

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Jacqueline Meyer

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACILOS PROMOTORES DO  
CRESCIMENTO VEGETAL DE ARROZ CULTIVADO EM SOLO COM EXCESSO  
DE FERRO

Porto Alegre  
2013

JACQUELINE MEYER

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACIOS PROMOTORES DO  
CRESCIMENTO VEGETAL DE ARROZ CULTIVADO EM SOLO COM EXCESSO  
DE FERRO

Trabalho de Conclusão apresentado como  
requisito para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane M. P.  
Passaglia

Coorientação: Doutoranda Rocheli de Souza

Porto Alegre  
2013

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio durante a graduação.

À professora Luciane Passaglia pela oportunidade e pela orientação.

À Rocheli de Souza pela coorientação e, principalmente, por todos os ensinamentos.

A todos os colegas e amigos do Núcleo de Microbiologia Agrícola do Departamento de Genética.

A todos os amigos da Biologia por esses quatro anos de companhia e amizade.

À Dr<sup>a</sup>. Anelise Beneduzi e à professora Sueli Teresinha Van Der Sand por aceitarem o convite para fazer parte da banca examinadora.

Às instituições financiadoras e apoiadoras deste trabalho (PROPESQ/UFRGS, FAPERGS, INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio e IRGA - Rodrigo Schoenfeld).

## RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz e o RS é o maior produtor brasileiro. O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, porém o alagamento do solo promove a solubilização do ferro, podendo o acúmulo de  $Fe^{2+}$  na solução do solo atingir níveis tóxicos ao arroz. Têm-se procurado novas tecnologias que visam o aumento de produtividade, a melhoria da qualidade e a rentabilidade no cultivo dessa gramínea. Uma das alternativas para o aumento da produção é a utilização de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Muitas espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* são conhecidas por promoverem o crescimento das plantas e minimizar os efeitos de estresses bióticos e abióticos. Os bacilos são capazes de auxiliar no desenvolvimento das plantas através da solubilização de minerais, produção de hormônios, fixação de nitrogênio e síntese de sideróforos. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a caracterização de bacilos associados ao solo rizosférico de cultivares de arroz com diferentes níveis de resistência ao excesso de ferro. Foram coletadas amostras de solo rizosférico de duas cultivares de arroz, uma sensível e outra resistente ao excesso de ferro, em duas regiões: Camaquã (solo com excesso de ferro) e Cachoeirinha (controle). A obtenção de bacilos diazotróficos promotores de crescimento vegetal ocorreu por meio da inoculação em meio de cultura semi-seletivo (meio Tiamina-Biotina - TB) sem nitrogênio. Foram isolados 85 bacilos, dos quais 78 produziram compostos indólicos, quatro solubilizaram fosfato, um produziu sideróforo, quatro metabolizaram ACC e 71 apresentaram atividade da enzima catalase. Através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, identificou-se 21 espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*. Os cinco isolados que apresentaram diferentes características promotoras do crescimento vegetal foram avaliados em experimento em câmara de crescimento, utilizando sementes de arroz da cultivar sensível ao excesso de ferro. As plantas expostas ao excesso de ferro apresentaram, em geral, redução no crescimento, em comparação às condições controle (sem excesso de ferro). Porém, plantas inoculadas com o isolado FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*) apresentaram crescimento similar às condições controle, indicando que este isolado teve um efeito positivo na tolerância das plantas ao excesso de ferro.

Palavras-chave: *Bacillus*, *Paenibacillus*, arroz, toxidez por ferro, promoção do crescimento vegetal

## ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important crops for human nutrition. It's the food base for more than three billion people in the world. Brazil is among the top ten rice producers and the RS is the largest producer in Brazil. Iron is an essential micronutrient for plants, but the flooding of the soil promotes its solubilization causing the accumulation of  $Fe^{+2}$  in soil solution, that can reach toxic levels to rice. New technologies are being developed to increase rice productivity, improving the quality and profitability in the cultivation of this grass. One of the alternatives to increase rice production is the use of plant-growth-promoting rhizobacteria. Many species of *Bacillus* and *Paenibacillus* are known to promote plant growth and to minimize biotic and abiotic stresses. These bacilli are able to assist the development of plants through the solubilization of minerals, production of hormones, nitrogen fixation, and synthesis of siderophores. The aim of this work was the isolation and characterization of bacilli associated with rhizospheric soil of rice cultivars that present different levels of iron resistance. Samples of rhizospheric soil of rice were collected from two cultivars (sensitive and resistant to iron toxicity) in two regions: Camaquã (soil with iron excess) and Cachoeirinha (control). Plant growth promoting bacilli were obtained by the inoculation on semi-selective culture medium (TB N-free). A total of 85 isolates were obtained and most of them produced indolic compounds (78). Phosphate solubilization was observed in four isolates, one was able to produce siderophores, four presented the ability to metabolize ACC, and 71 presented catalase enzyme activity. Through 16S rRNA partial gene sequencing, 21 species belonging to the genera *Bacillus* and *Paenibacillus* were identified. The five isolates that presented different plant growth promoting characteristics were evaluated in a growth chamber assay. Plants exposed to excess of iron showed, in general, reduction in their growth, compared to control conditions. However, plants inoculated with isolate FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*) presented growth similar to control conditions, indicating that this isolate had a positive effect on plant tolerance to iron excess.

Keywords: *Bacillus*, *Paenibacillus*, rice, iron toxicity, plant growth promotion

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	7
1.1 Arroz .....	7
1.2 Efeitos do ferro nas plantas .....	7
1.3 Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal .....	8
1.4 Bacilos Gram-positivos produtores de endósporos .....	10
2 OBJETIVOS.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 Coleta do solo rizosférico .....	13
3.2 Obtenção dos isolados .....	14
3.3 Extração de DNA total .....	14
3.4 Identificação dos isolados .....	15
3.5 Avaliação de características promotoras de crescimento vegetal .....	15
3.6 Avaliação da diversidade metabólica bacteriana .....	17
3.7 Avaliação da promoção de crescimento de arroz em experimento em câmara de crescimento .....	17
3.8 Análise estatística .....	18
4 RESULTADOS .....	19
4.1 Isolamento de bacilos e identificação dos isolados .....	19
4.2 Características promotoras do crescimento vegetal nos isolados .....	21
4.3 Avaliação da diversidade metabólica bacteriana .....	21
4.4 Experimento em câmara de crescimento .....	23
5 DISCUSSÃO .....	26
5.1 Isolamento e diversidade de bacilos .....	26
5.2 Características promotoras do crescimento vegetal nos isolados .....	26
5.3 Diversidade metabólica .....	27
5.4 Experimento em câmara de crescimento .....	28
REFERÊNCIAS .....	30

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Arroz**

O arroz (*Oryza sativa* L.), gramínea pertencente à subfamília Pooideae e família Poaceae, é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo (SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO, 2010). Possui um ótimo balanceamento nutricional, fornecendo 715 kcal per capita por dia, 27% da energia, 20% das proteínas e 3% dos lipídios da dieta da população em países em desenvolvimento, segundo Kennedy et al. (2002). Por ser uma cultura extremamente versátil, se adapta a diferentes condições de solo e clima. Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado (EMBRAPA, 2005b).

O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz e a região Sul é responsável por 60% da produção total deste cereal, sendo o RS o maior produtor brasileiro (EMBRAPA, 2005b). O país, com uma produção anual entre 11 e 13 milhões de toneladas de arroz nas últimas safras, participa com cerca de 82% da produção do Mercosul, seguido pelo Uruguai, Argentina e, por último, o Paraguai, com menos de 1 % do total. Atualmente, o arroz é a cultura com maior potencial de aumento de produção (SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO, 2010). Diante dessa situação, as instituições de pesquisa têm procurado gerar novas tecnologias visando aumento de produtividade, melhoria da qualidade e rentabilidade no cultivo dessa gramínea (EPAMIG, 2004).

