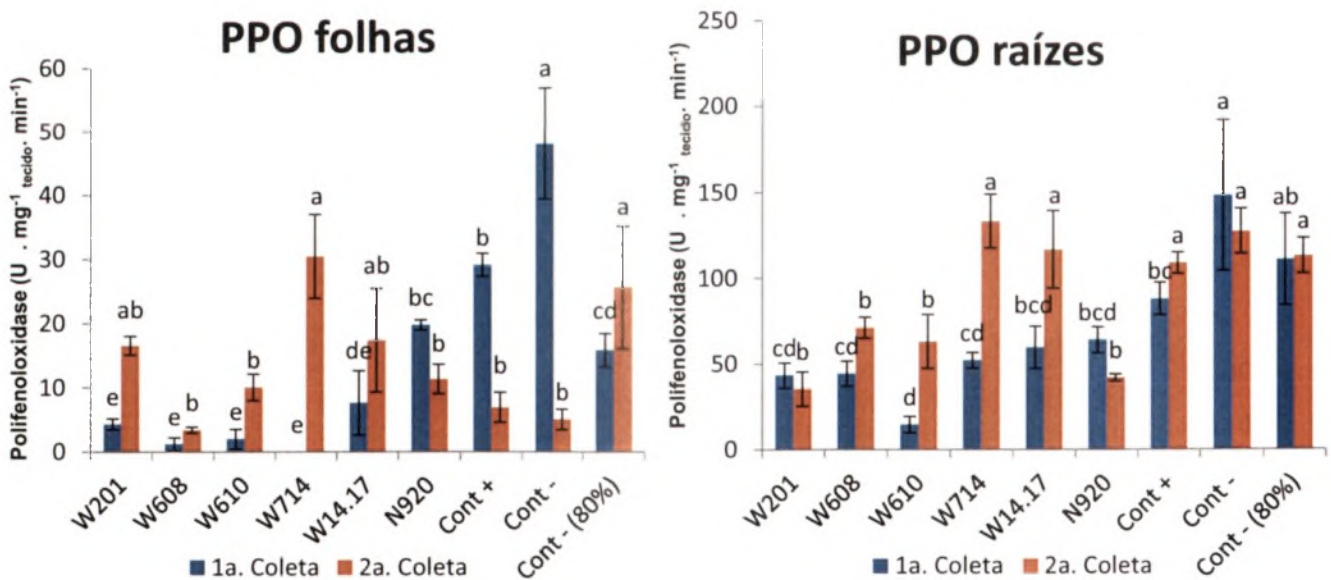


Figura 15 - Expressão enzimática de polifenoloxidase em folhas e raízes de soja sob condições de estresse hídrico. 1ª coleta: dois dias consecutivos de estresse; 2ª coleta: cinco dias de estresse hídrico. Análise estatística foi efetuada por comparação entre os tratamentos para cada coleta em separado, com 3 repetições por amostra e teste de Tukey a 5% de probabilidade

Quando a acumulação de EROs, sob condições de estresse hídrico excede a capacidade de remoção do sistema antioxidante, os efeitos do dano oxidativo aparecem. De acordo com Mittler (2002), a indução de enzimas que eliminam EROs, como por exemplo, PO (peroxidase), PPO (polifenoloxidase), é o

mecanismo de desintoxicação mais comum de EROs que ocorre durante as respostas ao estresse oxidativo.

Os dados encontrados na literatura para estas enzimas antioxidantes, são grandemente variados entre espécies de plantas e até mesmo entre duas cultivares da mesma espécie. Segundo Reddy et al (2004), o nível de resposta depende do desenvolvimento e do estado metabólico da planta, assim como a intensidade e duração do estresse. Muitas situações de estresse causam um aumento da atividade antioxidante, principalmente na área foliar das plantas (PASTORI et al., 2000), o que corrobora com o presente estudo. Ainda pouco se conhece sobre o controle da atividade de coordenação e de expressão das diferentes enzimas antioxidantes nas células de plantas que são submetidas à estresses.

No presente trabalho, as enzimas antioxidantes se mostraram ativas, reduzindo o estresse oxidativo causado pelo estresse hídrico, o qual levaria a desorganização, bem como a degradação de clorofila e proteínas (PASTORI e TRIPPI, 1992).

#### 4.5.6 Promoção de crescimento em *Glicine max*

Para a promoção de crescimento em casa de vegetação, dois parâmetros foram comprados. Fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo) e fornecimento reduzido, simulando estresse hídrico nas plantas de soja (30% da capacidade de campo). Todos os seis isolados foram testados em casa de vegetação nos dois parâmetros e comparados com a testemunha (sem inóculo bacteriano).

Sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo) houve diferença significativa na promoção de crescimento tanto para o peso da parte aérea, quanto o peso das raízes, quando se comparado com o controle negativo (testemunha) (Figura 16).

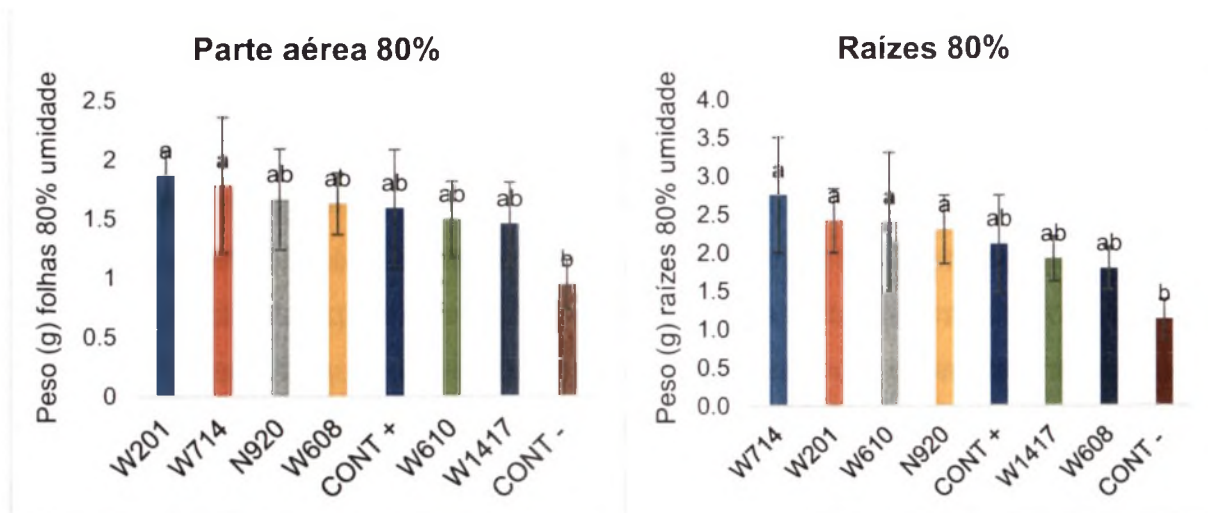


Figura 16 - Promoção de crescimento de *Glycine max* sob fornecimento normal de água (80% da capacidade de campo). Comparação do peso (g) da parte aérea e raiz, com o controle – (testemunha). Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Apenas duas linhagens W201-*Bacillus* sp. e W714 foram capazes de aumentar significativamente ( $p < 0,05$ ) o peso seco da parte aérea juntamente com o peso seco radicular. Essas duas linhagens proporcionaram um melhor desenvolvimento da planta quando se comparado com os outros tratamentos e também com a testemunha.

Para o teste realizado com fornecimento de água reduzido (30% da capacidade de campo) também obteve-se diferença significativa entre os isolados na promoção de crescimento sob condições de estresse hídrico, quando comparados com o controle negativo (testemunha) (Figura 17).

