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

Caracterização de bactérias diazotróficas assimbióticas cultiváveis associadas
à filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da floresta Amazônica

Bianca Machado Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2018

Bianca Machado Silva
Licenciada em Ciências Biológicas

**Caracterização de bactérias diazotróficas assimbióticas cultiváveis associadas à
filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da floresta Amazônica**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2018**

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

Silva, Bianca Machado

Caracterização de bactérias diazotróficas assimbióticas cultiváveis associadas à filosfera e serapilheira da floresta Amazônica / Bianca Machado Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

83 p.

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

1. Diazotrófica 2. Bioprospecção 3. Filosfera 4. Serapilheira 5. Floresta Amazônica I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico

A minha mãe Edvânia, meu pai Joaquim e a minha irmã Bruna, responsáveis por este título.

Aos meus avós José Carlos Machado e Joana Luzia Dognani Machado (*in memoriam*)

À todos meus familiares e amigos,
Em especial ao Rogério, meu namorado.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me proporcionado inúmeras bênçãos, dentre elas, a saúde e a oportunidade de estudar, Ele foi minha fortaleza em todos os momentos de provas.

Agradeço meus avós, em especial a Dona Joana e Zé Carlos Machado (como são conhecidos em minha cidade), por sempre acreditarem em mim, por sempre incentivarem meus sonhos, e sei o quanto estariam orgulhosos hoje se estivessem aqui do meu lado.

Agradeço a minha família, meu pai Joaquim, minha mãe Edvânia e minha irmã Bruna, por nunca me negarem ajuda, por sempre incentivarem meus estudos, meus sonhos. Vocês foram/são essenciais na minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Doutor Marcio Rodrigues Lambais, por todas dicas, auxílios e pela paciência que teve comigo durante meu trabalho, serei eternamente grata pela oportunidade que ele me concedeu em trabalharmos juntos, um grande profissional que para mim é referência, muito obrigada!

Agradeço meu namorado Rogério, por todo amor, paciência e incentivo durante essa caminhada, foi fundamental para mim, muito obrigada!

Agradeço minha prima Luana Machado, que me ajudou muito durante minha trajetória no mestrado, principalmente quando entrei no mestrado e no final, com conselhos e ensinamentos, meu mais sincero obrigada!

Agradeço meus colegas de pesquisa, que me ajudaram a solucionar dúvidas e compartilhar conhecimento, Adriano Lucheta, Denise, Fernando, Simone, Armando, Sonia, Elisa e Wlade.

Em especial, agradeço a Júlio Fornazier, por nunca me negar ajudar, sempre muito atencioso e disposto a ajudar, agradeço de coração por toda informação compartilhada, pela paciência que teve comigo durante o tempo que trabalhamos juntos, e pela amizade que construímos, levarei sempre comigo.

Alice Cassetari, por todas as dicas e auxílios em minha pesquisa; sempre paciente e disposta a me ajudar. Agradeço imensamente toda atenção que sempre teve comigo, desde o primeiro dia que entrei no laboratório, foi essencial para tudo que aprendi sobre microbiologia/biotecnologia. Agradeço também pela amizade, risadas e conselhos.

André Alves, agradeço pelas dicas e por toda atenção despendida em relação a análises e escrita da minha dissertação. Com ele construí uma grande amizade, da qual sempre lembrarei.

Endreus Delbaje, agradeço pelas dicas, paciência e por sempre estar disposto a me ajudar a solucionar qualquer tipo de problema. O cara mais engraçado do mundo, muito obrigada pela amizade.

Felipe Bozza, agradeço por sempre me auxiliar no trabalho de bancada, em análises e cálculos. Sempre muito atencioso e prestativo, foi essencial para meu aprendizado em microbiologia, muito obrigada!

Agradeço imensamente ao Ademir Durrer, que nunca me negou ajuda quando o procurei, e sempre sanou todas minhas dúvidas, verdadeiro profissional e que sabe muito bem compartilhar e transmitir conhecimento.

Jamais irei me esquecer da melhor técnica de laboratório com que já trabalhei, Nivanda, mais conhecida como “Nivanda *Troubleshooter*”, agradeço-a por sempre me ajudar a resolver todos os imprevistos, e por sempre me apoiar nos momentos em que mais precisei. Sempre muito paciente comigo, foi uma verdadeira mãe para mim, muito obrigada!

Rosmery Cruz, por todo auxílio prestado durante os testes de síntese de AIA, pela amizade e companheirismo, espero reencontra-lá em breve na Colômbia.

Erick Mutti, agradeço por ter me ajudado no início do mestrado, com o isolamento das bactérias e por sempre estar disposto a ajudar, muito obrigada!

Silvia Berdugo, por me ajudar com análises moleculares e com os cálculos de FBN, sempre muito atenciosa.

Agradeços a todas as meninas da República Café c/ Leite - ESALQ, que sempre me receberam tão bem, muito obrigada a todas, estarão sempre em meu coração.

Agradeço a todos meus amigos de Taquarituba – SP, que sempre me incentivaram e se orgulharam de cada conquista minha.

Agradeço a Capes e a CNPq, agências que financiaram minha pesquisa, sem elas seria inviável essa divulgação de conhecimento.

Agradeço a todos os colegas do Departamento de Ciência do Solo – ESALQ/USP, pelos momentos compartilhados e risadas.

Agradeço a todos que de alguma forma possam ter contribuído para a realização desse sonho. Muito obrigada.

EPÍGRAFE

"Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários"

Santa Paulina

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 HIPÓTESES	15
1.2 OBJETIVOS	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 DIVERSIDADE BACTERIANA EM FLORESTAS TROPICAIS	17
2.1.1. MICROBIOMA VEGETAL E SERAPILHEIRA	19
2.1.1.1. Filosfera	20
2.1.1.2. Dermosfera	22
2.1.1.3. Rizosfera.....	23
2.1.2.2 Serapilheira.....	24
2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)	25
2.2.1 Bactérias diazotróficas.....	27
2.2.2 Bactérias produtoras de hormônios vegetais	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM	33
3.2 AMOSTRAGEM	34
3.3 DESALOJAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS DA FILOSFERA E SERAPILHEIRA.	35
3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS (FILOSFERA E SERAPILHEIRA).....	36
3.5 TAXA DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (IN VITRO)	37
3.6 SÍNTESE DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (IN VITRO).....	38
3.7 AVALIAÇÃO DAS COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA-LIVRE	40
3.7.1 Extração de DNA.....	40
3.7.2 Sequenciamento parcial do gene rRNA16S.	41
4. RESULTADOS	40
4.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DA FILOSFERA E SERAPILHEIRA DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA FLORESTA AMAZÔNICA	43
4.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO IN VITRO.....	44
4.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO IN VITRO.....	47

4.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO GENE rRNA 16S DOS ISOLADOS BACTERIANOS DA FILOSFERA E SERAPILHEIRA DA FLORESTA AMAZÔNICA	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	79

RESUMO

Caracterização de bactérias diazotróficas assimbióticas cultiváveis associadas à filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da floresta Amazônica

Grandes esforços têm sido empreendidos para preservar recursos naturais e desenvolver sistemas de produção agrícola mais sustentáveis, reduzindo o uso de fertilizantes. Uma das alternativas ao uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura são os inoculantes com bactérias diazotróficas. Os micro-organismos diazotróficos mais estudados para produção de inoculantes são os simbioses noduladores de leguminosas. Para outros grupos de plantas, os diazotróficos mais utilizados são assimbióticos. Estudos conduzidos na Mata Atlântica e na Amazônia tem mostrado que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) assimbiótica associada a filosfera pode contribuir com aportes de N significativos, e que esses biomas podem abrigar uma grande diversidade de bactérias diazotróficas, sendo ambientes apropriados para prospectar diazotróficos eficientes para o uso na agricultura. O objetivo deste trabalho foi isolar novos genótipos de bactérias diazotróficas assimbióticas da filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da floresta Amazônica, e estimar suas taxas de FBN e de síntese de ácido indolacético *in vitro*, bem como identificar taxonomicamente os isolados considerados mais promissores para uso biotecnológico. Bactérias diazotróficas de vida-livre foram isoladas da filosfera e serapilheira de três espécies arbóreas (*Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* e *Chamaecrista xinguensis*), e cultivadas em meio isento de N. Um total de 86 isolados foram obtidos. A taxa de fixação de nitrogênio foi estimada para todos os isolados, através do ensaio de redução de acetileno (ARA), pelo complexo nitrogenase. Para todos os isolados, também foi determinada a taxa de produção de ácido indolacético (AIA), na presença de L-triptofano. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott e pelo teste de Duncan ($p < 0,05$), através do software estatístico R. Os isolados que apresentaram as maiores taxas de redução de acetileno e de síntese de AIA foram identificados através do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S. Cerca de 84,8% dos isolados apresentaram atividade de nitrogenase *in vitro*, e o teste estatístico demonstrou não haver diferenças significativas entre as taxas de redução de acetileno entre os isolados, exceto o isolado 10RF, o qual apresentou uma taxa de redução de acetileno maior do que a dos demais isolados ($p < 0,05$). Todos os isolados produziram AIA *in vitro*, e houve diferenças significativas na síntese de AIA entre os isolados, e quanto origem dos mesmos. Isolados bacterianos de *Amphirrhox longifolia* sintetizaram mais AIA *in vitro*, em comparação aos isolados das outras duas espécies arbóreas. Cerca de 22% dos isolados apresentaram taxas de fixação de nitrogênio maiores que $0,025 \text{ ng N } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, e 20% dos isolados produziram mais de $21,87 \text{ } \mu\text{g/mL}^{-1}$ de AIA. 21 isolados, considerados promissores para uso agrícola (fixadores de N e produtores de AIA), foram identificados através do sequenciamento do gene rRNA 16S, e afiliados aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas*. Aproximadamente 71 % dos isolados considerados promissores para promoverem o crescimento de plantas foram isolados da

filosfera, indicando ser este um ambiente propício à prospecção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento de plantas.

Palavras-chave: Bioprospecção; Diazotróficas; Assimbióticas; Fixação biológica de nitrogênio; Floresta Amazônica; Ácido indolacético

ABSTRACT

Characterization of culturable asymbiotic diazotrophic bacteria associated with the phyllosphere and litter of tree species of the Amazon forest

Great efforts have been made to preserve natural resources and develop more sustainable agricultural production systems, reducing the use of fertilizers. One of the alternatives to the use of nitrogen fertilizers in agriculture is the use of inoculants with diazotrophic bacteria. The most studied diazotrophic microorganisms for the production of inoculants are nodule-forming symbionts of legumes. For other groups of plants, the most used diazotrophs are asymbiotic. Several studies in the Atlantic and Amazon forests have shown that the biological nitrogen fixation (BNF) associated with the phyllosphere may contribute with significant N inputs, and that these biomes can harbor a great diversity of diazotrophic bacteria, making them important environments for the prospection of efficient diazotrophs for agricultural use. The objective of this work was to isolate new genotypes of asymbiotic diazotrophic bacteria from the phyllosphere and litter of tree species of the Amazon forest, and to estimate their rates of BNF and indoleacetic acid biosynthesis *in vitro*, as well as to identify taxonomically the most promising isolates for biotechnological use. Asymbiotic diazotrophic bacteria were isolated from the phyllosphere and litter of three tree species (*Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* and *Chamaecrista xinguensis*), and cultivated in N-free medium. A total of 86 isolates were obtained. The nitrogen fixation rate was estimated for all isolates measuring the nitrogenase activity by the acetylene reduction assay (ARA). The rates of indoleacetic acid (IAA) production in the presence of L-tryptophan was also determined for all isolates. The data obtained were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Scott-Knott test and the Duncan test ($p < 0.05$) using the statistical software R. The isolates showing the highest rates of acetylene reduction and IAA biosynthesis were identified through the partial sequencing of the 16S rRNA gene. Approximately 84.8% of the isolates were positive for nitrogenase activity *in vitro*, and the statistical analyses showed that there were no significant differences between the acetylene reduction rates among the isolates, except the isolate 10RF, which showed a higher acetylene reduction rate than the other isolates ($p < 0.05$). All isolates produced IAA *in vitro*, and there were significant differences in the biosynthesis rates among the isolates, as well as regarding the origin of the isolate. Bacterial isolates from *Amphirrhox longifolia* synthesized higher amounts of IAA *in vitro* as compared to the isolates from the other two tree species. Approximately 22% of the isolates showed nitrogen fixation rates greater than $0.025 \text{ ng N } \mu\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, and 20% of the isolates produced more than $21.87 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of IAA. 21 isolates, considered promising for agricultural use (N-fixers and IAA producers), were identified by sequencing the 16S rRNA gene, and affiliated to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Rhizobium* and *Stenotrophomonas*. Approximately 71% of the isolates considered promising to promote plant growth were isolated from the phyllosphere, suggesting that this environment is propitious to the prospection of diazotrophic plant growth promoting bacteria.

Keywords: Bioprospection; Diazotroph; Asymbiotic; Biological nitrogen fixation; Amazon forest, Indolacetic Acid

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as técnicas de manejo de culturas agrícolas têm sido modificadas para aumentar a sustentabilidade e minimizar a degradação do ambiente, principalmente usando insumos biológicos (ROESCH et al., 2007). Com esse propósito, várias iniciativas internacionais, como a Phytobiomes Initiative (2014) (<http://www.phytobiomes.org>), têm estimulado estudos para melhor compreender as relações complexas que existem entre as populações microbianas dos microbiomas vegetais, e destas com o ambiente. Um entendimento holístico dos papéis das comunidades microbianas na biosfera pode ser a chave para o desenvolvimento sustentável da agricultura moderna (DUBILIER; MCFALL-NGAI; ZHAO, 2015), preservando assim recursos naturais valiosos.

O microbioma vegetal compreende o conjunto de micro-organismos (epifíticos e endofíticos) associados a uma determinada planta (SCHLAEPI; BULGARELLI, 2015). As interações estabelecidas entre o microbioma e o hospedeiro têm papéis fundamentais no controle da fisiologia e adaptação da planta a um determinado ambiente (VAN DER HEIJDEN; HARTMANN, 2016; AGLER et al., 2016).

Uma parte importante do microbioma vegetal inclui bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) que comumente residem na rizosfera e filosfera (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018). BPCPs são capazes de aumentar o crescimento e a produtividade de muitas espécies de plantas através de vários mecanismos, incluindo a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios, solubilização de fosfato, produção de sideróforos (PEDRAZA, 2008), síntese de ACC desaminase (GLICK, 2012), entre outros.

Os micro-organismos responsáveis pela fixação do nitrogênio são chamadas diazotróficos. Os diazotróficos são procariontes que possuem o complexo enzimático nitrogenase, o qual é altamente conservado em diazotróficos de vida-livre e simbióticos, e catalisa a conversão de N_2 para amônia (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). Os micro-organismos diazotróficos desempenham papel ecológico relevante nos ecossistemas em que vivem, já que a disponibilidade de nitrogênio (N) exerce forte influência sobre a diversidade e produtividade de muitos ecossistemas e a FBN é uma importante fonte natural de N para a biosfera (VITOUSEK et al., 2013).

Em florestas tropicais úmidas, a FBN de vida-livre pode superar a FBN simbiótica, ao contrário do que se pensava anteriormente (SULLIVAN et al., 2014). A FBN assimbiótica pode ocorrer no solo, serapilheira e nas superfícies das plantas (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008), incluído a filosfera (RIGONATO et al., 2016). Diazotróficos

assimbióticos podem apresentar maior vantagem adaptativa em relação aos simbióticos, devido a menor especificidade em sua interação com a planta, o que pode favorecer seu emprego na agricultura como inoculantes (CASSETARI, 2015).

Apesar da importância das comunidades diazotróficas assimbióticas nos processos ecossistêmicos, o conhecimento da diversidade, abundância e composição dessas comunidades em florestas tropicais permanece limitado (MIRZA et al., 2014). Uma grande diversidade de bactérias diazotróficas de vida-livre já foi reportada no solo, dermosfera e filosfera da Mata Atlântica (GÓMEZ, 2012; BERDUGO, 2012), muito embora seus papéis ecológicos não tenham sido definidos. No geral, os estudos sobre comunidades diazotróficas dos solos são mais abundantes do que os de comunidades das superfícies das plantas (RICO et al., 2013).

Estimativas das taxas de FBN associada a filosfera de *Merostachys neesii* e de *Guapira opposita* na Mata Atlântica, mostram que esse micro-habitat pode contribuir com aportes de aproximadamente 10 a 21 ng N g⁻¹ h⁻¹ e 19,43 a 23,01 ng N g⁻¹ h⁻¹ respectivamente (dados não publicados). A serapilheira de espécies arbóreas da Mata Atlântica também apresenta taxas de FBN consideráveis (BERDUGO, 2012; GÓMEZ, 2012). Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa na floresta Amazônica mostraram que as espécies arbóreas *Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* e *Chamaecrista xinguensis* apresentam altas taxas de FBN na filosfera (dados não publicados). No entanto, os diazotróficos responsáveis por essa atividade não são conhecidos.

