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

**Avaliação de consórcios bacterianos para mitigar os efeitos do estresse
hídrico em culturas de soja**

Jorge Fernandes Albano de Moraes

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

**Piracicaba
2018**

Jorge Fernandes Albano de Moraes
Bacharel em Ciências Biológicas

**Avaliação de consórcios bacterianos para mitigar os efeitos do estresse hídrico em
culturas de soja**

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

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

Piracicaba
2018

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

Morais, Jorge Fernandes Albano de

Avaliação de consórcios bacterianos para mitigar os efeitos do estresse hídrico em culturas de soja / Jorge Fernandes Albano de Moraes. - - Piracicaba, 2018.

39 p.

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

1. Estresse hídrico 2. Inoculante 3. Promoção de crescimento I. Título

DEDICO

À minha mãe Celina Aparecida Albano

Por todo o amor transmitido de onde quer que esteja.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Capes pela bolsa concedida!

Ao meu orientador Itamar Soares de Melo, pela oportunidade e ensinamentos!

Aos funcionários da Embrapa: Marcia Parma pela ajuda durante todo o trabalho!

Aos colegas do laboratório pela companhia e ensinamentos!

À minha namorada Érica pela companhia, ajuda e todo o carinho dado à mim!

À toda minha família!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. DESENVOLVIMENTO	11
2.1 Revisão Bibliográfica.....	11
2.1.1 Aquecimento Global e diminuição da disponibilidade de água	11
2.1.2 Estresse hídrico na soja	13
2.1.3 Microrganismos de solo e rizosfera	14
2.1.4 Respostas fisiológicas dos organismos ao estresse.....	14
2.1.5 Produção de osmólitos intracelulares por microrganismos tolerantes ao estresse hídrico.....	15
2.2 Objetivos.....	16
2.2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2.2 Objetivos Específicos	16
2.3 Material e Métodos	16
2.3.1 Isolados utilizados	16
2.3.2 Teste de Compatibilidade entre inoculantes	16
2.3.3 Formação de biofilme em diferentes condições nutricionais	17
2.3.4 Quantificação da formação de Biofilme	17
2.3.5 Avaliação da Produção de Ácido Indol-acético (AIA)	18
2.3.6 Avaliação Quantitativa de solubilização de Fosfatos Inorgânicos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	19
2.3.7 Fixação de Nitrogênio em Meio Livre de Nitrogênio (NFb).....	19
2.3.8 Avaliação da Resposta ao Estresse Hídrico em Casa de Vegetação	20
2.3.8.1 Desinfecção Superficial das Sementes de <i>Glycine max</i>	20
2.3.8.2 Microbiolização das Sementes	21
2.3.8.3 Ensaio em Casa de Vegetação	21
2.3.9 Análise Estatística	22
2.4 Resultados e Discussão	23
2.4.1 Teste de compatibilidade entre os isolados	23
2.4.2 Formação de Biofilme	23
2.4.4 Solubilização de fosfato inorgânico.....	24
2.4.5 Fixação de Nitrogênio.....	24

2.4.6 Análise Fotossintética dos consórcios	28
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS.....	33

RESUMO

Avaliação de consórcios bacterianos para mitigar os efeitos do estresse hídrico em culturas de soja

O crescente aumento da população acarretará uma alteração na demanda por alimentos, tornando-se assim motivo de preocupação no âmbito da produção agrícola mundial. As mudanças climáticas constituem uma das mais sérias variáveis que podem prejudicar o processo produtivo de diferentes culturas de importância econômica, pois tais condições têm alterado o cenário ambiental global, tornando o estresse hídrico uma questão importante em todo o mundo. Esta condição tem sido apontada como um problema para o aumento produtivo de diferentes culturas. Assim, novas soluções para a sobrevivência e o crescimento das plantas sob a disponibilidade restrita de água são de importância central para maior eficiência agrícola. O uso de microrganismos simbióticos como inoculantes em culturas agrícolas pode contribuir com o sucesso desta atividade, pois diversos trabalhos têm relatado a presença de mecanismos adaptados a condições extremas podendo ser utilizados como ferramentas alternativas para aumentar a tolerância à seca das culturas que estarão associadas. Neste contexto, a busca por microrganismos com capacidade de sobrevivência em ambientes extremos, tem se apresentado como uma estratégia favorável na busca de opções para resolução destes problemas. Entretanto, pouco se sabe sobre bactérias simbióticas com a soja e os efeitos deste quando em condições de estresse hídrico. Desta forma, propõe-se com este estudo a descoberta de linhagens compatíveis que promovam crescimento de plantas de soja sob estresse hídrico e elucidação dos mecanismos que essas bactérias utilizam para induzir tolerância ao estresse. Dentro dessa abordagem, visa-se ainda o desenvolvimento de inoculante bacteriano em consórcio capaz de promover o crescimento e aumentar a produtividade de plantas da soja sob condições limitantes de água.