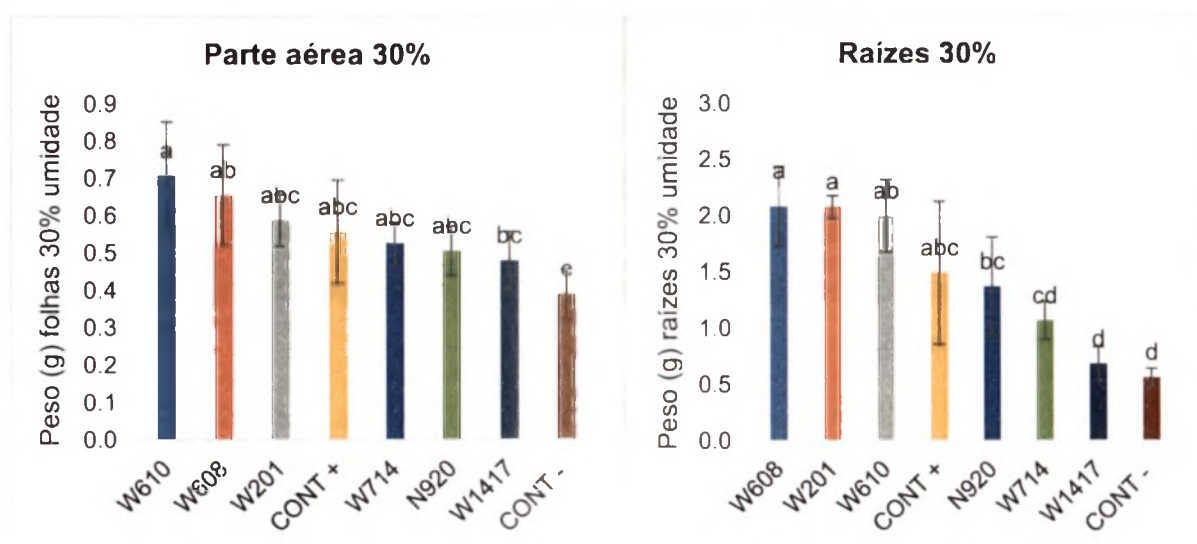


Figura 17 - Promoção de crescimento de *Glycine max* sob fornecimento reduzido de água (30% da capacidade de campo). Comparação do peso (g) da parte aérea e raiz com o controle –



(testemunha). Valores estatisticamente significativos, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em relação ao peso da parte aérea, o isolado W610-*Paenibacillus* sp e a linhagem W608 se sobressaíram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros isolados e também quando comparados com o controle negativo (testemunha), proporcionando um incremento de 81% e 68% respectivamente. Para o peso da área radicular, a linhagem W608, W201-*Bacillus* sp. e W610-*Paenibacillus* sp apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no sistema radicular em 270%, 269% e 255%, respectivamente quando comparados com as plantas que não receberam inóculo bacteriano.

Kavamura et al. (2013) reportam a promoção de crescimento em plantas de milho sob condições de estresse hídrico por linhagens de *Bacillus* spp. isoladas do semiárido brasileiro. No presente estudo, a linhagem identificada como *Bacillus* sp. (W201) atuou como promotor de crescimento em plantas de soja, tanto em fornecimento normal de água, quanto em o fornecimento reduzido, mitigando os efeitos impostos pela seca. Outro isolado promissor na promoção de crescimento em condições de estresse hídrico foi *Paenibacillus* sp. (W610), pois aumentou de modo significativo os dois parâmetros medidos, parte aérea e sistema radicular. Já se conhece o potencial de espécies de *Paenibacillus* spp. na promoção de crescimento vegetal. Silva e Figueiredo (2006) mostraram que *P. polymyxa* co-inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. proporcionou uma tendência de aumento nas concentrações de cálcio, fósforo e ferro na parte aérea das plantas de caupi, auxiliando deste modo, a promoção de crescimento vegetal.

Os efeitos negativos causados pela seca, foram mitigados aparentemente por ambas linhagens, *Bacillus* sp. (W201) e *Paenibacillus* sp. (W610) sendo estas, capazes de manter as plantas saudias (Figura 18 a) e alongar o sistema radicular em relação a testemunha (Figura 18 b), quando submetidas ao estresse hídrico.

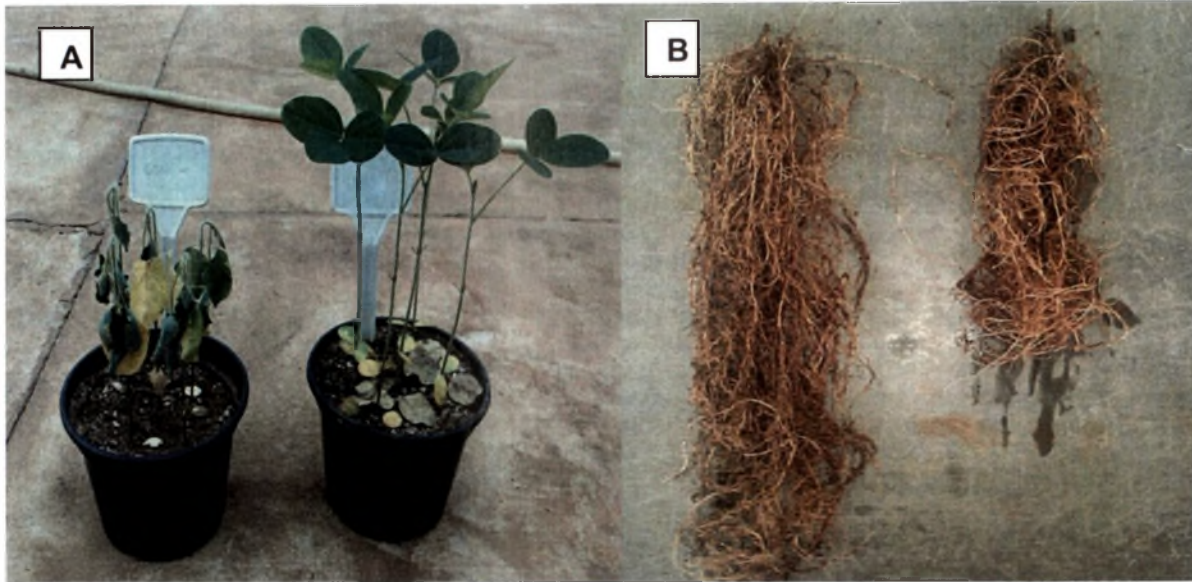


Figura 18 - Reação de plantas de soja à inoculação de *Bacillus* e *Paenibacillus* sob estresse hídrico. A) Efeitos da seca de plantas inoculadas com *Bacillus* sp. (W201) (30% da capacidade de campo) comparada com a planta controle. B) Sistema radicular de soja contendo inóculo de *Paenibacillus* sp. (W610) comparado com o sistema radicular de planta controle