É sabido também que vários diazotróficos produzem fitormônios, principalmente ácido indol-3-acético (AIA), que podem contribuir para a promoção do crescimento vegetal. O AIA desempenha um papel central na regulação do desenvolvimento das plantas, incluindo processos que determinam a arquitetura do sistema radicular (PEDRAZA, 2008). O AIA pode induzir a ramificação e o alongamento da raízes, que por sua vez favorecem a absorção de água e minerais no solo, tendo efeito positivo no crescimento das plantas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Recentemente, foi observado que a superprodução de AIA pode melhorar o desempenho do aparato de fixação de nitrogênio de bactérias diazotróficas, tanto *in vitro* quanto em plantas hospedeiras inoculadas (DEFEZ et al., 2017). Seria interessante investigar nos biomas brasileiros, como a floresta Amazônica, a existência de diazotróficos capazes de produzir AIA, para um possível uso agrícola como inoculante. Para isso, o uso de técnicas baseadas no isolamento e cultivo de micro-organismos é importante (GOMES et al., 2017).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi isolar bactérias diazotróficas de vida-livre cultiváveis associadas a filosfera e serapilheira de três espécies arbóreas da Amazônia, e determinar suas taxas de FBN e síntese de AIA *in vitro*, bem como identificar taxonomicamente os isolados mais promissores para aplicação na agricultura.

1.1. HIPÓTESES

- Existem bactérias diazotróficas cultiváveis na filosfera e serapilheira de *Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* e *Chamaecrista xinguensis* da floresta Amazônica capazes de sintetizar AIA *in vitro*.
- O local de origem (micro-habitat e espécie arbórea) e a filogenia da bactéria afeta sua eficiência em fixar N₂ e sintetizar AIA *in vitro*.

1.2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- Isolar bactérias diazotróficas assimbióticas cultiváveis da filosfera e serapilheira de três espécies arbóreas da floresta Amazônica (*Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* e *Chamaecrista xinguensis*).
- Estimar as taxas de FBN e de síntese de AIA *in vitro* dos isolados bacterianos.
- Identificar taxonomicamente os isolados bacterianos mais promissores para promoção de crescimento de plantas em sistemas agrícolas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diversidade bacteriana em florestas tropicais

As florestas tropicais, apesar de representam apenas 7% da superfície terrestre, são consideradas “hot spots” de biodiversidade, pois abrigam mais de 50% de todas as espécies vegetais e animais (CONG et al., 2015; MYERS et al., 2000; SCHULDT et al., 2015). Essas florestas desempenham papéis importantes na regulação do clima global e na ciclagem biogeoquímica (GIBSON et al., 2011), amplamente mediados pelas atividades metabólicas das comunidades microbianas (CONG et al., 2015).

Nas florestas tropicais, a intensidade luminosa e a alta precipitação pluviométrica induzem altos níveis de produção primária e alta taxa de decomposição da matéria orgânica no solo, a qual é desempenhada por diversos micro-organismos que além de decomporem a matéria orgânica estão também associados a ciclagem de nutrientes (SPACCINI et al., 2002). A diversidade microbiana é fundamental para os serviços ecossistêmicos, manutenção da produtividade e diversidade em ecossistemas (BARDGETT; VAN DER PUTTEN, 2014). Dessa forma, a compreensão e a conservação da biodiversidade é fundamental para o bem-estar humano (SCHULDT et al., 2015).

Muito embora a diversidade vegetal e animal em florestas tropicais seja razoavelmente conhecida, muito pouco se sabe sobre a diversidade microbiana nesses ecossistemas. Em um estudo avaliando-se como as práticas agrícolas, bem como a recuperação florestal, estão relacionadas com a estrutura das comunidades bacterianas do solo amazônico, foram observadas diferenças na estrutura das comunidades bacterianas relacionadas a mudanças nos atributos do solo que, por sua vez, foram correlacionados ao uso da terra. A maior similaridade entre comunidades bacterianas do solo de floresta primária e secundária indica a recuperação da estrutura da comunidade bacteriana durante o processo de sucessão vegetal. Bacteriodetes foi o filo mais abundante em solos agrícolas, enquanto que Firmicutes só foi encontrado em solos de florestas primárias e secundárias (JESUS et al., 2009).

Os microbiomas de raízes de diferentes plantas em diferentes solos tropicais também foi avaliado, usando perfis de amplicons do gene rRNA 16S, e constatou-se que o tipo de solo influencia significativamente a composição das comunidades microbianas associadas às raízes das plantas (YEOH et al., 2017). Nottingham et al. (2018) avaliaram um transecto com diferentes altitudes desde o Andes até a floresta amazônica no Peru, para determinar se a

diversidade de espécies de bactérias em florestas tropicais segue padrões biogeográficos associados com fatores ambientais compartilhados. No geral, a riqueza de espécies bacterianas diminuiu a medida que a altitude aumentou, enquanto que a diferença na composição das comunidades bacterianas aumentou com a altitude. A temperatura foi a principal responsável pelos gradientes de diversidade bacteriana, com pouca influência das propriedades edáficas. Este foi o primeiro estudo que sugere que a temperatura controla padrões de diversidade e de distribuição de espécies microbianas em ecossistemas tropicais.

Previamente, Lambais et al. (2006), avaliando a diversidade bacteriana associada a filosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica, observaram que a estrutura das comunidades de bactérias na filosfera está associada a espécie vegetal, e que a maioria das espécies de bactérias detectadas representam espécies ainda não descritas. Já, Kim et al. (2012) estudaram a comunidade bacteriana associada a filosfera de árvores tropicais na Malásia e verificaram que a variabilidade da estrutura da comunidade bacteriana é maior entre as espécies de árvores, do que dentro da mesma espécie, corroborando os resultados de Lambais et al. (2006). Posteriormente, Lambais; Lucheta e Crowley (2014) avaliaram as estruturas das comunidades bacterianas associadas a filofera, dermosfera e rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica, através de PCR-DGGE e sequenciamento dos genes rRNA 16S, e observaram que as estruturas das comunidades bacterianas associadas a esses micro-habitats estão estreitamente relacionadas com o táxon da planta hospedeira, nos níveis de espécie, família e ordem, e cada micro-habitat apresenta comunidades bacterianas únicas. Se o mesmo ocorre em outras florestas tropicais, não se sabe.

Em estudo recente, onde se analisaram sequências do gene rRNA 16S bacteriano de amostras de solos de diferentes florestas tropicais do Noroeste de Bórneu, foi observado que o filo Proteobacteria era o mais abundante (40,6% de todas as sequências bacterianas), seguido de Acidobacteria (37,2%), Planctomycetes (7,1%), Actinobacteria (3,5%), Verrucomicrobia (3,4%) e Chloroflexi (2,9%) (TRIPATHI et al., 2016). Na floresta Amazônica, utilizando-se pirosequenciamento do gene rRNA 16S para determinar a diversidade bacteriana no solo, foi observado que os filos mais abundantes eram Proteobacteria (24%), Acidobacteria (10%), Actinobacteria (7%), Verrucomicrobia (8%) e Firmicutes (3%) (NAVARRETE et al., 2010). Recentemente a diversidade microbiana nos solos da floresta Amazônica nativa foi avaliada com base em análises de metagenomas, e revelou alta abundância do filo Proteobacteria, Acidobacteria e Verrucomicrobia, correspondendo a 61%, 14% e 2% do total de sequências, respectivamente (MENDES et al., 2015).

A diversidade de diazotróficos em florestas tropicais é pouco conhecida. Avaliando-se a diversidade de potenciais diazotróficos de vida-livre associados a filosfera, dermosfera e rizosfera de *Euterpe edulis* e *Guapira opposita* da Mata Atlântica, através do pirosequenciamento da região V4 do gene rRNA 16S de bactérias, foi observado que, entre os possíveis diazotróficos, o filo Proteobacteria foi dominante nos três compartimentos, e entre as Proteobacteria, a classe Alphaproteobacteria foi dominante na maioria dos compartimentos. Os gêneros *Rhodophila*, *Beijerinckia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* e *Methylovirgula* foram os gêneros mais abundantes no três compartimentos (BERDUGO, 2012).

Mirza et al. (2014) relataram alta diversidade de diazotróficos de vida-livre em solos da floresta Amazônica, através de análises de sequências do gene *nifH*, e observaram que o grupo Proteobacteria era mais abundante, e que as comunidades de diazotróficos de vida-livre também mudavam com as mudanças do manejo do solo, já que em solos sob florestas observou-se maior diversidade de diazotróficos de vida-livre do que em solos sob pastagens. Silva et al. (2012) isolaram diversas espécies diazotróficas do gênero *Burkholderia* a partir de vários tipos de solos da floresta Amazônica. Todos os isolados, com exceção de um, apresentaram atividade da nitrogenase sob condições de vida-livre.

Estudos avaliando a diversidade de diazotróficos de vida-livre e a estruturação dessas comunidades na filosfera e serapilheira da floresta Amazônica são inexistentes.

2.1.1. Microbioma vegetal e serapilheira

As plantas estão associadas a muitos micro-organismos, os quais colonizam suas superfícies (epífitas) e tecidos internos (endófitos), além da rizosfera. Os micro-organismos associados a planta e ao solo rizosférico compõem o microbioma vegetal. O microbioma serve como um reservatório de genes adicionais que as plantas podem acessar quando necessário (ROUT, 2014), e deve ser considerado fator-chave para manutenção da saúde e produtividade da planta, bem como para composição da comunidade e funcionamento do ecossistema (BERG et al., 2014).

O papel do microbioma vegetal ainda vem sendo estudado, mas sabe-se que ele influencia o desenvolvimento, fisiologia e produtividade vegetal (BASCOM-SLACK; ARNOLD; STROBEL, 2012). Existem evidências de que o microbioma da planta está envolvido no controle de doenças, impondo restrições fisiológicas a patógenos que infectam tecidos vegetais (MENDES et al., 2011). Os mecanismos de controle do microbioma vegetal envolvem o sistema imune inato da planta, o qual permite que micro-organismos benéficos sobrevivam em associação com o vegetal, enquanto o crescimento de potenciais patógenos é

inibido (HANEY; AUSUBEL, 2015). Além desse mecanismo, o microbioma pode ocupar nichos ecológicos abertos, e aumentar a resistência vegetal a invasão de patógenos, contribuir com o aumento da aquisição de nutrientes (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009), e aumentar a tolerância a estresses (ANDREOTE et al., 2014), beneficiando o crescimento e a produtividade vegetal (LUNDBERG et al., 2012).

O microbioma associado à planta expandiu enormemente o repertório metabólico das plantas e aumentou a captação de recursos ao fornecer novas vias nutricionais, de defesa e modificando vias bioquímicas, assim, o microbioma associado à planta pode aumentar ou diminuir a coexistência de espécies e, consequentemente, influenciar não apenas uma única planta, mas também ecossistemas completos (BERG et al., 2014).

A manipulação do microbioma vegetal pode ser uma abordagem alternativa para aumentar a produtividade agrícola e a qualidade dos alimentos, bem como a qualidade do solo (VERMA, 2018), já que os micro-organismos ocorrem naturalmente no ambiente. Futuras estratégias de melhoramento da produtividade de plantas devem dar mais importância às interações planta-micro-organismo, para obter plantas com alta produtividade e mais tolerantes as restrições ambientais (BERG et al., 2014).

Para facilitar o estudo, o microbioma vegetal pode ser sub-dividido em sub-microbiomas específicos de tecidos ou órgãos da planta, inclui as comunidades microbianas das superfícies das plantas (filosfera e dermosfera, por exemplo), do interior das plantas (endofíticos) e da rizosfera. Nos próximos tópicos serão abordados os microbiomas da filosfera, dermosfera, rizosfera e a serapilheira como micro-habitats importantes em florestas tropicais.

2.1.1.1.Filosfera

A filosfera representa a interface entre as partes aéreas da planta e o ar. A maioria dos estudos com microbiologia desse micro-habitat se concentra nas superfícies foliares, por ser a estrutura da parte aérea mais dominante na planta. As bactérias são as colonizadoras mais numerosas da filosfera, mas também leveduras, fungos, algas e menos frequentemente nematóides e protozoários podem ocorrer (LINDOW; BRANDL, 2003). Numa escala global, a estimativa do número de células bacterianas que habitam a filosfera é de 10^{26} (MORRIS; KINKEL, 2002).

Esse ambiente está sujeito à alta incidência de radiação ultravioleta, altas variações de temperatura e de disponibilidade de água e limitações nutricionais, dentre outros fatores que podem modular as comunidades microbianas (VORHOLT, 2012). As principais

características que devem ser essenciais para apoiar a vida microbiana na filosfera incluem a quimiotaxia e a capacidade de produzir biofilmes, bem como pigmentos que auxiliam na tolerância à radiação UV (VORHOLT, 2012). Além desses fatores, o táxon da planta hospedeira também pode modular a estrutura da comunidade bacteriana na filosfera. De uma maneira geral, plantas mais relacionadas filogeneticamente, nos níveis de espécie, família e ordem, apresentam estruturas de comunidades mais similares entre si (LAMBAIS; LUCHETA; CROWLEY, 2014). A comunidade epifítica também responde às mudanças climáticas, através da alteração da composição da microbiota, como verificado em uma floresta de carvalhos no sul da Catalunha (Espanha), onde a seca/verão aumentou a riqueza de espécies da comunidade microbiana epifítica. Essas alterações foram associadas a maiores razões C:N das folhas em resposta a seca em áreas semi-áridas, e ainda, essa comunidade potencialmente pode fixar N e assim, melhorar a capacidade das plantas de se adaptarem ao ambiente (RICO et al., 2014).

Bactérias da filosfera têm alta adaptabilidade e características funcionais que podem promover o crescimento de plantas (VENKATACHALAM et al., 2016). Dentre as várias funções que as bactérias da filosfera podem desempenhar, a FBN é uma das mais importantes (FURNKRANZ et al., 2008, VORHOLT, 2012). Entre as diazotróficas cultiváveis da filosfera da Mata Atlântica, as espécies da família Enterobacteriaceae (Proteobacteria) podem apresentar altas taxas de FBN e de síntese de AIA *in vitro* (CASSETARI, 2015). A FBN na filosfera foi apontada como uma importante fonte de nitrogênio para as plantas em uma floresta tropical úmida na Costa Rica, e foi detectado, através de análises do gene rRNA 16S, que as cianobactérias e gamaproteobactérias provavelmente contribuem com uma entrada significativa de nitrogênio nesse ecossistema (FURNKRANZ et al., 2008). Na Mata Atlântica, há estimativas de que a taxa de FBN associada à filosfera de *Merostachys neesii*, pode variar de 10 a 21 ng N g⁻¹ h⁻¹ (LAMBAIS et al., dados não publicados). Essas informações mostram que a filosfera é um ambiente apropriado para prospecção de bactérias fixadoras de N assimióticas.

Bulgaderi et al. (2013) relataram a presença dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, e Proteobacteria na filosfera, sendo este último frequentemente dominante na comunidade bacteriana. Os gêneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Massilia*, *Arthrobacter* e *Pantoea* parecem compor o núcleo das comunidades da filosfera de soja e arroz, entre outras espécies (BULGADERI et al., 2013). Redford et al. (2010) utilizaram técnicas de pirosequenciamento para caracterizar comunidades bacterianas da filosfera de 56 espécies de árvores em Boulder, Colorado, EUA, e encontraram 25

diferentes filos bacterianos nas amostras, com os grupos mais abundantes dentro das Proteobacteria (24,5%, 16,4% e 7,9% das sequências afiliados aos sub-filos Alpha, Beta e Gammaproteobacteria respectivamente), Bacteroidetes (22,5% das sequências), Actinobacteria (9,0% das sequências), TM7 (9,0% das sequências) e Firmicutes (5,3% das sequências). O grupo mais comum de bactérias encontradas na filosfera foi Sphingobacteriales da classe Bacteroidetes, que representou 21,3% de todas as sequências (REDFORD et al., 2010).

2.1.1.2. Dermosfera

A dermosfera é a superfície do tronco das árvores (LAMBAIS; LUCHETA; CROWLEY, 2014), onde geralmente se encontram líquens, briófitas, cianobactérias e outros micro-organismos (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2007). Assim como a filosfera, a dermosfera é um ambiente hostil à vida microbiana, já que está exposta a flutuações de temperatura, umidade e radiação ultravioleta, estresse osmótico, e variações morfológicas e genotípicas das plantas (ANDRADE, 2007). A estrutura da comunidade bacteriana da dermosfera também é dependente do táxon vegetal, da mesma maneira que da filosfera (LAMBAIS; LUCHETA; CROWLEY, 2014).

Muitos dos micro-organismos que habitam a dermosfera podem ter aplicações biotecnológicas importantes, como produção de antibióticos e outros metabólitos secundários (BERDUGO, 2016). A FBN associada à dermosfera pode ser um dos principais aportes de nitrogênio em uma floresta Montana da Mata Atlântica, variando de 160,89 a 212,63 $\text{ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Já na Floresta de Terras Baixas da Mata Atlântica, a FBN variou de 77,89 a 93,55 $\text{ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A floresta de Restinga da Mata Atlântica apresentou os menores valores de FBN, variando de 12,16 a 25,49 $\text{ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (LAMBAIS et al., dados não publicados).

