

Isolamento e Potencial Uso de Bactérias do Gênero *Bacillus* na Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Déficit Hídrico



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
192**

**Isolamento e Potencial Uso de Bactérias do
Gênero *Bacillus* na Promoção de Crescimento
de Plantas em Condições de Déficit Hídrico**

*Bárbara Temponi Vilarino Godinho
Amanda Nayê Guimarães Tavares
Ubiraci Gomdes de Paula Lana
Sylvia Moraes de Sousa
Christiane Abreu de Oliveira Paiva
Ivanildo Evódio Marriel
Eliane Aparecida Gomes*

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2019*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sa

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia
Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia
Ferreira Simeone, Roberto dos Santos
Trindade e Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Tânia Mara Assunção Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto da capa
Bárbara Temponi Vilarino

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Isolamento e potencial uso de bactérias do gênero *Bacillus* na promoção de
crescimento de plantas em condições de déficit hídrico / Bárbara T. V. Godinho
... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2019.

24 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo,
ISSN 1679-0154; 192).

1. Bactéria. 2. Microrganismo. 3. Crescimento vegetal. 4. Estresse hídrico. I.
Godinho, Bárbara Temponi Vilarino. V. II. Tavares, Amanda Naye Guimarães. III.
Lana, Ubiraci Gomes de Paula. IV. Sousa, Sylvia Morais de. V. Paiva, Christiane
Abreu de Oliveira. VI. Marriel, Ivanildo Evódio. VII. Gomes, Eliane Aparecida. VIII.
Série.

CDD 571.82 (21. ed.)

Sumário

Resumo	04
Abstract	06
Introdução.....	07
Material e Métodos	08
Resultados e Discussão	11
Conclusões.....	18
Referências	18

Isolamento e Potencial Uso de Bactérias do Gênero *Bacillus* na Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Déficit Hídrico

Bárbara Temponi Vilarino¹

Amanda Nayê Guimarães Tavares²

Ubiraci Gomes de Paula Lana³

Sylvia Moraes de Sousa⁴

Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁵

Ivanildo Evódio Marriel⁶

Eliane Aparecida Gomes⁷

Resumo – O microbioma do solo é constituído por diferentes espécies de microrganismos, incluindo grupos capazes de promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios, proteínas e moléculas quelantes, solubilização de fosfato e potássio, fixação de nitrogênio, controle de alguns fitopatógenos e aumento da tolerância a estresses abióticos, como a seca. Dessa forma, o presente estudo objetivou isolar e selecionar bactérias tolerantes ao estresse hídrico e caracterizá-las indiretamente quanto à potencial capacidade de promoção de crescimento de plantas *in vitro*. Os microrganismos foram isolados de amostras de solos coletadas em diferentes municípios do Estado do Ceará em regiões da Caatinga. Os isolados bacterianos foram selecionados em meio de cultura enriquecido com diferentes concentrações de sorbitol, visando simular condições de restrição hídrica, avaliados quanto a características macromorfológicas e identificados molecularmente pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*. Um total de 414 cepas foi isolado do solo, das quais 28 foram capazes de crescer em meio de cultura contendo sorbitol nas concentrações de 520 e/ou 780 g L⁻¹. As bactérias

¹ Estudante, Bolsista de Doutorado, Universidade de Lavras.

² Estudante, Bolsista FAPEMIG, Faculdade Ciências da Vida.

³ Químico, D.Sc. em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo.

⁴ Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

⁵ Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

⁶ Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo.

⁷ Bióloga, DSc. em Genética, Pesquisadora em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo.

avaliadas apresentaram, em sua maioria, colônia pequena, de forma circular, elevação achatada, bordas lisas, opaca, na cor creme e com aspecto viscoso e foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, mostrando-se eficientes na produção de exopolissacarídeos e sideróforos. Além disso, 64% das cepas apresentaram capacidade de fixação de nitrogênio e 35% foram fortes produtoras de biofilme. Os diferentes isolados do gênero *Bacillus* são microrganismos promissores para a utilização na promoção do crescimento de plantas em condições de estresse hídrico.

Termos para indexação: *Bacillus*, biofilme, sideróforo, fixação de nitrogênio, estresse hídrico.

