

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DE
ISOLADOS DO SOLO E SEUS POTENCIAIS NA
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSTATO E INFLUÊNCIA NO
CRESCIMENTO DE SOJA (*Glycine max*) E MILHO (*Zea
mays*)**

Wallynson Eduardo Silva Almeida

Bacharel em Ciência e Tecnologia de Laticínios

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DE
ISOLADOS DO SOLO E SEUS POTENCIAIS NA
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSTATO E INFLUÊNCIA NO
CRESCIMENTO DE SOJA (*Glycine max*) E MILHO (*Zea
mays*)**

Wallynson Eduardo Silva Almeida

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Coorientadora: Karla Stropa Goulard

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2017

Almeida, Wallynson Eduardo Silva
A447c Caracterização parcial do gene 16S rRNA de isolados do solo e seus potenciais na solubilização de fostato e influência no crescimento de soja (*glycine max*) e milho (*zea mays*). / Wallynson Eduardo Silva Almeida. – Jaboticabal, 2017
x, 48 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza
Banca examinadora: Eduardo da Silva Martins; Natalia Vinhal Grupioni; Jackson Antônio Marcondes de Souza
Bibliografia

1. Solubilização. 2. Fosfato. 3. 16S rRNA,. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.64:633.15:633.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DE ISOLADOS DO SOLO E SEUS POTENCIAIS NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DE SOJA (*Glycine max*) E MILHO (*Zea mays*)


AUTOR: WALLYNSON EDUARDO SILVA ALMEIDA

ORIENTADOR: JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. EDUARDO DA SILVA MARTINS
Universidade do Estado de Minas Gerais / Frutal, MG


Pós-doutoranda NATALIA VINHAL GRUPIONI
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de janeiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Wallynson Eduardo Silva Almeida, Nascido em 16 de agosto de 1988 na cidade de Frutal – MG. Bacharel em ciência e Tecnologia de Laticínios (2009). Desenvolver pesquisa de iniciação científica nos anos de 2006 a 2009, com o tema, Produção e caracterização de proteases, por fungos filamentosos termofílicos. No mesmo período atuou como professor monitor das disciplinas de Bioquímica, Química orgânica, Microbiologia, Controle de qualidade e Cálculo. Atuou como analista químico na Bunge Brasil, Unidade Frutal, (2010-2011). Professor na Escola técnica de Uberaba, no Curso Técnico de Açúcar e Álcool, das disciplinas de Controle de Qualidade e Microbiologia, (2010). Professor na Universidade do Estado de Minas gerais UEMG-Frutal (2014) atuando na área de Informática. Atualmente é mestrando em Microbiologia Agropecuária, com dedicação exclusiva, na Universidade Estadual de São Paulo (Unesp - FCAV) atuando na linha de pesquisa de Genética Molecular de Microrganismos. Tem experiência na área de microbiologia geral e produção de etanol. Experiência em ensino nas áreas de Microbiologia Geral e Bioquímica geral. Desenvolve pesquisas nas áreas de Microbiologia agrária e enzimologia. Atuando principalmente nos seguintes temas: aproveitamento de subprodutos agro-industriais, produção de enzimas microbianas de interesse industrial e estudos da expressão de genes de bactérias solubilizadoras de fosfato.

“Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha.”

Confúcio

DEDICATÓRIA

Dedico a minha Mãe Hlenice, que com ombros gigantes me amparou nos momentos mais difíceis da vida.

Dedico esta dissertação aqueles que não me deixaram desistir quando acreditei que nada mais era possível. Aos que enxergaram meus sonhos, quando estavam se evaporando, e me fizeram ter força e coragem suficiente para enfrentar a escuridão.

Dedico esse trabalho aqueles que conheci que não tiveram a mesma oportunidade para chegar até aqui.

Dedico a todos os sorrisos que recebi ao longo do período de execução deste trabalho, por facilitarem cada dia e torna-los mais alegres e leves.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar ao meu lado sempre.

Aos meus pais pelo amor, apoio, preocupação, ajuda e incentivo, por estarem presentes em todos os momentos em que precisei.

Ao meu Orientador Professor Dr. Jackson Antônio Marcondes, por ter me aceito como orientado, por toda a paciência, ajuda e instrução, por ter proporcionado essa porta pela qual hoje posso vislumbrar um horizonte superior.

A Universidade Estadual Paulista-Unesp FCAV, campus de Jaboticabal, por toda sua estrutura, e por seu campus agradável.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por ter me concedido auxílio financeiro durante todo o período do mestrado.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Ao Laboratório de Genética Aplicada e ao Departamento de Biologia, por serem minha estrutura física de execução do projeto.

Ao Departamento de Tecnologia, e a Professora Dr. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, por terem me concedido prontamente o laboratório, reagentes, e a casa de vegetação necessários para execução de parte do projeto.

A todos os colegas (e foram muitos) que auxiliaram no processo de execução, seja nas etapas de bioinformática, plantio e indicação de artigos.

Aos amigos que fiz.

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
Lista de tabelas.....	IIX
Lista de figuras	IX
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Fósforo	2
2.1.1 Papéis do fósforo no metabolismo das plantas.....	4
2.2 Importância das bactérias na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas	5
2.2.1 os microrganismos e as transformações do fósforo no solo .	6
2.2.2 O gene 16S RNA.....	9
3 OBJETIVOS.....	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Origem dos isolados bacterianos	12
4.2 Cultivo Bacteriano e manutenção das culturas	13
4.3 Extração do DNA genômico.....	13
4.4 Quantificação do DNA genômico.....	14
4.5 Amplificação e Purificação do gene 16S rRNA.....	15
4.6 Reação da PCR para sequenciamento do gene 16S rRNA	16
4.7 Análise de dados	16
4.8 Curvas de crescimento em meio Ty	17
4.9 Teste de solubilização em meio NBRIP	18
4.9.1 Avaliação de solubilização em meio NBRIP sólido.....	18
4.9.2 Avaliação de solubilização em meio NBRIP líquido	19
4.10Ensaio com plantas: Avaliação da influência no crescimento de soja e milho	20

4.11	Análise de crescimento, da raiz, parte aérea, e massa seca. .	20
4.12	Análise dos dados estatísticos.....	21
5	RESULTADOS	22
5.1	Qualidade do DNA genômico	22
5.2	Qualidade da purificação do produto da PCR	22
5.3	Análise de isolados bacterianos por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	23
5.4	Filogenia bacteriana dos isolados com base no sequenciamento parcial 16S rRNA	24
5.5	Curvas de multiplicação celular em meio TY, e avaliação do pH	26
5.6	Testes de solubilização nos meios NBRIP.....	27
5.6.1	Avaliação de solubilização de fósforo em meio NBRIP sólido.....	27
5.6.2	Avaliação de comportamento em meio NBRIP líquido (solubilização, D.O. e pH)	30
5.7	Ensaio com plantas: Avaliação da influência no crescimento de soja e milho.....	33
5.7.1	Análise de crescimento de soja	33
5.7.2	Análise de crescimento do Milho	36
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÕES	42
8	REFEFÊNCIAS.....	43

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DE ISOLADOS DO SOLO E SEUS POTENCIAIS NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSTATO E INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO DE SOJA (*Glycine max*) E MILHO (*Zea mays*)

RESUMO - Os microrganismos têm participação ativa nas transformações do fósforo (P) no solo, influenciando sua disponibilidade para as plantas e seu fluxo na natureza. As transformações resultam de decomposição e mineralização de compostos orgânicos, imobilização na microbiomassa e solubilização das formas inorgânicas dos minerais. A base desse estudo consistiu em avaliar 10 isolados bacterianos, visando caracterizá-los quanto: padrão de crescimento em meio Tryptone Yeast (TY) (padrão de crescimento em meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate); solubilização de fosfato de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$); variação do pH nos diferentes meios; sequenciamento parcialmente do gene 16S rRNA, e influência do crescimento, em casa de vegetação, para as culturas da soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*). Os melhores solubilizadores em 120 h de cultivo foram os isolados LGA-11-V0522, 33,81 mg/ml, *Chromotacterium Violaceum*, LGA13-V20F, 32,65 mg/ml, *Arthrobacter echigonensis*, LGA1-V4-V20J, 32,19 mg/ml, *Arthrobacter echigonensis*, e LGA05-V0513, 30,96 mg/ml, *Bacillus Cereus*. Em casa de vegetação, os isolados que apresentaram melhores resultados foram, com maior desenvolvimento de parte aérea, LGA13-V20F, 22,67 cm, *Arthrobacter echigonensis*, LGA09-V20L, 22,0 cm, *Bacillus thuringiensis*, LGA07-V0508, 21,25 cm, *Bacillus thuringiensis*, e LGA12-V05D 19,25, *Bacillus thuringiensis*.

Palavras chave: Solubilização, Fosfato, 16S rRNA, Soja, Milho.

PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE 16S rRNA GENE OF SOIL ISOLATES AND ITS POTENTIALS IN THE SOLUBILIZATION OF PHOSPHATE AND INFLUENCE IN SOYBEAN GROWTH (*Glycine max*) AND CORN (*Zea mays*)

ABSTRACT - The microorganisms have an active participation in the transformations of the phosphorus (P) in the soil, influencing its availability to the plants and their flow in nature. The transformations result from decomposition and mineralization of organic compounds, immobilization in the microbiomass and solubilization of inorganic forms of minerals. The base of this study was to evaluate 10 bacterial isolates, aiming to characterize them as: growth pattern in Tryptone Yeast (TY) medium (growth pattern in NBRIP medium; solubilization of calcium hydroxide phosphate $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$), pH variation in the different media, partial sequencing of the 16S rRNA gene, and growth influence in the greenhouse for soybean (*Glycine max*) and maize (*Zea mays*) crops. The best solubilizers in 120 h of culture were the isolates LGA-11-V0522, 33.81 mg / ml, *Chromotacterium violaceum*, LGA13-V20F, 32.65 mg / ml, *Arthrobacter echigonensis*, LGA1-V4-V20J, 32.19 mg / ml, *Arthrobacter echigonensis*, and LGA05-V0513, 30.96 mg / ml, *Bacillus Cereus*, and LGA13-V20F, 22.67 cm. In the greenhouse, LGA09-V20L, 22.0 cm, *Bacillus thuringiensis*, LGA07-V0508, 21.25 cm, *Bacillus thuringiensis*, and LGA12-V05D 19.25, *Bacillus thuringiensis*.

Key words: Solubilization, Phosphate, 16S rRNA, Soybean, Maize.

LISTAS DE ABREVIATURAS

ATP: Adenosinatrifosfato

CREBIO: Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica.

D.O.: Densidade Óptica

Fosfato: $(\text{CaCO}_3(\text{PO}_4)_2)$;

LBMP: Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas

LGA: Laboratório de Genética Aplicada

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NBRIP: National Botanical Research Institute's Phosphate.

NCBI : National Center for Biotechnology information

P: fósforo

TY: Yeast Triptone

YMAB: Yeast Mamilol Broth

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Sequencias similares de 16S rRNA com base no banco de dados Gen Bank.	24
Tabela 02: capacidade de solubilização avaliado em meio NBRIP Sólido	28
Tabela 3 Variação de D ₀ , pH, e solubilização em meio NBRIP, observados após 120 horas de cultivo	31
Tabela 4 Resultados da influência no crescimento para cultura da soja.	34
tabela 5: Resultados da influência no crescimento para cultura do milho.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Avaliação do DNA genômico extraído dos 10 isolados e das duas estirpes padrão, através de eletroforese em gel de agarose 1%. P-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®);	22
Figura 2 Avaliação do produto de PCR purificado dos 10 isolados e das duas estirpes padrão, através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. P-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®);	23
Figura 3 Dendograma evidenciando os isolados usando o método de Neighbor-Joining, Saitou N. And Nei M., (1987). Foram realizado 1000 “bootstrap”. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Jukes-Cantor, descrito por Julkes T.H	25
Figura 4 Densidade Optica a 600 nm ao longo do período de cultivo dos isolados, experimento realizado em triplicata.	26
Figura 5 Gráfico com valores de pH ao longo do período de cultivo dos isolados. Experimento realizado em triplicata.	27

Figura 6 Capacidade de solubilização dos isolados selecionados no 15 ^o dia após a inoculação	29
Figura 7 Perfil de solubilização pelos isolados ao longo do período de cultivo dos isolados em meio NBRIP líquido. Resultados expressos referentes ao fosforo não solubilizado restante no meio. Experimento realizado em triplicata.	31
Figura 8 multiplicação de células em meio NBRIP líquido medido ao longo do período de cultivo dos isolados. Experimento realizados em triplicata.....	32
Figura 9 Determinação dos valores de pH ao longo do período de cultivo dos isolados em meio NBRIP líquido. Experimento realizados em triplicata.....	33
Figura 10 Amostras de soja inoculadas com os isolados em (A) e controle em (B) no momento da medição de comprimento.....	35
Imagem 11: Amostras de milho inoculadas com os isolados em (A) e controle em (C) no momento da medição de comprimento.....	37

1 INTRODUÇÃO

O uso de tecnologias sustentáveis de produção vem se tornando uma constante. Nesse contexto, o uso de doses adequadas de fertilizantes minerais vem se tornando uma rotina no campo, sendo com certeza, um dos fatores mais importantes para o aumento da produção e da produtividade das mais diferentes culturas nos últimos anos (WANG et al., 2015).