Poucos estudos abordam a composição da comunidade bacteriana associada à dermosfera. Lambais, Lucheta e Crowley (2014) avaliaram a composição da comunidade bacteriana associada a filosfera, dermosfera e rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica, com base em uma combinação de análises de PCR-DGGE e sequenciamento dos genes rRNA 16S, e observaram que a dermosfera apresentou menor riqueza e diversidade de UTOs quando comparada com a rizosfera. Entretanto, Gómez (2012) avaliou a diversidade bacteriana associada a filosfera, dermosfera e rizosfera de três espécies da Mata Atlântica, sendo que dermosfera foi avaliada somente em duas espécies, através do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S, e observou maior diversidade de bactérias na dermosfera quando

comparada com filosfera e rizosfera, devido provavelmente a presença de epífitas, como musgos e briófitas associadas a este micro-habitat.

Lambais, Lucheta e Crowley (2014) observaram também que a composição da comunidade bacteriana da dermosfera é muito semelhante à da filosfera, e que o gênero *Pseudomonas* é o mais abundante nos dois micro-habitats em espécies arbóreas da Mata Atlântica. Gammaproteobacteria foi a classe mais abundante de bactérias na dermosfera das sete espécies arbóreas avaliadas. BERDUGO (2012) acessou a comunidade bacteriana da dermosfera de *Guapira opposita* e *Euterpe edulis* em uma Floresta de Restinga em Ubatuba, SP, através do pirosequenciamento da região V4 do gene rRNA 16S. Na dermosfera de *E. edulis*, a classe mais abundante foi Gammaproteobacteria, já na dermosfera de *G. opposita* foi Alphaproteobacteria. Dentre as Gammaproteobacteria, os gêneros de maior ocorrência foram *Pseudomonas*, *Azorhizophilus*, *Azomonas* e *Methylobacterium*. Já, dentre as Alphaproteobacteria foram *Rhodophila*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Methylovirgula* e *Beijerinckia*.

2.1.1.3. Rizosfera

A rizosfera é a zona do solo sob influência das raízes das plantas, constituindo a região biologicamente mais ativa do solo (KUZYAKOV, 2002). É um ambiente dinâmico, onde os micro-organismos podem se desenvolver, interagir entre si e com a planta (NIHORIMBERE et al., 2011). As raízes exsudam parte do carbono fixado fotossinteticamente na forma de açúcares solúveis, aminoácidos ou outros metabólitos secundários na rizosfera, os quais podem ser metabolizados pela comunidade microbiana e contribuir para a seleção de grupos microbianos específicos (CHAPARRO et al., 2013). O genótipo, a saúde, o estágio de desenvolvimento e a fisiologia das plantas determinam a composição e as propriedades dos exsudatos radiculares (TIMMUSK et al., 2017).

Assim como na filosfera, o táxon vegetal também modula a estrutura da comunidade microbiana na rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica (LAMBAIS; LUCHETA; CROWLEY, 2014). Outros fatores que podem influenciar na estruturação das comunidades bacterianas da rizosfera, são o estado nutricional da planta (YANG; CROWLEY, 2000), a intensidade do uso do solo, alterações no pH, degradação da serapilheira, pesticidas, níveis de nutrientes (LAMMEL et al., 2015), e zona da rizosfera habitada, além do tipo de solo (MARSCHNER et al., 2001).

Da mesma forma que as plantas favorecem os crescimento de micro-organismos na rizosfera, esses, por sua vez, podem favorecer as plantas, fornecendo nutrientes como N,

através da FBN (VEGA, 2007). Bactérias diazotróficas de vida-livre no solo podem fornecer quantidades significativas de nitrogênio em vários ecossistemas naturais, incluindo florestas tropicais (CLEVELAND et al., 1999). O solo rizosférico é um ambiente favorável à FBN assimiótica em florestas tropicais, e, em algumas espécies arbóreas, a contribuição da FBN pode ser de $9 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (REED; CLEVELAND; TOWSEND, 2011). Na Mata Atlântica, a taxa de FBN de vida-livre no solo rizosférico pode variar de 0,15 a $0,94 \text{ ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (LAMBAIS et al., dados não publicados).

Lambais, Lucheta e Crowley (2014) encontraram uma grande riqueza de espécies bacterianas, com grande frequência de Alphaproteobacteria e Acidobacteria, associadas à rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica. Myung-oh et al. (2012) avaliaram o rizoplane (superfícies das raízes, onde há maior efeito dos exsudatos radiculares) de 4 espécies arbóreas de uma floresta tropical da Malásia, através do pirossequenciamento do gene rRNA 16S, e observaram que Acidobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria foram dominantes no rizoplane dessas arbóreas. Já, Fonseca et al. (2017) avaliaram os microbiomas do solo não rizosférico e da rizosfera da espécie arbórea *Brosimum guianense*, nativa da Floresta Amazônica, através do sequenciamento do metagenoma, e verificaram que Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria foram os filos predominantes para os dois tipos de amostra, sendo que na rizosfera, os filos Bacteroidetes, Proteobacteria e Planctomycetes eram mais frequentes. Esse estudo sugere que a rizosfera florestal tem potencial para selecionar bactérias benéficas que participam ativamente de funções metabólicas associadas com a ciclagem de nitrogênio e carbono.

2.1.1.4 Serapilheira

A serapilheira é composta por folhas, flores, frutos, caules, restos de plantas (podendo ser considerado um material derivado da filosfera) e também, em menor proporção, por resíduos de animais que cobrem a superfície dos solos sob florestas (VASQUEZ-YANES et al., 1990). Além de micro-organismos, a serapilheira é colonizada por organismos da meso e macrofauna (MANHÃES et al., 2009), mas, em muitos casos, as bactérias predominam nesse ambiente (FRAGA et al., 2012). A composição química da serapilheira influencia a composição e estrutura das comunidades microbianas, como observado em florestas de eucalipto no estado do Rio de Janeiro (NDAW et al., 2009). Outro estudo também documentou que a diversidade microbiana na serapilheira é influenciada pelo tipo de folha presente, com efeitos em nível de genótipo vegetal e química foliar (WYMORE et al., 2016). Em ecossistema florestal na República Checa, também foi relatado que a espécie arbórea

exerce efeito na composição da comunidade bacteriana presente na serapilheira, sendo que o efeito da espécie arbórea é parcialmente mediado pelo pH da serapilheira (URBANOVÁ; SNAJDR; BALDRIAN, 2015).

Da mesma forma que em outros ambiente, uma das funções dos micro-organismos na serapilheira é a FBN, além da mineralização de formas orgânicas de N. Já foi observado que a FBN assimiótica na serapilheira de plantas com maior relação C:N pode ser mais elevada do que em plantas com relação C:N mais baixa (HEDIN et al., 2009). Em uma floresta tropical úmida de Costa Rica, foi observado que a taxa de FBN de vida-livre é maior na serapilheira do que na filosfera e no solo (REED; CLEVELAND; TOENSEND, 2008), e pode variar de 0,36 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹ na estação seca a 5,48 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹ na estação chuvosa (REED; CLEVELAND; TOENSEND, 2007). Na Mata Atlântica, a FBN na serapilheira apresentou variação espacial, com locais de alta atividade (BERDUGO, 2012), podendo abrigar diversas bactérias diazotróficas assimióticas.

Cassetari (2015) isolou bactérias associadas à serapilheira e filosfera de bambu (*M. neesii*) na Mata Atlântica, e observou que os isolados originados da serapilheira apresentaram as maiores taxas de FBN e de síntese de AIA *in vitro*. Esses isolados tiveram o gene rRNA 16S parcialmente sequenciado, e foram afiliados ao gênero *Klebsiella*. CASSETARI (2015) mostrou que a serapilheira pode ser um ambiente importante para a prospecção de bactérias diazotróficas de assimióticas para uso agrícola.

Urbanová, Snajdr, Baldrian (2015) avaliaram a comunidade bacteriana do solo e da serapilheira associada a sete espécies arbóreas de uma floresta na República Checa, através do pirosequenciamento da região V4-V6 do gene rRNA 16S, e verificaram que a comunidade bacteriana é mais diversa na serapilheira do que no solo. Os filos mais frequentes na serapilheira foram Proteobacteria (58,9%), seguido de Actinobacteria (13,8%), Bacteroidetes (13,8%) e Acidobacteria (6,0%). A maioria das UTOS de Proteobacteria pertenciam a Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria. Os gêneros mais comuns foram *Shingomonas*, *Erwinia*, *Mucilaginibacter*, *Burkholderia* e *Pedobacter*.

2.2 Bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP)

Dentre os micro-organismos que compõem o microbioma vegetal, as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) apresentam mecanismos capazes de incrementar o crescimento vegetal. As BPCPs podem promover o crescimento de plantas fornecendo ou induzindo a produção de substâncias reguladoras de crescimento pela própria

planta, ou fornecendo ou alterando a absorção de certos nutrientes essenciais. Elas podem também diminuir ou prevenir efeitos deletérios de um ou mais micro-organismos fitopatogênicos (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008).

Os mecanismos diretos para promoção do crescimento de plantas podem incluir: produção de auxinas (ex. ácido indolacético), que são responsáveis pelo crescimento de raízes laterais e adventícias e divisão celular (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017); síntese de 1-aminociclopropano-1-carboxilase (ACC desaminase), a qual cliva ACC, o precursor de etileno, impedindo respostas de estresse (senescência, clorose e abscisão) em plantas (GLICK, 2014); produção de citocininas, as quais estão envolvidas no desenvolvimento vascular, controlando diferenciação celular em tecidos meristemáticos de plantas (DE RYBEL et al., 2016); síntese de giberelinas, as quais influenciam na germinação de sementes, alongamento e desenvolvimento do caule, floração e frutificação das plantas (ZAIDI et al., 2015); fixação de nitrogênio, fornecendo nitrogênio assimilável às plantas (LEGHARI et al., 2016); solubilização de fósforos, disponibilizando fósforo assimilável às plantas (BAKER et al., 2015); alteração da disponibilidade de ferro, através da síntese de sideróforos (ROUT, 2015).

Já os mecanismos indiretos podem incluir: síntese de antibióticos contra um patógeno; síntese de enzimas de degradação da parede celular de fungos patogênicos (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017); síntese de compostos inibidores de fitopatógenos; inibição de patógenos por competição por recursos energéticos e sítios de ligação no hospedeiro (BARAHONA et al., 2011); síntese de cianeto de hidrogênio (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017); e indução de resistência sistêmica (VAN-LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998), entre outros mecanismos.

As estratégias para promoção do crescimento variam com as diferentes épocas de crescimento e desenvolvimento vegetal. Os mecanismos de promoção de crescimento das plantas podem atuar concomitantemente, e somente monitorando diferentes parâmetros, durante todo o período de crescimento vegetal, pode-se estimar a contribuição de cada um dos diferentes mecanismos (TIMMUSK, et al., 2017).

Alguns gêneros de bactérias que já foram documentados como BPCP incluem *Azospirillum* (FBN e síntese de fitormônio), *Burkholderia* (FBN, síntese de AIA, ACC desaminase e ação antifúngica), *Enterobacter* (síntese de AIA, sideróforos e ação antifúngica); *Gluconacetobacter* (FBN e síntese de auxina), *Klebsiella* (FBN), *Pseudomonas* (FBN, síntese de AIA e de ACC desaminase), *Serratia* (síntese de AIA e ACC desaminase) e *Stenotrophomonas* (síntese de AIA e ACC desaminase) (SANTOYO et al., 2016).

A melhor compreensão dos mecanismos pelos quais as bactérias interagem com as plantas pode possibilitar o estabelecimento de novas estratégias de uso de micro-organismos para melhorar a produção agrícola (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014). Pode também estimular o desenvolvimento de novas técnicas de identificação e isolamento de BPCPs. No entanto, o desenvolvimento de um inoculante à base de BPCP é um processo complexo, e requer várias etapas desde o isolamento, triagem para eficiência *in vitro* e *in vivo*, até ensaios em condições de lavoura (TIMMUSK et al., 2017). Assim, conhecer os mecanismos de promoção de crescimento é de suma importância para o uso em larga escala dessas bactérias na agricultura.

2.2.1 Bactérias diazotróficas

O N é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila e proteínas. Em diversos sistemas de produção, a disponibilidade de N assimilável pode ser considerada limitante (BREIDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Esse elemento é abundante na atmosfera, porém na sua forma mais estável (N₂) não pode ser assimilado diretamente pelas plantas. No entanto, micro-organismos diazotróficos possuem o complexo enzimático nitrogenase, o qual catalisa a redução do N₂ atmosférico para NH₃, processo conhecido com fixação biológica de nitrogênio (REIS et al., 2006), representado pela seguinte equação:

O processo de FBN demanda grande quantidade de energia, 8 elétrons e 16 ATPs, para romper a forte ligação tripla que confere estabilidade para a molécula de N₂ (BERNHARD, 2010). Elevadas quantidades de compostos nitrogenados inibem o complexo nitrogenase, seja ao nível de transcrição, com a inibição da expressão dos genes *nif*, ou ao nível de pós-tradução, através da rápida e reversível inativação do complexo nitrogenase por adição de ADP-ribose à proteína NifH (HALBLEIB; LUDDEN, 2000).

Outros fatores também podem influenciar a FBN, tais como disponibilidade de fósforo (P), ferro (Fe) e molibdênio (Mo) (VITOUSEK; HOWARTH, 1991), temperatura (HICKS; HARMON; GRIFFITHS, 2003), e disponibilidade de água (FREIBERG, 1998). Já foi relatado que, em florestas tropicais, a aplicação de P estimula a atividade de FBN. Além disso, a adição de P pode também evitar o efeito inibitório de compostos nitrogenados sobre o complexo nitrogenase (WANG et al., 2017).

Cleveland et al. (1999) estimaram o potencial de FBN global (simbiótica e assimbiótica) em ecossistemas naturais, e observaram valores variando de 100 e 290 milhões de toneladas de N ano⁻¹. Além de ser a principal via de incorporação de N à biosfera, a FBN pode promover o crescimento de plantas através do fornecimento de compostos nitrogenados. No Brasil, a inoculação de rizóbios na cultura de soja, com objetivo de substituir a adubação nitrogenada, trouxe significativas economias para o país (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2018).

Roesch et al. (2007) isolaram cepas de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* associadas à rizosfera, raízes e caule de milho coletados no Rio Grande do Sul, as quais apresentaram uma alta atividade da nitrogenase e alta síntese de AIA *in vitro*. Já, Araújo et al. (2015) utilizaram a técnica de diluição isotópica de N¹⁵ para identificar melhorias na aquisição de N pela cultura de milho inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, as quais contribuíram respectivamente com 19.40% e 9.49% do N requerido para o desenvolvimento da cultura.

Islam et al. (2009) isolaram cepas de *Herbaspirillum* sp., *Paenibacillus* sp. e *Bacillus* sp. de arrozais, as quais foram testadas *in vitro* para múltiplas características de promoção de crescimento de plantas, incluindo fixação de N. Os isolados foram avaliados por seus efeitos em canola e plantas de arroz sob condições controladas. A inoculação com *Herbaspirillum* sp. (RFNB26) resultou em comprimento máximo de raiz (54,3%), vigor de plântulas e biomassa em canola. Plantas de canola inoculados com *Bacillus* sp. RFNB6 exibiram atividade da nitrogenase significativamente maior. Rizosfera de arroz inoculado com *Herbaspirillum* sp. (RFNB26) também exibiu maior atividade de nitrogenase. A inoculação com *Paenibacillus* sp. (RFNB4) aumentou significativamente a altura das plantas e produção de biomassa em 42,3% e 29,5%, respectivamente.

Kifle e Laing (2016) isolaram bactérias diazotróficas de vida-livre da rizosfera, de folhas e raízes de milho. Os isolados capazes de crescer em meio isento de N foram avaliados para fixação de N, através do teste de redução de acetileno. Vinte isolados foram considerados promissores com base na triagem *in vitro*, e foram inoculados em plântulas de milho. Dos 20 isolados inoculados, cerca de 50% promoveram aumento no conteúdo de clorofila, condutância estomática e peso seco, em relação ao controle não-inoculado. As contribuições da inoculação de bactérias diazotróficas de vida-livre foram bastante significativas, e mostraram que essas bactérias podem substituir parcialmente os fertilizantes nitrogenados.

2.2.2 Bactérias produtoras de hormônios vegetais

O desenvolvimento de plantas depende de meristemas, onde as proliferações celulares, como divisão celular e crescimento, dão origem a novas estruturas vegetais e permitem que a planta aumente de tamanho. Os fitohormônios são os responsáveis pela regulação da proliferação celular e modulação do desenvolvimento e crescimento das plantas. Dentre os fitormônios conhecidos, as citocininas, giberelinas e auxinas, ajudam a regular o crescimento das plantas, agindo em vários pontos do ciclo celular, quando a luz, a água e os nutrientes minerais não são limitantes. A produção de moléculas homólogas aos fitohormônios vegetais têm sido observada em várias BPCP (WONG et al., 2015) e podem alterar o desenvolvimento e crescimento vegetal.

As giberelinas estimulam várias funções metabólicas na planta, e são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo a germinação de sementes, alongamento, floração e formação de frutos e senescência (ALI; CHARLES; GLICK, 2017; ZAIDI et al., 2015). A via completa da biossíntese de giberelinas bacterianas foi recentemente descrita por Nett et al. (2017). Várias bactérias diazotróficas já foram documentadas como produtoras de giberelinas, dentre elas *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii* (NETT et al., 2017), *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* (ALI; CHARLES; GLICK, 2017).