Houve uma correlação positiva entre a produção de AIA com o aumento radicular das plantas, pois as bactérias com os maiores potenciais para a produção do hormônio vegetal, cujo está diretamente relacionado ao alongamento radicular, foram os que aumentaram estatisticamente de modo significativo o peso das raízes sob condições de estresse hídrico.

O alongamento radicular é um dos marcadores do benefício de RPCP. As plantas aumentam a sua habilidade de se ancorar ao solo e obter água e nutrientes de forma mais eficiente quando há a promoção do crescimento radicular, acentuando assim, as chances de sobrevivência (PATTEN; GLICK, 2002). O AIA aparentemente não funciona como um hormônio em células bacterianas e sua produção por bactérias pode ter surgido devido a sua importância na relação benéfica entre bactéria-planta.

Patten e Glick (2002) utilizaram uma linhagem de *Pseudomonas putida* capaz de produzir altas concentrações de AIA e constataram um aumento de até 110% no crescimento primário das raízes de canola. Demonstrando assim, uma correlação entre a produção de AIA e o alongamento da raiz, quando a bactéria produtora está associada à planta.

Outros parâmetros como a produção de exopolissacarídeos, formação de biofilme em condições de estresse, presença da enzima ACC deaminase, também se correlacionaram de forma positiva com o resultado obtido em casa de

vegetação, para promoção de crescimento vegetal em condições de estresse hídrico. Sandhya et al (2009) ao inocularem em plantas de girassol sob condições de estresse hídrico, uma linhagem de *Pseudomonas putida* capaz de produzir EPS, observaram a indução de biofilme na superfície radicular, melhorando a estrutura do solo e mantendo um microambiente mais hidratado. Têm sido sugerido por muitos autores, que as bactérias que contêm a atividade da enzima ACC deaminase, de uma forma geral, agem para reduzir o nível de estresse produzido por altas concentrações de etileno. Mayak, Tirosh e Glick (2004) isolaram uma espécie de *Alcaligenes piechaudii* com atividade da ACC deaminase, de uma amostra de solo em uma região seca, com baixa precipitação pluviométrica no sul de Israel. A bactéria isolada foi inoculada em plantas de tomate sob condições de estresse hídrico, a fim de avaliar a promoção de crescimento nestas condições. *A. piechaudii* foi capaz de promover o crescimento sob condições de seca de um modo significativo quando comparado com a testemunha, e até mesmo com uma estirpe de *P. putida* promotora de crescimento vegetal. Os autores acreditam que a proteção vegetal contra a dessecação pode estar associada com os baixos níveis de etileno na planta após serem inoculadas com bactérias capazes de produzir ACC deaminase, restringindo assim, a produção de etileno pelas plantas. Kavamura et al (2013), observaram uma correlação estatística significativa entre a produção de biofilme e a promoção de crescimento em plantas de milho sob estresse hídrico. Bactérias isoladas de cactáceas do bioma Caatinga foram capazes de aumentar a área foliar, comprimento do caule e o peso seco da parte aérea em plantas de milho, correlacionando-se fortemente com a produção de biofilme pelos isolados. Os autores sugeriram que a produção de biofilme pelas linhagens, pode ter conferido certa proteção à planta, que foi capaz de crescer sob reduzida aplicação de água.

A seca é uma das principais condições ambientais adversas capazes de reduzir a produtividade agrícola, portanto, o uso de RPCP tolerantes à seca, capazes de diminuir os danos causados para as plantas é de suma importância para práticas agrícolas, principalmente em locais onde a seca é endêmica.