Isolation and Potential Use of Bacteria of the *Bacillus* Genus in the Promotion of Growth of Plants in Conditions of Water Deficit

Abstract – The soil microbiome consists of different species of microorganisms including bacterial groups capable of promoting plant growth through the production of phytohormones, proteins and chelating molecules, phosphate and potassium solubilization, nitrogen fixation, phytopathogen control and increase tolerance to abiotic stresses, such as drought. Thus, the present study aimed to isolate and select bacteria tolerant to water stress conditions and to characterize their production of metabolites *in vitro* related to promotion of plant growth. The isolated microorganisms originated from soil samples collected in the Brazilian Caatinga biome, in different regions of the State of Ceará. The bacterial isolates were selected in culture medium enriched with different concentrations of sorbitol, simulating water restriction conditions. Isolates were evaluated for macromorphological characteristics and they were molecularly identified by the sequencing of the *16S rRNA* gene. A total of 414 strains were isolated from the soil, of which 28 were able to grow in sorbitol-containing culture medium at concentrations of 520 and/or 780 g L⁻¹. Most of the evaluated bacteria presented small, circular, flattened, smooth, opaque, cream-colored and viscous aspect colonies, and were identified as belonging to the genus *Bacillus*, known to be efficient in the production of exopolysaccharides and siderophores. In addition, 64% of the strains showed capacity of fixating nitrogen and 35% were biofilm-producers. Our results indicate that the identified *Bacillus* strains are promising as plant growth-promoting microorganisms under water stress conditions.

Index terms: *Bacillus*, biofilm, siderophore, nitrogen fixation, water stress.

Introdução

A região da Caatinga brasileira é conhecida por apresentar solos com características ácidas, ricos em minerais, pedregosos e com baixa capacidade de retenção da água, além do clima com chuvas irregulares e precipitação anual variando entre 200 e 900 mm (Alves et al., 2009). Outros fatores característicos da região, como altas temperaturas associadas à alta intensidade luminosa, provocam rápida evaporação e consequente dessecação do solo, fazendo com que as plantas cultivadas nesta região sofram diferentes tipos de estresse, como baixo teor de nutrientes e escassez de água.

Nessas condições de estresses ambientais, várias espécies vegetais podem produzir exsudatos radiculares que atraem bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) presentes no solo e que podem auxiliar na redução dos efeitos do estresse hídrico (Vurukonda et al., 2016). Estes microrganismos evoluíram, se adaptaram e/ou desenvolveram mecanismos de tolerância à seca, tais como produção de enzimas, exopolissacarídeos (EPS) e biofilmes que formam uma camada de proteção ao redor das células, podendo levar a uma redução da perda de água pelas plantas, além de aumentar a estabilidade do solo (Alami et al., 2000; Carminati et al., 2011; Deng et al., 2015). A produção de fitormônios, regulação de genes de resposta a estresses e alteração da morfologia de raízes também são importantes mecanismos de tolerância à seca. As BPCP podem atuar por mecanismos diretos ou indiretos (Glick, 2012; Santoyo et al., 2012). A promoção do crescimento vegetal por meio direto pode ocorrer tanto pela maior absorção de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fósforo e potássio (Calvo et al., 2017), quanto pela regulação dos níveis de hormônios da planta, como auxina, citocininas e giberelinas (Bhattacharyya et al., 2015; Pérez-Flores et al., 2017). Dentre os mecanismos indiretos de promoção de crescimento, pode-se citar a síntese de antibióticos, proteases, quitinases, bacteriocinas, sideróforos (quelantes de íons ferro), lipopeptídeos e compostos orgânicos voláteis (Leclère et al., 2005; Santoyo et al., 2012; Glick, 2012; Martínez-Absalón et al., 2014; Hernández-León et al., 2015; Orozco-Mosqueda et al., 2018), que levam à redução de ataques de fitopatógenos às plantas ou ao controle de danos sofridos por estas quando já atacadas (Ryan et al., 2008; Santoyo et al., 2012, 2016).

O objetivo do presente trabalho foi isolar e avaliar *in vitro* o potencial de promoção de crescimento vegetal de bactérias tolerantes ao estresse hídrico de solos de região da Caatinga para futura aplicação como bioinoculantes.

Material e Métodos

Isolamento e caracterização morfológica de bactérias do solo

Para o isolamento das bactérias, 1,0 g de solo, coletado em diferentes localidades do Estado do Ceará em regiões da Caatinga, foi transferido para tubo cônico de 15 mL contendo 5 mL de NaCl 0,85% (m/v). As amostras foram incubadas a 30 °C com agitação de 150 rpm durante 16 horas. Em seguida, os tubos permaneceram em repouso por 30 minutos até decantação do solo, sendo transferido 1,0 mL do sobrenadante para outro tubo que foi submetido a um choque térmico por 30 min. em banho-maria a 65 °C, seguido de 5 min. no gelo. Posteriormente, 50 µL da suspensão foram distribuídos em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e incubados a 30 °C por 24 horas. Após este período, as colônias de bactérias foram observadas em lâminas no microscópio de contraste de fase, e as colônias que apresentaram características do gênero *Bacillus*, como formato de bastonete e presença esporos, foram selecionadas, inoculadas individualmente em meio LB sólido e incubadas a 30 °C por 72 horas.