As citocininas são um grupo de fitohormônios que promovem a divisão celular em raízes e brotos (ALI; CHARLES; GLICK, 2017). Ainda não se sabe como a biossíntese desse fitormônio é regulada em bactérias (GLICK, 2012). No entanto, seus efeitos em plantas são notórios. Foi observado em *Arabidopsis* que a síntese de citocinina por *Pseudomonas fluorescens* é chave para o controle da infecção causada por *Pseudomonas syringae* (GROBKINSKY et al., 2016). Algumas das bactérias já relatadas como produtoras de citocininas são *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa* (ALI; CHARLES; GLICK, 2017).

Auxinas são hormônios vegetais que desempenham papéis vitais em quase todas as etapas de desenvolvimento da planta (ALI; CHARLES; GLICK, 2017). A principal auxina encontrada em plantas é o ácido indol-3-acético (AIA), o qual é produzido principalmente no meristema apical do caule e transportado para as raízes através das células do parênquima (GOMES et al., 2017). Este fitormônio tem papel central no desenvolvimento e crescimento de plantas como um regulador da divisão, diferenciação e expansão celular, formação de raízes laterais e florescimento (PANT; AGRAWAL, 2014).

AIA é o fitohormônio mais efetivo para promover o crescimento das plantas, e muitas bactérias promotoras de crescimento podem sintetizá-lo. No solo, a grande quantidade de AIA pode aumentar o crescimento e rendimento de culturas. Muitas plantas são dependentes de fontes exógenas de fitohormônios, incluindo aqueles sintetizados por bactérias (CHERIF-SILINI et al., 2016).

Há várias vias para síntese de AIA em bactérias, sendo uma delas a via dependente de triptofano, onde pode haver a conversão de triptofano exógeno à AIA. Os genes da biosíntese de AIA estão envolvidos na degradação de aminoácidos, seja por transaminação, descarboxilação e/ou desidrogenação. Bactérias benéficas às plantas tendem a usar a via do IPyA (indole-3-piruvato) para síntese de AIA. O primeiro passo nesta via é a conversão do triptofano em IPyA por uma aminotransferase (transaminação). No passo com limitação de velocidade de reação, o IPyA é descarboxilado pela enzima indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC), produzindo indole-3-acetaldeído (IAAld). No último passo o IAAld é oxidado a AIA. A enzima chave IPDC (Indol-3-piruvato descarboxilase) é codificada pelo gene *ipdC* em bactérias (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Diversos fatores ambientais podem estar relacionados à ativação da síntese de AIA em bactérias, e tais fatores variam muito entre as espécies bacterianas. No entanto, o pH baixo da rizosfera (o pH baixo ativa a expressão do gene *ipdC*) e o potencial matricial nas superfícies vegetais (a expressão do gene *ipdC* aumenta sob baixo potencial matricial) são condições importantes e comuns para que ocorra a síntese de AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Há também compostos específicos, como flavonóides, produzidos pela planta na rizosfera e na superfície vegetal que estimulam a síntese de AIA (VANDEPUTTE et al., 2005). A expressão do gene *ipdC* é muito baixa quando não há disponibilidade de triptofano e oxigênio, e a aplicação de triptofano exógeno mostrou aumentar fortemente a produção de AIA em várias bactérias. Além disso, há reguladores de transcrição, como RpoS, que regulam a transcrição de genes em resposta a condições de estresse. Quando este regulador está presente, a expressão do gene *ipdC* em algumas espécies de bactérias é maior (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Várias espécies de bactérias diazotróficas podem sintetizar AIA (PEDRAZA, 2016). Já foi relatada a síntese de AIA pelos gêneros *Pseudomonas* (MARATHE et al., 2017), *Bacillus* (PANT; AGRAWAL, 2014), *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum* (SINGH, 2015), *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Burkholderia* (SILVA et al., 2016).

Efeitos positivos de bactérias diazotróficas epifíticas produtoras de AIA sobre o crescimento de cana-de-açúcar, milho e tomateiro já foram relatados (CASSETARI, 2015;

SOUZA, 2017). Essas descobertas mostram a capacidade de bactérias diazotróficas isoladas da filosfera em estimular o crescimento das plantas não só pela fixação de nitrogênio, mas também pela síntese de AIA (CASSETARI, 2015; SOUZA, 2017). Schultz et al. (2014) mostraram que a inoculação de bactérias diazotróficas melhorou o rendimento de cana-de-açúcar, mas que o efeito não foi devido à FBN, sugerindo que os benefícios do inoculante para a cana-de-açúcar podem ser provenientes do efeito da promoção de crescimento pela síntese de AIA. A prospecção e estudos de bactérias que, além de fixarem N atmosférico, sintetizem fitormônios, trás possibilidades de combinações de bactérias e plantas mais eficientes para serem utilizadas na agricultura comercial, podendo reduzir impactos ambientais causados pelo uso inadequado de fertilizantes químicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de amostragem

Bactérias capazes de se desenvolver em meios de cultura isentos de N foram isoladas da filosfera e serapilheira associada a três espécies arbóreas abundantes da Floresta Nacional do Tapajós (*Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* e *Chamaecrista xinguensis*), localizada no centro-leste da Amazônia, ao sul da cidade de Santarém, próximo ao quilômetro 67 da rodovia Santarém-Cuiabá BR-163 (entre 2° 45' e 4° 10' de latitude sul e 54° 45' e 55° 30' de longitude oeste). Nessa região existe uma predominância de Latossolo Amarelo Distrófico, caracterizado por diferentes texturas, geralmente profundo, ácido, friável e revestido por florestas densas (ESPIRÍTO-SANTO et al., 2005). A fisionomia da floresta é de Floresta Tropical Úmida Densa de Terra Firme, com alta produtividade, mesmo em períodos com poucas chuvas (NEPSTAD et al., 2012). A floresta tem característica semi-decídua, com espécies verdes e poucas espécies decíduas, vegetação densa, com altura média do dossel entre 35 e 40 m (GOULDEN et al., 2004).

O clima é caracterizado por uma estação seca que se estende de agosto a novembro, e uma estação chuvosa durante os meses de dezembro a julho (GOULDEN et al., 2004). A floresta recebe de 600 a 3000 mm de chuva a cada ano, com uma média de 2000 mm; mas pode experimentar graves secas durante os eventos de El Niño (NEPSTAD et al., 2012). A temperatura média anual é de 25°C (GOULDEN et al., 2004), e a temperatura média do dia mais frio do ano é superior a 18 °C (GOULDEN et al., 2004). No dossel florestal as temperaturas máximas e mínimas diárias oscilam entre 24 e 32°C e 20 e 25°C, respectivamente (GOULDEN et al., 2004).

Figura 1 – Localização da Floresta Nacional de Tapajós (SANTOS et al., 2017b).

3.2 Amostragem

A amostragem foi realizada em período relativamente seco na Amazônia, entre 13 e 23 de julho de 2016, em três espécies vegetais arbóreas (*Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* e *Chamaecrista xinguensis*) e dois compartimentos (filosfera e serapilheira). Foram amostrados 10 indivíduos de cada espécie vegetal. As amostras de folhas foram retiradas de ramos coletados, de forma aleatória, da região mediana, com auxílio de podão e tesoura de poda. A serapilheira foi coletada com o auxílio de uma moldura de 25x25 cm (Figura 2), a qual foi lançada ao acaso sob a projeção da copa da árvore de interesse e a serapilheira contida em sua área interna coletada e armazenada em gelo.

Figura 2 – Serapilheira e folhas amostradas das espécies arbóreas estudadas. **A.** Moldura utilizada para coleta da serapilheira. **B.** Imagem da Floresta Nacional do Tapajós.

3.3 Desalojamento dos micro-organismos da filosfera e serapilheira

Sob condições assépticas, e dependendo da área foliar de cada espécie vegetal, entre 5 e 10 folhas de cada indivíduo foram utilizadas para o desalojamento da comunidade microbiana. Para serapilheira, sub-amostras de aproximadamente 10 g foram colocadas em um becker contendo 500 mL de solução tampão fostato esterilizada (pH 7) e sonicadas por 10 minutos a 22,5 kHz, utilizando-se um homogeneizador de células ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Coleparmer Instrument Company, Illinois, USA). A suspensão bacteriana foi filtrada à vácuo através de uma membrana com porosidade 0,22 μm e diâmetro de 47 mm.

Os filtros foram armazenados em tubos plásticos esterilizados e mantidos à -20°C até o isolamento de bactérias.

Figura 3 – Membrana (porosidade 0,22 μm) com a suspensão bacteriana advinda da filosfera.

3.4 Isolamento de bactérias (filosfera e serapilheira)

As membranas foram colocadas em Erlenmeyers com 50 mL de solução salina 0,85% (8,5g de NaCl em 1 L de água Milli-Q) autoclavados, e agitadas em agitador orbital (100 rpm) por 6 horas à 28°C. Da suspensão resultante foi retirado 1 mL e preparado uma diluição seriada (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Uma alíquota de 0,1 mL dessas suspensões foi adicionada em placas contendo meio de cultura sólido para bactérias diazotróficas de vida-livre, descrito por Dobereiner; Baldani e Baldani (1995), sem adição de N (ANEXO B). Os meios de cultura inoculados foram mantidos em câmara de crescimento à 28°C, e quando o crescimento bacteriano formou colônias características, foi realizado o isolamento das colônias, por meio de sucessivas repicagens, alternando o crescimento no mesmo meio de origem sólido. Após esse processo, os isolados foram cultivados em meio de cultura líquido por dois dias, homogeneizados e estocados em glicerol 20% à -80°C.

3.5 Taxa de fixação biológica de nitrogênio (*in vitro*)

Os isolados foram cultivados em meio de cultura Dyg's (ANEXO C, RODRIGUES; MALAVOLTA; VICTOR, 1986), por 24 h, sob agitação orbital de 200 rpm à 30°C, com 3 repetições por isolado. Posteriormente, 10 mL do meio foi retirado e colocado em tubos falcon, para ser centrifugado à 5000 g e 4° C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi decartado e o pélete lavado com solução salina (NaCl 0,85%). Esse processo foi repetido duas vezes e ao final uma alíquota de 1 mL foi retirada para determinação da densidade ótica (OD). Uma alíquota de 200 µL foi retirada da suspensão de células bacterianas e inoculada em frascos de 10 mL contendo 5 mL de meio semi-sólido JNFb (ANEXO D, DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) sem biotina e sem azul de bromotimol. As culturas foram incubadas por 5 dias à 30°C no escuro, quando foi evidenciado o aparecimento da película característica de crescimento.

Os frascos foram vedados e 1mL de ar foi retirado de cada frasco e substituído por 1 mL de gás acetileno (AA, pureza 99,8%, Air Liquid). Os frascos foram incubados por 1 hora, e em seguida 1 mL do ar dos frasco (headspace) foi retirado e analisado por cromatografia gasosa usando um cromatógrafo Shimadzu – GC 2010, com detector de ionização de chama à 250°C e uma coluna HP PLOT/Q à 60°C (Agilente J&W GC Columns, Santa Clara, Califórnia – EUA). Amostras incubadas sem bactérias, apenas com gás acetileno, foram utilizadas para determinação do etileno contaminante no ar, e consideradas controles negativos (brancos). Imediatamente após a amostragem da atmosfera dos frascos para cromatografia, as culturas foram armazenadas à -80°C, para posterior quantificação de proteína total. Para a extração de proteínas, as amostras foram sonicadas por 1 minuto à 22,5 KHz por 3 vezes, e a concentração de proteína total foi determinada por fluorimetria usando-se o kit *Qubit® Protein Assay*.

A atividade da nitrogenase foi expressa pela taxa de redução de acetileno, em nanomoles de etileno por micrograma de proteína por hora de incubação (nmol µg⁻¹ h⁻¹), de acordo com a equação:

$$nmol\ etileno\ \mu g^{-1}\ prote\acute{a}na\ h^{-1} = \frac{(S - C). V}{Pr. t. 25530}$$

Sendo, S = quantidade de etileno obtido na amostra após incubação (ppm); C = quantidade de etileno nos frascos incubados apenas com gás acetileno, sem bactérias (ppm); Pr = Proteína total da amostra (µg /5mL); V = volume “headspace” nos frascos de incubação

(mL); t = tempo de incubação (h); 25530 = constante, considerando-se as condições de temperatura e pressão do local de análise do etileno, para 1 mol de gás.

Para estimar a quantidade de N fixado, foi utilizado a relação descrita por (HARDY et al., 1968), de 1 mol de NH_3 para 3 moles de C_2H_4 . A quantidade de nitrogênio fixado pelos isolados foi expressa em ng de N μg de proteína⁻¹ h⁻¹.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das variáveis comparadas através do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) (JELIHOVSCHI et al., 2014), e do teste de Duncan com auxílio do pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2016), através do software estatístico R (R CORE TEAM, 2016).

Figura 4. Fotos mostrando etapas do teste de redução de acetileno (ARA). **A.** Amostra lacradas para incubação com gás acetileno. **B.** Injeção da amostra no cromatógrafo.

3.6 Síntese de ácido indolacético (*in vitro*)

A quantidade de ácido indolacético (AIA) produzida pelas culturas bacterianas foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ahmad; Ahmad e Khan (2008). Esse método se baseia na mudança da coloração de solução contendo compostos indólicos, a qual varia de amarelo (não oxidado) para vermelho (oxidado). Assim, os isolados bacterianos foram cultivados em meio Dyg's (ANEXO C) por 24 h a 30° C, sob agitação orbital (160

rpm). Posteriormente, 10 mL do meio foi retirado e colocado em tubos de fundo cônico de 15 mL, e centrifugado a 5000 g e 4°C , durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com solução salina (NaCl 0,85%). O processo foi repetido duas vezes, e ao final uma alíquota de 1 mL foi retirada para determinação da densidade ótica (OD) à 600 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Hewlett Pckard, modelo 8453. A OD da suspensão bacteriana foi ajustada para $0,6 - 0,8\text{ mL}^{-1}$ e foi inoculado em triplicata em meio Dyg's suplementado com L-triptofano (1g L^{-1}).

Após 24 h, uma alíquota de 1,5 mL da cultura dos isolados foi centrifugada à 15700 g por 10 minutos. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo eppendorf, no qual foi adicionado 1 mL do reagente Salkowski ($\text{FeCl}_3\text{ }0,5\text{ mol L}^{-1}$, 1 mL; $\text{HClO}_4\text{ }35\%$, 49 mL) (SERGEERA; LIAIMER, BERGMAN, 2002). A mistura foi incubada por 30 min ao abrigo de luz. A concentração de AIA foi determinada por espectrofotômetro à 535 nm, com base em uma curva padrão de AIA ($1-100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das variáveis comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) (JELIHOVSCHI; FARIA; ALLAMAN, 2014) e pelo teste de Duncan, com auxílio do pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2016), através do software estatístico R (R CORE TEAM, 2016).

Figura 5 – Determinação da síntese de AIA *in vitro*. **A.** Foto exemplifica as diferenças na intensidade da coloração entre alguns isolados testados para síntese de AIA (B = Branco) **B.** Espectrofotômetro utilizado para avaliação da produção de AIA pelos isolados testados.

3.7 Avaliação das comunidades de bactérias diazotróficas de vida-livre

3.7.1 Extração de DNA

Curvas de crescimento dos isolados em meio de cultura descrito por Dobereiner; Baldani e Baldani (1995), sem adição de N, foram realizadas. O DNA bacteriano foi extraído utilizando-se o kit *Wizard® Genomic DNA Purification*, de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA), depois de corado com *Sybr Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). As imagens dos géis foram obtidas através de um

densitômetro *Typhoon Trio* (GE Healthcare Uppsala, Suécia). A concentração de DNA foi determinada por fluorimetria, utilizando-se um fluorímetro *Qubit™* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e o kit *Quant-It™* dsDNA BR (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

3.7.2 Sequenciamento parcial do gene rRNA16S

O gene rRNA 16S foi amplificado utilizando-se os iniciadores universais BAC8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e BAC1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3') em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de tampão Taq DNA polimerase 10x (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂ SO₄ e 0,1% Tween 20), 0,75 µL de 25 mM MgCl₂, 2,5 mL de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,3 µL de 5 U/µL Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá), 1 µL de cada iniciador (10 pmoles µL⁻¹) e 100 ng de DNA genômico, sendo o restando completado com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram: 3 minutos à 94°C; 30 ciclos de 45 segundos à 94°C, 30 segundos à 56°C e 2 minutos à 72°C, e a extensão final por 7 minutos à 72°C. Os amplicons resultantes foram analisados como descrito anteriormente, e purificados utilizando o do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Start-Up*, de acordo com as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado utilizando-se um sequenciador automático capilar Modelo 3500 *Genetic Analyzer da Applied Biosystems* pelo método de Sanger. A reação de sequenciamento foi composta por 7 µL de DNA purificado (21 ng µL⁻¹), e 1 µL de tampão de sequenciamento (200 mM Tris-HCl, pH 9; 5 mM MgCl₂), 1 µL de *DYEnamic™ ET Terminator* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Foram utilizados os iniciadores PRBA63F (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC3') (MARCHESI et al., 1998) ou UM518R (5'ATTACCGCGGCTGCTGG3') (ØVREÅS et al., 1997) em reações independentes. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial à 95°C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos à 95°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 2 min, sendo a reação incubada à 10°C após o término.