### **1.2 Efeitos do ferro nas plantas**

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, participando de processos como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de clorofila (TAIZ & ZEIGER, 2004). No entanto, o alagamento do solo promove a solubilização do ferro, podendo o acúmulo de  $Fe^{2+}$  na solução do solo atingir níveis tóxicos ao arroz (SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO, 2010). Existem dois tipos de toxidez por ferro, a direta e a indireta. A toxidez direta é um excesso de

absorção de  $\text{Fe}^{+2}$ . Essa toxidez é manifestada visualmente através do bronzeamento das folhas, caracterizado como manchas marrons, que se propagam a partir das pontas para a base das folhas, desenvolvendo-se mais rapidamente nas folhas mais velhas (TANAKA et al., 1966). A toxidez indireta ocorre quando a planta, durante a respiração, elimina oxigênio através das raízes e há a reoxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  (mais solúvel) em  $\text{Fe}^{+3}$  (pouco solúvel) (KNOBLAUCH & REIS, 2004). De acordo com Knoblauch & Reis (2004), esse ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) que precipita sobre as raízes bloqueia a absorção de outros elementos, como cálcio, magnésio, fósforo, potássio, nitrogênio e zinco. Os sintomas causados pela toxidez indireta são o atrofiamento da planta, a redução do perfilhamento e o alaranjamento das folhas (FILHO et al., 1994). Já as raízes, quando expostas ao excesso de ferro, são poucas, curtas e grossas, geralmente cobertas por uma camada de óxido de ferro de cor avermelhada (STONE et. al., 2001).

Uma das alternativas que tem sido propostas para se contornar o problema de toxidez por ferro é o melhoramento genético, buscando genótipos de arroz que sejam resistentes ao excesso de ferro. A utilização de cultivares resistentes é a forma mais econômica e eficiente para solucionar o problema (REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2012). Entre as cultivares resistentes está a IRGA 420, lançada pelo Programa de Melhoramento Genético do Instituto Rio Grandense do Arroz em 1999, a qual se caracteriza por apresentar folhas lisas, resistência à toxidez por excesso de ferro no solo e alto potencial de rendimento de grãos. Por outro lado, a cultivar BR-IRGA 409 é considerada sensível ao excesso de ferro. Essa cultivar foi lançada em parceria entre a Embrapa e o IRGA no ano de 1979. Possui ciclo médio e destaca-se pela excelente qualidade de grãos e alta produtividade (REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2012). As folhas de BR-IRGA 409 são curtas, eretas e pilosas e podem apresentar coloração amarelo-alaranjada (sensibilidade à toxicidade por ferro) durante a fase de máximo perfilhamento (EMBRAPA, 2005a).

### **1.3 Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**

Uma das alternativas para o aumento da produção de arroz é o uso de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, conhecidas como PGPRs (do inglês, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Essas bactérias vivem na região do

solo sob influência da raiz (rizosfera) e promovem o crescimento das plantas associadas em uma relação não simbiótica (SOTTERO, 2003). Segundo Badri et. al. (2009), as relações existentes na rizosfera não são dirigidas somente pelas raízes, mas estão altamente integradas com os organismos residentes e com os fatores edáficos como o pH e a umidade.

Esses micro-organismos, além de se beneficiarem dos nutrientes secretados pelas raízes da planta, influenciam-na benéficamente de forma direta ou indireta, resultando na estimulação de seu crescimento (BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001). De acordo com Moreira et al. (2010), essas bactérias podem contribuir para o crescimento vegetal através da fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfatos inorgânicos, síntese de compostos, entre outros.

O nitrogênio está presente na atmosfera em sua forma mais estável ( $N_2$ ). Sua estabilidade é devido à presença de uma forte ligação tríplice, entre as duas moléculas de N. Dessa forma, ele está indisponível para muitos organismos (REIS & TEIXEIRA, 2005). A fixação biológica de nitrogênio é o processo que transforma o  $N_2$  em  $NH_4^+$  biologicamente utilizável. Esse processo é mediado, na natureza, somente por micro-organismos (LINDERMANN & GLOVER, 2003). Isso é possível porque esses micro-organismos possuem a enzima nitrogenase, caracterizada como um complexo enzimático, responsável pela quebra da ligação tríplice usando energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) (REIS & TEIXEIRA, 2005).

As bactérias solubilizadoras de fosfato desempenham um importante papel na disponibilidade de fósforo nos solos. Há fortes evidências de que essas bactérias são capazes de transformar o fósforo do solo nas formas disponíveis para as plantas (KHAN et al., 2009). Essas bactérias solubilizam o fosfato insolúvel através da produção de diversos ácidos orgânicos (KIM et al., 1997). Bactérias pertencentes a diferentes gêneros bacterianos (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* e *Burkholderia*) foram identificadas como capazes de solubilizar compostos fosfatados inorgânicos (KUSS, 2006).

Outro mecanismo de promoção do crescimento vegetal frequentemente citado é a produção de hormônios vegetais por micro-organismos do solo. Entre eles, os compostos indólicos são essenciais para o crescimento da planta e são requeridos para o desenvolvimento normal do vegetal (GEISLER & MURPHY, 2006). Tem-se demonstrado que o aumento da proliferação das raízes está relacionado com a síntese de compostos indólicos por PGPRs (SPAEPEN et al., 2007).

Várias PGPRs podem produzir e secretar moléculas de baixo peso molecular que se ligam ao ferro com uma alta afinidade, denominadas de sideróforos (GRAY & SMITH, 2005). Estas bactérias são capazes de fornecer ferro em quantidade suficiente à planta, quando este composto encontra-se em limitação nos solos. Além disso, a ligação ferro-sideróforo pode impedir a proliferação de patógenos ao redor das raízes devido ao sequestro de ferro do solo, deixando este elemento indisponível para os organismos patogênicos (LEONG, 1986).

Segundo Glick (2012), muitas PGPRs que contêm a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase podem promover uma proteção significativa contra vários estresses abióticos às plantas. Essa enzima pode decompor o ACC produzido pela planta, que é precursor do etileno e, desse modo, baixar o nível de etileno na planta. Altos níveis de etileno afetam de forma negativa o crescimento das raízes e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal como um todo (GLICK, 2005).

#### **1.4 Bacilos Gram-positivos produtores de endósporos**

Os bacilos, isolados neste estudo, são bactérias Gram-positivas em forma de bastonete anaeróbias ou anaeróbias facultativas. De acordo com Driks (2004), uma das características mais bem estudadas nos bacilos é a sua capacidade de formar um tipo de célula dormente altamente resistente ao estresse ambiental, conhecida como endósporo, o que permite que esses organismos possam sobreviver em ambientes bastante diversos, com variação de temperatura, variação de nutrientes e outros estresses. Muitas espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* expressam atividade de supressão de patógenos ou promovem o crescimento vegetal (GARDENER, 2004). De acordo com Govindasamy et al. (2011), o aumento no crescimento e produtividade da planta pela aplicação de *Bacillus* e *Paenibacillus* são mediados por três diferentes mecanismos ecológicos: promoção do crescimento e nutrição da planta, antagonismo contra patógenos e insetos e estimulação dos mecanismos de defesa da planta.

Os bacilos promotores de crescimento vegetal são capazes de auxiliar no desenvolvimento das plantas através da solubilização de minerais, produção de hormônios, fixação de nitrogênio e síntese de sideróforos. Além disso, bacilos podem minimizar os efeitos causados por estresses bióticos e abióticos. Segundo

Grover et al. (2011), bactérias pertencentes a diferentes gêneros, incluindo *Bacillus*, foram relatadas por promover tolerância para a planta sob diferentes estresses abióticos (seca, salinidade e baixas temperaturas).