Palavras-chave: Estresse hídrico; Inoculante; Promoção de crescimento

ABSTRACT

Evaluation of bacterial consortia to mitigate the effects of water stress in soybean crops

The increasing population will lead to a change in the demand for food, making it a major concern in the field of world agricultural production. Climate change is one of the most serious variables that can hinder the productive process of different crops of economic importance. such conditions have altered the global environmental scenario, making water stress an important issue throughout the world. This condition has been pointed out as a problem for the productive increase of different cultures. Thus, new solutions for the survival and growth of plants under the restricted availability of water are of central importance for greater agricultural efficiency. The use of symbiotic microorganisms as inoculants in agricultural crops may contribute to the success of this activity, since several studies have reported the presence of mechanisms adapted to extreme conditions and can be used as alternative tools to increase the drought tolerance of the crops that will be associated. In this context, the search for microorganisms with the ability to survive in extreme environments has been presented as a favorable strategy in the search for options to solve these problems. However, little is known about symbiotic bacteria with soybean and its effects when under stress conditions. Thus, it is proposed with this study the discovery of compatible strains that promote the growth of soybean plants under water stress and elucidation of the mechanisms that these bacteria use to induce tolerance to stress. Within this approach, the development of a bacterial inoculant in a consortium capable of promoting growth and increasing the productivity of soybean plants under water limiting conditions.

Keywords: Hydric stress; Inoculant; Growth promotion

1. INTRODUÇÃO

O déficit hídrico é um dos fatores que mais afeta a produção agrícola, pois dificulta o crescimento da planta (REF). O déficit de água danifica o mecanismo fotossintético, altera a expressão gênica e, prejudica a síntese protéica necessária para seu desenvolvimento e, pode dificultar a abertura estomática, retardando o crescimento e a produção vegetal (Siddalingaswamy et al., 2008). As implicações do déficit hídrico no mundo podem ser drásticas, na agricultura, especificamente pode afetar os níveis de produção e, na sociedade, pode se tornar uma ameaça severa para a segurança alimentar mundial (Farias et al., 2001). No intuito de superar tais obstáculos, a irrigação dos cultivos tem apresentado constante ascensão. Embora a irrigação na agricultura se apresente como uma maneira eficaz no aumento da produtividade, o aumento no consumo de água também causar preocupação devido à cada vez menos disponibilidade deste recurso (Paz et al.; 2000). Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a atividade humana que consome maior quantidade de água é a agricultura irrigada. A nível mundial, estima-se que, o setor agrícola seja responsável por cerca de 80% das derivações de água, como consequência da sua utilização, além disso, as ações do homem podem agravar a seca em diversos países, resultando em mudanças climáticas que alteram as temperaturas médias anuais e influenciam os ciclos de chuva, dificultando o abastecimento e a disponibilidade da água (Mendelsohn, 2016).

Diferentes culturas necessitam otimização dos processos de produção, com o fim de aumentar os índices de produção anuais, como é o caso da soja (*Glycine max*), um dos principais cultivos de grãos, produzidos em diferentes países do mundo. O Brasil, é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo superado apenas pelos Estados Unidos (CONAB, 2017). Na safra 2016/2017, o Brasil atingiu uma produção estimada em 114 milhões de toneladas (CONAB, 2017). A soja vem desempenhando um papel protagonista no aumento da produção de grãos no país, constituindo assim um dos principais responsáveis pelo PIB nacional (Ferrari et al., 2015). Entretanto, o déficit hídrico é o fator mais negativo que limita a produtividade da soja (Battisti, 2013). Os períodos da semeadura, emergência e, enchimento dos grãos são os mais críticos com relação a falta de água na planta (REF), além disso, atividades enzimáticas, como a nitrogenase pode ser afetada (Hungria e Vargas, 2000).

Alguns microrganismos foram avaliados enquanto a seus mecanismos que podem auxiliar na sobrevivência das plantas em ambientes extremos, características como possibilitam a indução de tolerância à seca em culturas de grande valor econômico (Kavamura et al., 2013; Marulanda et al., 2006).

Considerando este cenário, resulta imprescindível avaliar características específicas dos microrganismos associados ao cultivo da soja com capacidade de mitigar os efeitos causados pelo estresse hídrico, visando maior produtividade e, conservação dos recursos naturais, especificamente o hídrico.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Aquecimento Global e diminuição da disponibilidade de água

O aquecimento global é uma mudança atmosférica como consequência do acúmulo de gases como o dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (NO_x) e o metano (CH_4) que causam o efeito estufa (REF). Parte dessa emissão, cerca de 23%, são causadas por atividades agrícolas antropogênicas, como é o caso do uso da terra para fins agrícolas (Cerri et al., 2004). O desmatamento, criação de ruminantes, uso de fertilizantes e decomposição de matéria orgânica no solo, também estão envolvidos na emissão desses gases (Lal et al., 1988; Reicosky, Lindstrom, 1993).

Essas mudanças, têm sérias implicações sobre o solo, clima, e a biodiversidade (Pounds et al., 2007). Em solos muito úmidos, a atividade microbiana é comprometida pela limitação de O_2 , já em condições de seca, esta atividade é comprometida pela redução da solubilidade do carbono orgânico (Linn e Doran, 1984; Zanchi et al., 2002). Além disso, com as mudanças climáticas, há o aumento da temperatura que ocasiona aumento da evapotranspiração, reduzindo a quantidade de água disponível no solo, mesmo que as chuvas não diminuam significativamente (REF).