Para precipitação do DNA amplificado, foram adicionados 2 µL de solução 3 M acetato de sódio pH 9 + 0,5 M EDTA (pH 8) e 60 µL de etanol 100% gelado, agitando-se. As placas foram centrifugadas à 4°C, durante 45 min e 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 150 µL de etanol 70% gelado e uma nova centrifugação foi realizada por 15 minutos. O etanol foi descartado e a placa incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 2 horas para total evaporação do etanol.

As sequências obtidas foram processadas com o programa *Codon Code Aligner* (CodonCode Corporation, MA, USA) para remover bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade >20, menos de um erro em 100 nucleotídeos). As sequências válidas foram comparadas com sequências do banco de dados do GenBank do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do software *MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), e possíveis classificações em diferentes níveis taxonômicos foram definidas com base na distância evolutiva entre as sequências. A árvore filogenética foi construída através do método Neighbor joining (através do software *MEGA*), agrupando-se as sequências dos fragmentos do gene rRNA 16S dos isolados bacterianos obtidas (com primer UM518R) da filosfera e serapilheira das espécies arbóreas amostradas e de cepas de referência.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento de bactérias da filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da Floresta Amazônica

Através do isolamento de bactérias da folha e da serapilheira das três espécies arbóreas amostradas neste trabalho, foi possível obter 86 isolados bacterianos, sendo 41 da filosfera e 45 da serapilheira. Desses, foram obtidos 7 isolados da filosfera e 16 da serapilheira de *Chamaecrista xinguensis*; 15 isolados da filosfera e 20 da serapilheira de *Amphirrhox longifolia*; 19 isolados da filosfera e 9 da serapilheira de *Rinorea pubiflora*.

O meio de cultura utilizado para o isolamento é isento de N (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), para selecionar bactérias diazotróficas. Todos os isolados apresentaram crescimento lento, de no mínimo 5 dias, as cores variaram de branco, amarelo, laranja e rosa com consistência gomosa e de caráter acidificante (ANEXO A). Todos os isolados foram capazes de crescer em meios de cultura líquido e semissólido, como Dyg's (ANEXO C) e JNFb (ANEXO D).

A partir do isolamento e purificação dos isolados, todos foram submetidos a testes *in vitro* para avaliar a atividade da nitrogenase e síntese de AIA. Os isolados que se sobressaíram nestes testes foram selecionados e submetidos a identificação por meio do sequenciamento parcial do gene rRNA16S.

Figura 6 – Imagens de alguns dos isolados bacterianos diazotróficos de vida-livre cultivados em meio de cultura isento de N, com aproximadamente 10 dias de incubação à 28°C.

4.2 Fixação biológica de nitrogênio *in vitro*

A atividade da nitrogenase foi mensurada a partir da capacidade dos isolados em reduzir acetileno (substrato alternativo) a etileno. Todos os isolados apresentaram película de crescimento característica de diazotróficos quando cultivados em meio de cultura JNFb (ANEXO D, DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) e foram submetidos ao ensaio de redução de acetileno (ARA), em triplicata. Dos 86 isolados testados, 74 (86,04%) apresentaram atividade de nitrogenase *in vitro*.

A atividade da nitrogenase variou de 0.0002 a 0.228 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} , A atividade da nitrogenase foi classificada como baixa, intermediária e alta. 14% dos isolados

não apresentaram atividade de nitrogenase, 20% apresentaram baixa atividade, variando de 0.0002 a 0.009 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} . Cerca de 44% dos isolados apresentaram atividade da nitrogenase intermediária, variando de 0.010 a 0.025 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} . Por fim, 22% dos isolados apresentaram alta atividade da nitrogenase, variando de 0.025 a 0.228 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} (Figura 7). A análise estatística dos dados mostrou não haver diferença significativa na fixação de N *in vitro* entre os isolados, com exceção do isolado 10RF, que apresentou uma atividade de 0.228 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} , significativamente superior aos outros isolados, de acordo com o teste de Skott-Knott ($p < 0,05$) (Figura 8).

Ao comparar os isolados bacterianos em relação ao micro-habitat de origem, não houve diferenças significativas na taxa de redução de acetileno. No entanto, comparando-se os isolados em relação às espécies arbórea de origem, as bactérias isoladas de *Rinorea pubiflora* apresentaram taxas de redução de acetileno mais altas do que as bactérias isoladas das outras duas espécies arbóreas (Tabela 1), de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

Figura 7 – Frequência dos isolados que foram testados para atividade da nitrogenase. Baixa fixação de N (0.0002 - 0.009 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1}); fixação de N intermediária (0.010 - 0.025 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1}); fixação de N alta (0.025 a 0.228 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1}).

Figura 8 – Atividade da nitrogenase ($\text{ng N fixado } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína h^{-1}) *in vitro* dos isolados da filosfera (A) e serapilheira (B) de três espécies arbóreas da Amazônia. Isolados que não apresentaram atividade de redução de acetileno ($n=12$) não foram plotados no gráfico. Os valores correspondem às médias de 3 repetições por isolado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Skott-Knott ($p<0,05$).

Tabela 1. Média da atividade da nitrogenase (ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1}) considerando-se todos os isolados de cada espécie arbórea.

Espécie Arbórea	Atividade da nitrogenase (ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1})	Número amostral (n)
<i>Rinorea pubiflora</i>	0,02967 a	28
<i>Amphirrox longifolia</i>	0,01614 b	35
<i>Chamaecrista xinguensis</i>	0,009702 b	23

Os valores correspondem às médias da atividade da nitrogenase *in vitro* dos isolados originados de cada uma das espécies arbóreas. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

4.3 Produção de ácido indolacético *in vitro*

Todos os 86 isolados apresentaram síntese de AIA, nas condições testadas. A produção de AIA variou de 2,09 a 141,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Aproximadamente 13% dos isolados apresentaram baixa produção de AIA, variando de 2,09 a 4,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 67% dos isolados apresentaram produção intermediária de AIA, variando de 5,11 a 21,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 20% dos isolados apresentaram alta síntese de AIA, variando de 21,87 a 141,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Figura 9). A análise estatística mostrou haver diferenças significativas na síntese de AIA entre os isolados (Tabela 2), sendo que os isolados 76AF (141,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 3Rex (85,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e 69CF (73,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sintetizaram significativamente mais AIA do que os outros isolados.

Ao comparar as bactérias em relação aos micro-habitats dos quais elas foram isoladas, diferenças significativas na síntese de AIA foram detectadas, de acordo com teste de Duncan ($p < 0,05$). Em média, os isolados da filosfera sintetizaram 20,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, enquanto que os isolados da serapilheira sintetizaram 14,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em relação às espécies arbóreas das quais as bactérias foram isoladas, diferenças significativas entre as três espécies amostradas também foram detectadas, de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$). As bactérias isoladas da *Amphirrox longifolia* sintetizaram aproximadamente 26 a 41% mais AIA do que as bactérias isoladas das outras duas espécies arbóreas (Tabela 3).

Figura 9 – Frequência dos isolados que sintetizaram AIA na presença de L-triptofano. Baixa produção (2,09 a 4,95 µg mL⁻¹ de AIA); Produção intermediária (5,11 a 21,19 µg mL⁻¹ de AIA); Alta produção (21,87 a 141,17 µg mL⁻¹ de AIA).

Tabela 2. Síntese de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$), na presença de L-triptofano, pelos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira, considerando-se as três espécies arbóreas (Continua).

Isolado	Compartimento de origem	Gênero da arbórea de origem	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Isolado	Compartimento de origem	Gênero da arbórea de origem	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
67CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	2,751574 e	53CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	2,091068 e
68CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	4,338722 e	49CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	5,118681 e
65CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	7,866278 e	60CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	6,191238 e
61CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	8,272263 e	52CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	7,584855 e
66CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	10,98145 e	56CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	8,0422 e
62CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	20,44953 d	48CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	8,692569 e
69CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	73,14226 b	50CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	9,185236 e
75AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	3,710428 e	54CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	10,58716 e
70AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	5,64478 e	59CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	10,87934 e
42AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	6,259546 e	47CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	10,88033 e
41AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	6,61078 e	51CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	11,63088 e
44AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	7,116633 e	55CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	12,0425 e
71AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	7,241534 e	46CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	12,84222 e
78AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	8,573726 e	57CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	13,87735 e
74AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	20,50998 d	45CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	14,71859 d
73AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	21,08165 d	58CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	15,57528 d
77AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	23,67285 d	33AEx	serapilheira	<i>Amphirox</i>	2,3669 e
72AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	38,51977 c	25AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	5,57051 e
43AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	40,461 c	28AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	7,489587 e
80AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	45,45918 c	34AEx	serapilheira	<i>Amphirox</i>	7,556758 e
79AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	46,56265 c	37AEx	serapilheira	<i>Amphirox</i>	7,684917 e
76AF	filosfera	<i>Amphirox</i>	141,1752 a	30AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	7,786629 e
12RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	2,999987 e	27AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	9,087786 e
13RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	4,253323 e	36AEx	serapilheira	<i>Amphirox</i>	9,469391 e
84RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	4,709803 e	26AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	10,5535 e
7RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	4,958834 e	39AEx	serapilheira	<i>Amphirox</i>	12,52332 e
6RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	5,840055 e	29AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	13,22291 e
9RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	5,955824 e	24AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	14,61756 d
83RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	6,835093 e	38AEx	serapilheira	<i>Amphirox</i>	17,72818 d
8RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	7,051978 e	23AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	19,13229 d
20RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	7,481304 e	22AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	21,0718 d
10RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	8,068916 e	21AS	serapilheira	<i>Amphirox</i>	21,13548 d

Valores correspondem às médias de 3 repetições por isolado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 2. Síntese de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$), na presença de L-triptofano, pelos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira, considerando-se as três espécies arbóreas (Conclusão).

Isolado	Compartimento de origem	Gênero da arbórea de origem	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Isolado	Compartimento de origem	Gênero da arbórea de origem	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
11RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	9,548462 e	31AS	serapilheira	<i>Amphirrox</i>	42,48018 c
86RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	10,88641 e	35AEx	serapilheira	<i>Amphirrox</i>	43,26962 c
17RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	15,75947 d	5REx	serapilheira	<i>Rinorea</i>	2,80383 e
16RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	20,08053 d	2REx	serapilheira	<i>Rinorea</i>	3,316663 e
18RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	21,89586 d	1REx	serapilheira	<i>Rinorea</i>	5,541103 e
85RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	30,93384 d	64RS	serapilheira	<i>Rinorea</i>	6,589759 e
14RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	32,95071 d	82RS	serapilheira	<i>Rinorea</i>	7,848301 e
19RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	36,40004 c	81RS	serapilheira	<i>Rinorea</i>	8,719659 e
15RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	50,87477 c	4REx	serapilheira	<i>Rinorea</i>	10,55803 e
40AEx	serapilheira	<i>Amphirrox</i>	27,31015 d	63RS	serapilheira	<i>Rinorea</i>	19,74676 d
32AS	serapilheira	<i>Amphirrox</i>	38,99681 c	3REx	serapilheira	<i>Rinorea</i>	85,29182 b

Valores correspondem às médias de 3 repetições por isolado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 3. Média da síntese de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$), considerando-se todos os isolados de cada espécie arbórea.

Espécie Arbórea	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Número amostral (n)
<i>Amphirrox longifolia</i>	21,45 a	35
<i>Rinorea pubiflora</i>	15,83 ab	28
<i>Chamaecrista xinguensis</i>	12,51 b	23

Valores correspondem às médias da síntese de AIA *in vitro* pelos isolados originados de cada espécie arbórea. As médias correspondentes das espécies arbóreas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

4.4 Análises das sequências do gene rRNA 16S dos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira da floresta Amazônica

Dos 86 isolados, foram selecionado 21 para sequenciamento parcial do gene rRNA 16S, sendo selecionados aleatoriamente 11 isolados que apresentaram ARA entre 0,025 e 0,228 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} e 16 isolados que sintetizaram entre 21,87 e 141,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA. Dos 21 isolados selecionados, 6 deles (32AS, 80AF, 79AF, 14RF, 18RF, 19RF) apresentaram altos valores em ambos os testes, dentro da faixa determinada.

Das 21 sequências obtidas, 3 delas apresentaram baixa qualidade e baixa similaridade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Um novo sequenciamento deve ser realizado para definir a afiliação taxonômica desses isolados.

Adotando-se um critério de um mínimo de 98% de similariedade (com exceção da 77AF), dentre as sequências analisadas foram identificados 7 gêneros diferentes, sendo que 8 isolados pertenciam ao gênero *Pseudomonas*, 3 a *Bacillus*, 2 a *Burkholderia*, 2 a *Citrobacter*, 1 a *Lysinibacillus*, 1 a *Rhizobium* e 1 a *Stenotrophomonas*. Ao nível de filo, 77,7% dos isolados foram afiliados a Proteobacteria e 22,2% a Firmicutes (Tabela 4). Uma árvore filogenética foi construído para mostrar a similariedade dos isolados aos respectivos gêneros bacterianos (Figura 10). A afiliação dos isolados bacterianos selecionados para o sequenciamento, seus respectivos compartimentos de origens e os valores apresentados para síntese de AIA e FBN *in vitro* são mostrados na Tabela 5.

Tabela 4 - Afiliação dos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da floresta Amazônica, a partir do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S.

Isolado	Similaridade (%)	Gênero
10RF	98%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
14RF	98%	<i>Bacillus</i> (Bacillaceae; Bacillales; Bacilli; Firmicutes)
18RF	98%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
15RF	99%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
79AF	99%	<i>Burkholderia</i> (Burkholderiaceae; Burkholderiales; Betaproteobacteria; Proteobacteria)
77AF	83%	<i>Bacillus</i> (Bacillaceae; Bacillales; Bacilli; Firmicutes)
80AF	100%	<i>Burkholderia</i> (Burkholderiaceae; Burkholderiales; Betaproteobacteria; Proteobacteria)
43AF	100%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
72AF	98%	<i>Lysinibacillus</i> (Bacillaceae; Bacillales; Bacilli; Firmicutes)
76AF	98%	<i>Citrobacter</i> (Enterobacteriaceae; Enterobacteriales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
69CF	99%	<i>Citrobacter</i> (Enterobacteriaceae; Enterobacteriales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
61CF	99%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
35AEx	98%	<i>Bacillus</i> (Bacillaceae; Bacillales; Bacilli; Firmicutes)
40AEx	99%	<i>Rhizobium</i> (Rhizobiaceae; Rhizobiales; Alphaproteobacteria; Proteobacteria)
31AS	98%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
32AS	98%	<i>Stenotrophomonas</i> (Xanthomonadaceae; Xanthomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
3REx	98%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)
46CS	99%	<i>Pseudomonas</i> (Pseudomonadaceae; Pseudomonadales; Gammaproteobacteria; Proteobacteria)

Figura 10 – Árvore filogenética construída através do método Neighbor joining, gerada pelo parâmetro Kimura 2 e teste de bootstrap com 1000 repetições. Mostra a relação das sequências do gene rRNA 16S dos isolados de espécies arbóreas da floresta Amazônica com cepas de referência.

Tabela 5 - Afiliação dos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da floresta Amazônica, e suas respectivas taxas de síntese de AIA e FBN *in vitro*.

Isolado	Compartimento de origem	Gênero da arbórea de origem	Gênero do isolado	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ARA (ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1})
3REx	serapilheira	<i>Rinorea</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	85,291824 b	0,0047087003 b
10RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	8,068916 e	0,228933346 a
11RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	ND	9,548462 e	0,0973290297 b
14RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	<i>Bacillus</i> (98%)	32,950705 d	0,0566991627 b
15RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	50,874765 c	0,014769839 b
16RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	ND	20,08053 d	0,0255165563 b
18RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	21,895857 d	0,0255165563 b
19RF	filosfera	<i>Rinorea</i>	ND	36,40004 c	0,0255165563 b
31AS	serapilheira	<i>Amphirrhox</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	42,480181 c	0,0255165563 b
32AS	serapilheira	<i>Amphirrhox</i>	<i>Stenotrophomonas</i> (98%)	38,996809 c	0,0255165563 b
35AEx	serapilheira	<i>Amphirrhox</i>	<i>Bacillus</i> (98%)	43,269622 c	0,0255165563 b
40AEx	serapilheira	<i>Amphirrhox</i>	<i>Rhizobium</i> (98%)	27,310146 d	0,0255165563 b
43AF	filosfera	<i>Amphirrhox</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	40,461003	0,0255165563 b
46CS	serapilheira	<i>Chamaecrista</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	12,842215 e	0,0255165563 b
61CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	<i>Pseudomonas</i> (98%)	8,272263 e	0,0255165563 b
69CF	filosfera	<i>Chamaecrista</i>	<i>Citrobacter</i> (98%)	73,142264 b	0,0255165563 b
72AF	filosfera	<i>Amphirrhox</i>	<i>Lysinibacillus</i> (98%)	38,519767 c	0,0255165563 b
76AF	filosfera	<i>Amphirrhox</i>	<i>Citrobacter</i> (98%)	141,175198 a	0,0255165563 b
77AF	filosfera	<i>Amphirrhox</i>	<i>Bacillus</i> (98%)	23,672851 d	0,0255165563 b
79AF	filosfera	<i>Amphirrhox</i>	<i>Burkholderia</i> (98%)	46,562654 c	0,0255165563 b
80AF	filosfera	<i>Amphirrhox</i>	<i>Burkholderia</i> (98%)	45,459175 c	0,0255165563 b

ND = Não determinado

Valores correspondem às médias de 3 repetições por isolado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Com a crescente preocupação em preservar recursos naturais, há um grande incentivo para o desenvolvimento de tecnologias alternativas para aumentar a produtividade de culturas de interesse agrícola, bem como a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Uma das técnicas mais promissoras para minimizar a degradação ambiental, é o uso de biofertilizantes compostos por bactérias diazotróficas como alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados. As bactérias diazotróficas, além de fixarem N atmosférico e disponibilizá-lo para as plantas, também podem sintetizar fitormônios como o AIA (ROESCH et al., 2007), um importante metabólito envolvido no controle do desenvolvimento e crescimento vegetal (PANT; AGRAWAL, 2014).