Espécies do gênero *Bacillus* habitam o solo, rios e águas estuarinas. Os membros do gênero *Paenibacillus* habitam solos, raízes e a rizosfera de diversas plantas (GOVINDASAMY et al., 2011). Existem poucos estudos com bactérias Gram-positivas capazes de promover o crescimento vegetal e minimizar os efeitos de estresses abióticos e bióticos. Segundo Gardener (2004) um maior conhecimento em relação à diversidade e atividade dessas bactérias é importante para a identificação de novas linhagens e para a formulação de inoculantes.

## 2 OBJETIVOS

Caracterizar a diversidade de bacilos promotores de crescimento vegetal do solo rizosférico de diferentes cultivares de arroz, uma resistente e outra sensível ao excesso de ferro.

Avaliar a capacidade das linhagens isoladas quanto à fixação biológica de nitrogênio, produção de fito-hormônios, sideróforos, solubilização de fosfatos, metabolização de ACC, atividade de catalase a diversidade metabólica bacteriana através da utilização de diferentes fontes de carbono.

Eleger as linhagens mais eficientes em termos de características de promoção de crescimento vegetal e testá-las em experimento com arroz em câmara de crescimento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do solo rizosférico

Amostras de solo rizosférico de arroz foram coletadas de duas regiões do Estado do Rio Grande do Sul: Camaquã ( $30^{\circ}54'07.96''\text{S}$ ,  $51^{\circ}51'26.25''\text{W}$ ), que se destaca por apresentar solo com alto teor de ferro e Cachoeirinha ( $29^{\circ}56'51.91''\text{S}$ ,  $51^{\circ}06'46.36''\text{W}$ ), como controle (Figura 1). Em cada região, foram coletadas amostras de duas cultivares: BR-IRGA 409 (suscetível ao excesso de ferro) e IRGA 420 (resistente ao excesso de ferro). As amostras de solo foram analisadas quanto ao pH, conteúdo de argila, fósforo (P), potássio (K), ferro (Fe), alumínio (Al), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e matéria orgânica (MO), através de métodos convencionais (TEDESCO et al., 1995; Tabela 1).

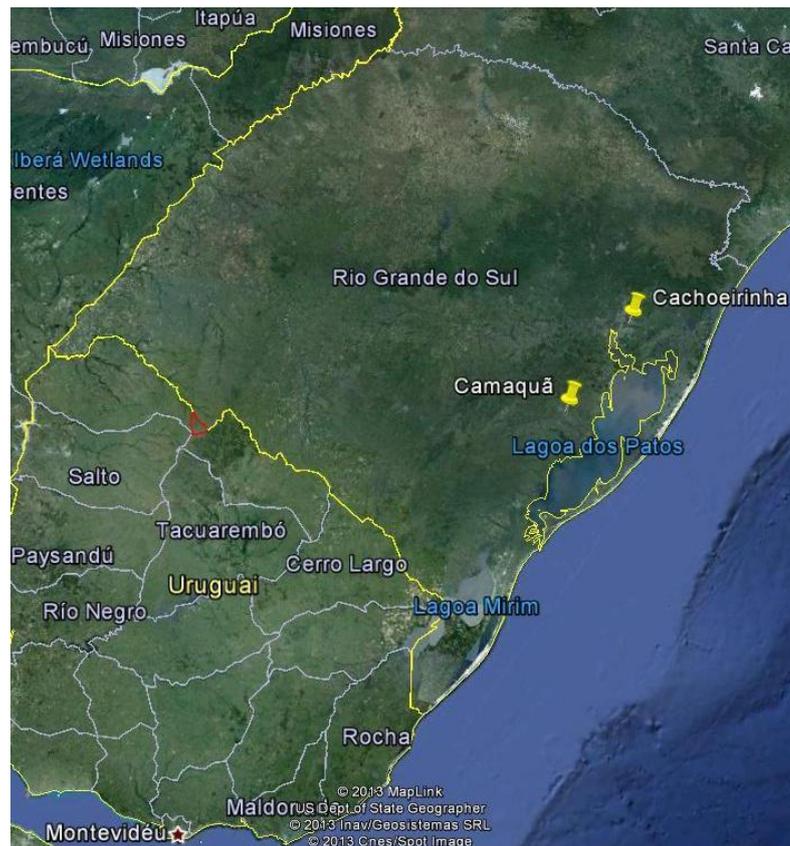


Figura 1: Localização das cidades de Cachoeirinha e Camaquã/RS.

### 3.2 Obtenção dos isolados

O isolamento dos bacilos foi realizado a partir das amostras de solo coletadas nas duas regiões, de acordo com Seldin et al. (1983) e Beneduzi et al. (2008). Dez gramas de solo rizosférico foram suspensas em 90 ml de solução salina 0,85% e mantidas sob agitação à temperatura de 4°C por 4-6 h. Um ml dessa solução foi misturado a nove mL de solução salina estéril. As duas suspensões foram incubadas a 80 °C por 15 minutos para eliminar as células vegetativas e manter somente os endósporos. Posteriormente, foi realizada a inoculação de 100 µl das suspensões em meio de cultura semi-seletivo sem nitrogênio (meio Tiamina-Biotina - TB) por uma semana em condições anaeróbicas a 28°C para o isolamento de bacilos diazotróficos. Após esse período, foi realizada a re-inoculação das colônias em meio TB por mais sete dias em condições anaeróbicas. As colônias isoladas foram transferidas para meio líquido (King B - KB) e incubadas a 28 °C por três dias sob agitação. A coloração de Gram foi realizada para verificar a morfologia celular e a pureza da cultura. Por fim, as bactérias foram estocadas em glicerol 50%.

### 3.3 Extração de DNA total

Cada isolado foi inoculado em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio King B e incubados por 48 h sob agitação a 28°C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm. O *pellet* foi ressuspendido em 700 µl de TES (10 mM de Tris pH 8,0, 25 mM de EDTA, 150 mM de NaCl), posteriormente centrifugado e novamente e ressuspendido em 500 µl de TE (10 mM de Tris pH 8,0, 25 mM de EDTA). As células foram lisadas com 20 mg/ml de lisozima e incubadas a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 108 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e 20 mg/ml de proteinase K e a solução foi incubada a 56 °C por 15 minutos. À solução adicionou-se 200 µl de acetato de amônio (8 M, pH 8,0) e as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos para posterior centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. A extração com fenol-clorofórmio e a precipitação com etanol foram realizadas de acordo com Sambrook & Russel (2001). A concentração e a integridade do DNA foram conferidas utilizando eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

### 3.4 Identificação dos isolados

A identificação dos bacilos em nível de espécie foi realizada através de PCR do gene 16S rRNA (aproximadamente 1.500 pares de bases) com os oligonucleotídeos iniciadores: BacPaeF (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (STACKEBRANDT & LIESACK, 1993) e Bac1542R (AGAAAGGAGGTGATCCAGCC) (EDWARDS et al., 1989). A amplificação foi realizada em termociclador, de acordo com Garbeva et al. (2003). Cada reação continha 25 µl: 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 0,3 µM de cada primer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2 U de Taq polimerase (Invitrogen®). O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV. As amostras foram enviadas para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (aproximadamente 650 pares de bases). As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do servidor EZTAXON versão 2.1 (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>).

Após a identificação dos indivíduos, calculou-se, no software PAST, o índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) para cada amostra de solo, com base no número total de indivíduos e no número de indivíduos de cada espécie presentes em cada uma das amostras.

### 3.5 Avaliação de características promotoras de crescimento vegetal

Os isolados foram avaliados, por meio de testes *in vitro*, quanto à capacidade de produção de compostos indólicos (CI), sideróforos, solubilização de fosfatos, fixação biológica de nitrogênio, metabolização de ACC e atividade da enzima catalase.

A produção de compostos indólicos foi realizada de acordo com Glickmann & Dessaux (1995). Para tanto, os isolados foram inoculados em meio KB com triptofano. Após 72 h de incubação a 28°C sob agitação, as culturas foram centrifugadas e 100 µl de sobrenadante foram misturados com 100 µl do reagente de Salkowski (FeCl<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A mistura foi deixada em temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro, e avaliada ao final desse período. Os isolados que produziram uma coloração rosa-avermelhada foram considerados produtores de compostos indólicos. A intensidade da cor foi medida em leitor de microplacas com

absorvância de 520 nm, utilizando a curva padrão de acordo com Sarwar & Kremer (1992).