A água, é um recurso natural finito e de fundamental importância em todos os aspectos da vida, já que, sem a sua ação direta ou indireta nenhum processo metabólico acontece (REF). Este valioso recurso, vem refletindo o descuido humano, pois sua qualidade está piorando devido à falta de políticas públicas voltadas para a sua preservação. O desequilíbrio ecológico da água é devastador, já que, sua escassez pode levar a miséria e fome e, seu excesso causa catástrofes ambientais (REF). Segundo registros do Sistema Único de Saúde (SUS), as doenças de veiculação hídrica correspondem à 80% das internações hospitalares no Brasil, evidenciando assim a qualidade imprópria da água para consumo humano (Merten e Minella, 2002).

Mundialmente, cerca de 70% do total do consumo de água doce é destinada ao setor agrícola, enquanto países subdesenvolvidos chegam a 90% (FAO, 2011). Estima-se que até 2050 o uso deste recurso aumentará em 20% (WWAP, 2016). Ao longo do último século, a taxa do uso da água aumentou duas vezes quando comparado ao crescimento populacional.

Segundo FAO (2011), uma redução de 10% no desperdício de água, seria possível abastecer o dobro da população mundial atual. A ineficiência de sistemas e métodos de irrigação influenciam na abundante quantidade de água que se usa em áreas de cultivos, já que em termos médios, para a produção de uma tonelada de grão, mil toneladas de água são utilizadas (Paz et al., 2000).

O Brasil dispõe de uma das maiores reservas de água doce do planeta, possuindo aproximadamente 13% do total da reserva de água doce disponível mundialmente (Simon e Webber, 2015). A Amazônia, área de menor densidade populacional, detém 70 % da água do país (Fernandes, 2008), entretanto, esses recursos hídricos não são distribuídos por igual temporal, espacial e territorialmente. Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2017), tais fatores, aliados aos problemas de qualidade da água e, o uso pelas diferentes atividades econômicas nas bacias hidrográficas, geram áreas de conflito social.

Para maximizar o uso dos recursos hídricos do Brasil, é necessário uma conscientização sobre o uso racional da água e manejo da irrigação, não apenas investir em novos equipamentos e tecnologias, já que, tem se reportado perda de até 36% da água destinada para a irrigação, principalmente por problemas de condução e distribuição nas infra-estruturas hidráulicas, que somado a fenômenos naturais como a evaporação, provocam grande desperdício no uso da água na agricultura (Fernandes, 2008).

Como consequência do mau gerenciamento dos recursos hídricos e a poluição de mananciais, grandes extensões territoriais no Brasil foram afetadas pelas secas e estiagens. Dados alarmantes da ANA (2017), mostram que, no período entre 2013 e 2016, foram afetadas 48 milhões de pessoas por estiagens ou secas no território nacional. Ainda neste período, houve a ocorrência de 4.824 eventos de seca com danos humanos. O maior impacto da escassez hídrica em 2016, afetou 18 milhões de habitantes, sendo que 84% dos impactados viviam na região do Nordeste.

2.1.2 Estresse hídrico na soja

Estresses hídricos resultam em diminuição significativa do rendimento das lavouras, restringindo os solos para plantio de culturas de importância comercial. Assim, toda uma cadeia produtiva é afetada, tanto os agricultores quanto os consumidores, colocando em risco a segurança alimentar mundial (Farias et al., 2001).

O estresse hídrico pode se descrever tanto do déficit quanto o excesso de água no ambiente, sendo que, o mais comum é a desidratação ou déficit hídrico. Segundo Bergamaschi (1992), conforme o solo vai secando, as plantas encontram dificuldade para absorver a água, uma vez que, há o aumento da força de retenção e diminuição da disponibilidade de água no solo para as plantas. A falta de água ocasiona distúrbios na estrutura lipídica da membrana biológica (Dias, 2010), perda da atividade enzimática e integridade da membrana (Mahajan e Tuteja, 2005), afeta a eficiência do processo fotossintético, o fechamento estomático e a desidratação do citoplasma (Miyasaka e Medina, 1981). A água desempenha o importante papel de absorver nutrientes do solo e transportá-los para diferentes partes da planta (REF). A germinação, é a primeira propriedade das sementes a ser prejudicada devido a seca (Harris et al., 2002). Culturas como a soja, possuem dois períodos críticos que podem ser afetados pelo déficit hídrico: a semeadura e a floração/enchimento de grãos. Sendo que, a escassez de água é mais prejudicial no período de enchimento de grãos do que na floração (Doss et al., 1974; Sionit & Kramer, 1977), pois na floração causa o aborto das flores, já no enchimento dos grãos, afeta o peso dos grãos e assim a produção (Berlato, 1981; Fageria, 1989). No período da germinação, excessos hídricos são mais limitantes que os déficits, porém ambos atrapalham o estabelecimento da cultura (Salinas et al., 1989). Quando a seca ocorre nos primeiros estágios do desenvolvimento vegetativo, a soja é capaz de recuperar-se melhor do que outras culturas (Doss & Thurlow, 1974), sendo tolerante a curtos períodos de déficit, já que, seu período de florescimento é longo e seu sistema radicular é profundo (Mota, 1983).