Existem vários estudos que realizaram triagens para encontrar micro-organismos promissores para substituir a adubação nitrogenada e/ou promover o crescimento das plantas (AMBROSINI; PASSAGLIA, 2017; CELADOR-LERA et al., 2016, CASSETARI, 2015; SOUZA, 2017). No entanto, a aplicação prática desses micro-organismos ainda é restrita. O caso de maior sucesso é o uso de rizóbios para inocular leguminosas, principalmente soja (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2018). Muitas espécies de plantas de interesse agrícola ainda não podem ser beneficiadas com a inoculação de diazotróficos, principalmente pelas limitações impostas pela especificidade da relação entre as bactérias e as plantas. Uma possível solução para este problema é encontrar bactérias diazotróficas de vida-livre que possam promover o crescimento vegetal, evitando os mecanismos que determinam a especificidade das associações (CASSETARI, 2015).

Com esse objetivo, 86 isolados bacterianos foram obtidos da filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da floresta Amazônica, e cultivados em meio de cultura sólido para bactérias diazotróficas de vida-livre, isento de N. O meio de cultura utilizado neste trabalho já foi testado por Mirza e Rodrigues (2012), os quais isolaram 278 bactérias do solo da floresta Amazônica, e mostraram que a maioria dos isolados possuíam o gene *nifH*, característico de bactérias diazotróficas. CASSETARI (2015), utilizando o mesmo método, obteve 120 isolados da Mata Atlântica, sendo que 10 deles foram considerados promissores para promover o crescimento de plantas e possuíam o gene *nifH*. Já, Neroni e Cardoso (2007) isolaram bactérias diazotróficas de *Araucaria angustifolia*, pelo mesmo método descrito neste trabalho, e o caráter diazotrófico foi confirmado através do teste de redução de acetileno. Com base nos resultados deste trabalho e dos autores citados, é possível dizer que o método de isolamento de diazotróficos de vida-livre utilizado é eficiente.

Todos os isolados obtidas neste estudo foram testados para atividade da nitrogenase *in vitro*, e 12 isolados não apresentaram resultados positivos, sugerindo que essas bactérias não possuem nitrogenase ou que a nitrogenase não apresentou atividade nas condições experimentais usadas. Gothwal et al. (2008) e Cassetari (2015) também isolaram bactérias capazes de crescer em placas contendo meio de cultura isento de N, mas que não apresentaram atividade de nitrogenase *in vitro*, medido pelo método de redução de acetileno. Da mesma forma, Mirza e Rodrigues (2012) isolaram bactérias do solo da floresta Amazônica e apenas 39% dos isolados foram positivos para FBN *in vitro*, mesmo possuindo o gene *nifH*.

Os isolados que apresentaram resultados positivos no teste de FBN *in vitro*, podem ser comparados em relação à espécie de origem, pois dados coletados previamente por nosso grupo de pesquisa mostram que a FBN associada à espécie arbórea *Rinorea pubiflora* é maior do que em outras espécies da floresta Amazônia estudadas (dados não publicados). De fato, os isolados originados de *Rinorea* apresentaram maior atividade de nitrogenase *in vitro*, como mostrado na Tabela 1. É possível que a filogenia da planta hospedeira possa afetar a taxa de fixação de N de bactérias associadas (GOTHWAL et al., 2008).

Neste trabalho, a atividade da nitrogenase *in vitro* dos isolados bacterianos variou entre 0,0002 e 0,228 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} (Figura 8). Outros trabalhos também relataram variação elevada. Cassetari (2015) isolou diazotróficas de vida-livre da Mata Atlântica, e essas apresentaram atividade da nitrogenase *in vitro* variando de 0,04 a 0,28 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} . Rangjaroen et al. (2015) isolaram diazotróficos de vida-livre de arroz, e esses apresentaram atividade da nitrogenase variando de 0,16 a 2,11 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1} . Assim a variabilidade na atividade da nitrogenase dos diferentes isolados, medida através do teste de redução de acetileno, um método indireto (DINIZ et al., 2012), é relativamente elevada. O complexo enzimático responsável pela redução de nitrogênio depende de muitos fatores para funcionar adequadamente. Por exemplo, a fonte de carbono pode influenciar na atividade da nitrogenase, e as sucessivas repicagens em meio de cultura podem fazer com que a enzima perca ou reduza a sua atividade (GYANESHWAR et al., 2001). O pH e a intensidade de luz também podem influenciar na atividade da nitrogenase em cianobactérias, tendo sido demonstrado que a atividade máxima para essas diazotróficas foi atingida em pH 9 e alta intensidade luminosa (SOLTANI et al., 2006).

Cassetari (2015) selecionou alguns isolados com base nos testes *in vitro*, e mostrou que esses isolados melhoraram o desenvolvimento de cana-de-açúcar, em casa-de-vegetação. Rangjaroen et al. (2015) aplicaram os isolados bacterianos selecionados em cultivar de arroz comercial *in vivo*, e mostraram que os isolados também melhoraram o desenvolvimento de

arroz. No entanto, algumas bactérias podem apresentar alta eficiência em fixar N_2 *in vitro* sem, no entanto, fazê-lo *in vivo* (DINIZ et al., 2012). *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp foram previamente isolados do interior de colmos de cana-de-açúcar, como possíveis fixadores de N. No entanto, estudos moleculares e fisiológicos sugerem que o principal papel dessas bactérias na estimulação do crescimento da planta é pela produção de fitormônios (YONEYAMA; TERAKADO-TONOOKA; MINAMISAWA, 2017). Portanto, o ensaio de ARA pode ser usado para selecionar bactérias interessantes, porém, não deve ser o único critério para escolha de estirpes promissoras para uso na agricultura.

Todos os isolados também foram testados quanto a síntese de AIA *in vitro*, e todos apresentaram resultados positivos (Tabela 2). Os isolados originados da filosfera apresentaram maior síntese de AIA *in vitro*, e isso pode estar relacionado a uma maior competitividade durante a colonização das folhas pelas bactérias (BRANDL e LINDOW, 1998). Na superfície foliar, o AIA promove o afrouxamento da parede celular e pode estimular a liberação de açúcares para as bactérias. Frequentemente, o crescimento das bactérias nas superfícies das plantas é limitado pela disponibilidade de nutrientes. Assim, existe a possibilidade de que a maior habilidade de crescimento epifítico de isolados produtores de AIA, resulte na maior disponibilidade de nutrientes causada pelo aumento da liberação de açúcares das células vegetais (LINDOW e BRANDL, 2003).

Isolados originados de *Amphirox longifolia* apresentaram maior síntese de AIA *in vitro* (Tabela 3). Como as vias de síntese de AIA são dependentes de L-triptofano (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007), a quantidade de triptofano liberado pode variar significativamente entre espécies vegetais (KRAVCHENKO et al., 2004) e o triptofano exógeno pode ser eficientemente absorvido pelas bactérias e ativar a síntese de AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007), é possível que a habilidade em sintetizar AIA pelas bactérias esteja associada com a taxonomia da planta.

Shokri e Emtiazi (2010) isolaram bactérias simbióticas e assimbióticas de alfafa, lentilha, ervilha, feijão, arroz e trigo, e avaliaram a síntese de AIA por esses isolados. Os isolados pertencentes ao gênero *Rhizobium* mostraram maior eficiência em produzir AIA (entre 5,23 e 0,27 ppm AIA mg^{-1} de biomassa), assim como bactérias não simbióticas, como *Paenibacillus*, que produziu AIA em concentrações variando de 4,90 a 0,19 ppm de AIA mg^{-1} de biomassa. Essas diferenças entre os isolados não foram significativas, mostrando que bactérias de vida-livre podem ter a mesma eficiência na síntese de AIA que a bactérias simbióticas.

Longatti, Marra e Moreira (2013) isolaram 17 bactérias de solos de vários sistemas de uso da terra na região oeste da Amazônia, as quais foram testadas para síntese de AIA na presença de L-triptofano, e a produção variou de 10 a 38 μg de AIA mL^{-1} . Da mesma forma, Cassetari (2015) isolou bactérias diazotróficas da filosfera e serapilheira de *M. neesii* da Mata Atlântica, e a síntese de AIA pelos isolados diazotróficos variou de 1,71 a 51,77 μg de AIA mL^{-1} . Os isolados considerados promissores foram testados em cana-de-açúcar e foram capazes de melhorar o desenvolvimento da planta. Neste trabalho, a síntese de AIA chegou a 141,17 μg de AIA mL^{-1} pelo isolado 76AF (Tabela 2), mostrando que podem ter potencial para promover o crescimento de plantas *in vivo*.

Como mostrado na Tabela 2, nem todos os isolados deste trabalho apresentaram alta síntese de AIA, a produção de auxina pelas bactérias pode variar muito entre diferentes espécies e linhagens da mesma espécie. A síntese de AIA pode ser influenciada pela condição de cultura, estágio de crescimento e disponibilidade de substratos (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; SHOKRI e EMTIAZI, 2010). Outros fatores, como fonte de nitrogênio, quantidade de L-triptofano, temperatura e tempo de incubação desempenham papéis significativos na síntese de AIA por isolados bacterianos simbióticos e assimbióticos (SHOKRI; EMTIAZI, 2010). Mohito, 2013 observou que diferentes isolados requerem diferentes fontes de carbono, N, diferentes valores de pH e diferentes concentrações de L-triptofano para otimizar a síntese de AIA. Os resultados deste trabalho mostrou que todos os isolados podem sintetizar AIA; no entanto, a verdadeira capacidade destes isolados em promover o crescimento vegetal deve ser avaliada em associação com plantas para determinar a real capacidade de produção de AIA e promoção de crescimento.

Mesmo sem avaliar a verdadeira capacidade dos isolados em promover o crescimento de plantas, os isolados bacterianos considerados promissores, foram afiliados taxonomicamente a diferentes grupos, conforme mostrado na tabela 4. Lindow e Brandl (2003), utilizando métodos dependentes de cultivo, verificaram que na superfície de folhas há predomínio de *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Erwinia* e *Methylobacterium*. Através de métodos independentes de cultivo, Lambais et al. (2006) mostraram que na filosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica pode existir pelo menos 95 a 671 espécies bacterianas, mas a grande maioria das bactérias são ainda desconhecidas. Ainda na Mata Atlântica, foi estudada a diversidade de bactérias diazotróficas na filosfera de *Guapira opposita* e *Euterpe edulis*, através de pirosequenciamento, e se encontrou predominância de Proteobacteria, especificamente das classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria (BERDUGO, 2012). Já, Gómez (2012) verificou que o filo Proteobacteria e a classe Alphaproteobacteria

predominam na comunidade bacteriana de diazotróficos da filosfera de *M. neesii* na Mata Atlântica. Em recente estudo, bactérias diazotróficas associadas a *Eucalyptus urograndis* foram isoladas e 5 isolados pertenciam ao filo Actionobacteira, 9 ao filo Proteobacteria (gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* e *Methylobacterium*), 10 ao filo Firmicutes (gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Brevibacillus*) (FONSECA et al., 2018). Assim como neste estudo, os filos Proteobacteria e Firmicutes foram os mais frequentes na filosfera de *Rinorea* e *Amphirox* (Tabela 5).

Os isolados identificados neste trabalho foram afiliados aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, os quais já foram relatados como BPCP (PEDRAZA, 2008). *Bacillus* e *Lysinibacillus* já foram caracterizados como BPCP, utilizando abordagens tanto bioquímicas quanto moleculares (LYNGWI et al., 2017). *Lysinibacillus* isolada de uma planta halófito foi também caracterizada como BPCP, e era capaz de fixar N e sintetizar AIA *in vitro* (SGROY et al., 2009). O gênero *Citrobacter* também já foi documentado como BPCP, possuindo mecanismos de fixação de N, síntese de AIA, solubilização de fosfato e tolerância a estresse (HABIB et al., 2016). Da mesma forma, *Stenotrophomonas* também já foi relatada como BPCP, podendo sintetizar AIA (TAGHAVI et al., 2009).

Lysinibacillus, *Citrobacter* e *Stenotrophomonas* foram isoladas e identificadas neste trabalho como potenciais promotoras do crescimento de plantas, com base nos testes *in vitro*. Os gêneros *Bacillus* e *Stenotrophomonas* foram também frequentes nas comunidades de filosfera de diversas espécies de plantas na Austria (ORTEGA et al., 2016). Neste estudo, *Stenotrophomonas* (32AS) foi isolada da serapilheira (Tabela 4), que é composta essencialmente por folhas, sugerindo que essa bactéria pode sobreviver na superfície das folhas mesmo depois que a folha senesce e morre. *Stenotrophomonas* tem sido reportado como um grupo bacteriano com resistência a múltiplos fármacos (BETRIU et al., 2001) e parece se adaptar igualmente bem em humanos e plantas. Nas plantas, *Stenotrophomonas* pode promover o crescimento, sintetizando AIA (SUCKSTORFF; BERG, 2003).

Burkholderia é um gênero que abriga muitos fixadores de nitrogênio associados a plantas, e apresenta uma ampla distribuição ambiental e geográfica (SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001). A maioria dos isolados bacterianos obtidos do solo e rizosfera de *Araucaria angustifolia* pertenciam ao gênero *Burkholderia* (NERONI; CARDOSO, 2007). Kifle e Laing (2016) isolaram bactérias com alta atividade de redução de acetileno da rizosfera, filosfera e interior da raiz de milho, e a maioria dos isolados foram afiliados aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Neste trabalho, os isolados

afiliados a *Pseudomonas* e *Burkholderia* (Tabela 4) apresentaram baixa atividade de redução de acetileno (Tabela 5).

Poucos estudos mostrando a prospecção de BPCP associadas a plantas em florestas tropicais têm sido reportados. Cassetari (2015) isolou bactérias da filosfera e serapilheira de *M. neesii* na Mata Atlântica, e encontrou bactérias do filo Proteobacteria, pertencentes ao gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* que apresentaram *in vitro* mecanismos para promoção de crescimento de plantas. Huang et al. (2015) isolaram bactérias do gênero *Bacillus* da floresta Amazônica peruana que apresentavam características de promotores de crescimento de plantas. Outro grupo de pesquisa isolou 17 bactérias de solos de vários sistemas de uso da terra na região oeste da Amazônia, as quais foram testadas para FBN de vida-livre e síntese de AIA, e mostrou que a maioria dos isolados eram capazes de fixar N de forma assimbiótica. Esse foi também o primeiro estudo que relatou FBN de vida-livre realizada por bactérias do gênero *Rhizobium* (LONGATTI; MARRA; MOREIRA, 2013). Neste estudo, foram encontrados isolados que apresentaram potencial para promover o crescimento de plantas pertencentes também ao filo Proteobacteria, mas nenhum deles foi afiliado aos gêneros documentados por CASSETARI (2015). Já os gêneros *Bacillus* e *Rhizobium* também foram isolados neste estudo, onde o isolado (40AEx) afiliado ao gênero *Rhizobium* sintetizou AIA (Tabela 2), mas não apresentou atividade da nitrogenase *in vitro* (Tabela 5). Cepas de *Rhizobium* e *Bulkholderia*, isoladas de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia, também se mostraram capazes de sintetizar AIA (10 a 38 μg de AIA mL^{-1}), quando cultivadas em meio suplementado com L-triptofano (LONGATTI; MARRA; MOREIRA, 2013). Neste estudo, os dois isolados (79AF e 80AF) afiliados a *Burkholderia* sintetizaram em média 46,01 μg de AIA mL^{-1} .