Dentre os vários nutrientes que as plantas precisam para a produção, o fósforo (P) ocupa um lugar de destaque, devido à sua deficiência generalizada na grande maioria dos solos no Brasil.

O fósforo (P) é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, envolvido em vias metabólicas importantes como fotossíntese, oxidação biológica, absorção de nutrientes e divisão celular (YAMADA et al., 2004). Solos de todo o mundo são complementados com P inorgânico como fertilizantes químicos com o intuito de melhorar a produção agrícola. Devido à grande demanda do nutriente, se faz importante a busca por estratégias sustentáveis. Para aliviar o prejudicial efeito deletério das práticas de agricultura intensiva que usam grandes quantidades de P. A solubilização microbiana desse fertilizante tem sido vista como uma alternativa valiosa para o sistema de agricultura sustentável (GUPTA et al., 2012). Em termos mundiais, 99% dos fertilizantes fosfatados são produzidos por meio de reservas fosfáticas. Dados sobre as reservas mundiais estimados indicam valores próximos de 71 bilhões de toneladas do fertilizante, o que seria suficiente para algo próximo de 80 e 240 anos seguindo a demanda de consumo atual (YAMADA et al., 2004).

Uma alternativa agrícola sustentável, para minimizar o uso desse fertilizante seria a aplicação de bactérias que solubilizem o fosfato, e o torne disponível para as

plantas, o que possibilitaria a diminuição da quantidade atualmente usada. Sabe-se que microrganismos solubilizadores tem a capacidade de converter P insolúvel para P solúvel, por meio de processos que liberam ácidos orgânicos, quelação e de troca iônica (GUPTA et al., 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fósforo

O fósforo (P) é componente vital para todos os seres vivos. O P é incorporado na estrutura genética fundamental (DNA e RNA) e está criticamente envolvido em produção, transferência e armazenamento de energia via ATP (adenosina trifosfato) e NADPH (Hidrogeno Niacina adenina dinucleotídeo) em todos os processos biológicos na natureza. Nas plantas, o P é necessário para fotossíntese, respiração, função celular, transferência de genes e reprodução (YAMADA et al., 2004).

A quantidade de P exigida por culturas altamente produtivas é grande. Manter a planta bem nutrida com p e um fator primordial na criação de altas produtividades. O P está fortemente ligado aos processos metabólicos da planta, e se concentra nas partes aéreas, que são regiões de crescimento mais ativas. Como consequência, a maior parte do P absorvida pela planta é transferida e armazenada no Fruto ou no grão (KAUR & REDDY, 2015).

A deficiência de P como um todo tem impactos amplos e devastadores. Um resultado da ligação entre o P e as funções celulares anteriormente observadas é que a quantidade adequada de P concede um benefício fundamental para a melhoria do estabelecimento do vigor da cultura. O crescimento e o desenvolvimento de plantas

submetidas à deficiência de P são reprimidos desde os estágios mais iniciais da plântula e, dependendo da severidade, os efeitos negativos podem continuar durante o desenvolvimento das sementes e frutos (PARK et al., 2011).

Sob condições limitantes de P, as plantas normalmente apresentam pequeno desenvolvimento de raízes e brotações e, como resultado, ocorre uma exploração ineficiente do solo, resultando em acesso limitado e baixa eficiência de uso, tanto de nutrientes como de água. Um dos melhores mecanismos de defesa contra estresses provocados por doenças e fatores climáticos é um sistema radicular forte; por isso, os efeitos negativos resultantes de doenças e estresse são reduzidos com adubação e uso adequado do P (CHEN et al.,2006).

O papel benéfico do P para a melhoria do estabelecimento e do crescimento durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura é naturalmente traduzido em culturas com amadurecimento precoce. Dependendo da cultura e da região, a maturação precoce tem muitas vantagens em termos de lucro, incluindo a menor taxa de umidade no grão, o que proporciona menores custos de secagem, e a oportunidade de entrega antecipada do produto no mercado. O processo agilizado de colheita também pode trazer benefícios como escape de estações frias, chuvosa ou seca (KAUR & REDDY, 2015;YAMADA et al., 2004).

Um enorme desafio para a maior parte do mundo é examinar criticamente os sistemas generalizados de recomendação de adubação. Tais recomendações mascaram o verdadeiro potencial das áreas e estão muitas vezes ultrapassados em relação ao potencial genético de produtividade das cultivares modernas. Os avanços nos sistemas de produção, manejo de água, densidade populacional, parcelamento das aplicações de fertilizantes, por exemplo, ajustam continuamente o balaço nutricional ótimo para obtenção de uma agricultura sustentada de alta produtividade;

as decisões quanto aos insumos são tomadas despreocupadamente, e uma pesquisa forte é necessária para dar suporte aos enormes benefícios advindos do melhoramento de todas as formas de manejo, principalmente o manejo relacionado ao nutriente P (KAUR & REDDY, 2015).

A cultura da soja consome cerca de 7kg de P_2O_5 (Peroxido de difósforo) para produzir 1 tonelada de grãos (YAMADA et. Al., 2004). Segundo Embrapa, (2016), a produção mundial 2014/2015 foi de cerca de 317 milhões de toneladas, o que indica um consumo de mais de 2 milhões de toneladas de P. Na cultura do milho, para se obter a melhor produtividade, é indicado o uso de cerca de 80 kg de P_2O_5 para produção de 6 toneladas de grãos. Segundo a Embrapa (2016), a produção mundial de milho foi próxima de 967,867 milhões de toneladas no período 2014/2015, o que remete ao gasto para a safra 2014/2015 de mais de 72 milhões de toneladas de P_2O_5 .

2.1.1 Papéis do fósforo no metabolismo das plantas

O papel do fósforo pode ser dividido em: transferência de energia na célula, desdobramento de carboidratos, síntese de carboidratos, utilização de energia de ligação do fosfato.

Sobre o armazenamento de energia Yamada et al. (2004), diz que o tipo de ligação fosfatada dos compostos orgânicos na célula tem diferentes funções, o nível energético de cada ligação influencia na energia livre. A ligação fosfatada com alta energia é um meio para armazenar e usar grandes quantidades de energia. Fosfato inorgânico é necessário para o funcionamento da célula, pode estar presente nos vacúolos como forma de reserva, e está presente nos cloroplastos. Os ésteres de

fósforo, na forma de açúcar fosforilado, estão presentes na forma de triose, pentoses, hexoses, heptoses, fosfatos, e inosol, que é a reserva de fósforo das sementes.

Os ésteres de fósforo na forma de nucleotídeos, mono, di e trifosfatos de adenosina (AMP, ADP, ATP) estão ligados ao armazenamento e fornecimento de energia, respiração e da fotossíntese, biossínteses, aos nucleotídeos de piridina, coenzimas da respiração e da fotossíntese e da transferência de elétrons, flavoproteínas, oxidação de timinas, respiração, e conversões de carboidratos. Os fosfolipídios, Glicerol, ácidos graxos, ácido fosfórico, fosfatidil, colina, fosfatidil etanol amina, fosfatidil glicerol, e fosfatidil serina, estão presentes em várias partes da célula e estão ligados ao caráter lipídico da membrana. A molécula de DNA, estando ligado ao armazenamento e transferência de informações genéticas. E por fim o RNA, que é responsável pela tradução da informação genética via RNA mensageiro (YAMADA et al. 2004).

2.2 Importância das bactérias na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas

A principal fonte de P para os seres vivos são as rochas fosfáticas. Em termos globais estima-se que mais de 75% do P aplicado no solo é perdido ou fica retido nas partículas do solo, o que ocasiona o acúmulo deste elemento nos solos cultivados. Estima-se que a quantidade de P acumulada nos solos agrícolas é suficiente para sustentar a produção agrícola mundial por 100 anos (YAMADA et al., 2004).

O P, como os demais nutrientes, sofre transformações diversas cujo conjunto compõe seu ciclo na natureza. O ciclo do P é um sistema complexo, controlado por reações estritamente químicas ou medidas pelos organismos do solo e pelas plantas.

Isso, em conjunto, resulta em processos como imobilização e mineralização do P-orgânico, imobilização química e biológica (retenção no solo e absorção pelos organismos). Esses processos garantem os fluxos e a ciclagem do P nos ecossistemas e no planeta (MOREIRA, 2006).

O ciclo de P tem sofrido forte interferência antrópica. Para atender a demanda de fertilizantes de P para outras finalidades, a atividade mineradora e o intemperismo do solo tem causado aumento do fluxo global do P em 400 vezes. (YAMADA et al., 2004). Isso traz sérias consequências ambientais aos mananciais hídricos, causando a eutrofização das águas. Assim existe a necessidade de racionalizar a adubação fosfática de modo a atingir a máxima eficiência agrônômica com o mínimo de impacto ambiental. Para isso tem-se que conhecer melhor as formas e as transformações do P no ecossistema, o que, necessariamente, passa pela microbiologia do solo.

2.2.1 Os microrganismos e as transformações do fósforo no solo

Os microrganismos têm participação ativa nas transformações do P no solo, influenciando sua disponibilidade para as plantas e seu fluxo. As transformações resultam de decomposição-mineralização de compostos orgânicos, imobilização na microbiomassa e solubilização de formas inorgânicas. Além disso os microrganismos influenciam na absorção e no uso do P do solo (MALAVOTA, 2006).

O P do solo, tem sua origem no mineral acessório chamado genericamente apatita. O elemento encontra-se normalmente no solo em seu estado oxidado (PO_4^{3-}) (MALAVOTA, 2006). Grandes quantidades de P-orgânico podem ser encontradas no solo, estando em forma lábil, passiva ou resistente à decomposição e a mineralização do solo. Para aqueles encontrados como macromoléculas há

necessidade de degradação em moléculas menores, suficiente para serem absorvidas e metabolizadas. As principais reações de mineralização do P-orgânico no solo ocorrem principalmente pela ação das fosfatases, que fazem a hidrólise de ésteres fosfatados (YAMADA et al., 2004).

A grande maioria dos heterotróficos do solo tem ação mineralizadora, sendo mais comuns os produtores de fitases. Os microrganismos são a principal fonte de enzimas mineralizadoras de fosfatos, a síntese de atividades das fosfatases microbianas são reguladas pelo ambiente, essas atividades podem ser induzidas ou reprimidas de acordo com as quantidades do nutriente. A falta de P interfere na expressão de cerca de 400 proteínas em bactérias, por meio de dois sistemas reguladores, (genes PhoB e PhoR). O gene PhoR (*Phosphate regulon sensor protein*) atua como sensor que regula a atividade do gene PhoB (*Phosphate regulon transcriptional regulatory protein*), que controla os genes envolvidos na aquisição de P. A deficiência de P atua no PHO-box (regulon multigenico), que controla por exemplo a fosfatase alcalina. Isso permite que as bactérias absorvam P mesmo em condições de baixa disponibilidade, acumulando-o em sua massa. Ao final do ciclo celular, o P acumulado será mineralizado e disponibilizado pelas plantas e outros microrganismos. Este processo é conhecido como mineração biológica do P (YAMADA et al., 2004, MOREIRA, 2006).

Os microrganismos do solo também são capazes de mobilizar formas insolúveis de fosfatos inorgânicos. A produção de ácidos orgânicos é um dos principais mecanismos usados pelos microrganismos para essa finalidade, porém não é o único. (MOREIRA, 2006)

Segundo Yamada et al. (2004), a formação de CO₂, ácidos orgânicos, compostos quelantes ou complexantes exerce ação solubilizadora direta sobre os

fosfatos inorgânicos, uma vez que o CO_2 se transforma em H_2CO_3 (ácido carbônico) que solubiliza fosfatos de cálcio e magnésio. A redução enzimática de elementos metálicos como Fe^{3+} em Fe^{2+} , que ao ser removido da molécula libera P de fosfatos de ferro. Produção de H_2S , ácido sulfúrico, em condições redutoras favorece a solubilização de fosfatos de ferro, comum em solos inundados. E a produção de quimioautotróficos de ácidos inorgânicos com ação solubilizadora, como ácido sulfúrico e nítrico, agem dissolvendo várias formas de P no solo. Além da solubilização, os microrganismos podem reduzir a retenção do fosfato solúvel aplicado ao solo por meio de imobilização da biomassa.

Como consequência dos avanços sobre o entendimento da solubilização, surgiram inoculantes bacterianos contendo solubilizadores de fosfatos chamados fosfobacterinas, cuja aplicação tornou-se popular em alguns países, como Índia e Rússia, mas com resultados duvidosos sobre sua eficácia como insumo agrícola biológico. Esses microrganismos estão distribuídos por todos os gêneros de microrganismos do solo, destacando-se os gêneros de bactérias *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium*. Grande parte dos trabalhos indica que o principal mecanismo de solubilização ocorre graças a liberação de ácidos orgânicos (NAHAS, 1999).