Seleção de bactérias tolerantes ao estresse hídrico

As bactérias foram inoculadas em meio de cultura TSA 10% (m/v) enriquecido com sorbitol nas concentrações 405, 520 e 780 g L⁻¹, com atividade de água (a_w) equivalente a 0,919, 0,897 e 0,807, respectivamente, e incubadas a 40 °C por 72 horas. As amostras capazes de crescer em meio contendo sorbitol nas concentrações mais altas foram selecionadas para identificação molecular.

Extração de DNA e amplificação do gene *16S rRNA*

Os isolados bacterianos foram inoculados em 5 mL de meio TSB e incubados a 28 °C por 24 horas. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o Kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de PCR e os ciclos de amplificação foram preparados de acordo com Abreu et al. (2017) utilizando os primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Turner et al., 1999) e 1492R (5'-TACGYTACCTTGTTACGACT-3') (Lane, 1991).

Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR

As reações de PCR foram purificadas com o kit ExoSap IT (Affymetrix, EUA) e sequenciadas utilizando o kit “Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing” (ThermoFisher, EUA) com os primers 8F, 1492R, 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Turner et al., 1999) e 902R (5'-GTCAATTCITTTGAGTTTYARYC-3') (Hodkinson; Lutzoni, 2009), de acordo com as recomendações dos fabricantes. As amostras foram purificadas e injetadas no equipamento Sequenciador de DNA 3500XL Genetic Analyzer (Hitachi, Japão). Para análise das sequências foi utilizado software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, EUA). As sequências foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta BLASTN “Basic Local Alignment Search Tools” (Altschul et al., 1997).

Produção de exopolissacarídeos (EPS)

A avaliação da capacidade de produção de EPS pelos microrganismos foi realizada de acordo com Paulo et al. (2012). Brevemente, discos de papel filtro de 5 mm de diâmetro foram colocados em placas de Petri contendo o meio de cultura modificado de Guimarães et al. (1999) e inoculados com 5 µL da cultura de cada isolado bacteriano crescido em meio TSB. Cinco diferentes isolados foram testados por placa de Petri. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas, e a produção de EPS foi avaliada pela presença de uma colônia mucosa ao redor dos discos. A confirmação da produção de EPS foi realizada pelo método químico, por meio da mistura de uma alça de platina impregnada com a colônia em 2 mL de etanol absoluto, com a formação de

precipitado mucoso para resultado positivo e a presença de turbidez para resultado negativo.

Produção de biofilme

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo método proposto por Christensen et al. (1985) com modificações. Inicialmente, 2 μL de cultura bacteriana (10^8 UFC mL^{-1} ; $\text{OD}_{540\text{nm}} = 1,0$) foram inoculados em 200 μL de meio de cultivo TSB, complementado com glicose 1% (m/v) em microplaca de poliestireno com capacidade para 96 amostras, em triplicada com inclusão de amostra em branco contendo apenas o meio de cultura. As amostras foram incubadas a 30 °C por 40 horas. Após o período de incubação, o líquido foi removido por inversão, cada poço foi lavado com 200 μL de água deionizada, e a placa foi invertida sobre papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 200 μL de metanol em cada amostra para fixação do biofilme eventualmente presente, seguido de incubação em temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, o metanol foi descartado, e a placa foi seca em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 μL de solução de cristal violeta 0,5% (m/v), e as amostras foram incubadas por 15 min. Após remoção da solução por inversão, a placa foi lavada com água deionizada e incubada em temperatura ambiente até secagem. Por fim, foram adicionados 200 μL de etanol absoluto, as amostras foram incubadas por 30 min e foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/VIS (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha) a 570 nm. Foram considerados produtores de biofilme os microrganismos capazes de reter a coloração violeta.

Avaliação qualitativa da produção de sideróforos

Para avaliação da produção de sideróforos, as bactérias foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio ágar nutriente e incubadas a 37 °C por 16 horas. Em seguida, cada placa recebeu uma fina camada do meio Overlay-CAS (Schwyn; Neilands, 1987), seguido de incubação a 25 °C por quatro dias. Foram considerados produtores de sideróforos os microrganismos capazes de promover mudança de coloração no meio de cultura.

Capacidade de fixação de nitrogênio

As bactérias foram avaliadas quanto à capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio em triplicata (Dobereiner, 1989). Tubos contendo 3 mL de meio NFb foram inoculados em triplicata com 10 μ L de cultura bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹; OD_{540nm} = 1,0). Após 10 dias de incubação a 30 °C, foram consideradas positivas aquelas culturas que apresentaram uma película visível de crescimento abaixo da superfície do meio.