Para o teste de produção de sideróforos, utilizou-se o protocolo de Schwyn & Neilands (1987). Cinco  $\mu\text{l}$  da cultura bacteriana foram inoculados em placas de Petri contendo meio KB com cromoazurol S. As bactérias que contêm fortes quelantes são capazes de se multiplicar devido à remoção do ferro complexado ao corante. Os isolados que apresentaram formação de colônias envoltas por halos claros foram considerados produtores de sideróforos.

O método descrito por Sylvester-Bradley et al. (1982) e Ambrosini et al. (2012) foi utilizado para a avaliação da capacidade dos isolados em solubilizar fosfatos. As bactérias foram inoculadas em meio Garen-Levinthal (GL) acrescido de duas soluções estéreis:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{CaCl}_2$ . A adição de fosfato insolúvel ( $\text{CaPO}_4$ ) torna o meio turvo. Os micro-organismos capazes de solubilizar esse fosfato produzem halo claro ao redor de suas colônias.

A atividade de ACC deaminase foi avaliada através da capacidade dos isolados em utilizar o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como fonte de nitrogênio. Para tanto, utilizou-se o procedimento descrito por Penrose & Glick (2003) e Souza et al. (2012). As bactérias foram inoculadas em meio KB e deixadas sob agitação a  $28^\circ\text{C}$ . Após o crescimento, as colônias foram centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos e lavadas três vezes com solução salina 0,85% estéril. Posteriormente, 2  $\mu\text{l}$  da cultura foram inoculados em duas placas de Petri com meio Dworkin-Foster (DF) Salts, uma contendo somente o meio de cultura (controle) e outra contendo 50  $\mu\text{l}$  de ACC ( $C_f$  1 mM) adicionados ao meio. As placas foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  por aproximadamente 5 dias e as colônias que apresentaram melhor desenvolvimento no meio com ACC, em comparação ao controle, utilizaram o ACC como fonte de nitrogênio.

Para o teste da catalase, as bactérias foram inoculadas em meio Luria - Bertani (LB). Após dois dias de crescimento a  $28^\circ\text{C}$ , foi adicionado 40  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrogênio 3% às colônias. As bactérias que contêm a enzima catalase quebram o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A liberação de oxigênio leva à formação de bolhas, indicando positividade para o teste.

Os cinco isolados selecionados para o experimento em câmara de crescimento foram avaliados quanto à capacidade de fixação biológica de N, de acordo com Boddey (1987) e Ambrosini et al. (2012). As bactérias foram inoculadas

em meio TBNR e deixadas em estufa a 28°C por aproximadamente por 48 h ou até a película atingir a superfície do meio. Adicionou-se 0,5 mL de acetileno em cada vidro e deixou-se a 28°C por 24 h. Mediu-se atividade da enzima nitrogenase de cada isolado, através da redução de acetileno a etileno (ARA). As concentrações de etileno formado e acetileno foram determinadas por cromatografia gasosa.

### **3.6 Avaliação da diversidade metabólica bacteriana**

Biolog Ecoplates (Biolog, Hayward, EUA) foram utilizadas para avaliar a diversidade metabólica bacteriana em cada uma das quatro amostras de solo com base no padrão de utilização de carbono pelos micro-organismos dessas amostras. As placas são compostas por três repetições de 31 substratos de carbono diferentes (ácidos carboxílicos, carboidratos polímeros, aminoácidos e amidas). As amostras de solo foram diluídas e deixadas para decantação por 2 h. Em seguida, 120 µl das suspensões de solo foram adicionados em cada um dos poços da placa (total de 96 poços). O crescimento microbiano é indicado pela reação de coloração com violeta de tetrazólio, a qual foi avaliada em espectrofotometro a 590 nm. A utilização de carbono foi determinada através da equação  $WE = 100 (WA - W0) / W0$  (IBEKWE & KENNEDY, 1998), onde WE é o índice de desenvolvimento da cor, WA é a absorvância em cada poço e W0 é a absorvância em um tratamento controle. Índices de crescimento (WE) superiores a 100 foram considerados positivos para utilização de carbono. Construiu-se uma matriz binária para diferenciar a utilização das fontes de carbono em cada amostra de solo e determinou-se o índice de diversidade de Shannon ( $H^M$ , SHANNON & WEAVER, 1949).

### **3.7 Avaliação da promoção de crescimento de arroz em experimento em câmara de crescimento**

As linhagens que apresentaram diferentes características de promoção de crescimento vegetal foram testadas em experimento em câmara de crescimento. As unidades experimentais foram compostas de copos plásticos de 500 ml. Sementes de arroz (BR-IRGA 409) foram desinfestadas com álcool 70% por 2 min, com solução de hipoclorito de sódio (4%, v/v) por 5 min e, em seguida, foram feitas cinco lavagens com água destilada estéril. Os isolados foram multiplicados em meio KB

líquido sob agitação a 28°C, sendo que, as culturas bacterianas puras foram centrifugadas e suspendidas em solução salina (0,85%) estéril até obter a concentração final de  $10^8$  UFC/mL. As sementes foram inoculadas com 10 mL dos diferentes isolados por 30 min. Posteriormente, foram plantadas em vermiculita autoclavada, 2 cm abaixo da superfície e irrigadas com solução nutritiva. Utilizou-se a solução nutritiva de Yoshida (YOSHIDA, 1981) com as seguintes modificações: KCl 0,1 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mM,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,7mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1mM,  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM e micronutrientes. Após a emergência, as plantas foram mantidas nessas condições por mais 12 dias. Em seguida, as plantas foram transferidas para o cultivo em hidroponia. Cada copo recebeu duas plantas, que foram mantidas em condições controle (somente solução nutritiva) por 12 dias. Após esse período, as plantas foram submetidas a dois tratamentos: (1) excesso de ferro (500 mg/L de Fe); e (2) controle (6,5 mg/L de Fe), ambas utilizando  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  como fonte de ferro. As soluções foram trocadas a cada três dias. Após 9 dias, avaliou-se a estatura da parte aérea, a massa seca (5 dias a 65°C) e a quantidade de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nas folhas.

### 3.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados do experimento em câmara de crescimento foi realizada através da ANOVA e as médias foram comparadas com o teste de Tukey ( $P = 0,05\%$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento de bacilos e identificação dos isolados

Em cada região, foram feitas coletas de duas cultivares de arroz. Em Camaquã (local com excesso de ferro), coletou-se solo rizosférico da cultivar resistente ao ferro (IRGA 420), denominada como FeR, e solo rizosférico da cultivar sensível ao ferro (BR-IRGA 409), denominada como FeS. Em Cachoeirinha (local sem excesso de ferro) as amostras foram de solo rizosférico da cultivar resistente ao ferro (IRGA 420), denominada como CaR, e solo rizosférico da cultivar sensível ao ferro (BR-IRGA 409), denominada como CaS.

A análise química dos solos apontou baixo pH para todas as amostras. O solo de Cachoeirinha apresentou maior conteúdo de matéria orgânica e de P e menores valores de pH e ferro, quando comparado com o solo coletado na região de Camaquã (Tabela 1).

Um total de 85 bacilos com diferentes características promotoras de crescimento vegetal foi obtido (Tabelas 2 e 3).

Através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, identificou-se 21 espécies, pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* (Tabela 2). A espécie *Paenibacillus zanthoxyli* foi encontrada nas quatro amostras, sendo uma das espécies mais abundantes, juntamente com *Paenibacillus durus* e *Bacillus aryabhatai*.