Tem sido observado que, em meio de cultura suplementado com L-triptofano (500 μg mL^{-1}), isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus*, sintetizam de 0,20 a 22,02 μg de AIA mL^{-1} , e 0,15 a 7,03 μg de AIA mL^{-1} , respectivamente (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008). No presente estudo, em meio de cultura suplementado com L-triptofano (1000 μg mL^{-1}), os 8 isolados afiliados a *Pseudomonas* sintetizaram de 8,07 a 85,3 μg de AIA mL^{-1} (média de 33,8 μg AIA mL^{-1}). Os 3 isolados afiliados a *Bacillus* sintetizaram de 23,7 a 43,3 μg de AIA mL^{-1} , (média de 33,3 μg de AIA mL^{-1}). Os isolados deste estudo originados da floresta Amazônica produziram mais auxina *in vitro* do que os isolados testados por Ahmad; Ahmad e Khan (2008), e os isolados afiliados a *Bacillus* sintetizaram aproximadamente a mesma quantidade de AIA do que os isolados afiliados a *Pseudomonas*, o que não foi observado por Ahmad; Ahmad e Khan (2008).

Citrobacter isolada de rizosfera de arroz sintetizou 16 μg de AIA mL^{-1} *in vitro* (HABIB et al., 2016). Neste estudo, dois isolados afiliados a *Citrobacter* (76AF e 69CF) sintetizaram altas concentrações de AIA (141,17 e 73,14 μg de AIA mL^{-1} , respectivamente), se comparado aos isolados de HABIB et al. (2016). No caso de *Stenotrophomonas* isolada da rizosfera de *Coleus forskohlii*, a síntese de AIA foi de 93 μg de AIA mL^{-1} (PATEL; SARAF, 2017), enquanto que o isolado 32AS deste estudo, afiliado a *Stenotrophomonas*, sintetizou 38,99 μg de AIA mL^{-1} . NAUREN et al. (2017) observaram que *Lysinibacillus* isolada da rizosfera de milho era capaz de sintetizar elevadas concentrações de AIA (697 μg mL^{-1}) *in vitro*. Já, neste estudo o isolado 72AF, afiliado a *Lysinibacillus*, sintetizou 38,51 μg de AIA mL^{-1} , uma quantidade bem inferior àquela produzida pelo isolado do estudo de Nauren et al. (2017). Todos os gêneros bacterianos encontrados neste trabalho, já foram relatados na literatura como capazes de sintetizar AIA, e esses produziram uma quantidade apreciável de AIA, ao serem comparados com os estudos relatados acima.

O isolado 10RF, afiliado a *Pseudomonas*, apresentou maior atividade da nitrogenase *in vitro* (0,228 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1}) e sintetizou 8,06 μg mL^{-1} de AIA. O isolado 76AF afiliado a *Citrobacter*, apresentou a maior produção de AIA (141,17 μg de AIA mL^{-1}) e não apresentou atividade da nitrogenase. O isolado 11RF apresentou a segunda maior atividade no teste de FBN *in vitro* (0,097 ng N fixado μg^{-1} de proteína h^{-1}) e sintetizou 9,54 μg mL^{-1} de AIA. Os isolados 3REx e 69CF foram afiliados a *Pseudomonas* e *Citrobacter*, sintetizaram 85,39 e 73,14 μg mL^{-1} de AIA, e tiveram baixa e intermediária fixação N *in vitro*, respectivamente (Tabela 5). Com base nos testes *in vitro*, esses isolados podem ser considerados promissores para promover o crescimento de plantas, e poderiam até ser testados em consórcios para aproveitar a complementaridade de seus mecanismos de promoção de crescimento. Adesmoye; Torber e Kloepper (2010) inocularam uma mistura de BPBP (*Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus*) e mostraram que essas estirpes melhoraram o desenvolvimento de tomateiro, devido a maior absorção de N, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados. Santos et al. (2017a) inocularam uma mistura das estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em sorgo, os quais melhoraram a produtividade, aumentando a massa seca, o teor de N, o N da FBN e a eficiência de utilização do N provindo da fertilização. Além dos efeitos da FBN para cultura, já foi demonstrado que a síntese de fitormônios pode ser o principal mecanismo que BPCPs podem apresentar para melhorar o desenvolvimento vegetal (PEDRAZA, 2008). Assim, novos inoculantes usando consórcios de diferentes espécies/linhagens de BPCPs poderiam contribuir para o aumento da produtividade dos sistemas agrícolas (SANTOS et al., 2017a).

É interessante comparar os dados da afiliação taxonômica dos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira deste estudo que apresentaram potencial para promover o crescimento de plantas com outros dados obtidos por nosso grupo de pesquisa, o qual identificou potenciais BPCP na filosfera, serapilheira e rizosfera de espécies arbóreas da Floresta Amazônica a partir de reconstrução de metagenomas (dados não publicados). Amostras da filosfera, serapilheira e rizosfera de 6-14 indivíduos de nove espécies arbóreas, incluindo *Rinorea pubiflora*, *Amphirrhox longifolia* e *Chamaecrista xinguensis*, foram coletadas em período relativamente seco (julho 2015) na Floresta Nacional do Tapajós. A região V4 do gene 16S rRNA foi sequenciada usando a plataforma Illumina MiSeq. Utilizando-se *PICRUSt* (Investigação Filogenética de Comunidades por Reconstrução de Estados Não Observados), uma abordagem computacional que prediz a composição de um metagenoma a partir da informação do gene rRNA 16S, foi possível prever o número e identificar a nível de ordem, as UTOs com possíveis atributos associados com habilidade em promover crescimento de plantas (FBN e síntese de AIA) em cada micro-habitat. Das UTOs potenciais, capazes de fixar N atmosférico com base na predição de metagenoma, 3 foram afiliadas a Pseudomonadales, 912 a Burkholderiales, 768 a Enterobacteriales, 10.279 a Rhizobiales, e nenhuma a Bacillales. Ainda na filosfera, das UTOs potencialmente capazes de sintetizar AIA, 283 foram afiliadas a Pseudomonadales, 336 a Bacillales, 43 a Burkholderiales, 3.559 a Enterobacteriales e 3.013 a Rhizobiales. Na serapilheira, das UTOs potencialmente diazotróficas, 270 foram afiliadas a Burkholderiales, 36 a Enterobacteriales e 4.402 a Rhizobiales, 1 a Pseudomonadales, e nenhuma a Bacillales. Também na serapilheira, foram encontradas UTOs potencialmente capazes de sintetizar AIA, sendo que 10 foram afiliadas a Pseudomonadales, 254 a Bacillales, 8 a Burkholderiales, 80 a Enterobacteriales e 712 a Rhizobiales (dados não publicados). Através da reconstrução de metagenomas, não foi possível identificar UTOs afiliadas a Xanthomonadales, entretanto um representante dessa ordem foi isolado da serapilheira e cultivado em nosso laboratório. Outra informação importante, fornecida pelo *PICRUSt*, é que a filosfera abriga o maior número de UTOs que possivelmente fixam N e sintetizam AIA. No presente estudo, dos 21 isolados considerados promissores para uso agrícola, aproximadamente 71% também são habitantes da filosfera.

Neste estudo, o sequenciamento do gene rRNA 16S foi parcial, e seria interessante realizar o sequenciamento do gene completo para que a afiliação taxonômica dos isolados seja mais precisa. Mesmo utilizando o sequenciamento parcial do gene rRNA 16S é possível verificar que os isolados obtidos neste estudo, caracterizados quanto à FBN e síntese de AIA *in vitro*, realmente habitam os micro-habitats propostos da floresta Amazônica, já que a

maioria das ordens afiliadas aos isolados também foram detectadas através da reconstrução de metagenomas, utilizando métodos independente de cultivo para amostrar esses micro-habitats. No entanto, através desse método, as ordens Pseudomonadales e Bacillales apresentaram poucas OTUs potencialmente capazes de fixar N e sintetizar AIA na filosfera e na serapilheira. No entanto, neste estudo, as ordens Pseudomonadales e Bacillales representaram 44,4% e 22,2% dos isolados com atividade de nitrogenase e capazes de sintetizar AIA. Nossas observações indicam que os métodos dependentes de cultivo podem apresentar resultados diferentes dos métodos independentes de cultivo quanto à prospecção de micro-organismos potencialmente promotores de crescimento de plantas. Deve-se considerar que os métodos independentes de cultivos têm limitações, tais como não representar espécies de baixa abundância na amostra, extração de DNA pode não ser homogênea para todos os micro-organismos da amostra, bem como a afinidade de primers durante a PCR pode não ser adequada. A baixa frequência das ordens Pseudomonadales e Bacillales entre as OTUs obtidas com a reconstrução de metagenoma, pode ser devida as limitações descritas acima. A ordem Rhizobiales foi bem representada através da reconstrução de metagenoma, no entanto apenas um isolado deste estudo foi afiliado a essa ordem. O método dependente de cultura, utilizado neste trabalho para prospectar a comunidade bacteriana associada aos micro-habitats, apresenta limitações, pois a maior parte da diversidade pode estar contida na fração da comunidade que não pode ser isolada e cultivada (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990), e esse método pode selecionar determinados grupos microbianos em função da composição do meio e condições de cultivo. Mesmo considerando-se todas as limitações da metodologia usada, os resultados obtidos são promissores e sugerem o uso combinado de diferentes técnicas para a prospecção mais eficiente de BPCPs.

6. CONCLUSÃO

Isolados bacterianos da filosfera e serapilheira da floresta Amazônica apresentaram atividade de FBN *in vitro* e alguns apresentaram alta produção de AIA, o que indica potencial para promover o crescimento de plantas.

Dos 21 isolados considerados promissores para promover o crescimento de plantas, 15 vieram da filosfera, indicando que este micro-habitat é propício para prospecção de BPCP.

Os isolados promissores para promover o crescimento de plantas foram afiliados aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas*.

REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Increased plant uptake of nitrogen from ^{15}N -depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 46, n. 1, p. 54–58, 2010.
- AGLER M. T. et al. Microbiana Hub Taxa Link Host e Fatores Abióticos Plant Microbiome Variação. **Plos Biology**, v. 14, p. 1-3, 2016.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p. 173-181, 2008.
- ALI, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R Endophytic Phytohormones and Their Role in Plant Growth Promotion. **Functional Importance of the Plant Microbiome**, p.89-105, 2017.
- AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant Growth–Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and Screening of PGP Activities. **Current Protocols in Plant Biology**, v.2, p.190-209, 2017.
- ANDRADE, M. R. **Diversidade e biogeografia de filosfera, dermosfera e solo sob a projeção da copa de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ-USP, Piracicaba, 2007.
- ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia. Agrícola**, v.71, p. 528–539, 2014.
- ARAÚJO, E. O. et al. Effect of nitrogen fertilization associated with diazotrophic bacteria inoculation on nitrogen use efficiency and its biological fixation by corn determined using ^{15}N . **African Journal of Microbiology Research**, v.9, N. 9, p.643-650, 2015.
- BAKER, A. et al. Replace, reuse, recycle: improving the sustainable use of phosphorus by plants. **Journal of Experimental Botany**, v.66, p.3523-3540, 2015.
- BARAHONA, E. et al. Pseudomonas fluorescens F113 Mutant with Enhanced Competitive Colonization Ability and Improved Biocontrol Activity against Fungal Root Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.5412-5419, 2011.
- BASCOM-SLACK. C. A.; ARNOLD. A. E.; STROBEL. S. A. Student-directed discovery of the plant microbiome and its products. **Science**, v.338, p.485–486. 2012.
- BARDGETT, R. D.; VAN DER PUTTEN, W. H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. **Nature**, v.515, p.505-511, 2014.
- BERDUGO, S. B. **Fixação biológica de N_2 e diversidade de bactérias fixadoras de N_2 associadas às espécies *Euterpe edulis* e *Guapira opposita***. Dissertação. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ-USP, Piracicaba, 2012.
- BERDUGO, S. B. **Redes ecológicas em comunidades bacterianas da filosfera, dermosfera e rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ-USP, Piracicaba, 2016.

BERG, G. et al. The plant microbiome and its importance for plant and human health. **Frontiers in Microbiology**, v.5, 2014.

BERNHARD, A. The nitrogen cycle: processes, players, and human impact. **Nature Education Knowledge**, v.2, n. 2, p.12, 2010.

BETRIU, C. et al. Antibiotic resistance surveillance of *Stenotrophomonas maltophilia*, 1993-1999. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.152-154, 2001.

BRANDL, M. T.; LINDOW, S. E. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3256-3263, 1998.

BREIDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.365-372, 2000.

BULGADERI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Reviews of Plant Biology**, v.64, p.807-838, 2013.

CASSETARI, A. S. **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ-USP, Piracicaba, 2015.

CELADOR-LERA L. et al. Analysis of the PGPB Potential of Bacterial Endophytes Associated with Maize. In: González-Andrés F., James E. (eds) **Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction**, p.23-35, 2016.

CHAPARRO, J. M. et al. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. **Plos One**, v.8, n.2, 2013.

CHERIF-SILINI, H. et al. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. **Annals of Microbiology**, v.66, n.3, p.1087-1097, 2016.

CLEVELAND C. C. et al. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, v.13, n.2, p.623-45, 1999.

CONG, J. et al. Available nitrogen is the key factor influencing soil microbial functional gene diversity in tropical rainforest. **BMC Microbiology**, v.15, p.1-10, 2015.

DEFEZ, R. et al. The Overproduction of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Endophytes Upregulates Nitrogen Fixation in Both Bacterial Cultures and Inoculated Rice Plants. **Microbial Ecology**, v.74, p.441-452, 2017.

DE RYBEL, B. et al. Plant vascular development: from early specification to differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell biology**, v.17, 2016.

DINIZ, P. F. A. et al. Diazotrophic bacteria in soils under rubber tree. **Revista Brasileira de ciência do solo**, v.36, p.1426-1433, 2012.

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

DUBILIER, N.; MCFALL-NGAI. M.; ZHAO, L. Create a global microbiome effort. **Nature** (Comment), v.526, p.631-634, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Fixação biológica de nitrogênio**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>>. Acesso em: 18 de outubro de 2016.

ESPIRITO-SANTO, F. D. B. et al. Análise da composição florística e fitossociológica da floresta nacional do Tapajós com o apoio geográfico de imagens de satélites. **Acta Amazonica**, v.35, p.155-173, 2005.

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

FONSECA, E. S. et al. The Microbiome of *Eucalyptus* Roots under Different Management Conditions and Its Potential for Biological Nitrogen Fixation. **Microbial Ecology**, v.78, p.183-191, 2018.

FONSECA, J. P. et al. Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. **Gene**, v.642, p.389-397, 2017.

FRAGA, M. E. et al. Interaction of microorganisms, soil and flora as drivers of diversity in the Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**, v.6, n.4, 2012.

FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rica premontane rain forest. **Oecologia**, v.117, n.1, p. 9-18, 1998.

FURNKRANZ, M. et al. Nitrogen Fixation by phyllophere bacteria associated with higher plants their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. **The Isme Journal**, v.2, p.561–570, 2008.

GIBSON L. et al. Primary forests are irreplaceable for sustaining tropical biodiversity. **Nature**, v.478, p.378–381, 2011.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v.169, p.30-39, 2014.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifical**, v.2012, p.1-15, 2012.

GOMES, et al. Auxin production by endophytic bacteria isolated from Banana Trees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.60, p.1-12, 2017.

GÓMEZ, S. P. M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica de nitrogênio na Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ESALQ-USP, Piracicaba, 2012.

GOTHWAL, R. K. et al. Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. **Applied ecology and environmental research** v.6(2) p.101-109. 2008.

GOULDEN, M. L. et al. Diel and seasonal patterns of tropical forest CO₂ exchange. **Ecological Applications**, v. 14, n. 4, p.42-54, 2004.

GROBKINSKY, D. K. et al. Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20- 18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsi*. **Scientific Reports (Nature)**, v.6, p.1-11, 2016.

GYANESHWAR, P. et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

HABIB, S. H. et al. Molecular Characterization of Stress Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Growth Enhancement of Rice. **International journal of agriculture & biology**, <https://doi.org/10.1155/2016/6284547>, 2016.

HALBLEIB, C.M.; LUDDEN, P.W. Regulation of biological nitrogen fixation. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1081-1084, 2000.

HANEY, C. H. AUSUBEL, F. M. Plant microbiome blueprints. **Science**, v.349, p.788-789, 2015.

HARDY, R.W.F. et al. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluations. **Plant Physiology**, v.43, p.1185-1207, 1968.

HEDIN, L. O. et al. The nitrogen paradox in tropical forest ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p.613-635, 2009.

HICKS, W. T.; HARMON, M. E.; GRIFFITHS, R. P. Abiotic controls on nitrogen fixation and respiration in selected woody debris from the Pacific Northwest, U.S.A. **Ecoscience**, v.10, n.1, p.66-73, 2003.

HUANG, X. F. et al. *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p.674-684, 2015.

ISLAM, M. D. et al. Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Free-Living Diazotrophic Bacteria and Their Inoculation Effects on Growth and Nitrogen Uptake of Crop Plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.1213–1222, 2009.

JELIHOVSCHI, E. G.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, I. B. Scottknott: A package for performing the scott-knott clustering algorithm in r. **Trends in Applied and Computational Mathematics**, v.15, n. 1, p. 003-017, 2014.

JESUS, E. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The Isme Journal**, v.3, p.1004-1011, 2009.

KIFLE, M. H.; LAING, M. D. Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. **Frontier Plant Science**, v. 6 p.1-8, 2016.