Resultados e Discussão

Isolamento e caracterização morfológica das bactérias

A morfologia das bactérias isoladas de amostras de solos da Caatinga foi caracterizada em meio de cultura e por microscopia óptica de contraste de fase (Figura 1). As bactérias apresentaram, em sua maioria, colônia pequena, de forma circular, elevação achatada, bordas e estrutura lisa, opaca, na cor creme e com aspecto viscoso. Ao microscópio, foi possível observar o formato celular de bacilos/bastonetes com formação de endósporos, características de espécies do gênero *Bacillus* (Logan; De Vos, 2009).



Figura 1. Caracterização morfológica de uma cepa bacteriana isolada de solo da região da Caatinga do Estado do Ceará. (A) Aparência das colônias em meio LB e (B) visualização das bactérias ao microscópio óptico de contraste de fase com aumento de 1000 X.

Seleção de bactérias em meio de cultura com baixa atividade de água

De um total de 414 bactérias capazes de crescerem em meio de cultura com baixa atividade de água (405 g L⁻¹ de sorbitol), 28 cresceram na concentração de 520 g L⁻¹, enquanto 17 apresentaram formação de colônias na concentração de 780 g L⁻¹ de sorbitol (Tabela 1). Nos meios de cultura com altas concentrações de sorbitol, estas bactérias apresentaram morfologia da colônia diferente quando comparada com o crescimento nos meios de cultivo LB e TSA, sendo observadas colônias com tamanho médio, com formato irregular, estrutura rugosa, cor creme e elevação protuberante. Segundo Tasaki et al. (2017), os padrões de colônia de *B. subtilis* em superfícies sólidas são muito diversos e podem variar drasticamente em resposta a condições ambientais, como concentração de nutriente e de água.

Tabela 1. Caracterização de microrganismos quanto ao potencial de promoção crescimento vegetal.

Cepa	Crescimento em sorbitol		EPS	Biofilme	Sideróforos (carboxilato)	Fixação de nitrogênio
	520 g L ⁻¹	780 g L ⁻¹				
1.A11	+	-	+	-	+	-
1.C2	+	+	+	+	+	+
1.H1	+	+	+	+	+	+
1.H10	+	+	+	+	+	+
2.A7	+	-	+	+	+	-
2.A8	+	-	+	+	+	-
2.B5	+	-	+	-	+	-
2.B7	+	+	+	-	+	+
2.B8	+	-	+	+	+	+
2.C5	+	+	+	-	+	+
2.C6	+	-	+	+	+	+
2.D7	+	-	+	-	+	-

Cepa	Crescimento em sorbitol		EPS	Biofilme	Sideróforos (carboxilato)	Fixação de nitrogênio
	520 g L ⁻¹	780 g L ⁻¹				
2.E5	+	-	+	+	+	+
2.E7	+	-	+	+	+	+
2.F6	+	+	+	+	+	+
2.F7	+	+	+	-	+	+
2.G5	+	-	+	-	+	+
2.G7	+	-	+	+	+	+
3.C4	+	+	+	+	+	-
3.D4	+	+	+	+	+	+
3.G4	+	+	+	+	+	+
3.H4	+	+	+	+	+	-
5.A6	+	+	+	+	+	-
5.D5	+	+	+	+	+	+
6.C12	+	+	+	+	+	-
6.D3	+	+	+	+	+	-
6.D11	+	+	+	+	+	+
6.E9	+	+	+	+	+	+

* (+) e (-) indicam resultado positivo ou negativo, respectivamente.

Microrganismos capazes de sobreviver em condições de baixa atividade de água são denominados xerotolerantes, sendo encontrados principalmente em ambientes onde são constantemente submetidos a estresse hídrico (Lebre et al., 2017), como aqueles encontrados em regiões áridas do Nordeste brasileiro. Estes microrganismos apresentam potencial como inoculantes, constituindo alternativas para mitigar os efeitos da seca em plantas, pois podem produzir substâncias como EPS e biofilmes que auxiliam as plantas contra a perda de água. Além disso, podem atuar como promotores do crescimento de plantas pela produção de fitormônios, sideróforos, solubilização de fósforo e potássio e fixação de nitrogênio.

Identificação molecular

De acordo com a identificação molecular baseada no sequenciamento do gene *16S rRNA*, as 28 bactérias que cresceram no meio de cultura acrescido de 520 g L⁻¹ de sorbitol pertencem a cinco espécies do gênero *Bacillus*. Todas pertencem à família *Bacillaceae*, que compreende bactérias formadoras de endósporos, o que favorece a sobrevivência das bactérias em condições ambientais desfavoráveis, como calor, radiação e seca (Kavamura et al., 2013).