A capacidade dos microrganismos de utilizar fosfatos inorgânicos resulta de mecanismos complexos controlados direta ou indiretamente por genes específicos (multigenes). Genes com ações indiretas tem sido estudados para expressão de dinitrato sintase e GDH-glicose desidrogenase (YAMADA et al., 2004).

Conhecer a população nativa dos solos, é uma estratégia que otimiza o conhecimento sobre o manejo e desenvolvimento de inoculantes microbianos específicos. É importante conhecer a abundância, diversidade e competência das

populações presentes nos diferentes solos, pois o processo de atuação de cada um varia nas diferentes condições ambientais, e do tipo de cultivo de plantas.

Embora o conhecimento sobre a influência dos microrganismos no crescimento das plantas seja, em grande parte, fundamentado em resultados de estudos básicos realizados em condições controladas, é evidente que os microrganismos exercem grande influência nas transformações no solo, na disposição e na aquisição do P pelas plantas (MOREIRA, 2006)

Apesar das fortes evidências da ação facilitadora dos microrganismos para a nutrição fosfatada e das proposições de sua aplicação, o emprego destes facilitadores em larga escala ainda é muito problemático. O melhor entendimento dos processos de mobilização do P pode trazer avanços reais, permitindo a manutenção da produtividade das culturas, enquanto há redução da necessidade de aplicação de P, o que prolongaria a vida útil desse recurso natural em vias de exaustão.

2.2.2 O gene 16S RNA

A maioria das novas tecnologias que estão sendo utilizadas no estudo da ecologia microbiana é baseada na filogenia molecular do RNA ribossomal (rRNA), particularmente o rRNA da menor subunidade (SSU ou 16S), uma aproximação para estudar a evolução microbiana.

O operon do DNA ribossomal, em bactérias, compreende três genes conservados funcionalmente e evolutivamente, sendo o gene da sub unidade menor 16S (rRNA), seguido por um espaço, o gene da subunidade maior, 23S (rRNA), com um segundo espaço. Estes espaços entre os genes são as regiões espaçadoras (ITS-Espaço Transcrito Intergênico), nas quais, também podem estar presentes os genes

tRNA (Innui et al., 2012), (MENNA et al., 2005), (RIBEIRO et al., 2009) (SCARITTO, 2009).

Os RNAs ribossômicos apresentam sua classificação baseada em seu coeficiente de sedimentação quando sob centrifugação, que deriva tanto do tamanho, como da densidade da molécula, em unidades denominadas como Svedberg (“S”). Existem três tipos de rRNAs nos procariotos: (120 nucleotídeos), 16S (1542 nucleotídeos) e 23S (2904 nucleotídeos) (GORAB, 2001).

De acordo com Innui, 2009, a sequência do gene 16S rRNA a mais utilizada como marcador filogenético para a ecologia microbiana. A alta conservação presente na sequência do gene 16S rRNA possibilita uma estimativa da distância filogenética. Os amplicons obtidos através da região 16S rDNA são sequenciados e analisados usando um banco de dados onde estão depositadas sequências do gene 16S rRNA por meio de softwares apropriados, permitindo rápida identificação de bactérias com base na sequências ribossomais. Entretanto, a sequência 16rRNA apresenta nível de resolução taxonômico, viável para a classificação das bactérias quanto ao gênero, mas insuficiente para classificá-las quanto às subespécies.

O operon do DNA ribossomal, em bactérias, compreende três genes conservados funcionalmente e evolutivamente, sendo o gene da sub unidade menor 16S (rRNA), seguido por um espaço, o gene da subunidade maior, 23S (rRNA), com um segundo espaço (SCAQUITO, 2009).

Através dos genes 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA e Espaço Transcrito Interno (ITS), tornou-se possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas e o entendimento, da ecologia microbiana em especial novas linhagens (SCAQUITO, 2009).

Baseado no genoma referência de *Escherichia coli*, sabe-se que o 16S rRNA possui aproximadamente 1.500 pares de bases (pb), variando de micro-organismo para micro-organismo. Além disso, como característica peculiar, este gene apresenta nove regiões conservadas, importantes para o desenho de oligonucleotídeos universais e nove regiões hiper-variáveis, que são utilizadas como cronômetro molecular e estimativa de distâncias filogenéticas no estudo de diversas populações microbianas (WEISBURG et al., 1991; NEEFS, 1993; WANG, 2009).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar 10 isolados bacterianos da comunidade microbiana de solos fertirrigados com vinhaça, pertencentes ao laboratório de Genética aplicada, (LGA) da FCAV-UNESP Jaboticabal.

Caracterizar 10 isolados bacterianos quanto ao: padrão de crescimento em meio TY (“Yeast Triptona”), padrão de crescimento em meio NBRIP (*National Botanical Research Institute’s Phosphate*), solubilização de fosfato de Araxá ($\text{CaCO}_3(\text{PO}_4)_2$); pH.

Realizar o sequenciamento parcial e classificação filogenética por meio do gene ribossomal 16S (16S rRNA).

Avaliar a influência no crescimento em casa de vegetação, para as culturas da soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados dez isolados bacterianos (LGA05-V0513, LGA06-V0517, LGA07-V0508, LGA08-V20C, LGA09-V20L, LGA10-V20I, LGA11-V0522, LGA12-V05D, LGA13-V20F, LGA14-V20J) provenientes do banco de cepas do Laboratório de Genética Aplicada (LGA), pertencente ao Departamento de Biologia, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) pertencente ao Departamento de Tecnologia da UNESP/FCAV. Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor do kit ou reagentes, foram baseados em Sambrook e Russel (2009). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, adequando-se aos padrões de biossegurança (NB-1).

4.1 Origem dos isolados bacterianos

As estirpes utilizadas foram isoladas a partir de amostras coletadas de dois solos distintos, identificados como Canal Mestre da Vinhaça e Solo de Plantio de cana-de-açúcar e solos fertirrigados com vinhaça. A coleta das amostras de solo foi realizada conforme descrito por Omori (2011). Oriundas da área de plantio de cana-de-açúcar da Fazenda Itaquerê de propriedade da Usina Santa Fé S.A. Esta área está localizada no município de Nova Europa, estado de São Paulo. A coleta foi realizada em fevereiro de 2011. A análise das características físicas e químicas do solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo e Planta do Departamento de Solos e Adubos, localizado na FCAV/UNESP. O isolamento em cultura pura e manutenção

em meio de cultivo dos isolados utilizado neste trabalho foram descritos por Omori (2011).

4.2 Cultivo Bacteriano e manutenção das culturas

Os dez isolados tiveram suas D.O.s (Densidade Óptica) de cultivo padronizadas em aproximadamente 0,800 no comprimento de onda de 600 nanômetros, após crescimento em meio PEG (*Polietileno glicol*) (conteúdo para 1 Litro (L): 0,6 gramas (g) de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4$, 0,1 g de NaCl, 1,0 g de extrato de evedura e 10,0 gramas de glicose; pH 6,9) e TY (conteúdo para 1 L: 5,0 g de Triptona, 3,0 g de extrato de levedura e 0,87 g de NaCl; pH 7,2), entre 17- 48 horas (h). Os estoques das células crescidas nesta D.O. foram identificados e armazenados quando cada uma das bactérias atingiu a D.O. aproximada de 0,800, no comprimento de onda de 600 nanômetros. Assim 800 μ L (microlitros) da suspensão foram transferidas para 10 microcubos contendo 200 μ L de glicerol estéril. A seguir, os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e em seguida, foram estocados em freezer a temperatura de -80 °C.

4.3 Extração do DNA genômico

Os microrganismos foram cultivados em meio líquido YMAB (*Yeast Manitol Broth*), sendo inoculados a partir do estoque em 50 ml de meio a temperatura de 28°C a 160 rpm , por 48 h.

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com Marmur (1961). Cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 12.000xg por 30 min, a 4°C. O sedimento foi

lavado com solução salina (NaCl 0,85%) e coletado após centrifugação de 15.600xg por 5 min. Para lise bacteriana, o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de solução salina/1mM EDTA e pré-incubado a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, colocou-se 500 µL de lisozima (5mg mL⁻¹) preparada em tampão Tris 24 mM/EDTA 10 mM/Dextrose 50 mM, e 15µL de RNase (10mg mL⁻¹), incubando-se 56°C, por 30 min.

Após este tempo de incubação, foram adicionados 500 µL de perclorato de sódio 5M, gota a gota, sob suave agitação, e 2 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram deixadas por 1 hora, a 8°C (banho de gelo), sob agitação orbital a 220 rpm. Foi efetuada uma centrifugação de 12.000xg por 20 min, a 4°C. A fase superior aquosa foi recolhida e misturada com 2mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo mantida por 20 min, a 8 °C, sob agitação de 220 rpm. Foi feita mais uma centrifugação e, posteriormente, foi coletada a fase superior. Para a precipitação do DNA genômico, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto (-20°C) com incubação a -20°C, por cerca de 16 horas. O material foi centrifugado a 5.860 x g por 20 min, a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% (-20°C) e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em tampão TE 10:1(Tris-HCl-10 mM; EDTA-1 mM; pH 8,0) em espectrofotômetro em 260 nm. A qualidade do DNA foi verificada através de análise eletroforética em gel de agarose 1%.

4.4 Quantificação do DNA genômico

O processo de quantificação foi realizado utilizando o método de Sambrook et al. (1989), com diluição de 10X do DNA em água milliQ. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro Beckmann-Du 640B, utilizando o comprimento de

onda 280 nm para a determinação de possíveis contaminações do mesmo com proteína e/ou fenol. Otimizou-se o DNA quando a leitura da absorbância da relação 260/280 nm apresentou-se na faixa entre 1,7 e 2,0. Para os cálculos da concentração do DNA, considerou-se o padrão de uma unidade de absorbância a 260 nm, como equivalente a 50 µg de DNA por mL de solução.

A avaliação da qualidade do DNA genômico foi realizada por meio da comparação visual com a intensidade das bandas do 1Kb ladder (Fermentas®), Thermofisher scientific gene Ruler. por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

4.5 Amplificação e Purificação do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi amplificado por reação da cadeia da polimerase (PCR) usando os oligonucleotídeos iniciadores universais FD1 e RD1 de acordo com MENA et al. (2006). As reações de PCR continham 10 mM de dNTPs, 5 pmol de cada iniciador, MgCl₂ 2 mM, tampão de PCR [1X], 1,25 U de polimerase de DNA de Taq (Fermentas®) e 20 ng de DNA genômico. As reações foram realizados em Gene Amp PCR System 9700 termociclador (Biosystems®), usando um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, pareamento a 56°C durante 40 min, extensão a 72 °C, por 7 min e redução a 4 °C.

O amplicon de cada isolado foi purificado usando Kit® GENE CLEAN (Bio 101). A avaliação da qualidade do DNA genômico foi realizada por comparação visual com a intensidade das bandas do 1Kb ladder (Fermentas®), por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

4.6 Reação da PCR para sequenciamento do gene 16S rRNA

As reações de sequenciamento foram realizadas no CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica), seguindo o protocolo desenvolvido por Mena et al. (2006) usando apenas o iniciador universal FD1. As reações foram realizadas em microplacas, utilizando o primer de forma independente com 20 ng de DNA, 1,0 µL de dye (DYEnamic ET, Amersham Biosciences), Tampão 2,5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂), 1,0 µL dos primer fd1 (5 pmoles). Após a reação, as amostras foram preparadas para o sequenciamento do produto de PCR em microplaca. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 min em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g por 45 min, a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e a placa foi deixada por 5 min em temperatura ambiente, invertida em papel absorvente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70%, e a microplaca foi centrifugada a 3.220 x g por 10 min, a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado novamente o sobrenadante, e a placa foi invertida novamente sobre papel absorvente para uma breve centrifugação da placa (spin). As amostras foram secas em fluxo laminar por 30 min.

O processo tornou possível sequenciar cerca de 1300 pares de bases (pb). As amostras foram analisadas no sequenciador ABI 3700 XL (Biosystems® Aplicada).

4.7 Análise de dados

A caracterização foi realizada com base em sequências de 16S rRNA obtidas de cada estirpe, sendo analisada e montada usando o pacote *Phred/Phrap/Consed* (GORDON, 2004).

Posteriormente, foi realizada a comparação por similaridade com sequências disponíveis no *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology information*) usando a ferramenta BLAST N, com o objetivo de verificar se as informações obtidas similaridade com dados disponíveis no banco. Assim foi realizada a construção de uma árvore filogenética. A seleção das sequências de comparação foi realizada tendo como parâmetro a escolha de sequências que apresentassem as maiores similaridades ($\geq 92\%$ no BLASTn).

Para o alinhamento sequencial foi usado o programa *Bioedit Sequence alignment* v.7.1.9, disponível para *download* em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. A partir das sequências alinhadas, uma árvore filogenética foi gerada pela método de distância Neighbor-joining, método Jukes-Cantor, com 1.000 repetições de bootstrap, utilizando software MEGA 7.0 disponível para download em: <http://www.megasoftware.net/> (TAMURA et al., 2011).