2.1.3 Microrganismos de solo e rizosfera

Os microrganismos desempenham funções ecológicas que mantêm a ciclagem de nutrientes e o equilíbrio dos ecossistemas (Marschner; Crowley; Yang 2004), além, facilitam a absorção de nutrientes pelas plantas (Gyaneshwar et al., 2002; Tinker, 1984), auxiliando nos processos como a fixação de nitrogênio atmosférico (Stewart, 1969; Vitousek et al., 2002), diminuindo a disponibilidade e a toxicidade de metais nas plantas (Burd et al., 2000) e, promovendo seu crescimento (Glick, 1995). Os microrganismos podem crescer usando partículas minerais e matéria orgânica e, ainda, colonizar a rizosfera das plantas (Foster, 1988). Kuske et al. (2002) constataram que, na camada mais superficial do solo (0 a 10 cm) a contagem foi significativamente maior que na profundidade de 20 a 30 cm. A rizosfera, definida como, o volume de solo que recebe influência das raízes das plantas (Hiltner, 1904), é constituída por três unidades que interagem entre si: a planta, o solo e os microrganismos (Lynch, 1990), nessa área, as raízes competem por água, espaço e nutrientes com as raízes de plantas vizinhas, além de competirem com os microrganismos presentes no solo (Ryan; Delhaize, 2001). Também, a atividade microbiana é muito intensa nessa região devido à secreção de compostos pelas raízes, tais como: exsudados, íons, enzimas, mucilagem, entre outros (Bais et al., 2006). A composição da estrutura microbiana da rizosfera pode ser influenciada por diversos fatores, como a quantidade e o tipo de exsudados radiculares, a espécie e a idade da planta, as condições do solo e as condições impostas pelo ambiente. (Rovira, 1965; (Marschner; Crowley; Yang 2004).

2.1.4 Respostas fisiológicas dos organismos ao estresse

Assim como as plantas, os microrganismos são capazes de sobreviver a estresse hídrico, usando mecanismos como: exopolissacarídeos, biofilme, produção de pigmentos e osmólitos intracelulares, entre outros (Chaves et al., 2002; Monier; Lindow, 2003). Os exopolissacarídeos, produzidos por microrganismos são compostos que se acumulam na superfície das células (Coronado et al., 1996), e tem sido associado como mecanismo de adaptação às condições estressantes ambientais em solos salinos, além de facilitar na tolerância das variações de temperaturas e estresse hídrico. Esses compostos degradam algumas substâncias

tóxicas, e facilitam a sobrevivência das plantas (Roper et al., 2007), além de proteger contra estresses ambientais (Coronado et al. 1996).

A sobrevivência da planta a determinados estresses ambientais pode ser auxiliada pela produção de EPS pelos microorganismos. A produção de EPS é controlada pelo fator AlgU (*AlgT*) que em condições de seca e hiperosmolaridade, é um importante fator na adaptação na rizosfera de microorganismos como *Pseudomonas fluorescense* (Schnider- Keel et al., 2001).

2.1.5 Produção de osmólitos intracelulares por microorganismos tolerantes ao estresse hídrico

Alguns microorganismos podem crescer em ambientes com altas concentrações salinas (Kavamura et al., 2013). As arqueias utilizam solutos inorgânicos como íons de cloreto e potássio para obter o balanço osmótico e, as eubactérias, acumulam pequenas moléculas orgânicas, denominadas osmólitos ou extremólitos que, balanceiam a concentração salina do ambiente (Lentzen; Schwarz, 2006). Esses mecanismos possibilitam o aumento da pressão osmótica citoplasmática, evitando a perda de água para o meio e, também, na estabilização de proteínas e membranas (McNeil et al., 1999). O extremólito ectoína atua na estabilização proteica contra alta temperatura, congelamento e desidratação (Lippert; Galinski, 1992). Alguns osmólitos, que também podem ser acumulados em caso de dessecação, podem ser açúcares como; sorbitol, mio-inositol e trealose, aminoácidos como glicina, taurina e prolina, e metilaminas como as betaínas (Yancey, 2001). McIntyre et al. (2007) concluíram que a trealose acumulada intracelularmente protege as células de *Rhizobium leguminosarum* contra a dessecação e contra o estresse durante a nodulação. *Azospirillum brasilense*, portando um plasmídeo com gene responsável pela biossíntese de trealose, foi capaz de crescer em concentrações salinas elevadas e acumular trealose (Rodríguez-Salazar et al., 2009), do mesmo modo, Ali e Ashraf (2011) avaliaram a aplicação de trealose na tolerância de milho ao estresse hídrico, através da regulação de atributos fotossintéticos e de mecanismos de defesa na planta.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de um consorcio bacteriano com potencial para promoção de crescimento de plantas e mitigação do estresse hídrico em culturas de soja (*Glycine max*, v. *Potenza*).

2.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar isolados de bactérias associadas ao cultivo da soja enquanto a seu potencial de promoção de crescimento vegetal.
- Avaliar a capacidade de tolerância a estresse hídrico em plantas de soja usando consórcios bacterianos.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Isolados utilizados

Os isolados foram obtidos da coleção de microrganismos de Embrapa Meio Ambiente (CMAA) Jaguariúna, SP. previamente descritos como tolerantes a estresse hídrico. Os isolados utilizadas foram: *Azospirillum brasilense* – CMAA 1195 (Azo), *Bacillus aryabhattai* – CMAA 1363 (Baci), *Paenibacillus* sp. – CMAA 1421 (Paeni), *Bacillus* sp. – CMAA 1196 (OG) e *Bradyrhizobium japonicum* – CMAA 1192 (Brady).