Muitas espécies, como *B. acidiceler*, *B. bataviensis*, *B. drentensis*, *P. borealis*, *P. cineris*, *P. jamilae*, *P. massiliensis*, *P. oceanisediminis*, *P. odorifer*, *P. pabuli*, *P. panacisoli* e *P. telluris* somente foram encontradas na região de Cachoeirinha na amostra proveniente da cultivar sensível ao excesso de ferro (CaS).

A região de Cachoeirinha apresentou a maior riqueza de espécies e os maiores índices de diversidade, sendo  $H' = 2,470$  para a cultivar sensível e  $H' = 1,534$  para a cultivar resistente. A menor diversidade foi encontrada na cultivar sensível da região de Camaquã ( $H' = 1,091$ ); já a cultivar resistente apresentou um  $H'$  de 1,213 nessa região (Tabela 2).

**Tabela 1:** Características abióticas dos solos amostrados.

Amostras de solo <sup>a</sup>	Argila (%)	MO (%)	pH (H <sub>2</sub> O)	P (mg/dm <sup>3</sup> )	K (mg/dm <sup>3</sup> )	Fe (%)	Ca (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	Mg (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )
CaR	28	3,0	4,8	9,0	43,0	0,18	2,7	0,5	1,0
CaS	28	3,0	4,7	22,2	73,0	0,15	2,7	0,4	1,0
FeR	24	1,1	5,4	0,9	54,0	0,25	2,1	0,4	1,3
FeS	25	1,1	5,5	0,9	57,0	0,35	2,4	0,4	1,6

<sup>a</sup> FeR, cultivar resistente ao excesso de ferro (Camaquã); FeS, cultivar sensível ao excesso de ferro (Camaquã); CaR, cultivar resistente ao excesso de ferro (Cachoeirinha); CaS, cultivar sensível ao excesso de ferro (Cachoeirinha); MO = conteúdo de matéria orgânica

**Tabela 2:** Espécies de bacilos encontradas nas regiões de estudo.

Espécie	Cachoeirinha <sup>a</sup>		Camaquã <sup>a</sup>		Total
	CaR	CaS	FeR	FeS	
<i>Bacillus acidiceler</i>	-	1	-	-	1
<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	7	3	-	10
<i>Bacillus bataviensis</i>	-	1	-	-	1
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	1	1
<i>Bacillus drentensis</i>	-	1	-	-	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	-	-	-	1
<i>P. barcinonensis</i>	-	2	-	1	3
<i>Paenibacillus borealis</i>	-	2	-	-	2
<i>Paenibacillus cineris</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus durus</i>	5	-	6	5	16
<i>Paenibacillus jamilae</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus massiliensis</i>	-	1	-	-	1
<i>P. oceanisediminis</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus odorifer</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus pabuli</i>	-	5	-	-	5
<i>Paenibacillus panacisoli</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus sabinae</i>	1	-	-	-	1
<i>Paenibacillus sonchi</i>	1	5	-	-	6
<i>Paenibacillus telluris</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus wynnii</i>	3	-	2	-	5
<i>Paenibacillus zanthoxyli</i>	6	2	10	7	25
H'	1,534	2,47	1,213	1,091	-
Total	17	33	21	14	85

<sup>a</sup> FeR, cultivar resistente ao excesso de ferro; FeS, cultivar sensível ao excesso de ferro; CaR, cultivar resistente ao excesso de ferro; CaS, cultivar sensível ao excesso de ferro;

## 4.2 Características promotoras do crescimento vegetal nos isolados

Todos os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produção de sideróforos e compostos indólicos (CI), solubilização de fosfato, atividade de catalase e ACC deaminase. A maioria dos isolados produziu CI (n = 78), quatro solubilizaram fosfato e um isolado produziu sideróforos. Além disso, quatro metabolizaram ACC e 71 apresentaram atividade da enzima catalase (Tabela 3). O único produtor de sideróforos foi encontrado na região de Cachoeirinha, bem como o maior número de produtores de compostos indólicos (n = 50). Por outro lado, a região de Camaquã apresentou um maior número de solubilizadores de fosfato (n = 3) e de organismos com atividade da enzima ACC deaminase (n = 3).

**Tabela 3:** Características promotoras do crescimento vegetal nos isolados bacterianos analisados.

Local <sup>a</sup>	Número de isolados	Síntese de sideróforos	Solubilização de fosfato	Produção de CI 0,1-50 (µg/mL)	Atividade ACC deaminase	Atividade de Catalase
CaR	17	0	0	17	0	15
CaS	33	1	1	33	1	21
FeR	21	0	0	21	0	21
FeS	14	0	3	7	3	14
Total	85	1	4	78	4	71

<sup>a</sup> FeR, cultivar resistente ao excesso de ferro (Camaquã); FeS, cultivar sensível ao excesso de ferro (Camaquã); CaR, cultivar resistente ao excesso de ferro (Cachoeirinha); CaS, cultivar sensível ao excesso de ferro (Cachoeirinha);

## 4.3 Avaliação da diversidade metabólica bacteriana

A análise da diversidade metabólica demonstrou que as bactérias utilizaram diferentes fontes de carbono (Tabela 4). A comunidade bacteriana de todas as amostras utilizou L-arginina, ácido pirúvico de éster metílico, ácido D-galacturônico, L-asparagina, Tween 40, L-fenilalanina, tween 80, D-manitol, ácido 4-hidroxibenzóico, L-treonina, glicogênio, ácido D-Glucosaminico, ácido itacônico, D-celobiose, feniletilamina, ácido D-málico e putrescina. Entretanto, nenhuma delas consumiu glicose-1-fosfato e ácido glicil-L-glutâmico. Somente as bactérias da região de Cachoeirinha utilizaram β-metil-D-glicosídeo e ácido 2-hidroxibenzoico. Já o ácido γ-hidroxibutírico foi utilizado apenas pela comunidade bacteriana da cultivar

sensível das duas regiões. O ácido  $\alpha$ -cetobutírico foi utilizado somente pelas bactérias presentes no solo da cultivar resistente da região de Camaquã.

Os valores de diversidade de Shannon ( $H^M$ , Tabela 4) obtidos demonstraram que a comunidade microbiana presente no solo rizosférico da cultivar sensível ao excesso de ferro da região de Cachoeirinha (CaS) apresentou o maior índice de diversidade metabólica ( $H^M = 3,332$ ), seguido pela região de Camaquã e pela cultivar resistente de Cachoeirinha.

**Tabela 4:** Fontes de carbono utilizadas pelas comunidades bacterianas das diferentes amostras de solo.

Fontes de carbono	Cachoeirinha <sup>a</sup>		Camaquã <sup>a</sup>	
	CaR	CaS	FeR	FeS
$\beta$ -metil-D-glicosídeo	X	X	-	-
Ácido D-galacturônico	-	X	X	X
$\gamma$ -Lactona	-	X	X	X
L-arginina	X	X	X	X
Ácido pirúvico de éster metílico	X	X	X	X
D-xilose	X	X	-	-
L-asparagina	X	X	X	X
Tween 40	X	X	X	X
I-Eritritol	-	X	X	X
Ácido 2-hidroxibenzoico	X	X	-	-
L-fenilalanina	X	X	X	X
Tween 80	X	X	X	X
D-manitol	X	X	X	X
Ácido 4-hidroxibenzóico	X	X	X	X
L-serina	-	X	-	-
$\alpha$ -Ciclodextrina	X	X	X	-
N-Acetil-D-Glucosamina	X	X	X	X
Ácido $\gamma$ -hidroxibutírico	-	X	-	X
L-treonina	X	X	X	X
Glicogênio	X	X	X	X
Ácido D-Glucosaminico	X	X	X	X
Ácido itacônico	X	X	X	X
Ácido glicil-L-glutâmico	-	-	-	-
D -celobiose	X	X	X	X
Glicose-1-fosfato	-	-	-	-
Ácido $\alpha$ -cetobutírico	-	-	X	-
Feniletilamina	X	X	X	X
$\alpha$ -D-Lactose	X	X	-	X
D,L- $\alpha$ -Glicerol fosfato	-	X	X	X
Ácido D-málico	X	X	X	X
Putrescina	X	X	X	X
$H^M$	3,045	3,332	3,135	3,135

<sup>a</sup> FeR, cultivar resistente ao excesso de ferro; FeS, cultivar sensível ao excesso de ferro; CaR, cultivar resistente ao excesso de ferro; CaS, cultivar sensível ao excesso de ferro;

#### 4.4 Experimento em câmara de crescimento

Cinco isolados bacterianos foram selecionados, com base em sua identificação taxonômica e diferentes características promotoras de crescimento vegetal (Tabela 5), para o experimento *in vivo* em câmara de crescimento. A fixação biológica de nitrogênio foi realizada para estes cinco isolados.