O gênero *Bacillus* tem sido amplamente estudado e várias espécies são encontradas em ambientes semiáridos, como *B. subtilis* e *B. licheniformis* isolados de regiões desérticas da Índia por Gaur et al. (2012). Tiwari et al. (2017) relataram que uma estirpe de *B. amyloliquefaciens* foi eficiente no controle de fitopatógenos e resistência a estresse hídrico, dentre outros, quando inoculado em sementes de arroz. Kavamura et al. (2013) identificaram 10 espécies de *Bacillus* associadas a cactos na região semiárida do Nordeste brasileiro capazes de crescer em meio com reduzido potencial hídrico. Estas bactérias apresentam potencial de promoção do crescimento de plantas, pois quando inoculadas em milho (*Zea mays*) promoveram aumento significativo da área foliar, comprimento da haste e biomassa seca sob baixa disponibilidade hídrica (Kavamura et al., 2013).

Avaliação de mecanismos associados à promoção de crescimento de plantas

Todos os 28 isolados selecionados em meio de cultura com restrição hídrica foram eficientes na produção de EPS *in vitro* (Tabela 1). EPS são carboidratos de alto peso molecular ligados à superfície externa das bactérias, relacionados à formação de biofilmes e à fixação das células bacterianas em superfícies, incluindo raízes de plantas e partículas do solo. Como os EPS são compostos hidratados, incluindo 97% de água em uma matriz polimérica, eles podem aumentar o crescimento e garantir a sobrevivência das plantas sob estresse hídrico (Vu et al., 2009; Nocker et al., 2012). Além disso, podem proteger a planta contra a dessecação por causa da formação de biofilmes hidrofílicos na superfície da raiz (Rossi et al., 2012). Biofilmes microbianos incluem inúmeras camadas de bactérias de espécies iguais ou

distintas incorporadas em uma matriz de EPS, proteínas, polissacarídeos e ocasionalmente DNA, ligadas aos poros e redes formadas pelas proteínas constituintes da matriz extracelular, que facilitam o fluxo de nutrientes e oxigênio, além de comunicação intercelular (*Quorum sensing*) (Vlamakis et al., 2013; Deng et al., 2015).

Embora EPS seja o principal constituinte do biofilme, dos 28 isolados produtores de EPS deste estudo, 21 também apresentaram produção de biofilme *in vitro* (Tabela 1). Visto que a presença de EPS e de biofilme são estreitamente relacionados, a diferença entre o número de bactérias produtoras desses dois compostos pode ser explicada pela necessidade de outras substâncias estarem presentes para a formação do biofilme, como proteínas extracelulares, ou moléculas relacionadas com a hidrofobia, que o torna mais ou menos solúvel (Vlamakis et al., 2013; Zhang et al., 2015). A produção de EPS por bactérias é importante porque aumenta a permeabilidade e a agregação do solo, mantendo alto potencial de água próximo às raízes (Alami et al., 2000; Selvakumar et al., 2012), o que facilita a difusão de nutrientes e o fluxo de massa de substâncias solúveis, como nitrato e sulfato (Selvakumar et al., 2012), aumentando a absorção pela planta, resultando em tolerância a estresses. Experimentos de inoculação de sementes de milho com cepas bacterianas produtoras de EPS, em combinação com seus respectivos EPS purificados, resultaram em maiores teores de umidade do solo, biomassa das plantas, comprimento das raízes e da parte aérea e a área foliar (Zhang et al., 2015). Sob estresse hídrico, estas plantas inoculadas também apresentaram aumento no conteúdo relativo de água, proteína e açúcar, embora o teor de prolina e as atividades das enzimas antioxidantes tenham diminuído. Rolli et al. (2015) observaram que bactérias produtores de EPS dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* promoveram o crescimento de plantas sob estresse hídrico pela formação de um biofilme hidrofílico ao redor da raiz. Os microambientes fornecidos pelos EPS retêm a água e desidratam mais lentamente que o ambiente circundante, protegendo assim as bactérias e as raízes das plantas contra a dessecação. Alguns estudos sugerem que a capacidade de espécies de *Bacillus* de colonizarem e protegerem as raízes de plantas contra fitopatógenos está diretamente relacionada à habilidade de tais espécies em formar biofilmes *in vitro* (Weng et al., 2013; Chen et al., 2013; Xu et al., 2014; Zhang et al., 2015). Por exemplo, a colonização e proteção de raiz de tomate contra o fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* por

cepas de *B. subtilis* depende da expressão de genes regulatórios e genes requeridos para a produção da matriz de biofilme (Chen et al., 2013).