4.8 Curvas de crescimento em meio Ty (Yeast Triptone)

Com o intuito de avaliar o desenvolvimento dos microrganismos em um meio de cultura rico em nutrientes, utilizou-se o meio TY (Yeast Triptone), para crescimento das culturas onde foi avaliado o pH e densidade óptica ($D.O_{800}$) durante 6 dias de cultivo. Foram inoculados 100 μ L, do estoque congelado, dos isolados em 50 ml de meio TY (conteúdo para 1 Litro (L): 5 gramas (g) de triptona, 3 g de extrato de levedura, 0,67 g de $CaCl_2 \cdot H_2O$) e cultivado por 24 h, 180 rpm, 28°C. Após esse período de

reabilitação das culturas, outros 5 frascos estéreis contendo 50 ml de meio TY, foram inoculados a partir do primeiro, até atingirem a D.O. de 0,1, padronizando assim todas as culturas. A cada 2 h a D.O foi verificada, por 4 vezes. Após isso foi realizada a leitura de D.O e pH a cada 24h possibilitando a construção da curva de crescimento de cada isolado, e verificação da mudança do pH.

4.9 Teste de solubilização em meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate)

As análises de solubilização de P foram realizadas segundo Inui et al. (2012), utilizando apenas uma fonte de fósforo, Araxá/MG (24% P).

4.9.1 Avaliação de solubilização em meio NBRIP sólido

A avaliação de solubilização em NBRIP, tendo como fonte de P, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, em meio sólido foi realizada por meio da visualização de um halo claro em torno das colônias, até o décimo quinto dia após a inoculação. As bactérias utilizadas foram cultivadas em meio TY como pré-inóculo. Posteriormente os meios NBRIP com fosfato de cálcio (NAUTIYAL, 1999), foram inoculados 100 μL no centro de cada placa. O meio foi preparado contendo para 1 litro (L) do meio sólido: 10 gramas (g) de glicose, 5 g de extrato de MgCl_2 , 0,25 g de MgSO_4 , 0,20 g de KI, 0,10 g de (NH_4) , 10 ml de solução de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, 5 g de Ágar, e o pH foi ajustado pra 7 com o uso de HCl. O experimento foi realizado em triplicada para cada isolado, tendo três placas controle inoculadas com água destilada estéril.

No décimo quinto dia a eficiência de solubilização (E) foi calculada pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro das colônias (BERRAQUEIRO et al., 1976). O processo de solubilização pode ser classificado em baixa solubilização ($E < 2$), solubilização média ($2 < E < 3$) e alta solubilização ($E > 3$) de acordo COM (SILVA FILHO & VIDOR 2000).

4.9.2 Avaliação de solubilização em meio NBRIP líquido

Foram inoculados 100 μ L (D.O. 0,8) de suspensão bacteriana em 50 ml de meio TY estéril. Após 17-24 h de crescimento aproximadamente 5 ml de suspensão foi transferidas para 50 ml de meio NBRIP estéril. O meio foi preparado contendo para 1 litro (L) do meio sólido: 10 gramas (g) de glicose, 5 g de extrato de $MgCl_2$, 0,25 g de $MgSO_4$, 0,20 g de KI, 0,10 g de (NH_4) , 10 ml de solução de $Ca_5(OH)(PO_4)_3$, pH 7, no qual foi realizado a inoculação das cultura com o intuito de se obter o pré-inóculo, por aproximadamente 24 h. Transcorrido às 24 h, inoculou-se aproximadamente a D.O.₈₀₀ de 0,1 em 5 frascos contendo 50 ml de meio NBRIP estéril para cada uma das dez estirpes de bactérias a serem testadas. A primeira D.O.₈₀₀ foi verificada a cada 2 h por 4 vezes e o restante foi aferido após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h e 120 h de inóculo. O branco neste caso foi o meio NBRIP estéril e as leituras foram realizadas em triplicata.

Para quantificar a presença de fosfato solúvel (PS) e insolúvel (Pi) no meio, após 15 min de precipitação de particulados insolúveis a temperatura ambiente, foi realizada uma centrifugação a baixa rotação de 420 x g, 2 min a 25°C. O sobrenadante foi coletado em triplicata e reservado para posterior análise, pelo método de molibdato-vanadato (Malavolta et al., 1989). A análise estatística gráfica foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, disponível em: <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>

e para delineamento estatístico final utilizou-se o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

4.10 Ensaio com plantas: Avaliação da influência no crescimento de soja e milho

As sementes da Soja (*Glycine max*) cultivar M 6210, e milho (*Zea mays*) cultivar AS1633 Agroest, foram fornecidas pela Coopercitrus, Cooperativa de Produtores Rurais de Bebedouro.

O plantio foi realizado em tubetes, de 290 cm³, contendo como substrato vermiculita autoclavada a 120 °C por 1h.

O delineamento experimental foi traçado tendo 7 repetições para cada isolado a ser testado e 7 plantas controle sem inoculação, sendo avaliados os 10 isolados em estudo. Antes da semeadura as sementes foram previamente desinfestadas por imersão em etanol 70% e em hipoclorito de sódio 4%, seguido de três lavagens em água destilada estéril (VICENT, 1970). Em cada tubete foi colocado três sementes.

O desbaste foi realizado após as sementes germinarem, deixando apenas uma planta por tubete. Nessa fase, foi inoculado uma suspensão de meio YMA contendo 10⁹ UFC/ml, em cada base de planta. A contagem de células foi realizada utilizando o método de diluição seriada.

A irrigação foi realizada diariamente com 25 ml de água por tubete. No 1^o, 7^o e 15^o dias, todas as plantas receberam 10 ml de solução nutritiva de Gibson (1987), estéril. Após 35 dias da semeadura foi realizada a coleta das amostras.

4.11 Análise de crescimento, da raiz, parte aérea, e massa seca.

Após a coleta, lavagem e secagem das plantas foram realizadas as medições, através de fita métrica, da raiz e parte aérea de cada planta de todos os tratamentos. Posteriormente, foi realizada a pesagem em balança analítica. Após a pesagem as plantas seguiram para estufa em sacos de papel, onde permaneceram a 60°C por 72 h. E, por fim, foi realizada a pesagem final, para posterior cálculo da matéria seca das plantas.

4.12 Análise dos dados estatísticos

Para a análise das variáveis (relacioná-las) foi utilizado o delineamento de parcelas subdivididas, testando o fator isolado (10 níveis) nas parcelas e o fator tempo (1 níveis) nas subparcelas, com 03 repetições por isolado. O quadrado médio de repetição dentro de isolado foi usado como resíduo para testar o efeito de isolado. Havendo diferenças significativas das médias entre isolados, entre tempos e das interações isolado/tempo, estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os dados de raiz, parte aérea e massa seca, tanto para soja como milho foram submetidos à análise de variância para um delineamento inteiramente ao acaso, com 10 isolados e 7 repetições por isolado, e nível de significância de 5%. Nas comparações múltiplas das médias dos isolados, utilizou-se o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Para ambas as análises foi utilizado o procedimento *General Linear Models* (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Qualidade do DNA genômico

A qualidade do DNA genômico extraído foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Foi utilizado o padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®) como padrão de tamanho molecular. O aparecimento de uma única banda de alto peso molecular indica que o processo de extração do DNA foi bem-sucedido, (Figura 1).

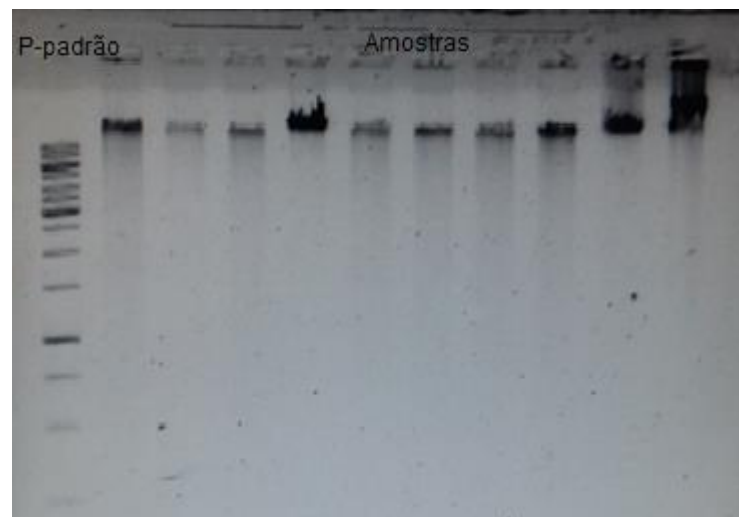


Figura 1. Avaliação do DNA genômico extraído dos 10 isolados, através de eletroforese em gel de agarose 1%. P-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®).

5.2 Qualidade da purificação do produto da PCR

A qualidade do produto da amplificação da PCR enviado para sequenciamento, foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®) como padrão de tamanho molecular. O aparecimento

de uma única banda íntegra de alto peso molecular indica que o processo de extração do DNA foi bem-sucedido (Figura 2).

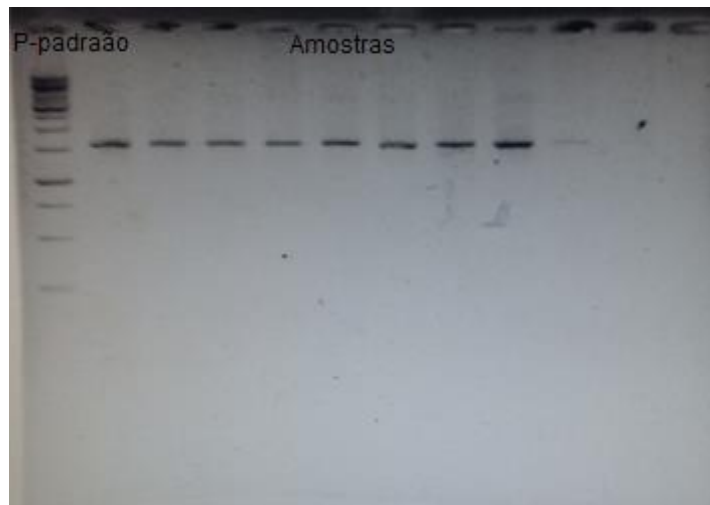


Figura 2. Avaliação do produto de PCR purificado dos 10 isolados e padrão, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. P-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®);

5.3 Análise de isolados bacterianos por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Pela análise das sequências 16S rRNA dos isolados comparadas com as sequências bacterianas do GenBank (Tabela 1), observa-se que os isolados LGA05-V0513, LGA06-V0517, LGA07-V0508, LGA09-V20L, LGA10-V20I e LGA12-V05D, tiveram níveis de similaridade entre 96 e 99% com o gênero *Bacillus*. Os resultados de comparação obtidos pelo isolado LGA08-V20C mostraram semelhança de 99% com o gênero *Acinetobacter*. O isolado LGA11-V0522 apresentou 98% de similaridade com o gênero *Chromobacterium*. E os isolados LGA13-V20F e LGA14-V20J tiveram 93 e 92% de similaridade com o gênero *Arthrobacter* (Tabela 1).

Tabela 1 Sequências similares de 16S rRNA com base no banco de dados Gen Bank.

Isolados	Número de acesso Gen Bank	pB**	Gen Bank Bast	% ident*
LGA05-V0513	KT583479.1	1380	<i>Bacillus cereus</i>	97
LAG06-V0517	KX101236.1	1389	<i>Bacillus cereus</i>	96
LGA07-V0508	KX101236.1	1342	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
LGA08-V20C	KU867576.1	1626	<i>Acinetobacter sp</i>	95
LGA09-V20L	KX101236.1	1332	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96
LGA10-V20I	AB677944.1	1371	<i>Bacillus thuringiensis</i>	97
LGA11-V0522	KJ634484.1	1358	<i>Chromobacterium violaceum</i>	98
LGA12-V05D	KX101236.1	1347	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96
LGA13-V20F	GU326383.1	1356	<i>Arthrobacter echigonensis</i>	93
LGA14-V20J	GU326383.1	1365	<i>Arthrobacter echigonensis</i>	92

*Porcentagem de Identidade; **Número de pares de bases sequenciadas.

5.4 Filogenia bacteriana dos isolados com base no sequenciamento parcial 16S rRNA

A análise filogenética com base em sequências de 16S rRNA permitiu um agrupamento mais coerente entre todos os gêneros, distribuídos na árvore filogenética (Figura 3). O ramo A agrupa a maioria dos isolados, mostrando alta similaridade entre os isolados LGA05-V0513, LGA06-V0517, LGA07-V0508, LGA09-V20L, LGA10-V20I e LGA12-V05D e o gênero *Bacillus thuringiensis*. O isolado LGA08-V20C teve grande similaridade com o gênero *Acinetobacter* sendo definido no ramo B. No ramo C pertencente ao gênero *Chromobacterium*, encontra-se o isolado LGA11-V0522. Em

um ramo abaixo, D na figura, encontram-se os isolados LGA13-V20F e LGA14-V20J, sendo comparados aos gêneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium* e *Sinomonas*.