- KIM, M. et al. Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. **Microbial Ecology**, v.63, p.674-681, 2012.
- KRAVCHENKO L. V. et al. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria . **Microbiology**, v.73, p.156–158, 2004.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, p.1870–1874, 2016.
- KUZYAKOV, Y. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. **Journal of Plant Nutrition and soil science**, v.165 p.382-396. 2002.
- LAMBAIS, M. R. et al. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. **Science**, v. 312, p.1917-1917, 2006.
- LAMBAIS, M. R.; LUCHETA, A.; CROWLEY, D. Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. **Microbial Ecology**, v. 68. p. 567-574. 2014.
- LAMMEL, D. R. et al. Land use, soil and litter chemistry drive bacterial community structures in samples of the rainforest and Cerrado (Brazilian Savannah) biomes in Southern Amazonia, v. 66, p. 32-39, 2015.
- LEGHARI, S. J. et al. Role of Nitrogen for Plant Growth and Development: A review. **Advances in Environmental Biology**, v.10, p.209-218, 2016.
- LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875 – 1883, 2003.
- LONGATTI, S. M. O.; MARA, L. M.; MOREIRA, M. S. et al. Evaluation of plant growth-promoting traits of Burkholderia and Rhizobium strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p.948-959, 2013.
- LUGTENBERG. B., KAMILOVA, F., Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review Microbiology**, v.63, p.541–556, 2009.
- LUNDBERG, D. S. et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v.488, p.86-90, 2012.
- LYNGWI, N. A. et al. Bioprospecting of Plant Growth Promoting Bacilli and Related Genera Prevalent in Soils of Pristine Sacred Groves: Biochemical and Molecular Approach. **Plos One**, v.11, p.1-13, 2016.
- MANHÃES, C. M. C. et al. Biomassa de Fauna do Solo e da Serapilheira em Diferentes Coberturas Vegetais no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n. 2, p.792-795, 2009.
- MARSCHNER, P. et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p.1437-1445, 2001.

MARATHE, R. J. et al. Effect of IAA produced by *Pseudomonas aeruginosa* 6a (bc4) on seed germination and plant growth of *Glycine max*. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.5, n.3, p.351-358, 2017.

MARCHESI, J. R. et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64. p.795-799. 1998.

MENDES, L. R. et al. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, v.70, n.1, p.255-265, 2015.

MENDES, R.; et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v.332, p. 1097-1100, 2011.

MENDIBURU, F. *Agricolae*: statistical procedures for agricultural research. **R package** version 1. URL <https://CRAN.R-project.org/package=agricola>. 2016.

MIRZA, B. S. et al. Response of Free-Living Nitrogen-Fixing Microorganisms to Land Use Change in the Amazon Rainforest. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.1, p. 281–288, 2014.

MIRZA, B. S. RODRIGUES, J. L. M. Development of a Direct Isolation Procedure for Free-Living Diazotrophs under Controlled Hypoxic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.5542-5549, 2012.

MORRIS, C. E.; KINKEL, L. L. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields. In: LINDOW, S. E.; HECHT-POINAR, E. I., *et al* (Ed.). **Phyllosphere Microbiology**. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society (APS Press), p.365-375, 2002.

MOHITO, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, v.13, p.638-649, 2013.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.

MYUNG-OH, Y. et al. Distinctive Bacterial Communities in the Rhizoplane of Four Tropical Tree Species. **Microbial Ecology**, v.64, p.1018-1027, 2012.

NAUREN, Z. et al. Exploring the Potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for Plant Growth Promotion and Biocontrol Activities against Phytopathogenic Fungi. **Frontier in Microbiology**, v.8, p.1-11, 2017.

NAVARRETE, A. A. et al. A Molecular Survey of the Diversity of Microbial Communities in Different Amazonian Agricultural Model Systems, **Diversity**, v. 2, n. 5, p.787-809, 2010.

NDAW, S. M. et al. Relationships between bacterial diversity microbial biomass, and litter quality in soils under different plant covers in northern Rio de Janeiro State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p.1089-1095, 2009.

NEPSTAD, D. C. et al. The effects of partial throughfall exclusion on canopy processes, aboveground production, and biogeochemistry of an Amazon forest. **Journal of Geophysical Research-Atmospheres**, v.107, p.18, 2002.

NETT, R. S. et al. Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. **Nature Chemical Biology**, v.13, p.69–74, 2017.

NERONI, R. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, v.64, p.303-304, 2007.

NIHORIMBERE, V. et al. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement (BASE)**, v.1, n.2, p.327-337, 2011.

NOTTINGHAM, A. T. Microbes follow Humboldt: temperature drives plant and soil microbial diversity patterns from the Amazon to the Andes. **bioRxiv - The preprint server for biology**, p.1-26, 2018.

OLANREWAJU, O. S; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.197, 2017.

OROZCO-MOSQUEDA, M. C. et al. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological research**, v.208, p.25-31, 2018.

ORTEGA R. A. et al. The plant is crucial: specific composition and function of the phyllosphere microbiome of indoor ornamentals. **FEMS Microbiology Ecology**, v.92, p.1-12. 2016.

OVREAS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3367–3373, 1997.

PANT, G.; AGRAWAR P. K. Isolation and characterization of indole acetic acid producing plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of *Withania somnifera*. **Journal of Biological & Scientific Opinion**, v.2, p.377-383, 2014.

PATEL, T.; SARAF, M. Exploration of Novel Plant Growth Promoting Bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* MTP42 Isolated from the Rhizospheric Soil of *Coleus forskohlii*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, p.944-955, 2017.

PEDRAZA, R. O. Acetic Acid Bacteria as Plant Growth Promoters. **Acetic Acid Bacteria**, p. 101-120, 2016.

PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.215, p.25-35, 2008.

RANGJAROEN, C. et al. Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. **Annals of Microbiology**, v.65, p.253-266, 2015.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REDFORD, A. J. et al. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environmental Microbiology**, v.12, p.2885–2893, 2010.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Controls Over Leaf Litter and Soil Nitrogen Fixation in Two Lowland Tropical Rain Forests. **Biotropica**, v. 39, n.5, p. 585-592, 2007.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.42 p.489–512. 2011.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. **Ecology**, v. 89, p. 2924-2934. 2008.

REIS, V. M. et al. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, Manlio Silvestre. **Nutrição Mineral de Plantas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2006.

RICO, L. et al. Community structures of N₂-fixing bacteria associated with the phyllosphere of a Holm oak forest and their response to drought. **Plant Biology**, v.6, p.583-593, 2014.

RIGONATO, J. et al. Estimating genetic structure and diversity of cyanobacterial communities in Atlantic forest phyllosphere. **Canadian Journal of Microbiology**, v.62, p. 953-960, 2016.

RODRIGUES, N. J.; MALAVOLTA, J. R.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. **Summa Phytolpathologica**, v. 2, p.16, 1986.

ROESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p.1377-1383, 2007.

ROUT, G. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Sciences**, v. 3, 2015.

ROUT, M. E. The plant microbiome. **Advance in Botanical Research**, v.69, p.279-309, 2014.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v.111, n.5, p.743-767, 2013.

SANTOS, C. L. R. et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v.113, p.86-106, 2017 (a).

SANTOS, L. S. Physiographic aspect of the Tapajós National Forest and its surroundings - West of Pará, Brazil. **Espacios**, v.38, p.26, 2017 (b).

SANTOS, P. E. L. BUSTILLOS-CRISTALES, R. CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.2790–2798, 2001.

SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v.183, p.92-99, 2016.

SCHLAEPI, K. BULGARELLI, D. The plant microbiome at work. **Molecular Plant – Microbe Interactions**. v.28. p.212–217, 2015.

SCHULDT, A. et al. Multitrophic diversity in a biodiverse forest is highly nonlinear across spatial scales. **Nature communication**, p.1-8, 2015.

SCHULTZ, N. Et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.38, p.307-414, 2014.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Source: Planta**, v.215, n.2, p. 229–238, 2002.

SGROY, V. et al. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.371-381, 2009.

SILVA, K. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n. 4, p.253-262, 2012.

SILVA, K. et al. Diversity and capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon region. **Acta Amazonica**, v.46, p.111-118, 2016.

SINGH, P. B. Screening and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): An overview. **Bulletin of Environmental and Scientific Research**, v.4, p.1-14, 2015.

SHOKRI, D.; EMTIAZI, G. Indole-3-Acetic Acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi Design. **Current Microbiology**, v.61, p.217-255, 2010.

SOLTANI, N. et al. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and Ph values. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.22, p.571-576, 2006.

SOUZA, A. A. **Resposta do milho e do tomateiro à inoculação com bactérias diazotróficas isoladas da superfície de folhas**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ-USP, Piracicaba, 2017.

SPACCINI, R. et al. Influence of the addition of organic residues on carbohydrate content and structural stability of some highland soils in Ethiopia. **Soil Use Manage**, v.18, p.404-411, 2002.

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

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

SUCKSTORFF, I.; BERG, G. Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. **Journal of applied Microbiology**, v.95, p.656-663, 2003.

SULLIVAN, B. W. et al. Spatially robust estimates of biological nitrogen (N) fixation imply substantial human alteration of the tropical N cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, p.8101-8106, 2014.

TAGHAVI, S. et al. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.748-757, 2009.

TIMMUSK, S. et al. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-10, 2017.

TORSVIK, V. GOKSOYR, J. DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.98-87, 1990.

TRIPATHI, B. M. et al. Distinctive Tropical Forest Variants Have Unique Soil Microbial Communities, But Not Always Low Microbial Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v.7 p. 1-11, 2016.

URBANOVÁ, M.; SNAJDR, J.; BALDRIAN, P. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. **Soil Biology and Biochemistry**, v.84, p.53-64, 2015.

VANDEPUTTE, O. et al. Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.1169–1177, 2005.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A. HARTMANN, M. Networking in the Plant Microbiome. **Plos Biology**, n.12, v.14, 2016.

VAN LOON, L.; BAKKER, P. A.; PIETERSE, C. M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453–483, 1998.

VASQUEZ-YANES, C. et al. Light beneath the litter in a tropical forest: Effects on seed germination. **Ecology**, v.71, p.1952-1958, 1990.

VEGA, N. W. O. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v.60, n.1, 2007.

VENKATALACHALAM, S. et al. Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere. **Plant Biology**, v.18, p.627-637, 2016.

VERMA, J. P. Functional importance of the plant microbiome: Implications for agriculture, forestry and bioenergy: A book review. **Journal of Cleaner Production**, v.178, p.877-879, 2018.

VITOUSEK, P. M. et al. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, p.1–9, 2013.

VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? **Biogeochemistry**, v.13, p.87-115, 1991.

VORHOLT, J.A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.828–840, 2012.

WANG, Q. et al. Influence of nitrogen and phosphorus additions on N₂-fixation activity, abundance, and composition of diazotrophic communities in a Chinese fir plantation. **Science on the total Environment**, v.619-620, p.1530-1537, 2017.

WONG, W. S. et al. The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers. **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**, v.12, p.105-158, 2015.

WYMORE, A. S. et al. The influence of time and plant species on the composition of the decomposing bacterial community in a stream ecosystem. **Microbial Ecology**, v.71, p.825-834, 2016.

YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.345-351. 2000.

YEOH, Y. K. et al. Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. **Nature Communications**, v.8, p.1-9, 2016.

YONEYAMA, T.; TERAKADO-TONOOKA, J.; MINAMISAWA, K.. Exploration of bacterial N₂-fixation systems in association with soil-grown sugarcane, sweet potato, and paddy rice: a review and synthesis. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.63, p.578-590, 2017.

ZAIDI, A. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. **Scientia Horticulturae**, v.193, p.231–239, 2015

ANEXOS

ANEXO A - Caracterização morfológica dos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da Floresta Amazônica (continua).

Isolado	Compartimento de origem	Espécie arbórea de origem	Parcela (coleta)	Consistência	Cor	Ph
1REx	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
2REx	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
3REx	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	Extrato	gomosa	Amarelo	Ácido
4REx	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
5REx	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
6RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Amarelo	Ácido
7RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Amarelo	Ácido
8RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Amarelo	Ácido
9RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Branco	Ácido
10RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Amarelo	Ácido
11RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Amarelo	Ácido
12RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Branco	Ácido
13RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	8	gomosa	Branco	Ácido
14RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	18	gomosa	Amarelo	Ácido
15RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	18	gomosa	Branco	Ácido
16RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	18	gomosa	Amarelo	Ácido
17RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	18	gomosa	Amarelo	Ácido
18RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	18	gomosa	Amarelo	Ácido
19RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	18	gomosa	Amarelo	Ácido
20RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	18	gomosa	Amarelo	Ácido
21AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Amarelo	Ácido
22AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Amarelo	Ácido
23AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Amarelo	Ácido
24AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
25AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
26AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
27AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
28AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
29AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
30AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	branco	Ácido
31AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
32AS	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Branco	Ácido
33AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
34AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
35AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
36AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Rosa	Ácido
37AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Laranja	Ácido
38AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
39AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
40AEx	Serapilheira	<i>Amphirrhox longifolia</i>	Extrato	gomosa	Branco	Ácido
41AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	17	gomosa	Amarelo	Ácido
42AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	17	gomosa	Branco	Ácido
43AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	13	gomosa	Laranja	Ácido
44AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	13	gomosa	Amarelo	Ácido
45CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
46CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Amarelo	Ácido
47CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
48CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
49CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Amarelo	Ácido
50CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Amarelo	Ácido
51CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
52CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Amarelo	Ácido
53CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Amarelo	Ácido
54CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido

ANEXO A - Caracterização morfológica dos isolados bacterianos da filosfera e serapilheira de espécies arbóreas da Floresta Amazônica (conclusão).

Isolado	Compartimento de origem	Espécie arbórea de origem	Parcela (coleta)	Consistência	Cor	Ph
55CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Amarelo	Ácido
56CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
57CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
58CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
59CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
60CS	Serapilheira	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2543	gomosa	Branco	Ácido
61CF	Filosfera	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2546	gomosa	Amarelo	Ácido
62CF	Filosfera	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	2546	gomosa	Amarelo	Ácido
63RS	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Branco	Ácido
64RS	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Branco	Ácido
65CF	Filosfera	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	588	gomosa	amarelo	Ácido
66CF	Filosfera	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	588	gomosa	Amarelo	Ácido
67CF	Filosfera	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	478	gomosa	Branco	Ácido
68CF	Filosfera	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	478	gomosa	Branco	Ácido
69CF	Filosfera	<i>Chamaecrista xinguensis</i>	478	gomosa	Branco	Ácido
70AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	15	gomosa	Amarelo	Ácido
71AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	21	gomosa	Branco	Ácido
72AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	21	gomosa	Amarelo	Ácido
73AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	21	gomosa	Branco	Ácido
74AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	21	gomosa	Branco	Ácido
75AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	11	gomosa	Branco	Ácido
76AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	11	gomosa	Amarelo	Ácido
77AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	11	gomosa	Branco	Ácido
78AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	11	gomosa	Amarelo	Ácido
79AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	11	gomosa	Branco	Ácido
80AF	Filosfera	<i>Amphirrhox longifolia</i>	11	gomosa	Branco	Ácido
81RS	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Branco	Ácido
82RS	Serapilheira	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Branco	Ácido
83RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Amarelo	Ácido
84RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	23	gomosa	Branco	Ácido
85RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	12	gomosa	Branco	Ácido
86RF	Filosfera	<i>Rinorea pubiflora</i>	12	gomosa	Amarelo	Ácido

ANEXO B – Meio de cultura para bactérias diazotrófica assimbiontes (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

Glicose.....	20g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeEDTA.....	4mL
NaMoO ₄ .2H ₂ O.....	0,02g
CaCO ₃	3g
Azul de Bromotimol.....	2,5g
Ágar.....	18g

*Completar com água destilada para 1L.

*Ajustar pH para 7,5

ANEXO C - Meio de cultura líquido Dyg`s (RODRIGUES, MALAVOLTA, VICTOR, 1986).

Glicose	2g
Ácido Málico.....	2g
Peptona.....	1,5g
Extrato de levedura	2g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,5g
Ácido Glutâmico.....	1,8g

*Sólido = 15g ágar;

*Completar com água destilada para 1L.

*Ajustar Ph = 7,5.

ANEXO D – Meio de cultura semi-sólido JNFb (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

Ácido málico.....	5g
K ₂ PO ₄ – (solução de 10%).....	6mL
KH ₂ PO ₄ – (solução de 10%).....	18mL
MgSO ₄ – 7H ₂ O - (solução de 10%).....	2mL
NaCl – (solução de 10%).....	1mL
CaCl ₂ – (solução de 10%).....	2mL
FeEDTA – (solução 1,64%).....	4mL
Azul de bromotimol 0,5%.....	2mL
Solução de micronutrientes.....	2ml
Vitamina para meio de cultura.....	1mL
KOH.....	4,5g

Meio sólido: 15g/L de ágar;

Meio semi-sólido: 2,350g/L de ágar.

*Completar com água destilada para 1L

*Ajustar pH para 6,8;

Solução de micronutrientes para JNFb

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0,200g
MnSO ₄ H ₂ O	0,235,g
H ₃ B ₃0,280g	
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,008g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,024g

*Completar com 200mL de H₂O destilada.

Vitamina para Meio de Cultura

Pyridoscol	20mg
Água destilada	100mL