Todas as 28 cepas selecionadas no presente estudo foram capazes de produzir sideróforos quando cultivadas em meio CAS com pH neutro. Foi observada alteração do meio da cor de azul para amarelo claro (Figura 2), indicando a produção de sideróforos do tipo carboxilato por todas as bactérias avaliadas (Pérez-Miranda et al., 2007). Considerados compostos importantes relacionados à promoção do crescimento de plantas, os sideróforos são definidos como moléculas quelantes, de baixo peso molecular, produzidas por bactérias e fungos, capazes de capturar o Fe^{3+} e disponibilizá-lo para o metabolismo celular da planta. Microrganismos produtores de sideróforos podem facilitar a nutrição de ferro das plantas, pois podem quelar o ferro insolúvel do ambiente e disponibilizá-lo para o crescimento de plantas ao mesmo tempo que privam possíveis fitopatógenos de adquirirem tal nutriente (Ilyas; Bano, 2012). Dentre os benefícios do uso de bactérias produtoras de sideróforos na promoção do crescimento de plantas foi relatada a redução dos sintomas de clorose e aumento do conteúdo de clorofila de plantas de feijão mungo (*Vigna radiata*) inoculadas com *Pseudomonas* e cultivadas em condições limitantes de ferro (Sharma et al., 2003). Em um estudo similar, Vansuyt et al. (2007) mostraram que o sideróforo pioverdina sintetizado por *P. fluorescens* C7 pode facilitar a absorção de ferro e melhorar o crescimento de *Arabidopsis thaliana*. Ghavami et al. (2017) mostraram que a inoculação com rizobactérias produtoras de sideróforos resultou em aumento do peso seco e conteúdo de ferro de raízes e parte aérea de milho e canola em comparação com o controle não inoculado mostrando o papel importante dos sideróforos no fornecimento de ferro para estas plantas.

Dentre as cepas de *Bacillus* avaliadas no presente estudo, cerca de 65% cresceram no meio de cultura NFb semissólido livre de nitrogênio, sugerindo que estas cepas são capazes de fixar N_2 atmosférico. Foi observada também uma mudança da cor do meio de cultura adicionado do indicador de pH, azul de bromotimol, de verde (pH 7,0) para azul (pH acima de 7,6), por causa do aumento do pH causado pela formação de amônio a partir do N_2 atmosférico. O meio semissólido tem sido utilizado no isolamento de microrganismos diazotróficos porque cria um ambiente com baixa tensão de oxigênio, condição apropriada para a enzima nitrogenase, que catalisa a redução do N_2 atmosférico e é sensível a oxigênio (Bhat et al., 2015). A associação com

bactérias fixadoras de nitrogênio, também conhecidas como diazotróficas, é uma importante estratégia que as plantas utilizam para adquirir este nutriente. Estas bactérias podem colonizar a rizosfera e/ou rizoplane de leguminosas ou não leguminosas (Dobereiner, 1992; Aryantha; Hidiyah, 2018), ou serem endofíticas, colonizando o interior das plantas ou outras estruturas como os nódulos nas raízes (Deng et al., 2015) disponibilizando o amônio reduzido para uso pelas plantas. Diferentes espécies de *Bacillus* isoladas da rizosfera têm sido relatadas como eficientes na fixação de nitrogênio (Deng et al., 2015; Kaushal; Kaushal, 2015). Verma et al. (2015) observaram que a atividade de fixação de nitrogênio de espécies de *Bacillus* variou de 10,5 a 98,3 nmol etileno h⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

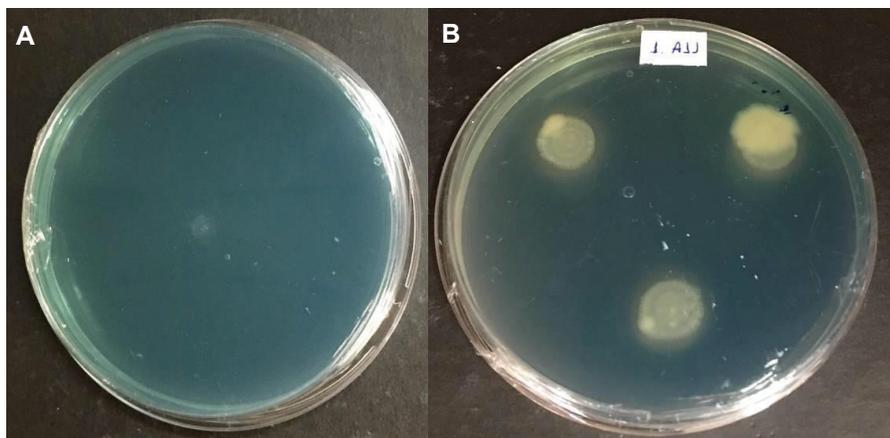


Figura 2. Teste de produção de sideróforos. A) controle negativo; B) Amostra Isolado 1.A11 promoveu alteração de cor do meio de cultura indicando produção de sideróforos (+).