Os isolados foram identificados como CaR114 (*Paenibacillus sonchi*), CaS40 (*Paenibacillus jamilae*), FeR64 (*Bacillus aryabhattai*), FeS24 (*Paenibacillus durus*) e FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*) (Tabela 5).

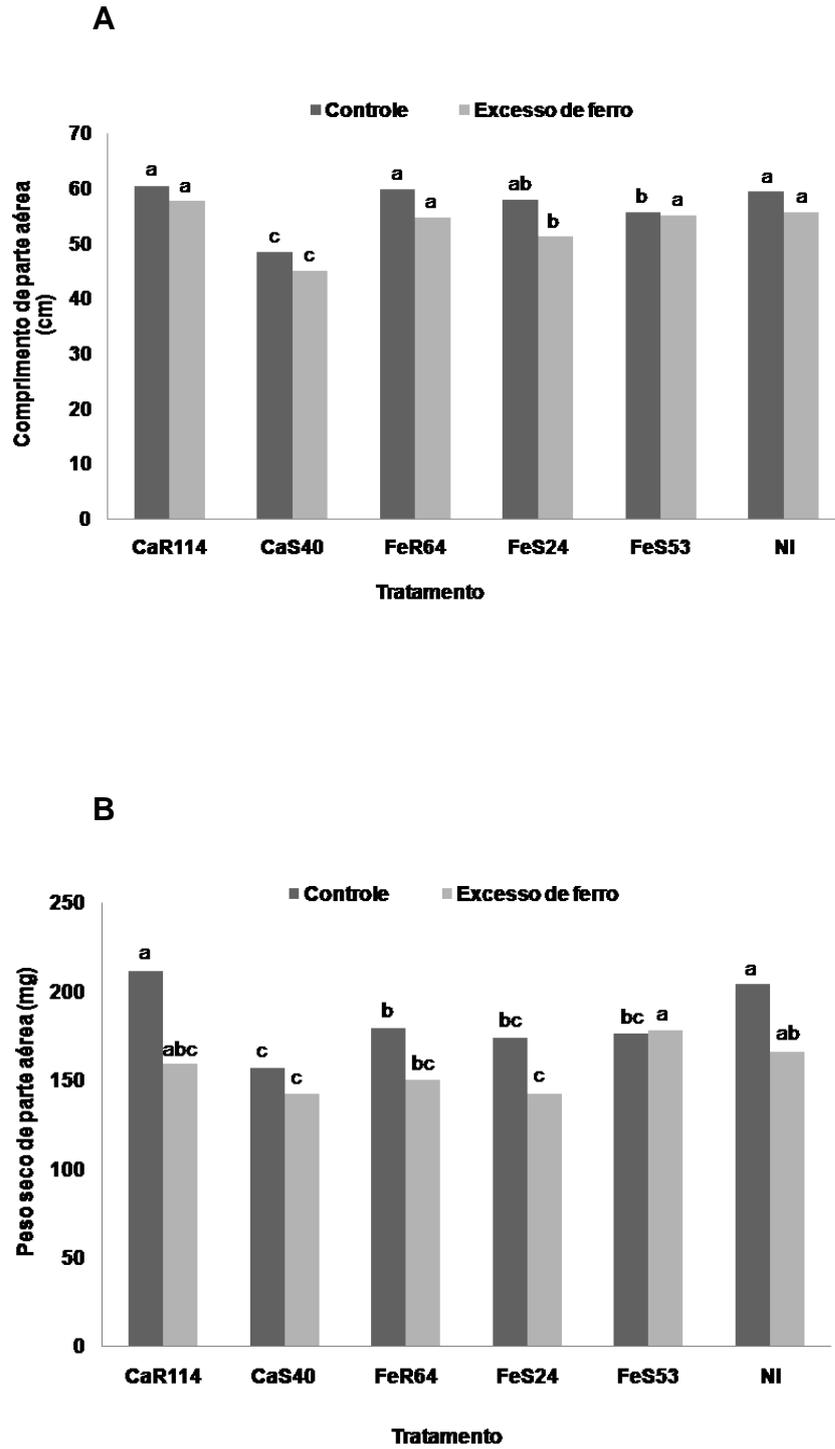
As plantas expostas ao excesso de ferro apresentaram, em geral, menor comprimento e menor peso seco de parte aérea, em comparação às condições controle. Porém, plantas inoculadas com o isolado FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*) apresentaram crescimento e peso seco de parte aérea similares estatisticamente às condições controle, indicando que este isolado teve um efeito positivo na tolerância das plantas ao excesso de ferro.

De acordo com a Figura 2, no tratamento com excesso de ferro, as plantas inoculadas com os isolados CaR114 (*Paenibacillus sonchi*) e FeS53 foram estatisticamente similares às plantas não-inoculadas em relação ao comprimento e peso seco de parte aérea. Entretanto, no tratamento controle ao excesso de ferro, os isolados CaR114 e FeR64 (*Bacillus aryabhattai*), tiveram respostas estatisticamente similares ao controle não-inoculado em relação ao comprimento de parte aérea. Somente o isolado CaR 114 apresentou peso seco similar ao das plantas não inoculadas (Figura 2).

**Tabela 5:** Isolados selecionados para experimento em câmara de crescimento.

Isolado <sup>a</sup>	Espécie	Solubilização de fosfato	Produção de sideróforo	Produção de CI (µg/mL)	ARA		
					(nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> mg proteína/h)	Atividade de ACC deaminase	Atividade de Catalase
FeS53	<i>P. zanthoxyli</i>	-	-	ND	1,45	+	+
FeS24	<i>P. durus</i>	+	-	0,51	4,14	+	+
FeR 64	<i>B. aryabhattai</i>	-	-	3,91	1,89	-	+
CaS40	<i>P. jamilae</i>	-	+	2,95	0,16	-	+
CaR114	<i>P. sonchi</i>	-	-	5,85	259,53	-	+
SBR5	<i>P. riograndensis</i>	ND	ND	ND	501,95	ND	ND

<sup>a</sup> FeR, cultivar resistente ao excesso de ferro (Camaquã); FeS, cultivar sensível ao excesso de ferro (Camaquã); CaR, cultivar resistente ao excesso de ferro (Cachoeirinha); CaS, cultivar sensível ao excesso de ferro (Cachoeirinha); CI = compostos indólicos; ACC = 1-aminociclopropano-1-carboxilato; ARA = atividade de redução de acetileno



**Figura 2:** Respostas de experimentos *in vivo* com isolados selecionados: CaR114 (*Paenibacillus sonchi*); CaS40 (*Paenibacillus jamilae*); FeR64 (*Bacillus aryabhata*); FeS24 (*Paenibacillus durus*); FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*), na promoção de crescimento de arroz comparadas ao controle não-inoculado (NI). A) Comprimento de parte aérea; B) Peso seco de parte aérea.

A capacidade de promoção do crescimento do arroz e indução de tolerância ao excesso de ferro também foram avaliadas através da concentração de nutrientes. Conforme a Tabela 6, em condições de excesso de ferro, todas as plantas tiveram menor taxa de captação de nitrogênio, fósforo e potássio, quando comparadas às condições controle. Porém, plantas inoculadas com o isolado FeS53 (*Paenibacillus zanthoxylī*) apresentaram captação de nitrogênio e potássio, nas condições de excesso de ferro, similares à condição controle de ferro.