No presente estudo, observamos que há um grande potencial de *Bacillus* sp. (W201) e *Paenibacillus* sp. (W610) em cultivo de *G. max* sob estresse hídrico, no entanto, não é possível afirmar quais mecanismos de fato estão certamente envolvidos na promoção de crescimento das plantas em condições de

estresse osmótico, pois, é necessário que haja um maior entendimento sobre as relações ecológicas entre plantas e micro-organismos (MONTAÑEZ et al., 2012)

## 5 CONCLUSÕES

1. Os isolados que foram capazes de crescer em meio com baixa atividade de água possuem mecanismos de proteção contra a dessecação, mecanismos de ação que envolvem a produção de EPS, biofilme e a presença da enzima ACC deaminase.
2. As bactérias com características para tolerância à seca, possuem pelo menos algum tipo de mecanismo que está envolvido na promoção de crescimento de plantas, sendo mecanismos diretos e/ ou indiretos de ação. Os mecanismos dominantes foram: produção de EPS, biofilme, AIA e fixação de nitrogênio.
3. O bioensaio realizado sob fornecimento normal de água sugere que as linhagens de *Bacillus* sp. (W201) e *Leucobacter* SP. (W714) promovem o crescimento de *Glycine max* L. nos dois parâmetros analisados, sendo eles a parte aérea e sistema radicular nas plantas de soja. A promoção de crescimento vegetal pode ter sido conferida por alguns dos mecanismos de ação identificados nos isolados, como a produção do fitohormônio de crescimento AIA, e a fixação de nitrogênio ou até mesmo por outro mecanismo não aprofundado no presente estudo.
4. Os resultados de plantio de *Glycine max* L. sob condições de estresse hídrico são promissores, pois sugerem que as linhagens de *Paenibacillus* sp. (W610), *Bacillus* sp. (W201) e W608, mitigaram os efeitos negativos impostos pelo estresse hídrico, protegendo as plantas de soja contra a dessecação. Esta proteção pode ter sido ocasionada pela produção de EPS, biofilme, ACC deaminase, ou ainda por algum outro mecanismo de ação não verificado no presente estudo.



## REFERÊNCIAS

- AB'SABER, N.A. **Os domínios da natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. 2. ed. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003. 36 p.
- AGUILERA, M.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.; SUÁREZ, A.; GUERRA, V.; LIZAMA, C.; BENNASAR, A. *Paenibacillus jamilae* sp. and exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1687-1692, 2001.
- ALI, A.; KHALID, R.; ALI, S.; AKRAM, Z.; HAYAT, R. Characterization of plant growth promotion rhizobacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum*). **Original Research Article**, Rawalpindi, v. 37, p. 11-22, 2015.
- ALI, B.; SABRI, A.N.; HASNAIN, S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 1379-1384, 2010.
- AMIL-RUIZ, F.; BLANCO-PORTALES, R.; MUNOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J.L. The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. **Plant Cell Physiology**, Georgia, v. 52, p. 1873–1903, 2011.
- ARAÚJO, C.S.F.; SOUSA, A.N. Estudo do processo de desertificação na caatinga: uma proposta de educação ambiental. **Ciência & Educação**, Bauru, v. 17, n. 4, p. 975-986, 2011.
- ARFAOUI, A.; EL HADRAMI, A.; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Plant Physiology Biochemistry**. Oxford, v. 45, p. 470-479, 2007.
- ARSHAD, M.; SHAHAROONA, B.; MAHMOOD, T. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). **Pedosphere**, Nanjing, v. 18, n. 5, p. 611-620, 2008.
- AUGUSTO, L.G.S.; GURGEL, D.G.I.; CÂMARA NETO, F.H.; MELO, H.C.; COSTA, M.A. O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 19-28, 2012.
- BARRETO, M.C.S.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; SILVA, M.L.R.B.; LIMA-FILHO, J.L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira Agrociência**, Recife, v. 17, n. 2/4, p. 221-227, 2011.
- British Broadcasting Corporation BBC. **Maior crise hídrica de São Paulo expõe lentidão do governo e sistema frágil**. Disponível em: <<http://www.bbc.co.uk/>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY P.C.; ENEBACK, S. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Toronto, v. 47, p. 793-800, 2001.

BEZERRA, F.M.L.; ARARIPE, M.A.E.; TEÓFILO, E.M.; CORDEIRO, L.G.; SANTOS, J.J. A. Feijão caupi e déficit hídrico em suas fases fenológicas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 1, p. 6-10, 2003.

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

BISWAS, B.; GRESSHOFF, P.M. The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels. **International Journal of Molecular Sciences**. New York, v. 15, p. 7380-7397, 2014.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

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

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.-W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCA, E.; STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, Berlin, v. 105, p. 1–14, 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.07.004>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

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

CHOWDHURY, S.P.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; TRIPATHI, A.K. Diversity of 16S rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus syndicus*. **European Journal of Soil Biology**, Mount rouge, v. 45, p. 114-122, 2011.

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

CORONATO, M.; IMERCIO, A. O Brasil pede água. **Revista Época**, São Paulo, v. 3, n. 825, p. 44-50, 2014.