Em suma, algumas cepas de *Bacillus*, como 1.C2, 3.D4, 5.D5, 6.D11 e 6.E9, foram capazes de crescerem em meio de cultura com baixa disponibilidade de água, sendo eficientes na produção de biofilme, EPS, sideróforos e fixação de nitrogênio. Somando aos resultados deste estudo, deve-se levar em conta o fato de que bactérias do gênero *Bacillus* possuem vantagem para a formulação de inoculantes por serem formadoras de endósporos resistentes a estresses ambientais, o que prolonga a vida de prateleira desses insumos (Akinrinlola et al., 2018). Avaliações complementares *in vitro* e em condições de casa de vegetação sob estresse hídrico serão realizadas para validação dessas estirpes como promotoras de crescimento vegetal.

Conclusões

As cepas 1.C2, 3.D4, 5.D5, 6.D11 e 6.E9 são promissoras para a utilização como inoculantes na promoção do crescimento de plantas em ambientes com baixa disponibilidade de água.

Referências

ABREU, C. S.; FIGUEIREDO, J. E.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, V. L. dos; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. A.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, gmr16019294, 2017.

AKINRINLOLA, R. J.; YUEN, G. Y.; DRIJBER, R. A.; ADESEMOYE, A. O. Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by *in vitro* physiological traits. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, article, 5686874, 2018.

ALAMI, Y.; ACHOUAK, W.; MAROL, C.; HEULIN, T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3393-3398, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.

ARYANTHA, I. N. P.; HIDIYAH, A. R. M. Colonization and performance of diazotroph endophytic bacteria on palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq L.) leaves. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 166, article ID012012, 2018.

BHAT, T. A.; AHMAD, D.; GANAI, M. A.; KHAN, O. A. Nitrogen fixing biofertilizers; mechanism and growth promotion: a review. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 1675-1690, 2015.

BHATTACHARYYA, D.; GARLADINNE, M.; LEE, Y. H. Volatile indole produced by rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 158-168, 2015.

CALVO, P.; WATTS, D. B.; KLOEPPER, J. W.; TORBERT, H. A. Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, n. 1, p. 56-70, 2017.

CARMINATI, A.; SCHNEIDER, C. L.; MORADI, A. B.; ZAREBANADKOUKI, M.; VETTERLEIN, D.; VOGEL, H.-J.; HILDEBRANDT, A.; WELLER, U.; SCHÜLER, L.; OSWALD, S. E. How the rhizosphere may favor water availability to roots. **Vadose Zone Journal**, v. 10, n. 3, p. 988-998, 2011.

CHEN, Y.; YAN, F.; CHAI, Y. R.; LIU, H. X.; KOLTER, R.; LOSICK, R.; GUO, J. H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 848-864, 2013.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSONVW, A.; YONGER, J. J.; BADDOR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

DENG, J.; ORNER, E. P.; CHAU, J. F.; ANDERSON, E. M.; KADILAK, A. L.; RUBINSTEIN, R. L.; BOUCHILLON, G. M.; GOODWIN, R. A.; GAGE, D. J.; SHOR, L. M. Synergistic effects of soil microstructure and bacterial EPS on drying rate in emulated soil micromodels. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 116-124, 2015.

DOBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 207-212, 1989.

DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with nonleguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, n. 1/3, p. 1-13, 1992.

GAUR, D.; JAIN, P. K.; BAJPAI, V. Production of extracellular α -amylase by thermophilic *Bacillus* sp. isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan,

India. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 5, p. 675-684, 2012.

GHAVAMI, N.; ALIKHANI, H. A.; POURBABAEI, A. A.; BESHARATI, H. Effects of two new siderophore producing rhizobacteria on growth and iron content of maize and canola plants. **Journal of Plant Nutrition**, v 40, n. 5, p. 736-746, 2017.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Hindawi Publishing Corporation, Scientifica**, article ID 963401, 2012.

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

HERNÁNDEZ-LEÓN, R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M. A. del C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; REYES-DELACRUZ, H.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v. 81, p. 83-92, 2015.

HODKINSON, B. P.; LUTZONI, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the *Rhizobiales*. **Symbiosis**, v. 49, n. 3, p. 163-180, 2009.

ILYAS, N.; BANO, A. Potential use of soil microbial community in agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in agrobiolgy**: plant probiotics. Berlin: Springer, 2012. p. 45-64.

KAUSHAL, M.; KAUSHAL, R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 221-227, 2015.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L. da; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCHI, D. Z.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. de. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acids techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley, 1991. p. 115-148.