2.3.2 Teste de Compatibilidade entre inoculantes

Foram realizadas teste de compatibilidade entre os isolados utilizando o método de antagonismo direto (Stockwell et al. 1996). Em placas de Petri de 9 cm com meio de cultivo TSA (triptona de soja 1.0%, agar 1.5%) e YMA (suplementado com ágar 1.5%), cada isolado foi inoculado em estria linear (8 cm de comprimento) na extremidade da placa e incubados a 28°C por 24 horas. Os demais isolados, foram repicados em direção perpendicular ao crescimento e novamente incubados. Decorrido 24 horas, foi avaliado o crescimento dos isolados na placa, para avaliação da ocorrência de inibição ou não entres os isolados.

2.3.3 Formação de biofilme em diferentes condições nutricionais

O *Bradyrhizobium japonicum* (Brady) foi crescido em meio YM (manitol-10,0g; K₂HPO₄ 0,5 g; MgSO₄.7H₂O-0,2 g; NaCl0,1 g; extrato de levedura-0,5 g; água destilada-1000 ml; pH 6,8), entretanto, os *Azospirillum brasilense* (Azo), *Bacillus aryabattai* (Baci), *Paenibacillus sp* (Paeni) e *Bacillus sp* (0G) isolados foram crescidas em meio TSB durante 24 horas, decorrido este período foram inoculadas em tubos de polipropileno do tipo eppendorf com 900 µL de meio TSB (1% e 100%) adicionado ou não de sorbitol (10%) de acordo com Tabela 1, em triplicata. Após 96 horas incubados a 40°C, os conteúdos dos tubos foram homogeneizados individualmente com pipeta e medido a absorbância em espectrofotômetro (modelo UV1601PC, Shimadzu) a 600 nm para verificar o crescimento. Em seguida foi realizado o descarte do conteúdo e os tubos lavados três vezes com água destilada, a seguir ocorreu a adição de 1000 µL de solução cristal violeta a 0,1% em cada tubo. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, foram novamente lavados três vezes com água destilada (Kavamura et al., 2013).

Tabela 1. Composição do meio TSB (1% e 100%) modificado ou não com sorbitol utilizado para teste de formação de biofilme

Meio TSB (%)	Sorbitol (%)
1	0
100	0
1	10
100	10

2.3.4 Quantificação da formação de Biofilme

A quantificação foi realizada com adição de 1000 µL de álcool etílico (95%) para solubilização do cristal violeta preso à parede de cada tubo. Foi realizado a

leitura em espectrofotômetro (modelo UV – 1601 PC, Shimadzu) a 560nm para a verificação da densidade óptica (DO) do corante solubilizado.

2.3.5 Avaliação da Produção de Ácido Indol-acético (AIA)

Foi preparado 10 mL do meio TSB (10%) em tubos de ensaio suplementado com 5Mm de L-triptofano. Em triplicata, foram inoculados 100 µL de inóculo bacteriano com concentração ajustada (10^8 UFC.mL⁻¹(DO_{550nm}=0,1)). No período de 24 horas os tubos foram mantidos sob agitação constante a 28 °C. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm, para obtenção do sobrenadante. Em seguida foi misturado 750 µL do sobrenadante com 750 µL do reagente de Salkowski (50 mL de ácido perclórico a 35% e 1 mL de FeCl₃ a 0,5 M) e incubado no escuro por 30 minutos, decorrido o tempo foi realizado a leitura da DO a 530 nm em espectrofotômetro (Hartmann et al., 1983). O resultado positivo foi evidenciado pela formação de uma coloração rósea (Figura 1). 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 1: Produção de ácido indol-acético. O eppendorf C corresponde ao controle (sem inóculo) e os eppendorfs Azo e Baci corresponde aos isolados *Azospirillum* sp. e *Bacillus* sp. respectivamente.

2.3.6 Avaliação Quantitativa de solubilização de Fosfatos Inorgânicos ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Cada isolado foi repicado em quatro pontos diferentes da placa de Petri contendo meio sólido NBRIP (Nautiyal, 1999), constituído de 1,0% glicose; 0,5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,5% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02% KCl; 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Após 15 dias incubados a 28°C os isolados capazes de solubilizar fosfato inorgânico produziram um halo transparente ao redor das colônias (Figura 2), estes foram medidos e com os valores obtidos foi calculado a média do diâmetro em milímetros.

Figura 2: Halo ao redor das colônias do isolado *Paenibacillus* sp (Paeni).

2.3.7 Fixação de Nitrogênio em Meio Livre de Nitrogênio (NFb)

A capacidade de fixar nitrogênio de modo assimbiótico (Döbereiner, 1989) das bactérias foi avaliado em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb). Frascos de penicilina com 6 mL do meio NFb com 100 μL de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL⁻¹ ($\text{DO}_{550}=0,1$)) foram incubados por sete dias. As bactérias que apresentaram crescimento visível abaixo da superfície do meio foram consideradas positivas.