DAI, A.G.; TRENBERTH, K.E.; QIAN, T.T. A global data set of Palmer drought severity index for 1870–2002: relationship with soil moisture and effects of surface warming. **Journal of Hydrometeorology**, Washington, v. 5, p. 1117–1130, 2004.

DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil**, The Hague, v. 110, p. 207-212, 1989.

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

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study for polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Boston, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.

DUTRA, V.F.; MORIM, M.P. *Mimosa*. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB023084>>. Acesso em: 03 mar. 2015.

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

FARIAS, J.R.B.; ALMEIDA, I.R.; GARCIA, A. **Zoneamento agroclimático da cultura da soja para estado do Paraná**. Londrina: Embrapa-Soja, 2001. 84 p. (Documento, 102).

FERNANDES, A.G.; BEZERRA, P. Estudo fitogeográfico do Brasil. **Stylus Comunicações**, Fortaleza, v. 6, p. 32-38, 1998.

FERNANDES, J.D. **A irrigação no Brasil: situação e diretrizes**. Brasília: Ministério da Integração Nacional; IICA, 2008. 132 p.

FERNANDES, J.D.; MEDEIROS, A.J.D. Desertificação no nordeste: uma aproximação sobre o fenômeno do Rio Grande do Norte. **Holos**, Rio Claro, v. 3, p. 147-161, 2009.

FLEMMING, H.-C.J.; WINGENDER, G.; MAYER, C. Physico-chemical properties of biofilms. In: EVANS, L.V. (Ed.). **Biofilms**: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 19-34,

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

FRITSCHÉ-NETO, R.; VALE, J.C.; CAVATTE, P.C. Melhoramento para tolerância a estresses ou para eficiência no uso de recursos In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 30-38.

GAGNÉ-BOURQUE, F.; MAYER, B.F.; CHARRON, J-B.; VALI, H.; BERTRAND, A.; JABAJI, S. Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26. Canadá, **PLoS ONE**, Victoria, v. 10, p. 6-13, e0130456, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0130456.

GAMALERO, E.; GLICK, B.R. Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**. Berlin: Springer, 2012. p. 395-412.

GHEVARIYA, K.K.; DESAI, P.B. Rhizobacteria of sugarcane: *in vitro* screening for their plant growth promoting potentials. **Research Journal of Recent Sciences**, Chicago, v. 3, p. 52-58, 2014.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A. To set the scene. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia 2006. p. 11-15.

GIULIETTI, A.M.; BOCAGE NETA, A.L. de; CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; VIRGÍNIO, J.F.; QUEIROZ, L.P. de. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.T.; FONSECA, LINS, L.V. (Org). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação** Brasília: MMA; UFPE; Conservation International do Brasil; Fundação Biodiversitas; Embrapa Semi-Árido, 2004 p. 48-80.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 1-7, 2005.

GLICK, B.R. **Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications**. New York: Hindawi Publishing Corporation; Scientifica. 2012. 33 p.

GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, São Francisco, v. 15, p. 353-378, 1995.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 26, p. 192-195, 1951

GRANT, W.D. Life at low water activity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences**, London, v. 359, p. 1249-1267, 2004.

GRICHKO, V.P.; GLICK, B.R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, p. 11-17, 2001.

GUIMARÃES, D.P.; COSTA, F.; RODRIGUES, M.J.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acid hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 129-139, 1999.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA JÚNIOR, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, São Paulo, v. 41, n. 8, p. 1247-1252, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, Las Vegas, v. 20, p. 73-80, 1982.

HARRIS, D.; TRIPATHI, R.S.; JOSHI, A. On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct seeded rice. In: PANDEY, S.; MORTIMER, M.; WADE, L.; TUONG, T.P.; LOPES, K.; HARDY, B. (Ed.). **Direct seeding: research strategies and opportunities**. Manila: International Rice Research Institute, 2002. p. 231-240.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 916-923, 1983.

HERNANDEZ, J.A.; TALAVERA, J.M.; MARTINEZ-GOMEZ, P.; DICENTA, F.; SEVILLA, F. Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. **Physiology Plant**, Houston, v. 111, p. 313-321, 2001.

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

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

KARADENIZ, A.; TOPCUOGLU, S.F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seattle, v. 22, p. 1061-1064, 2006.

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; AVILA, L.A. . . . . Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research (Jaguaruna)**, v. 168, p. 183-191, 2013.

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

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; Na, H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 62, p. 716-721, 2012

KOHLER, J.; HERNANDEZ, A.J.; CARAVACA, F.; ROLDAN, A. Induction of antioxidante enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Austin, v. 65, p. 245-252, 2009.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; DEVI, S.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. **Recent Research in Science and Technology**, Chicago, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2012.