LEBRE, P. H.; MAAYER, P. D.; COWAN, D. A. Xerotolerant bacteria: surviving through a dry spell. **Nature Reviews, Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 285-296, 2017.

LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; ADAM, A.; GUEZ, J. S.; WATHELET, B.; ONGENA, M.; JACQUES, P. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4577-4584, 2005.

LI, X.; YUAN, Y. Settling velocities and permeabilities of microbial aggregates. **Water Research**, v. 36, p. 3110-3120, 2002.

LIM, S. M.; YOON, M.-Y.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. J.; JANG, K. S.; SHIN, T. S.; PARK, H. W.; YU, N. H.; KIM, Y. H.; KIM, J.-C. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. **The Plant Pathology Journal**, v. 33, n. 5, p. 488-498, 2017.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. **Bergey's manual of systematic bacteriology: the Firmicutes**. 2nd ed. New York: Springer, 2009. v. 3, p. 21-128.

MARTÍNEZ-ABSALÓN, S.; ROJAS-SOLÍS, D.; HERNÁNDEZ-LEÓN, R.; PRIETO-BARAJAS, C.; OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; SAKUDA, S.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 12, p. 1349-1362, 2014.

NOCKER, A.; FERNÁNDEZ, P. S.; MONTIJN, R.; SCHUREN, F. Effect of air drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 2, p. 86-95, 2012.

OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; ROCHA-GRANADOS, M. del C.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological Research**, v. 208, p. 25-31, 2018.

PAULO, E. M.; VASCONCELOS, M. P.; OLIVEIRA, I. S.; AFFE, H. M. J.; NASCIMENTO, R.; MELO, I. S.; ROQUE, M. R. A.; ASSIS, S. A. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 4, p. 710-714, 2012.

PÉREZ-FLORES, P.; VALENCIA-CANTERO, E.; ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J.; PELAGIO-FLORES, R.; LÓPEZ-BUCIO, J.; GARCÍA-JUÁREZ, P.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. **Protoplasma**, v. 254, n. 6, p. 2201-2213, 2017.

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, R.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; FERNÁNDEZ, F. J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 127-131, 2007.

ROLLI, E.; MARASCO, R.; VIGANI, G.; ETTOUMI, B.; MAPELLI, F.; DEANGELIS, M. L.; GANDOLFI, C.; CASATI, E.; PREVITALI, F.; GERBINO, R.; PIEROTTI, C. F.; BORIN, S.; SORLINI, C.; ZOCCHI, G.; DAFFONCHIO, D. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 316-331, 2015.

ROSSI, F.; POTRAFKA, R. M.; PICHEL, F. G.; DE PHILIPPIS, R. The role of the exopolysaccharides in enhancing hydraulic conductivity of biological soil crusts. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 46, p. 33-40, 2012.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. A. del C.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 855-872, 2012.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. A. del C.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analitical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SELVAKUMAR, G.; PANNEERSELVAM, P.; GANESHAMURTHY, A. N. Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in agrobiolgy**: stress management. Berlin: Springer-Verlag, 2012. p. 205-224.

SHARMA, A.; JOHRIA, B. N.; SHARMA, A. K.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 887-894, 2003.

TASAKI, S.; NAKAYAMA, M.; SHOJI, W. Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. **Development Growth and Differentiation**, v. 59, n. 5, p. 369-378, 2017.

TIWARI, S.; PRASAD, V.; CHAUHAN, O. S.; LATA, C. *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1510, 2017.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999.

VANSUYT, G.; ROBIN, A.; BRIAT, J.-F.; CURIE, C.; LEMANCEAU, P. Iron acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 441-447, 2007.

VERMA, P.; YADAV, A. N.; KHANNAM, K. S.; PANJIAR, N.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; SUMAN, A. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1885-1899, 2015.

VLAMAKIS, H.; CHAI, Y.; BEAUREGARD, P.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 157-168, 2013.

VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13-24, 2016.

XU, Z. H.; ZHANG, R. F.; WANG, D. D.; QIU, M. H.; FENG, H. C.; ZHANG, N.; SHEN, Q. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation. **Applied and Environment Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 2941-2950, 2014.

WENG, J.; WANG, Y.; LI, J.; SHEN, Q. R.; ZHANG, R. F. Enhanced root colonization and biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by *abrB* gene disruption. **Applied Microbiology**, v. 97, n. 19, p. 8823-8830, 2013.

ZHANG, N.; YANG, D.; WANG, D.; MIAO, Y.; SHAO, J.; ZHOU, X.; XU, Z.; LI, Q.; FENG, H.; LI, S.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. **BMC Genomics**, v. 16, p. 685, 2015.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