Tabela 2- Meios de cultura livre de nitrogênio para bactérias fixadoras de nitrogênio

Constituintes	NFb
Ácido málico	5,0 (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,5 (g.L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 (g.L ⁻¹)
NaCl	0,1(g.L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 (g.L ⁻¹)
KOH	4,5 (g.L ⁻¹)
Solução aquosa de micronutrientes	2,0 (mL):
0,04% CuSO ₄ .5H ₂ O	
0,12% ZnSO ₄ .7H ₂ O	
0,14% H ₃ BO ₃	
0,1% Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	
0,1175% MnSO ₄ .H ₂ O	
Azul de bromotimol (, solução 0,5% em 0,2N KOH)	2,0 (mL)
1,1222% KOH	
0,5% azul de bromotimol	
FeEDTA (solução aquosa 1,64%)	4,0 (mL)
0,7011% FeSO ₄	
0,939% EDTA	
Solução aquosa de vitaminas	1,0 (mL)
0,01% biotina	
0,02% piridoxol-HCl	
Agar – semissólido	1,8 (g.L ⁻¹)
sólido	15,0 (g.L ⁻¹)
pH	6,5-6,8

2.3.8 Avaliação da Resposta ao Estresse Hídrico em Casa de Vegetação

2.3.8.1 Desinfecção Superficial das Sementes de *Glycine max*

Antes do plantio, as sementes de soja (*Glycine max*, v. *potenza*) foram desinfestadas superficialmente no laboratório. Primeiro as sementes foram lavadas com álcool 70% durante 1 minuto, na segunda lavagem foi utilizado hipoclorito de sódio 2% pelo tempo de 30 segundos, na terceira foi repetido o álcool 70% por 1 minuto, e por fim, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada

esterilizada. A água da última lavagem foi plaqueada em meio TSA com o objetivo de confirmar a desinfestação.

2.3.8.2 Microbiolização das Sementes

Para a microbiolização das sementes, os cinco isolados foram inoculados separadamente em meio TSB (Caldo de Triptona de Soja) e incubados a 28°C sob agitação por 24 horas. Após o período, foram ajustadas as concentrações das células bacterianas para 10^8 UFC.mL⁻¹ (DO₅₅₀=0,1)) com solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Em seguida, foram montados todas as combinações possíveis com os cinco isolados e separadas em tubos Falcon. Feito isto, as sementes desinfestadas foram imersas nas soluções bacterianas por uma hora. As sementes utilizadas no tratamento controle foram imersas somente em solução salina (0,85%) esterilizada, não contendo bactéria.

2.3.8.3 Ensaio em Casa de Vegetação

Em casa de vegetação foi utilizado vasos com 2 quilos de solo peneirado, sendo que para cada tratamento foi montado cinco repetições. O experimento foi montado com dezessete tratamentos formados com as combinações do Brady com as outras linhagens, além do tratamento controle negativo, este sem bactéria, e do tratamento controle positivo com somente Brady (Tabela 2). Foram semeadas 8 sementes por vaso e após a germinação foi calculado a porcentagem de sementes germinadas de cada tratamento. Após esta avaliação as plântulas foram desbastadas, mantendo duas plantas por vaso.

Após quinze dias da semeadura, foi inoculado 1 mL das combinações referente a cada tratamento. O fornecimento de água foi adequado (80% da capacidade de campo) durante os primeiros trinta dias, em seguida, a capacidade de campo foi reduzida a 30% e observado os tratamentos que toleraram a escassez de água.

Figura 3. Ensaio em casa de vegetação para estresse hídrico em soja.

O experimento foi repetido, porém foram utilizados vasos com capacidade para 3 quilos de solo.

A parte aérea das plantas foi separada para medição da altura e diâmetro do caule, as raízes foram lavadas e medido o comprimento, em seguida as plantas foram depositadas individualmente em sacos de papel e armazenadas em estufa a temperatura de 50 °C.

2.3.9 Análise Estatística

As diferenças entre os parâmetros microbiológicos dos consórcios bacterianos foram realizadas utilizando Análise de Variância (ANOVA). Para análises estatística foi utilizado o programa Statistica 7.1 (Statsoft Inc, 2005). As correlações simples entre as variáveis e as análises estatísticas acima citadas foram realizadas utilizando o programa SigmaPlot 10.0.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Teste de compatibilidade entre os isolados

2.4.2 Formação de Biofilme

2.4.3 Produção de Ácido Indol-acético

2.4.4 Solubilização de fosfato inorgânico

Dentre os cinco isolados crescidos em meio NBRIP para solubilização de fosfato, 40% não formaram halo de solubilização. Os isolados *Paenibacillus* sp (Paeni) e *Bacillus aryabattai* (Baci) são os que formaram halo, apresentaram índice de 1,33 e 1,06 respectivamente, estes valores de IS menor que 2 significam baixa solubilização.

2.4.5 Fixação de Nitrogênio

Os cinco isolados foram capazes de crescer em meio livre livre de nitrogênio.

Figura 4: Meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb). A – Crescimento de *Azospirillum brasilense* (Azo) sob a superfície do meio. B - Controle, sem inóculo bacteriano. A modificação da coloração do meio ocorre devido à alteração do pH.

2.4.7 Massa seca das plantas

Análise do comprimento da raiz

Tratamentos Análise do diâmetro do caule

Avaliação da massa seca da parte aérea

2.4.6 Análise Fotossintética dos consórcios

2.4.6.1 Assimilação de Carbono

2.4.6.2 Condutância Estomática

2.4.6.3 Transpiração

2.4.8 Enzima Antioxidante

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que o consórcio *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus aryabattai* mitigaram os efeitos do estresse nas plantas de soja e um dos mecanismos que pode influenciar nessa tolerância é a atividade enzimática da peroxidase, pois em condições de estresse apresentou uma maior atividade.