KUMAR, C.G.; JOO, H.-S.; CHOI, J.-W.; KOO, Y.-M.; CHANG, C.-S. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 673-681, 2004.

LAMBAIS, M.R.; RÍOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist Trust**, Ottawa, v. 160, p. 421-428, 2003.

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

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da caatinga**. 2. ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. 822 p

LE COMTE, D. Weather highlights around the world. **Weatherwise**, Surrey, v. 48, p. 20-22, 2005.

LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. **FEMS Microbiology Ecology**, Kingston, v. 22, p. 325-334, 1997.

LIU, S.; CHEN, X.; HE, H.; ZHANG, X.; XIE, B.; YU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the artic sea ice bacterium *Pseudolateromonas* sp. Strain SM20310. **Applied Environmental Microbiology**, Miami, v. 1, p. 224, 2013.

MARENGO, J.A.; BERNASCONI, M. Regional differences in aridity/drought conditions over Northeast Brazil: present state and future projections. **Climatic Change**, São Paulo, v. 12, p.103-115, 2015.

MARULANDA, A.; PORCEL, R.; BAREA, J.M.; AZCO, N.R. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. **Microbial Ecology**, Washington, v. 54, p. 543-552, 2009.

MATAMOROS, M.A.; DALTON, D.A.; RAMOS, J.; CLEMENTE, M.R.; RUBIO, M.C. BACANA, M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. **Plant Physiology**, Orlando, v. 133, p. 499-509, 2006.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Effect of wild-type and mutant plant growth promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 18, p. 49-53, 2004.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB). **Microbial Ecology**, Orlando, v. 51, p. 56-69, 2001.

MISHRA, A.K.; SINGH, V.P.; DESAI, V.R. Drought characterization: a probabilistic approach: stock environment. **Research and Risk Assessment**, São Francisco, v. 23, n. 1, p. 41-55, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, New York, v. 7, p. 405-410, 2002.

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

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

NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. **Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio23/tolerancia.pdf>> Acesso: 27 nov. 2014.

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

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Palntas**, Campinas, v. 2, p. 1-37, 1994.

PASTORI, G.; MULLINEAUX, P.; FOYER C.H. Post transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize: implication on the sensitivity of maize to low temperatures. **Plant Physiology**, Toronto, v. 122, p. 667-675, 2000.

PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. **Plant Cell Physiology**, Amsterdam, v. 33, n. 7, p. 957-961, 1992.

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

PAULO, E.M. **Encapsulamento de *Lactobacillus acidophilus* por atomização em *spray drying*, utilizando exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias lácticas**. 2010. 222 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

POTTS, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 58, n. 4, p. 755-805, 1994.

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

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; BRUIJN, F.J. de. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L., ELSAS, J.D. van; BRUIJN, J.D. de. **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. chap. 3.4.3, p. 1-26.

RAMEY, B.E.; KOUTSOUDIS, M.; von BODMAN, S.B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 602-609, 2004.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Santiago, v. 161, n. 11, p. 1189-1200, 2004.

RICHTER, C.; DIRKS, M.E.; GRONOVER, C.S.; PRUFER, D.; MOERSCHBACHER, B.M. Silencing and heterologous expression of ppo-2 indicate a specific function of a single polyphenol oxidase isoform in resistance of dandelion (*Taraxacum officinale*) against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Dallas, v. 25, p. 200–210, 2012.

ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Controle Biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Piracicaba, v. 11, p. 195-228, 2003.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.; TESLENKO, M. **MrBayes version 3.2 manual: tutorials and model summaries**. [s.l.: s.n.], 2011. 172 p.

ROSEGRANT, M.W.; CAI, X.; CLINE, S.A. Global water outlook to 2025: **Averting an Impending Crisis**, San Diego, v. 14, p. 27-36, 2012.

ROSS, T.; LOTT, N. **A climatology of 1980–2003 extreme weather and climate events**. Asheville: National Climatic Data Center, 2003. 12p. (National Climatic Data Center Technical Report, 2003-01).

SÁ, I.B.; RICHÉ, G.R.; FOTIUS, G.A. As paisagens e o processo de degradação do semiárido nordestino. In: SILVA, J.M.C.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (Ed.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. pt. 1, p. 17-36.

SALEH-LAKHA, S.; GRICHKO, V.P.; SISLER, E.C.; GLICK, B.R. The effect of the ethylene action inhibitor 1-cyclopropenylmethyl butyl ether on early plant growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, n. 4, p. 307-312, 2004.

SAMPAIO, E.V.S.B.; SAMPAIO, Y.; VITAL, T.; ARAÚJO, M.S.B.; SAMPAIO, G.R. **Desertificação no Brasil**. Recife: Editora Universitária, 2008. 202 p.