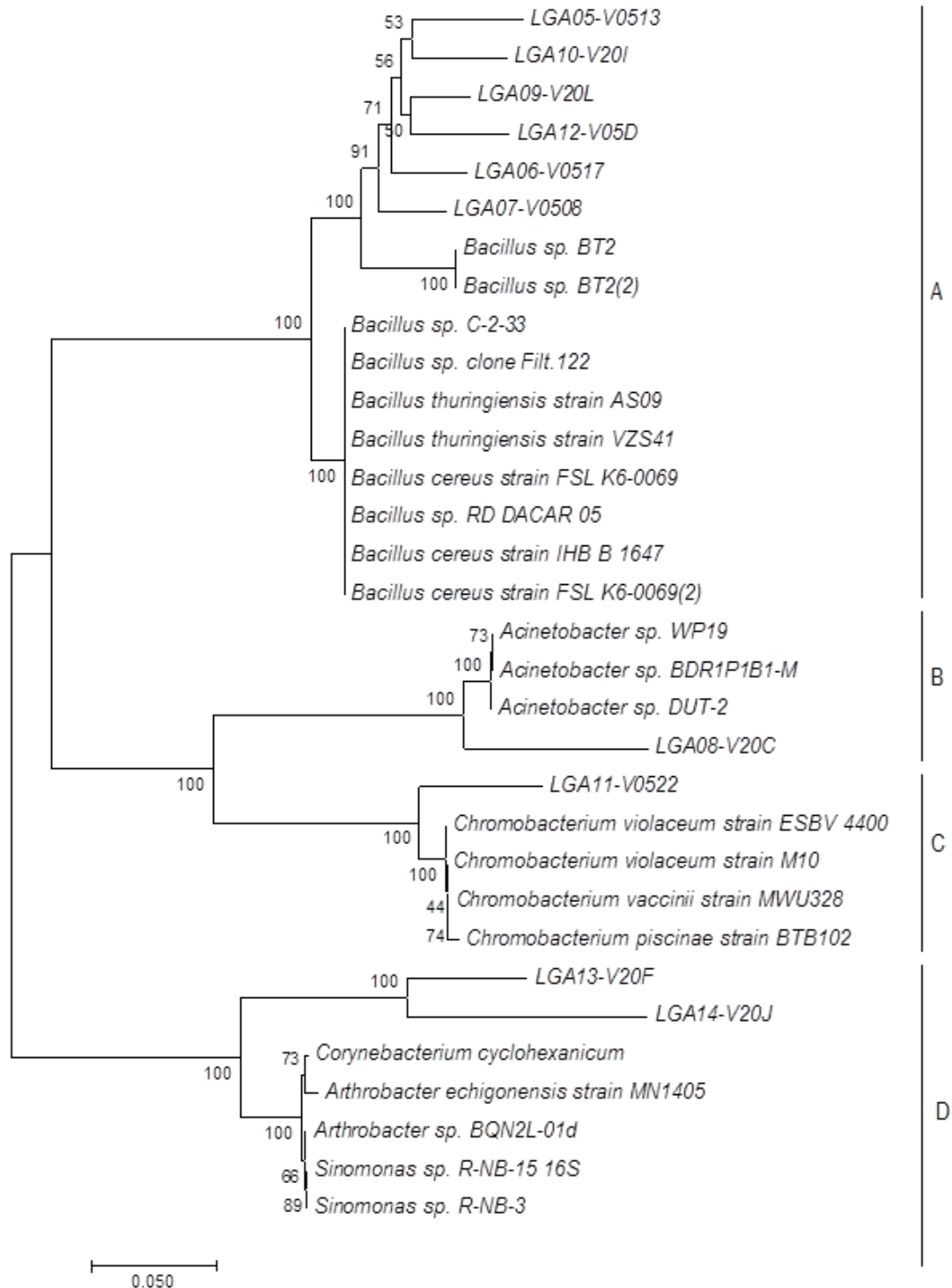


Figura 3 Dendrograma evidenciando os isolados usando o método de Neighbor-Joining, Saitou E Nei. (1987). Foram realizado 1000 “bootstrap”.

5.5 Curvas de multiplicação celular em meio TY e avaliação do pH

Quanto ao comportamento de multiplicação em meio TY, pode-se verificar que o isolado LGA05-V0513 apresentou a maior D.O. (cerca de 5,3), em apenas 24h, seguido do isolado LGA11-V0522 com D.O. aproximada de 4,4. Sobre os demais isolados é possível notar que apresenta crescimento parecido nesse meio, sugerindo que o meio de cultivo possa estar beneficiando de forma parecida, todos os isolados em termos de número de células (Figura 4)

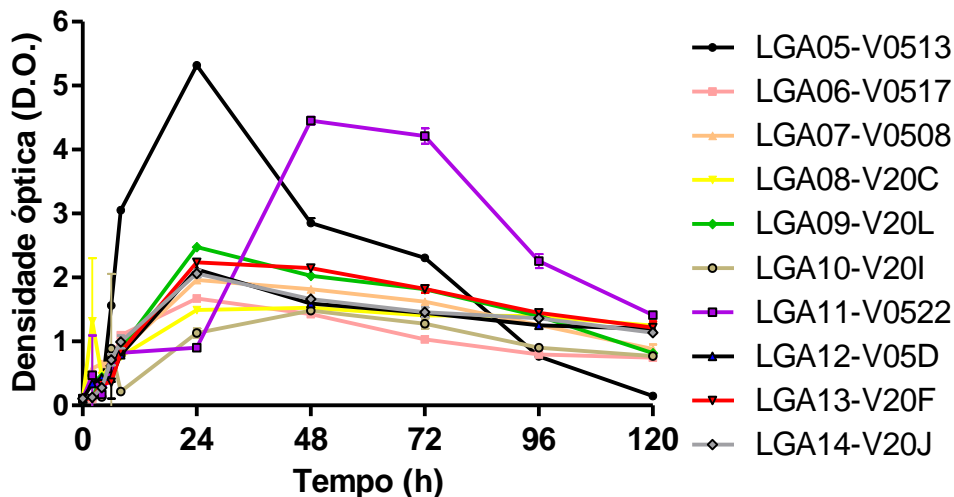


Figura 4. Densidade Ótica a 600 nm ao longo do período de cultivo dos isolados.

O comportamento em relação ao pH no meio TY dividiu os isolados em dois grupos: os isolados LGA05-V0513, LGA06-V0517, LGA08-V20C, LGA11-V0522, que alcalinizaram o meio, e os isolados LGA07-V0508, LGA09-V20L, LGA10-V20I, LGA12-V05D, LGA13-V20F, LGA14-V20J, que tornaram o meio mais ácido durante o período de cultivo.

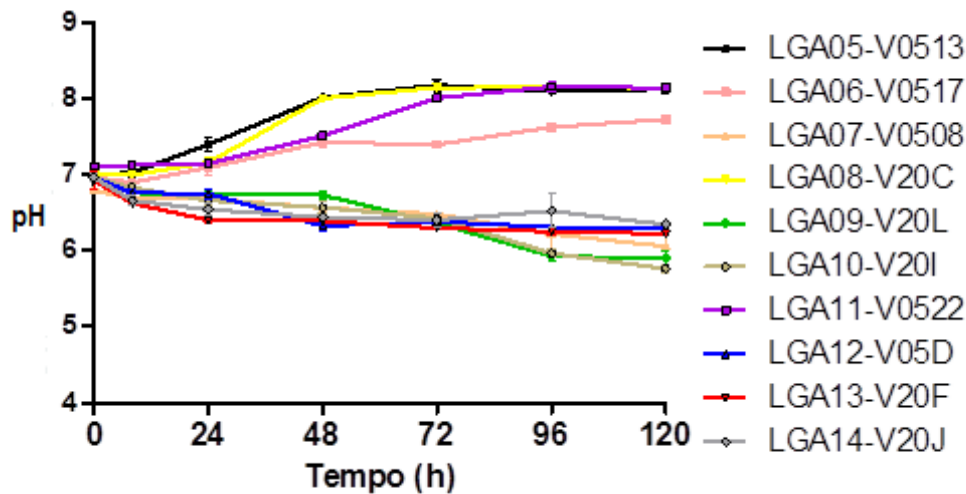


Figura 5 Gráfico com valores de pH ao longo do período de cultivo dos isolados. Experimento realizado em triplicata.

5.6 Testes de solubilização nos meios NBRIP

5.6.1 Avaliação de solubilização de fósforo em meio NBRIP sólido

Na avaliação de solubilização em meio sólido pode-se constatar que dos 10 microrganismos isolados, 6 se destacaram como bons solubilizadores (Figura 6 tabela 2). Apresentando altas taxas de solubilização quinze dias após a inoculação os valores dos isolados LGA05-V0513, LAG06-V0517, LGA11-V0522, LGA12-V05D, LGA13-V20F, LGA14-V20J foram maiores que três ($E > 3$). Os isolados LGA07-V0508, LGA09-V20L, LGA10-V20I, apresentaram taxas maiores que dois ($2 < E < 3$). E com menor taxa de solubilização, o isolado LGA08-V20C ($E=1$). (Tabela 2).

Tabela 02 Capacidade de solubilização média avaliado em meio NBRIP Sólido

Isolados	E= (Halo/colônia) mm**
LGA05-V0513	6,84
LAG06-V0517	6,78
LGA07-V0508	2,83
LGA08-V20C	1,00
LGA09-V20L	2,66
LGA10-V20I	2,80
LGA11-V0522	6,90
LGA12-V05D	5,30
LGA13-V20F	6,48
LGA14-V20J	6,20

** Eficiência da solubilização de fósforo em 15 dias após a inoculação.

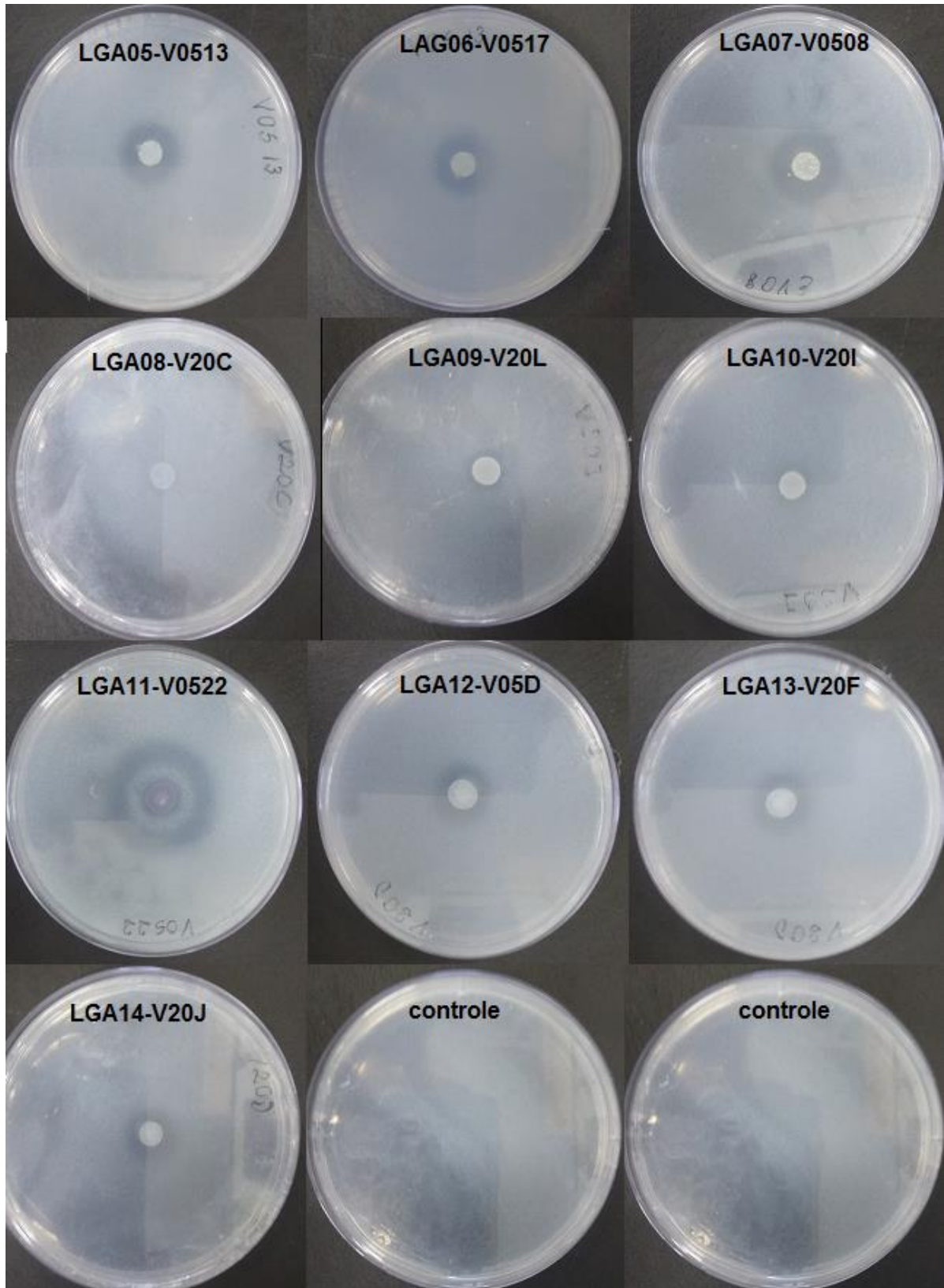


Figura 6 Capacidade de solubilização dos isolados selecionados no 15º dia após a inoculação

5.6.2 Avaliação de comportamento em meio NBRIP líquido (solubilização, D.O. e pH)

A capacidade de solubilização do fósforo (figura 7 e tabela 03) dividiu os isolados em dois grupos, de acordo com as médias referentes a quantidade de P solubilizada e similaridade expressa no método comparativo de Tukey. Foram constatados como melhores solubilizadores do grupo dos isolados LGA07-V0508, LGA09-V0522, LGA13-V20F e LGA14-V20J, solubilizando mais de 32 mg/ml de P em 120 horas de cultivo, juntamente com os isolados LGA05-V0513, LGA06-V0517, LGA12-V05D, LGA09-V20L, E LGA10-V20I, solubilizando entre 31 e 21 mg/ml de P em 120 horas de cultivo. o isolado LGA08-V20C apresentou as menores medias de solubilização ($P < 0,05$) com solubilizado em média de 16 mg/ml em 120 h de cultivo.