No tratamento com excesso de ferro, o isolado FeS53 promoveu aumento na captação de N e K, quando comparado ao controle não-inoculado (NI). Em relação ao conteúdo de P, os isolados CaR114 (*Paenibacillus sonchi*) e FeS53 foram estatisticamente similares ao controle NI (Tabela 6).

Em relação às plantas expostas à condição controle de ferro, o isolado CaR114 apresentou aumento da captação de nitrogênio em relação ao controle não-inoculado. Para a absorção de P e K, este mesmo isolado, apresentou resultados significativamente semelhantes às plantas não inoculadas (Tabela 6).

**Tabela 6:** Resultados da captação de N, P e K pelas plantas de arroz em experimento em câmara de crescimento.

Tratamento <sup>a</sup>	Nitrogênio (N) (mg/g)		Fósforo (P) (mg/g)		Potássio (K) (mg/g)	
	Controle	Excesso de ferro	Controle	Excesso de ferro	Controle	Excesso de ferro
CaR114	8,59 aA	6,03 bB	1,18 aA	0,58 aB	11,04 abA	8,57 abB
CaS40	6,27 cA	5,09 cB	0,97 bA	0,44 bB	8,77 dA	7,22 cB
FeR64	6,99 bcA	5,87 bcB	1,13 aA	0,48 bB	10,21 bcA	6,92 cB
FeS24	6,95 cA	5,67 bcB	0,97 bA	0,48 bB	8,86 dA	7,51 bcB
FeS53	6,71 cA	6,94 aA	0,95 bA	0,58 aB	9,35 cdA	9,25 aA
NI	7,84 abA	6,47 abB	1,21 aA	0,63 aB	11,87 aA	8,63 bB

<sup>a</sup> CaR114 (*Paenibacillus sonchi*); CaS40 (*Paenibacillus jamilae*); FeR64 (*Bacillus aryabhatai*); FeS24 (*Paenibacillus durus*); FeS53 (*Paenibacillus zanthoxylī*) e NI (tratamento não inoculado)

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra minúscula não diferem significativamente  $P > 0,05$  (Teste de Tukey).

Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem significativamente  $P > 0,05$  (teste de Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e diversidade de bacilos

Uma maior diversidade de bacilos foi encontrada na região sem excesso de ferro (Cachoeirinha). Na cultivar sensível ao excesso de ferro dessa região (BR-IRGA 409, CaS), foi observado o valor mais alto do índice de diversidade ( $H' = 2,47$ ) e algumas espécies bacterianas foram encontradas somente nessa amostra de solo. Por outro lado, a cultivar resistente ao excesso de ferro da mesma região (CaR) apresentou um menor índice de diversidade ( $H' = 1,534$ ). Na região de Camaquã, as duas cultivares apresentaram os menores índices de diversidade (Tabela 2). Esses resultados indicam que o excesso de ferro e a cultivar podem impactar de alguma maneira as comunidades de bacilos. Um estudo realizado por Haridoim et al. (2011) demonstrou que diferentes cultivares de arroz selecionam comunidades bacterianas específicas. Inceoglu et al. (2012), estudando bactérias da rizosfera de batata, verificaram que as comunidades da mesma cultivar eram diferentes entre dois tipos de solo. De acordo com Grayston et al. (1998), a abundância e as atividades dos micro-organismos do solo também são influenciadas por vários fatores ambientais, como o tipo de solo, disponibilidade de nutrientes, pH e umidade. Dessa maneira, o excesso de ferro no solo pode interferir nas comunidades bacterianas. Zhou et al. (2008) verificaram que o baixo conteúdo de N e P no solo, que são elementos essenciais para a formação de muitos nutrientes, diminui os nutrientes que promovem o crescimento bacteriano, o que leva a uma diminuição do número de micro-organismos. A região de Cachoeirinha com a cultivar sensível ao excesso de ferro (CaS) apresentou a maior diversidade de bacilos ( $H' = 2,47$ ), bem como maior quantidade de P e K no solo em comparação com a outra região (Tabela 1).

### 5.2 Características promotoras do crescimento vegetal nos isolados

A característica promotora do crescimento vegetal mais marcante obtida através dos testes *in vitro* foi a produção de compostos indólicos (CI). Dos 85 isolados, 78 foram capazes de produzir CI. Por outro lado, poucas bactérias foram capazes de solubilizar fosfato ( $n = 4$ ), produzir sideróforos ( $n = 1$ ) e metabolizar ACC ( $n = 4$ ). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Beneduzi et al.

(2008) que isolaram 296 bacilos da rizosfera de arroz, dos quais a maioria (n = 242) produziu CI, poucos bacilos foram capazes de solubilizar fosfatos (n = 22) ou de produzir sideróforos (n = 32).

A atividade da enzima catalase foi observada em 71 isolados. Embora a atividade da catalase não seja uma característica promotora de crescimento vegetal, essa enzima é importante por quebrar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio, protegendo os organismos de danos oxidativos, de acordo com Sychev & Isak (1995). Segundo Kampfenkel et al. (1995), o excesso de ferro pode levar a um estresse oxidativo em plantas. As espécies reativas de oxigênio como  $H_2O_2$ , podem levar à oxidação de proteínas e lipídeos de membrana, bem como a danos do DNA (SCHUTZENDUBEL & POLLE, 2002). Algumas PGPRs produzem enzimas antioxidantes, como a catalase, que resulta na degradação dessas espécies reativas de oxigênio (KOHLENER et al., 2008 *apud* YANG et al., 2009).

### 5.3 Diversidade metabólica

A comunidade bacteriana associada à cultivar resistente da região de Cachoeirinha (CaR) utilizou 21 das 31 fontes de carbono, já a comunidade bacteriana associada à cultivar sensível da mesma região (CaS) utilizou 28 substratos. Na região de Camaquã, as comunidades bacterianas associadas às duas cultivares utilizaram 23 fontes de carbono (Tabela 4). Bossio & Scow (1995) verificaram que as diferenças nos padrões de utilização de fontes de carbono pelas comunidades microbianas podem ser explicadas pelas variáveis ambientais impostas às comunidades. Dessa forma, as diferenças encontradas nos solos amostrados quanto à quantidade de ferro e de nutrientes podem influenciar o uso de diferentes fontes de carbono. Inceoglu et al. (2012) demonstraram que há diferenças no consumo de fontes de carbono com base no tipo de solo. Porém, o significado das alterações na utilização de substratos específicos é difícil de interpretar sem uma melhor compreensão de como as interações entre os organismos que constituem a comunidade afetam os padrões de utilização do substrato (BOSSIO & SCOW, 1995).

#### 5.4 Experimento em câmara de crescimento

O experimento em câmara de crescimento demonstrou que as plantas inoculadas com o isolado FeS53 (*P. zanthoxyli*) tiveram crescimento e peso seco de parte aérea similares às condições controle, indicando que essa bactéria pode beneficiar a planta em condições de excesso de ferro. Entretanto, nos experimentos *in vitro*, *P. zanthoxyli*, apresentou resultados positivos apenas para metabolização de ACC. Organismos que produzem a enzima ACC deaminase quebram o ACC (precursor do etileno) em amônia e  $\alpha$ -cetobutirato e são capazes de promover o crescimento de plantas através da redução dos níveis de etileno na planta. Um estudo realizado por Mayak (2004) demonstrou que a atividade de ACC deaminase de *Achromobacter piechaudii* promoveu o crescimento em tomate, quando as plantas foram expostas ao excesso de sal. Bactérias com a enzima ACC deaminase também diminuíram os efeitos do estresse salino no crescimento de pimenta vermelha (SIDDIKEE et al., 2011). De acordo com Saleem et al. (2007) plantas inoculadas com bactérias que contenham a enzima ACC deaminase podem tolerar alguns estresses como salinidade, seca, alagamento, temperatura, patogenicidade e contaminantes devido à redução do estresse causado pelo etileno.