SANDHYA, V.; ALI, S.Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; VENKATESWARLU, B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 17-26, 2009.

SEESURIYACHAN, P.; KUNTIYA, A.; HANMOUNGJAI, P.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T.; LEKSAWASDI, N. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Las Vegas, v. 76, n. 5, p. 912-917, 2012.

SEMINARA, A.; ANGELINI, T.E.; WILKING, J.N.; VLAMAKIS, H.; EBRAHIM, S.; KOLTER, R.; BRENNER, M.P. Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, p. 1116-1121, 2012.

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

SHIKLOMANOV, I.A. **World water resources at the beginning of the 21st century**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 45 p.

SIDDALINGASWAMY, N.; BONGALE, U.D.; BANDI, A.G.; NARAYANAGOWDA, S.N. Studies on water requirements and water use efficiency at different methods and levels of irrigation in mulberry. **Sericologia**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 433-439, 2008.

SILVA, N.V.; SILVA, F.S.E.L.; FIGUEIREDO, B.V.M. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Recife, v. 36, p. 95-99, 2006.

SILVI, S.; BARGHINI, P.; AQUILANTI, A.; JUAREZ-JIMENEZ, B.; FENICE, M. Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. **Microbial Cell Factories**, San Diego, v. 34, p. 233-245, 2013.

SIMON, M.F.; GREYER, R.; QUEIROZ, L.P.; SARKINEN, T.E.; DUTRA, V.F.; HUGHES, C.E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, Atlanta, v. 98, p. 1201-1221, 2011.

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

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, Reading, v. 33, p. 152-155, 2006.

STEARNS, J.C.; SHAH, S.; GREENBERG, B.M.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 701-708, 2005.

SUKWEENADHI, J.; KIM, Y.J.; CHOI, S.E.; KOH, C.S.; LEE, W.S.; KIM, J.Y.; YANG, C.D. *Paenibacillus yonginensis* DCY84 induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought and salt stress. **Microbiological Research**, Busan, v. 172, p. 7-15, 2015

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, Oct. 2013.

TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M.C.M. de; FAIRCHILD, T.R.; TAIOLI, F. (Org.). **Decifrando a terra**. São Paulo: Oficina de Textos, 2000. 568 p.

TENG, C.; ZHOU, Z.; MOLNÁR, I.; LI, X.; TANG, R.; CHEN, M.; WANG, L.; SU, S.; ZHANG, W.; LIN, M.; Whole-genome optical mapping and finished genome sequence of *Sphingobacterium deserti* sp. nov., a new species isolated from the Western Desert of China. **PLoS ONE**, Beijing, v. 10, p. 1-16, e0122254, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0122254.

THAKKER J.N.; PATEL S.; DHANDHUKIA P.C. Induction of defense-related enzymes in banana plants: effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, **ISRN Biotechnology**, New York, v. 13, p. 1–6, 2013.

TIMMUSK, S.; WAGNER, H. The plant growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Denver, v. 12, p. 951-959, 1999.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E.G.H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Paris, v. 71, p. 7292–7300, 2005.

TODAKA, D.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. **Frontiers in Plant Science**, San Diego, v. 6, p. 84-95, 2015. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00084>.



TUNDISI, J.G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Revista Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 63, p. 17-28, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142008000200002>>. Acesso em: 22 jul. 2015.

UNIVERSIDADE DA ÁGUA. **Água do planeta**. Disponível em: <<http://www.uniagua.org.br>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

VEBLEN, T.T.; YOUNG, K.R.; ORME, A.R. **The physical geography of South America**. New York: Oxford University Press, 2007. 380 p.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. Genomic finger printing of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting bacteria as biofertilizers. **Plant Soil**. Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

WILHITE, D.A. Drought: a global assessment. **Routledge**, New York, v. 1/2, p. 89-104, 2000.

WINKLER, L. Melhoramento genético de plantas por meio de ideotipos. **Fundacep**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 7, 2006.

WU, Z.; YUE, H.; LU, J.; LI, C. Characterization of rhizobacterial strain Rs-2 with ACC deaminase activity and its performance in promoting cotton growth under salinity stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 2383-2393, 2012.

ZHANG, S.; THOMAS, L.; WHITE MIRIAM, C.; MARTINEZ, J.A.; MCINROY, J.W.; KLOEPPER, K.W. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. **Biological Control**, Dallas, v. 53, p. 129-135, 2010.

ZHAO, J.-L.; ZHOU, L.-G.; WU, J.-Y. Promotion of *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide-protein fractions of plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus*. **Process Biochemistry**, London, v. 45, p. 1517-1522, 2010.