Nota-se que estas linhagens possuem mecanismos contra dessecação e capacidade de promover crescimento em plantas, além disso são compatíveis, possibilitando a formação de inoculante bacteriano para a soja. Alguns consórcios testados em casa de vegetação mostraram resultados positivos sob efeitos de estresse hídrico. No entanto, ainda serão realizados novos testes com a finalidade de melhora nos resultados.

O bioensaio será realizado em sala climatizada da Embrapa Meio Ambiente. As bactérias terão a concentração de células ajustadas e serão inoculadas no solo próximo a raiz das plantas durante o experimento, sendo realizadas duas inoculações. Inicialmente os tratamentos receberam o fornecimento normal de água, a após o crescimento, serão submetidas ao estresse hídrico, onde será cessado totalmente a irrigação de todos tratamentos. Além do estresse hídrico, as plantas serão induzidas ao tratamento salino pela adição de NaCl. Após quatro dias consecutivos de estresse hídrico e salino, será realizado a seleção dos isolados que apresentarem capacidade de proteção das plantas quanto aos efeitos adversos da seca.

As amostras de solo serão obtidas da região semiárida caracterizados por suas propriedades edafoclimáticas típicas da Caatinga. Os solos serão transportados para o laboratório de microbiologia ambiental, na Embrapa Meio Ambiente e dispostos em vasos em sala climatizada, nestes serão plantadas diferentes variedades de soja, (*Glycine max*) em condições controladas. Após 60 dias em sala climatizada as plantas serão removidas e avaliadas quanto a formação de nódulos em suas raízes, indicando o recrutamento de bactérias diazotróficas compatíveis com a cultura em questão.

Essas linhagens podem ser utilizadas como inoculantes destinados a aumentar a produtividade e permitir a expansão das áreas cultiváveis para locais

com condições ambientais extremas. Consequentemente, tende a reduzir os custos provenientes dos insumos agrícolas, em especial para os adubos fosfatados e nitrogenados, assim como reduzir custos com irrigação com a premissa futura de expandir a fronteira agrícola brasileira para regiões com baixa pluviosidade.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed.. New York, p. 467, 1977.
- ALI, Q.; ASHRAF, M. Introduction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Oxford, v. 197, n. 4, p. 258-271, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: informe 2017**. Brasília, p. 169 , 2017.
- ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; BERGE, O.; MAHMOOD, T. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide- producing bacteria restricts uptake and stimulates plant growth under salt stress. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 157-16, 2004.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M., The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BATTISTI, Rafael. Épocas de semeadura da cultura da soja com base no risco climático e na rentabilidade líquida para as principais regiões produtoras do Brasil. 2013. 262 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrônômica, Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- BERGAMASCHI H. Desenvolvimento de déficit hídrico em culturas. In: BERGAMASCHI, H. **Agrometeorologia aplicada à irrigação**. Porto Alegre: UFRGS, Ed. Universidade, p.25-32, 1992.
- BERLATO, M. A. Carta de aptidão climática da soja no Rio Grande do Sul. In. MIYSAKA, Shiro & Medina, Júlio César. **A Soja no Brasil**. Ed 1. São Paulo, p. 1062, 1981.
- BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 3, p. 237-245, 2000.

CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P.; DAVIDSON, E.A. ; BERNOUX, M.; FELLER, C.A. Ciência do solo e o sequestro de carbono. **Boletim informativo da Sociedade**, Campinas, v.29, p. 29-34, 2004.

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

CONAB.Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_03_13_14_15_33_grao_marc_o_2018.pdf>. Acesso em 8 de Março de 2018.

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

DIAS, J.M.R. **Estudo da produção de ácido abscísico em *Gluconacetobacter diazotrophicus* e caracterização do efeito da inoculação por tal bactéria na resposta de plantas de cana de açúcar aos estresses hídrico e salino**.2010. p. 155. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) - Universidade Estadual do norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Rio de Janeiro, 2010.

DOSS, B.D., PEARSON, R.W., ROGERS, H.T. Effect of soil water stress of various growth stages on soybean yields. **Agronomy Journal**, Madison, v.66, n.2, p.297- 299, 1974.

DOSS, B.D., THURLOW, D.L. Irrigation, row width and plant population in relation to growth characteristics of two soybean varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v.65, n.5, p.620-623, 1974.

FAGERIA N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas**. 1 o ed. Brasília: Departamento de Publicações EMBRAPA-CNPAP, p.381-392, 1989.

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

- FARIAS, J.R.B.;ALMEIDA, I.R., GARCIA, A. **Zoneamento agroclimático da cultura da soja para estado do Paraná**. Londrina: Embrapa-Soja, 2001.84p. (Documento,102).
- FERNANDES, J.D. **A irrigação no Brasil: situação e diretrizes**. Brasília: Ministério da Integração Nacional; IICA, p. 132 , 2008.
- FERRARI, E., PAZ, A., SILVA, A. C. Déficit Hídrico no metabolismo da soja em semeaduras antecipadas no Mato Grosso. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v. 3, n. 1, p. 67-77, 2015
- FOSTER, R.C. Microenvironments of soil microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, n. 3, p. 189-203, 1988.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free- living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p. 109-117, 1995.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants.. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 83-93, 2002.
- 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, p. 231–240,2002.
- 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.
- HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Branche. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft**, Berlin, v. 98, p. 59-78, 1904.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. 542p.

- KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. G.; LANCONI, M. D.; ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; MELO, I. S. **Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome.** Plos One, 2013.
- KUSKE, C.R.; Tic et al., **App Envir Microbi**, v. 68 ,p. 1854-1863 , 2002.
- LAL, R.; KIMBLE, J.M.; FOLLETT, R.F.; COLE, C.V. The potential of U.S. cropland to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect. **Sleeping Bear Press**, Ottawa, v. 2, p. 177-185, 1998.
- LENTZEN, G.; SCHWARZ, T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, p. 623-634 , 2006.
- LINN, D.M.; DORAN, J.W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and non-tilled soils. **Soil Science Society of America Journal**, Amsterdam, v. 48, n. 6, p. 1276-1272, 1984.
- LIPPERT, K.; GALINSKI, E.A. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying.**Applied Microbiology and Biotechnology**,Berlin, v. 37, p. 61-65 , 1992.
- LYNCH, J.M. **The Rhizosphere**. New York: John Wiley, p. 458, 1990.
- MAHAJAN S.; TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York,v. 444, p. 139- 158., 2005.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil-type. **Plant and Soil**,v. 261, p. 199-208 , 2004.
- MARULANDA, A.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associates with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 670-678, 2006.

- McINTYRE, H.J.; DAVIES, H.; HORE.; MILLER, S.H.; DUFOUR, J.-P.; RONSON, C.W. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolae* and its role in desiccation tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 73, p. 3984-3992, 2007.
- McNEIL, S.D.; NUCCIO, M.L.; HANSON, A.D. Betaines and related osmoprotectants. Target for metabolic engineering of stress resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 73, n. 120, p. 945-949, 1999.
- MENDELSON, R. Adaptation, Climate Change, Agriculture, and Water. **Choices**, v.31, n. 3, p. 1-7, 2016.
- MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.
- MONIER, J.-M.; LINDOW, S.E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promote aggregate formation on leaf surfaces. **PNAS**, Washington, v.100, p. 15077-15982, 2003.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.
- MOTA, F.S. Condições climáticas e produção de soja no sul do Brasil. In: VERNETTI, F.J. (Coord.) **Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. v.1, p.93-126.
- PAZ, V.P.S., TEODORO, R.E.F., MENDONÇA, F. C. Recursos Hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 3, p. 465-473, 2000.
- POUNDS, A.; CARNAVAL, A.C.O.Q.; CORN, S. Climate change, biodiversity loss, and amphibian declines. In: GASCON, C.; COLLINS, J.P.; MOORE, R.D.; CHURCH, D.R.; MCKAY, J.E.; MENDELSON, J.R. III (Ed.). **Amphibian conservation action plan**: IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Cambridge: Glands, p. 64, 2007.

- REICOSKY, D.C.; LINDSTROM, N.J. Fall tillage method: effect on short-term carbon dioxide flux from soil. *Agronomy Journal*, Madison, v. 85, p. 1237- 1245, 1993.
- RODRÍGUEZ-SALAZAR, J.; SUÁREZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; ITURRIAGA, G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 296, p. 52-59, 2009
- ROPER, M.C.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M; KIRKPATRICK, B.C. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7252-7258, 2007.
- ROVIRA, A.D. Interactions between plant and soil microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 19, p. 241-266, 1965.
- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Function and mechanism of organic exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 527-560, 2001.
- SALINAS, A.R., SANTOS, D.S.B., SANTOS F.O. et al. Comportamiento de genotipos de soja, hasta el estadio de plantulas, en diferentes niveles de humedad. IN: CONFERENCIA MUNDIAL DE INVESTIGACION EN SOJA, 4., 1989, Buenos Aires. **Actas...** Buenos Aires: Asociacion Argentina de la Soja (AASOJA), 1989. p.376-382.
- SCHNIDER-KEEL, U.; LEJBØLLE, K.B.; BAEHLER, E.; HAAS, D.; KEEL, C. The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5683-5693, 2001.
- 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.
- SIMON, J.; WEBBER, D. C. **Zoneamento aquícola: análise de contexto e abordagens técnicas**. Palmas: Embrapa, CNPASA, 2015. 33p.

SIONIT, N., KRAMER, J.P. Effect of water stress during different stages of growth of soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, n.2, p.274-278, 1977.

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

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

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

WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). **Relatório Mundial das Nações Unidas sobre Desenvolvimento dos Recursos Hídricos 2016: Água e emprego**. Resumo executivo. Paris, UNESCO. 2016.

YANCEY, P.H. **Water stress, osmolytes and proteins**, 41, p. 699-709, 2001.

ZANCHI, F.B.; GOMES, B.M.; VAN RANDOW, C.; KRUIJT, B.; MANZI, A.O. Medições dos fluxos de dióxido de carbono e estimativa do “fetch” (área de influência) em pastagem e floresta em Rondônia. In: CONGRESSO DE ESTUDANTES E BOLSISTAS DO LBA, 1., 2002, Rondônia. Anais... Rondônia: LBA, p.13 , 2002.