Verificou-se, através da análise de nutrientes que, em condições de excesso de ferro, todas as plantas tiveram menor taxa de captação de nitrogênio, fósforo e potássio, quando comparadas às condições controle (Tabela 6). Altas concentrações de ferro no solo diminuem a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e, principalmente, de P e K por plantas de arroz (MEHRABAN et al., 2008). Porém, as plantas inoculadas com o isolado FeS53 apresentaram captação de nitrogênio e potássio, nas condições de excesso de ferro, similares ao controle (Tabela 6). Shahzadi et al. (2013) demonstraram que a inoculação com bactérias que produzem ACC deaminase aumentaram significativamente o comprimento da parte aérea, o que pode ser atribuído a um alongamento da raiz, que capta mais nutrientes do solo e pode aumentar o peso seco da parte aérea.

As plantas inoculadas com o isolado CaR114 (*Paenibacillus sonchi*) tiveram um aumento da captação de nitrogênio, em relação ao controle não-inoculado nas condições controle de ferro (Tabela 6). Este isolado apresentou boa redução de acetileno e produção de CI, que podem estar relacionados com a captação de nutrientes. Os compostos indólicos aumentam o crescimento da parte aérea e da

raiz, aumentando, dessa maneira, a captação de nutrientes (LAMBRECHT et al., 2000).

Este estudo demonstrou que a inoculação de determinados isolados bacterianos, como o CaR114 e o FeS53, em sementes de arroz pode promover o crescimento da planta e aliviar os efeitos causados pelo excesso de ferro. Porém, é necessário avaliar os mecanismos moleculares pelos quais estes isolados beneficiam a planta em condições de estresse, a fim de estimular sua utilização para benefícios agrícolas.

## REFERÊNCIAS

- AMBROSINI, A. et al. Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil*, v. 356, p. 245-264, 2012.
- BADRI, D.V. et al. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, n. 6, p. 642–650, 2009.
- BENEDUZI A. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 39, p.311-320, 2008.
- BLOEMBERGB, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, p. 343-350, 2001.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Critical Reviews in Plant Science*, v. 6, p. 209-266, 1987.
- BOSSIO, D.A.; SCOW, K. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n.11, p. 4043-4050, 1995.
- DRIKS, A. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, v. 94, p. 1249-1251, 2004.
- EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, v. 17, n. 19, p. 7843-7853, 1989.
- EMBRAPA. *Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil. Cultivares de Arroz Irrigado no Brasil*, 2005a. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasi/cap05.htm>> Acesso em: 15 Maio 2013
- EMBRAPA. *Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil. Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz*. 2005b. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasi/cap01.htm>> Acesso em: 22 Setembro 2012.
- EPAMIG. *Arroz: Avanços Tecnológicos*. Belo Horizonte, Informe Agropecuário, v. 22(222), 2004.
- FILHO, M.P.B.; DYNIA, J.F.; FAGERIA, N.K. *Zinco e Ferro na cultura do arroz*. Brasília: EMBRAPA, p.40-43, 1994.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE *Microbial Ecology*, v. 45, p. 302-316, 2003.

GARDENER, B.B.M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In: Agricultural Systems Symposium: The Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* ssp. *Phytopathology*, v. 94, p. 1252–1258, 2004.

GEISLER, M.; MURPHY, A.S. The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters*, v. 580, n. 4, p. 1094–1102, 2006.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, v. 252, p. 1-7, 2005.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y.A. Critical Examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, DC, v. 61, p. 793–796, 1995.

GOVINDASAMY et. al. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. Potential PGPR for sustainable agriculture. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Microbiology Monographs*, v. 18, p. 333-364, 2011.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, p. 395-412, 2005.

GRAYSTON, S.J. et al. Selective influence of plants species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, p. 369-378, 1998.

GROVER, M. et al. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 27, p. 1.231-1.240, 2011.

HARDOIM, P.R. et al. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 77, p. 154–164, 2011.

IBEKWE, A.M.; KENNEDY, A.C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 26, p. 151–163, 1998.

INCEOGLU, Ö; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J.D. Soil and cultivar type shape the bacterial community in the potato rhizosphere. *Microbial Ecology*, v. 63, p. 460-470, 2012.

KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, V. Effects of iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants (implications to oxidative stress). *Plant Physiology*, v. 107, p. 725-735, 1995.

KHAN, A.G. et.al. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, v. 1, n. 1, p. 48-58, 2009.

KENNEDY, G. et al. Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. *International Rice Commission Newsletter*, v. 51, p. 33-42, 2002.

KIM, K.Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesiculararbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*. New York, v. 26, n. 2, p. 79-87, 1997.

KNOBLAUCH, R.; REIS, M.S. Arroz irrigado em sistema de cultivo pré-germinado. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 25, n. 222, p. 44-51, 2004.

KUSS, A.V. *Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado*. Tese (Doutorado-Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

LAMBRECHT, M. et. al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, v. 8, n. 7, p. 298–300, 2000.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v.24, p.187-209, 1986.

LINDERMANN, W.C.; GLOVER, C.R. Nitrogen fixation by legumes. *Cooperative Extension Service – College of Agriculture and home Economics*. Guide A-129, 2003.

MAYAK S. et al. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 565–572, 2004.

MEHRABAN, P.; ZADEH, A; SADEGHIPOUR, H. Iron Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.), under Different Potassium Nutrition. *Asian Journal of Plant Sciences*, v. 7, p. 251-25, 2008.

MOREIRA, F.M.S. et. al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, v. 118, p. 10-15, 2003.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R. dos S. Fixação biológica do nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.) *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 368p, 2005.

REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO. *Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil/Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado*. Itajaí, SC: SOSBAI, 179p, 2012.

SALEEM, M. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 10, p. 635-648, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, 2001.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, v. 20, p. 282–285, 1992.

SCHUTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant response to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1351-1365, 2002.

SCHWYN, B.; NEILANDS, B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, v. 160, p. 46-56, 1987.

SELDIN, L; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant Soil*, v. 70, p. 243–255, 1983.

SHAHZADI, I. et al. Effect of bacteria containing ACC deaminase on growth of wheat seedlings grown with chromium contaminated water. *Pakistan Journal of Botany*, v. 45, p. 487-494, 2013.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, 1949.

SIDDIKEE, M.A. et al. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 49, n. 4, p. 427-434, 2011.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. *Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil*. Porto Alegre: Palotti. 188p, 2010.

SOTTERO, A.N. *Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias*. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônômico de Campinas, 2003.

SOUZA, R. et. al. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil in press*, 2012.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

STACKEBRANDT E.; LIESACKI, W. *Nucleic Acids and Classification*. Academic Press, London, UK, 1993.

STONE, L.F.; MOREIRA, J.A.A.; RABELO, R.R.; BIAVA, M. (Ed.). *Arroz: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. p. 213-222. (Coleção 500 perguntas 500 respostas), 2001.

SYCHEV, A.Y.; ISAK, V.G. Iron compounds and the mechanisms of the homogeneous catalysis of the activation of O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and of the oxidation of organic substrates. *Russian Chemical Reviews*, v. 64, p. 1105-1129, 1995.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de micro-organismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANAKA, A.; LOE, R.; NAVASERO, S. A. Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokio, v. 12, n. 4, p. 32-38, 1966.

TEDESCO, J.M. et. al. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

YANG, J; KLOEPPER, J.W.; RYU, C-M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Science*, v.14, p. 1–4, 2009.

YOSHIDA, S. Growth and development of the rice plant. In: *Fundamentals of Rice Crop Science*. The International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, p. 1-61, 1981.

ZHOU, J. et al. Microbial community diversity in the profile of an agricultural soil in northern China. *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, n. 8, p. 981–988, 2008.