E sobre a relação entre D.O. e solubilização, pode-se verificar que os dois isolados com a D.O. mais baixa, LGA07-V0508, LGA11-V0522, ao longo de todo o período de cultivo (figura 8), foram os melhores solubilizadores do grupo. Induzindo a ideia de que produzem grandes quantidades de substâncias solubilizadoras.

Em relação ao pH pode-se dizer que a acidificação do meio não está diretamente ligada ao aumento da solubilização, pois, nem todos os isolados que tiveram pH mais baixo no final do período de cultivo, foram os que mais solubilizaram o fósforo. Como exemplo, temos o isolado LGA08-V20C, que teve um pH médio final de 5,10, e solubilizou em media 15,45 mg/mL. E os isolados LGA05-V0513 E LGA06-V0517, com pH médio final de 6,11 e 6,33, solubilizaram em média 30,96 e 30,58 mg/mL no final do período de cultivo.

Tabela 3 Variação de Densidade Óptica (D.O.), pH, e solubilização em meio NBRIP, observados após 120 horas de cultivo

Isolados	D.O. ₆₀₀	pH	Solubilização mg/mL
LGA05-V0513	1.61 ± 0.01 B	6.11 ± 0.05 B	30.96 ± 0.03 A
LGA06-V0517	1.64 ± 0.02 A	6.33 ± 0.06 A	30.58 ± 0.44 A
LGA07-V0508	0.26 ± 0.01 E F	5.10 ± 0.00 E F J	36.26 ± 0.17 A
LGA08-V20C	1.30 ± 0.03 H	5.73 ± 0.00 B E G H I	15.45 ± 0.95 B
LGA09-V20L	0.63 ± 0.01 H	5.39 ± 0.00 C F G	23.28 ± 0.06 A
LGA10-V20I	0.31 ± 0.06 C F H	5.27 ± 0.02 C E G H I	20.45 ± 0.32 A
LGA11-V0522	0.30 ± 0.00 C E	5.49 ± 0.00 D E F	33.81 ± 0.10 A
LGA12-V05D	0.90 ± 0.00 G	5.53 ± 0.03 D E F	28.89 ± 0.13 A
LGA13-V20F	1.03 ± 0.03 G	5.51 ± 0.06 D E F	33.65 ± 0.07 A
LGA14-V20J	0.53 ± 0.02 D E	4.88 ± 0.00 C	32.19 ± 0.02 A

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O perfil de solubilização ao longo do período de cultivo está expresso na figura 7, onde se pode observar, de forma detalhada, a evolução da solubilização ao longo do período de cultivo.

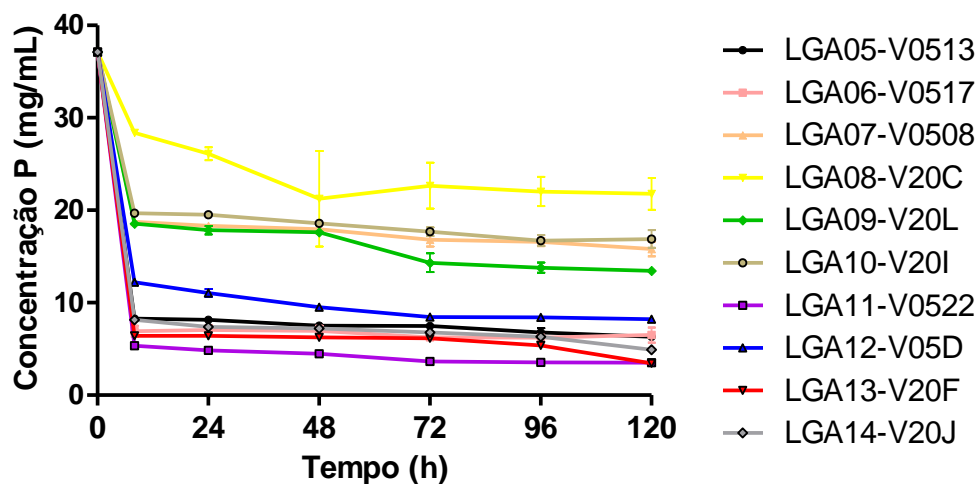


Figura 7. Perfil de solubilização pelos isolados ao longo do período de cultivo dos isolados em meio NBRIP líquido. Resultados expressos referentes ao fósforo não solubilizado restante no meio.

Sobre a multiplicação dos isolados em meio NBRIP medindo-se a D.O. pode-se observar que todos os isolados apresentaram baixas densidades, tendo maior valor o isolado LGA13-V20F próximo a 2 em 72 h, (Figura 8). E menores D.O. os isolados LGA07-V0508, LGA11-V0522.

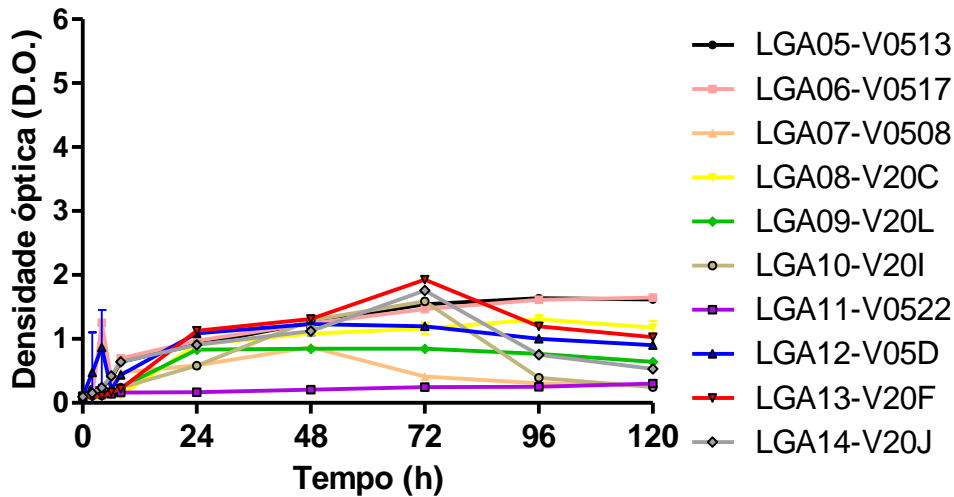


Figura 8 Multiplicação de células em meio NBRIP líquido medido ao longo do período de cultivo dos isolados.

Avaliando-se o pH pode-se dizer que todos os isolados tiveram tendência a acidificar o meio NBRIP, visto que apresentaram valores entre 6,3 e 4,9, sendo que o valor mais baixo foi 4,9 no fim do período de cultivo do isolado LGA14-V20J, e o isolado LGA06-V0517 menos ácido com pH mais alto, 6,3 (figura 9).

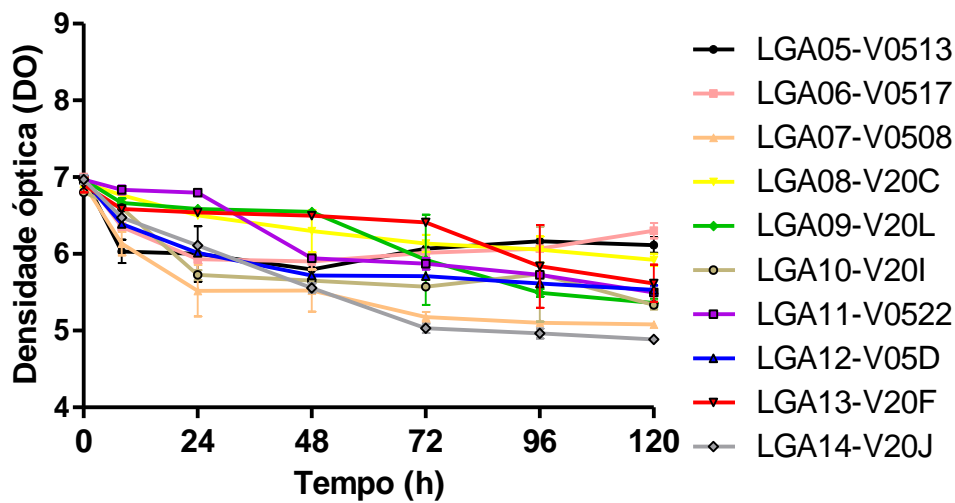


Figura 9. Determinação dos valores de pH ao longo do período de cultivo dos isolados em meio NBRIP líquido.

5.7 Ensaio com plantas: Avaliação da influência no crescimento de soja e milho

5.7.1 Análise de crescimento de soja

De acordo com os resultados observados após o cultivo da soja, pode-se verificar diferenças significativas ($P < 0,05$) quanto a influência dos isolados no crescimento da raiz em relação ao controle, sendo classificados como maiores influenciadores os isolados LAG06-V0517, LGA09-V20L, LGA12-V05D, LGA13-V20F, Z GA14-V20J (tabela 4; figura 10).

Sobre a influência no crescimento da parte aérea (Figura 10) as médias mostraram que apenas o isolado LGA13-V20F, 22,4 cm, se diferencia dos demais, de acordo com o teste de Tukey.

Os isolados estudados no experimento não influenciaram ($P < 0,05$) a matéria seca na cultura da soja, não apresentando diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 4 Resultados da influência no crescimento para cultura da soja.

Isolados	Raiz (cm)	Parte aérea (cm)	Matéria Seca (%)
Controle	04.62 ± 0.32 C	16.75 ± 1.04 A B	72.90 ± 04.54 A
LGA05-V0513	05.60 ± 0.50 B C	18.60 ± 0.67 A B	66.28 ± 03.04 A
LGA06-V0517	10.66 ± 0.88 A	18.00 ± 1.00 A B	68.20 ± 02 .94 A
LGA07-V0508	06.25 ± 0.79 B C	21.25 ± 1.01 A B	67.89 ± 01.71 A
LGA08-V20C	05.00 ± 1.00 C	16.66 ± 4.05 A B	71.56 ± 02.66 A
LGA09-V20L	09.66 ± 0.62 A B	22.00 ± 0.70 A B	52.08 ± 11.85 A
LGA10-V20I	05.25 ± 1.03 C	16.25 ± 2.39 A B	71.97 ± 02.44 A
LGA11-V0522	04.80 ± 1.31 C	14.80 ± 1.31 B	70.34 ± 00.93 A
LGA12-V05D	06.50 ± 0.50 A B C	19.25 ± 0.85 A B	66.92 ± 00.74 A
LGA13-V20F	09.80 ± 0.96 A B	22.40 ± 0.60 A	63.53 ± 02.25 A
LGA14-V20J	08.20 ± 1.39 A B C	16.20 ± 2.63 A B	72.44 ± 01.64 A

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Apesar de não existir muitas diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey 5%, pode-se observar visualmente uma pequena variação em algumas plantas influenciadas positivamente, tanto na raiz quanto parte Aérea (figura 10).

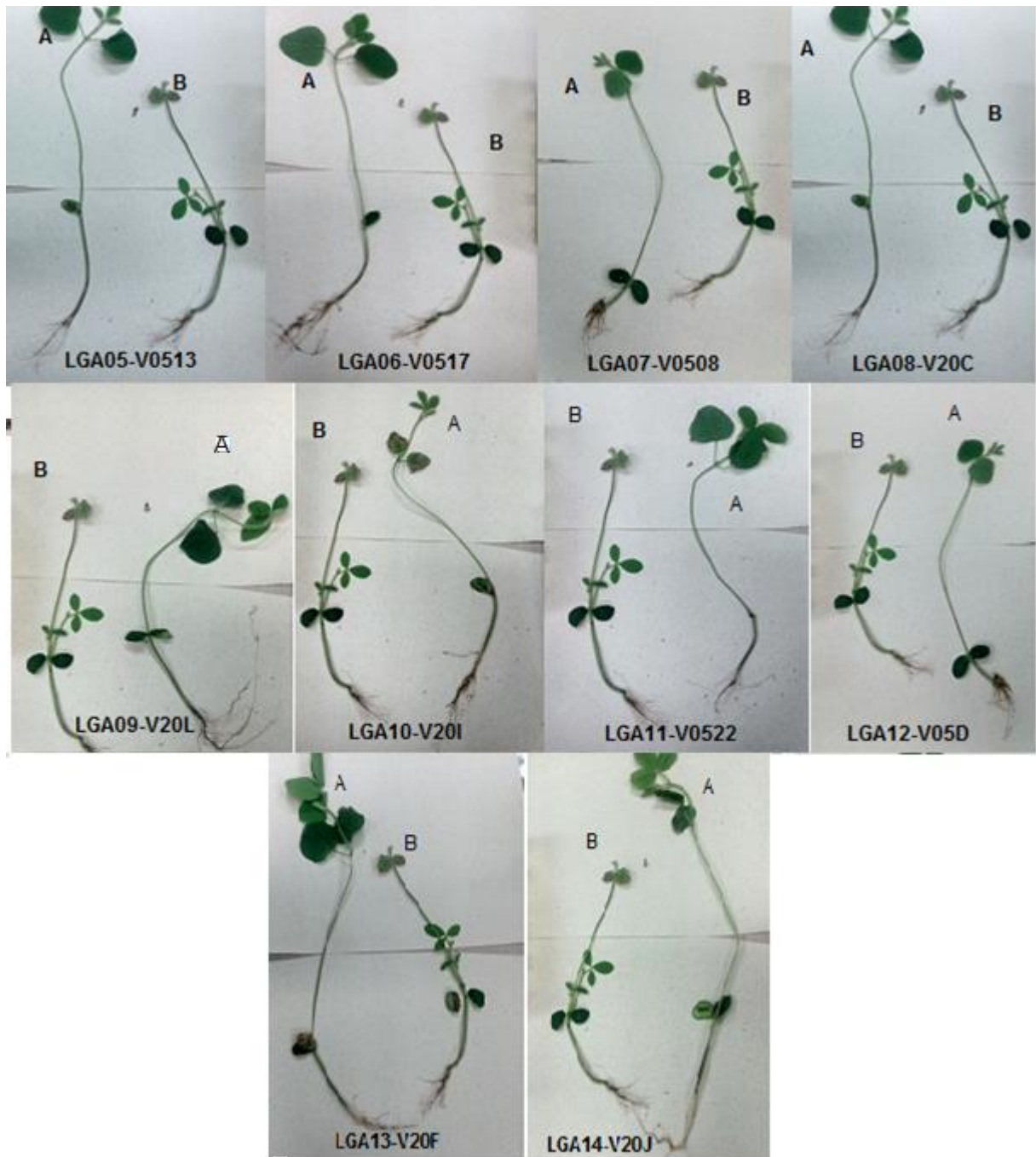


Figura 10 Amostras de soja inoculadas com os isolados em (A) e controle em (B) no momento da medição de comprimento.

5.7.2 Análise de crescimento do Milho

As médias dos isolados não apresentaram diferenças significativas no crescimento de raiz e parte aérea da altura do milho ao nível de 5% pelo teste de tukey ($P < 0,05$).

Contudo, pode-se verificar que o isolado LGA06-V0517, foi o único que se diferenciou do controle na análise de matéria seca tendo o nível de significância ao nível de 5% ($P < 0,05$) mostrando que esse isolados influenciou no crescimento em peso das plantas de milho durante o período cultivado. O que também pode ser observado na figura 11.

tabela 5: Resultados da influência no crescimento para cultura do milho.

Isolados	Raiz (cm)	Parte aérea (cm)	Matéria Seca (%)
Controle	20.70 ± 0.86 A	34.30 ± 1.56 A	36.07 ± 1.90 B
LGA05-V0513	21.00 ± 2.46 A	33.00 ± 1.12 A	39.24 ± 4.62 A B
LGA06-V0517	19.66 ± 1.97 A	32.83 ± 0.79 A	47.07 ± 2.68 A
LGA07-V0508	24.83 ± 2.03 A	35.16 ± 1.72 A	36.72 ± 2.11 A B
LGA08-V20C	22.66 ± 1.81 A	34.50 ± 1.68 A	38.53 ± 1.86 A B
LGA09-V20L	22.66 ± 2.26 A	38.33 ± 1.05 A	31.27 ± 1.46 B
LGA10-V20I	25.20 ± 2.81 A	34.40 ± 0.81 A	35.32 ± 2.83 B
LGA11-V0522	24.33 ± 2.06 A	34.50 ± 1.47 A	33.29 ± 0.89 B
LGA12-V05D	23.66 ± 1.56 A	37.16 ± 2.24 A	34.58 ± 1.50 B
LGA13-V20F	22.33 ± 1.14 A	38.83 ± 1.04 A	30.77 ± 1.17 B
LGA14-V20J	22.00 ± 0.85 A	33.16 ± 0.94 A	32.70 ± 1.27 B

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Apesar de não existir diferenças significativas de acordo com o teste de tukey 5%, com exceção da matéria seca da planta inoculada com o isolado LGA06-V0517,

pode-se observar visualmente uma pequena variação em algumas plantas influenciadas positivamente, tanto na raiz c quanto parte Aérea (figura 11).

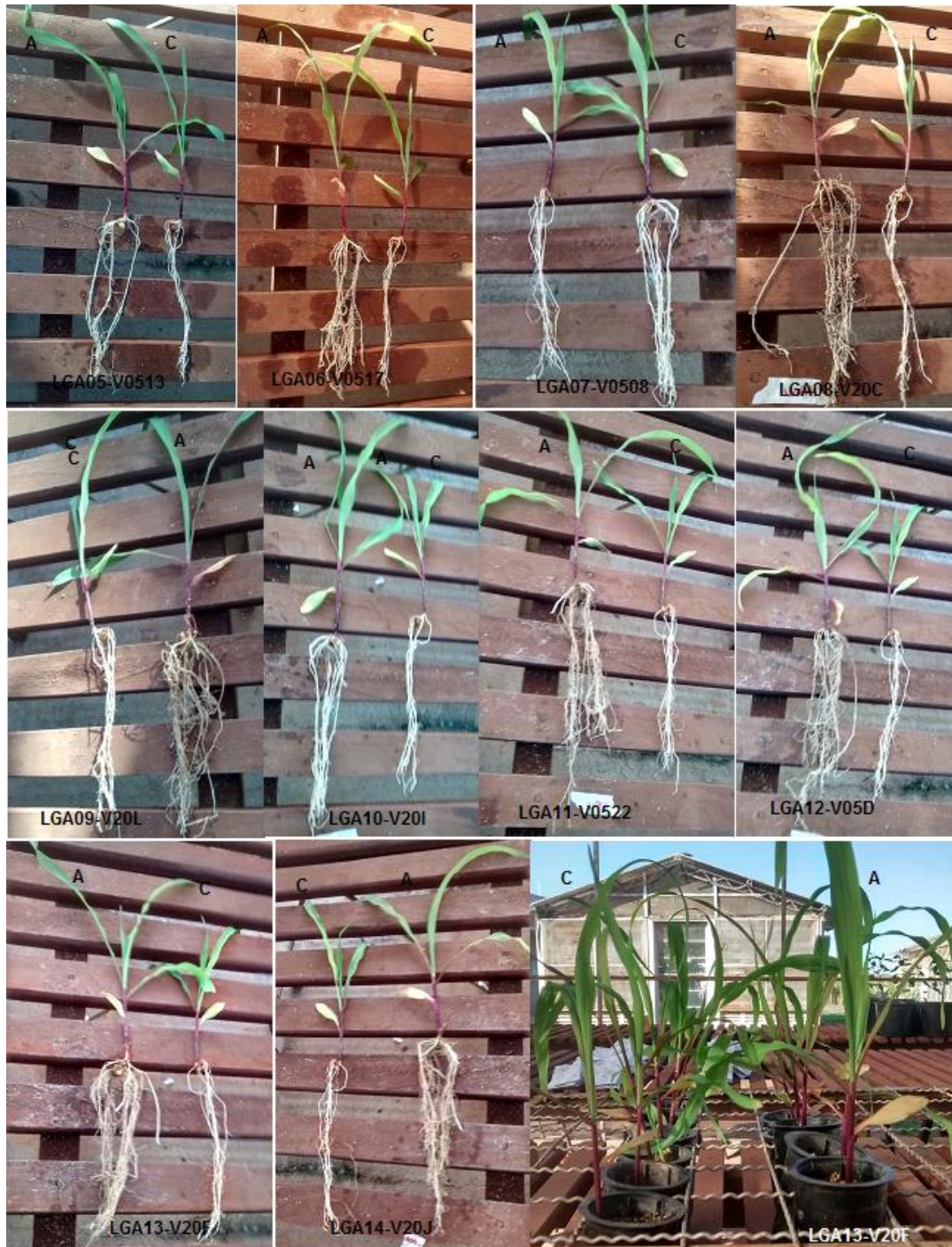


Figura 11. Amostras de milho inoculadas com os isolados em (A) e controle em (C) no momento da medição de comprimento.

6 DISCUSSÃO

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu a classificação em nível de gênero de todos os isolados, tendo similaridade de 92% a 97% com sequências disponíveis no GenBank. A avaliação das análises de solubilização e influência no crescimento em casa de vegetação, permitiram apurar de forma mais clara as características de cada isolado e prever possíveis usos para cada isolado em futuras pesquisas e aplicações comerciais, como exploração de genes ligados a solubilização e uso desses isolados como inoculantes.

Sobre os isolados LGA05-V0513, LGA06-V0517, LGA07-V0508, LGA09-V20L, LGA10-V20I e LGA12-V05D podemos afirmar a que existiu acima de 96 % de identidade com o gênero *Bacillus*. Analisando os dados de cultivo pode-se dividir esses seis isolados em dois grupos, que apresentaram comportamentos diferentes quanto aos padrões observados durante o cultivo em relação ao pH e solubilização em Meio NBRIP, os isolados (LGA-V0513 e LGA06-V0517) tenderam a tornar o meio menos ácido e solubilizaram quantidades parecidas de fosfato, tanto no meio sólido, quanto no líquido, justificando a comparação a *Bacillus cereus*, (Tabela 01), realizada pelo banco de dados. Mas os resultados na casa de vegetação mostraram que os isolados influenciaram de forma diferente o crescimento das plantas, sendo o isolado LGA06-V0517, que promoveu melhor crescimento para as raízes da soja, média de 11 cm, e isolado o LGA-V0513 teve menor resultado para matéria seca da soja, tabela 04, mesmo não diferindo significativamente dos demais isolados. Os isolados (LGA07-V0508, LGA09-V20L, LGA10-V20I e LGA12-V05D) acidificaram o meio (figura 5 e 9), e também mantiveram um grau de solubilização parecido nos dois meios teste, (figura

7), mas os resultados em casa de vegetação não apresentaram diferenciação significativa segundo o teste de Tukey 5%,

Sobre os isolados deste primeiro grupo, pertencentes ao gênero *Bacillus*, com proximidade ao *Bacillus* (*Bacillus thuringiensis*), e *Bacillus cereus* é comum encontrar referências as proteínas com potencial endopatogênicas (entomopatogênicas) devido a presença de delta-endotoxinas (Ibrahin, et al., 2010; Kronstad et al., 1983; Naimov, et al., 2008). E existem referências que sugerem a influência no crescimento de plantas através do *Bacillus cereus*, (NIU et al., 2012). Levando em consideração esses trabalhos pode-se sugerir que com os testes realizados, solubilização de P e influência de crescimento em casa de vegetação, os isolados em questão podem atuar como solubilizadores e mesmo de forma modesta induziram o crescimento das plantas. Assim torna-se necessário um estudo aprofundado dos mecanismos de atuação desses isolados e posterior classificação total do gene 16S rRNA.

Os resultados de comparação obtidos pelo isolado LGA08-V20C mostraram semelhança de 95% com o gênero *Acinetobacter*. E durante o processo de caracterização pode-se observar a baixa eficiência para solubilização de P por esse isolado, razão 1 para meio sólido, tabela 2, e 15 µg/ml, em NBRIP líquido (tabela 3), tendo uma acidificação leve dos meios, TY e NBRIP, deixando o pH próximo de 6 (Figura 5 e 9). Marra et al. (2015) relataram a solubilização realizada pelo mesmo gênero com razão entre, 1,13 e 1,79, para o mesmo meio sólido (Ogut et al.,2010), observa em seu trabalho que uma linhagem de *Acinetobacter* teve rápida eficiência na solubilização, em 24h houve produção de halo no meio Agar de Pikovskaya, e que o processo está relacionado a liberação de ácido Glucônico, determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados da casa de vegetação mostraram que esse isolado, mesmo influenciando de forma positiva no crescimento

das plantas, não apresentou diferenças significativas dos resultados do contotrole de acordo com o Teste de tukey a 5 %.

Os Isolados LGA13-V20F e LGA14-V20J tiveram 93 e 92% de similaridade com o gênero *Arthrobacter*, (tabela 01). As características observadas no cultivo foram a acidificação dos meios TY e NBRIP, pH final médio próximo a 5,0, (figura 5 e 9), e boa solubilização tanto em meio solido, razão média de solubilização de 6,5, (tabela 02), e 33,3 mg/ml em meio NBRIP líquido, (tabela 3) sendo considerado o isolado LGA13-V20F considerado o terceiro melhor solubilizador do grupo no teste de solubilização em meio NBRIP sólido, mas não diferindo significativamente dos demais quando comparados pelo método de tunkey 5% (tabela 3). INUI, et al. (2012) relata em seu trabalho que um isolado classificado como *Arthrobacter sp*, produziu nos mesmos meios, uma razão de solubilização de 3,92, e solubilização de 18 e 22 µg/ml. Essa diferença significativa encontrada sugere uma diferença de espécies que influenciam na solubilização, o que enfatiza a necessidade de uma classificação completa do gene 16S rRNA. Em casa de vegetação pode-se observar que os isolados se destacaram influenciando no crescimento da parte aérea e na matéria seca da soja sendo o isolado LGA09-V20F um dos que se diferiram significativamente do controle na análise de crescimento de raiz (tabela 4).

O isolado LGA11-V0522 apresentou 98% de similaridade com o gênero *Chromobacterium*, (tabela 1), foi determinado como o melhor solubilizador, tendo razão de solubilização média de 6,9, (tabela 2), e solubilizando 33.7 µg/ml (tabela 3). O pH no fim do período de cultivo variou de básico, 8,12, (figura 5), meio TY para 5,5, no meio NBRIP, (figura 9 e tabela 3), sugerindo que a produção de ácidos é responsável pela alta taxa de solubilização, os resultados em casa de vegetação mostraram que ouve bom desenvolvimento da parte aérea na cultura da soja, mas os

resultados mostrados no teste de Tukey 5% não apresentaram diferenças significativas do controle.

ZHAO et al. (2016), isolaram uma linhagem de *Chromobacterium* de raízes de arroz (*Oryza sativa*), o que sugere que o gênero pode estar associado a simbiose com a cultura de gramíneas. Entretanto existem poucos artigos que relacionam *chromobacterium* ao crescimento de plantas.

A colonização da rizosfera é determinada por uma série de fatores que varia de acordo com a planta, microrganismos e meio ambiente (RAMAMOORTHY et al., 2001). As associações são complexas e ocorrem variações de plantas para plantas e de microrganismo para microrganismo, e entre plantas para microrganismo. O presente estudo sugere que podem beneficiar o desenvolvimento da planta por meio de vários mecanismos de ação, exercidos diretamente, aumentando a disponibilidade de nutrientes no solo, solubilização de fosfato.

Ademais as bactérias solubilizadoras de fosfato dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela diminuição do pH; conseqüentemente, ocorre a produção de fosfato disponível que pode ser capturado pelas plantas (NAUTYAL, 1999; VASSILEV, et al., 2003; VAZQUEZ et al., 2000) e através da produção de substâncias que promovem o crescimento, ou indiretamente, através da supressão de fitopatógenos na rizosfera.

Gupta et al., (2012) avaliaram a solubilização de P por microrganismos e a influência no crescimento de *Aloe barbadensis* (Babosa), relatando que os organismos usados aumentaram o teor de P livre no solo, e aumento do crescimento das plantas. (PARK et al., 2011), isolaram bactérias de diferentes solos contaminados com metal pesado, e com diferentes níveis de P, e após análises in vitro de solubilização de fosfato em meio NBRIP verificou-se que nos solos com presença de fósforo

fertilizantes foram encontrados bons solubilizadores. os mesmo autores Relataram também que todos os isolados são produtores de indole-3-acetic acid (IAA), indicando que são potenciais percursos do crescimento de plantas. (RIBEIRO et al., 2012) relata que microrganismos isolados de amostras de solo de floresta, selecionados por meio NBRIP também tiveram bons níveis de solubilização e estão relacionados a promoção do crescimento de plantas. Esse tipo de comportamento também e descrito por (RODRIGUEZ et al., 1999; CHEN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009; Tao, 2008; MANTA et al., 2010; e PEREZ, 2007). Segundo (INUI et al.,2012), isolados de solos de cana de açúcar, também tiveram excelentes resultados quanto a solubilização de P em meio NBRIP, e na produção de AIA. Adicionalmente pode-se aferir que Bactérias solubilizantes de P (BSP) podem atuar como potenciais Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP).

Uma vez que os resultados revelam as possíveis implicações destes microrganismos na melhoria da qualidade e produtividade dessas culturas, mesmo que de forma modesta, e ainda sugerem que devem ser estudados outros fins, como produção de indutores de crescimento, e atividade fito patógenas e busca de outros genes de interesse biotecnológico visando a manipulação genética de microrganismos e plantas para melhoria da capacidade de solubilização e de aquisição de fosfatos do solo

7 CONCLUSÕES

Foram classificados parcialmente a nível de gênero os 10 isolados bacterianos, pertencentes ao laboratório de Genetica aplicada, (LGA) da FCAV-UNESP

Jaboticabal, através do sequenciamento parcial e classificação filogenética por meio do gene ribossomal 16S (16S rRNA).

Os mesmo isolados foram caracterizados quanto ao padrão de crescimento em meio TY (“Yeast Triptona”), padrão de crescimento em meio NBRIP (*National Botanical Research Institute’s Phosphate*), solubilização de fosfato de Araxá ($\text{CaCO}_3(\text{PO}_4)_2$); e pH.

E foi avaliar a influência no crescimento em casa de vegetação, para as culturas da soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).

8 REFERÊNCIAS

BARBOSA J.C., MALDONADO JUNIOR W. AgroEstat - **Sistema para Análises Estatística de Ensaios Agronômicos**, UNESP, Jaboticabal. 2008.

BERRAQUEIRO F.R., BAYA A.M. AND CORMENZANA A.R. **Establecimiento de índices para el estudio de la solubilizacion de fosfatos por bacterias del suelo.** Ars Pharmaceutica. 17: 399-406. 1976.

CHEN, Y.P.; REKHA P.D.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; YOUNG, W.-A.; LAI, C.C. **Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil andt heir tricalcium phosphate solubilizing abilities.** Applied Soil Ecology, 34 33–41, 2006.

Gibson, A. H. **Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber.** iN: Elkan, G.H. Symbiotic nitrogen fixation technology. New York: marcel Dekker inc. p. 321-369. 1987.

GORDON D, ABAJIAN C, GREEN P: [Consed: a graphical tool for sequence finishing.](#) Genome Research 8:195-202 (1998).

GORDON, D.; BAXEVANIS A. D.; DAVISON, D. B. "**Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed**", in *Current Protocols in Bioinformatics*, eds, New York: John Wiley & Co. 11.2.1-11.2.43: Genome Res 11:614-625. 2004.

GUPTAA, M.; KIRANC, B.; SINGHD, A. B.; RUPINDER, T. **Show more Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of Aloe barbadensis Miller**. 167, 358–363. 2012.

IBRAHIM, M. A.; GRIKO, N.; BULLA, M.; JUNKER, L. A. **Bacillus thuringiensis: A genomics and proteomics perspective**. Bioengineered Bugs.1:1, 31-50. 2010.

INUI, R. N.; KISHI, TAKESHI, L.; PICCHI, S. C.; BARBOSA, J. C., LEMOS, M. T. O.; MARCONDES, JACKSON. LEMOS, ELIANA. G. M. **Phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation**. ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences. VOL. 7, NO. 11, NOVEMBER 2012.

KAUR, GURDEEP; REDDY, Mondem Sudhakara. **Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping Cycle and Economics**. Soil Science Society of China.e 25(3): 428–437, 2015 ISSN 1002-0160/CN 32-1315/P c. 2015.

KRONSTAD, J.W.; SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. **Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes**. Journal of Bacteriology, Washington, v.154, n.1, p.419-428, 1983.

KUMAR, S. K.; TAMURA, M. NEI,. **MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment**. Brief. Bioinform. 150–163. 2004.

MALAVOLTA E.; VITTI G.C.; OLIVEIRA, S.A.; **Avaliação de Estado Nutricional das Plantas: Princípios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fosfato, Piracicaba. 1989.

MALAVOTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas** – São Paulo: Editora Agronomica Ceres, 638 p. 2006.

MARRA, L. M.; LONGATTI, S. M. O.; SOARES, C. R.F.S.; LIMA, J. M.; OLIVARES, F. L.; MOREIRA, F. M.S. **Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization**. Brazilian Journal of Microbiology 46, 2, 367-375. 2015.

MENNA, B. C. P.; HUNGRIAA, D, M.; BARCELLOSA, D. F. G.; BANGELE, E. V.; HESSF, G. P. N; MARTI´NEZ-ROMEROH E.; **Molecular phylogeny based on the 16s rrna gene of elite rhizobial strains used in brazilian commercial inoculants**. Systematic and Applied Microbiology 29. 315–332. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo** – 2. Ed. Atual e ampl. –Lavras: editor UFLA, 2006.

NAIMOV, S.; BONCHEVA, R., RUMYANA K.; DUKIANDJIEV, S.; MINKOV, I.; MAAGD, R. A. **Solubilization, Activation, and Insecticidal Activity of Bacillus thuringiensis Serovar thompsoni HD542 Crystal Proteins [down-pointing small open triangle**. Appl Environ Microbiol. 74(23): 7145–7151. 2008.

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

NEEFS, J.-M.; PEER, Y. V.; HENDRIKS, L.; WACHTER, R. **Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences**. Nucleic Acids Research, v. 18, p. 2237- 2317, 1990.

NIU, D.; LIU, H.; JIANG, C.; WANG, Y.; WANG, Q.; JIN, H.; GUO, J. **The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Bacillus cereus AR156 Induces Systemic Resistance in Arabidopsis thaliana by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways**. MPMI Vol. 24, No. 5, pp.

533–542. 2012. The American Phytopathological Society. doi:10.1094 / MPMI -09-10-0213. 201.,

OMORI, W. P. **Construção da biblioteca metagenômica a partir de oligoiniciador para Cu/Zn-SOD.** Trabalho de Graduação (Graduação) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

OMORI, W. P. **Diversidade bacteriana de amostras da indústria sucroenergética.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) –Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

PARK, J. H.; BOLAN, N.; MEGHARAJ, M.; NAIDY, R. **Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil.** Journal of hazardous Materials. 829-836. 2011.

PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. **Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture.** Applied and Environmental Soil Science, v. 2013, 2013.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. **Induction of systemic resistance by plant growthpromoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases.** Crop Protection, Surrey, v. 20, n. 1, p. 1 11, 2001.

RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M. **Prokaryotic systematics: PCR and sequence analysis of amplified 16S rRNA genes.** In: OSBORN, A . M.; SMITH, C. J. **Molecular microbial ecology.** 1.ed. New York:Taylor & Francis Group, cap. 2., p.252-264. 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 3. ed., v. 1, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1. ed., v. 1, 2006.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. **Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono.** Rev Brasil de Cien do Solo. 24: 311-319. 2000.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. **Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 11, n. 1, p.108-114, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PERTERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** Molecular Biology and Evolution, v. 28, n. 10, p.2731-2739, 2011.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. **Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agroindustrial wastes.** Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, DE, v. 61, n. 5-6, p. 435-440, 2003.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. **Phosphatesolubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon.** Biology and Fertility of Soils, Berlin, DE, v. 30, n. 5-6, p. 460-468, 2000.

VICENT, J.M.; **A manual for the practicl study of root nodule bacteria.** ICB HandBook,15, Oxford: Blackwell Scientific,1970. P.200

WANG, H.; ZHU, J.; FU, Q.; XIONG, J.; HONG, C.; HU, H.; Volante, A.; **Adsorption of Phosphate onto Ferrihydrite and Ferrihydrite-Humic Acid Complexes Pedosphere.** ISSN 1002-0160/CN 32-1315/P. Soil Science Society of China(3): 405–414, 2015.

WANG, Y.; QIAN, P. **Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies.** Public Library of Science, v. 4, n. 10, e7401, 2009

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., LANE, D.J., **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic studies**. Journal of Bacteriology 173, 697–703. 1992.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study**. Journal of Bacteriology, v. 173, p. 697-703, 1991.

WEISENBURG W.G.; BARNS S.M.; PELLETIER D.A.; LANE D.J.; **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study**. J. of Bacteriol. 173: 697-703. 1991.

YAMADA, T; ABDALLA. S.R.S. **Fosforo na agricultura brasileira** (Don Pedro SP). Piracicaba: Potafos, 2004.

Zhou, S.; Guo, X.; Wang, H.; Kong, D.; Wang, Y.; Zhu, J.; Dong, W.; He, Mingxiong; Hu, G.. **Chromobacterium rhizoryzae sp. nov., isolated from rice roots**. International Journal of Systematic and Evolutionary, 2016.