

**BETANIA GUILHERMINA PEDROSA**

**BACTÉRIAS DO EM (MICROORGANISMOS EFICIENTES) COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ISOLADAS EM CULTIVOS DE MILHO E FRAGMENTO FLORESTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: João Carlos Cardoso Galvão

Coorientadores:

Marliane de Cássia S. da Silva

Paulo Prates Júnior

Paulo Roberto Cecon

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**  
**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P372b Pedrosa, Betania Guilhermina, 1995-  
2022 Bactérias do EM (microrganismos eficientes) com potencial biotecnológico isoladas em cultivos de milho e fragmento florestal / Betania Guilhermina Pedrosa. – Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (54 f.): il.

Orientador: João Carlos Cardoso Galvão.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Agronomia, 2022.  
Referências bibliográficas: f. 44-54.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.569>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Milho - Crescimento. 2. Bactérias nitrificantes.  
3. Nitrogênio - Fixação. 4. Fosfatos - Solubilidade. 5. Ácido indolacético. I. Galvão, João Carlos Cardoso, 1962-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agroecologia.  
III. Título.

CDD 22. ed. 633.15899

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

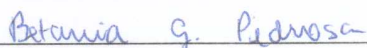
BETANIA GUILHERMINA PEDROSA

**BACTÉRIAS DO EM (MICROORGANISMOS EFICIENTES) COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ISOLADAS EM CULTIVOS DE MILHO E FRAGMENTO FLORESTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de julho de 2022.

Assentimento:



---

Betania Guilhermina Pedrosa  
Autora



---

João Carlos Cardoso Galvão  
Orientador

Dedico a Deus, à minha mãe e aos meus amigos que até aqui me deram força e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer primeiramente a Deus e a Jesus Cristo por terem me dado força para chegar até o final dessa trajetória. Quero agradecer à minha mãe pelo cuidado comigo durante o tempo em que mais precisei de ajuda, ao meu irmão e ao meu pai que, mesmo não estando mais presente entre nós, foi um modelo para mim de perseverança e dedicação. Quero agradecer ao meu namorado, Roy, pela companhia e por sempre me ajudar e por me dar tanto carinho e atenção. Quero agradecer aos meus amigos da vida (Marcilene, Grazi, Jão, Robson, Ju e João Vitor) e do laboratório de Associações Micorrízicas pelas palavras de incentivo e encorajamento. Quero agradecer especialmente aos meus amigos Camila, Leandro, Kaliane, Tomás, Nicolly, Thiago, Emiliane e Larissa do laboratório por terem me ajudado tanto, e por outras pessoas que ajudaram na minha trajetória. Essa dissertação foi construída a muitas mãos e com muita ajuda. Também quero agradecer à professora Catarina por todo apoio que me deu durante o tempo que estive no laboratório de Associações Micorrízicas. E quero agradecer aos meus orientadores, professor João, Paulo, Marliane por acreditarem na minha capacidade e por não medirem esforços pra me ajudar na execução do trabalho e na escrita, que é um desafio muito grande pra mim. Também agradeço ao professor Paulo Cecon pela ajuda com a estatística e pela paciência que teve comigo, e à minha psicóloga Izabela pelo apoio emocional e também ajuda com a escrita e com processos seletivos que surgiram durante esse tempo.

São muitas as pessoas que fizeram parte dessa trajetória que fica difícil colocar o nome de cada uma em poucas linhas. Levo cada uma no meu coração e em minhas orações, e peço a Deus pra que eu possa ajudar aos outros da mesma forma que essas pessoas me ajudaram, me deram carinho e apoio, pelos momentos de risada, pelas conversas no café, pelos momentos que enxugaram minhas lágrimas, que me acalmaram em crises de ansiedade, que me auxiliaram na execução de alguma parte do trabalho manual, da escrita. São muitos momentos. São muitas pessoas. Fica aqui meu agradecimento e meu carinho por cada uma delas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

PEDROSA, Betania Guilhermina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Bactérias do EM (microrganismos eficientes) com potencial biotecnológico isoladas em cultivos de milho e fragmento florestal.** Orientador: João Carlos Cardoso Galvão. Coorientadores: Marliane de Cássia Soares da Silva, Paulo Prates Júnior e Paulo Roberto Cecon.

O milho é o segundo grão mais produzido no Brasil e tem grande importância na alimentação humana e animal, sobretudo em regiões de baixa renda, além disso, é utilizado na produção de bebidas, polímeros e combustíveis. Na sua maioria, os pequenos produtores de milho possuem pouco acesso a insumos, infraestrutura e logística adequados, o que leva a baixa produtividade das lavouras. Desta forma, práticas de manejo de baixo custo devem ser implementadas com a finalidade de atender a esta importante parcela da população brasileira. É reconhecido que os microrganismos têm papel fundamental na construção de sistemas agroalimentares produtivos e saudáveis, a exemplo dos Microrganismos eficientes (EM), que se tornaram uma tecnologia social utilizada por diversas famílias camponesas da Zona da Mata mineira. Estes microrganismos podem melhorar a qualidade do solo, crescimento e produção de culturas, além de controlar doenças do solo, melhorar a absorção de nitrogênio, fósforo e potássio, aumentar a mineralização da matéria orgânica, entre outros benefícios. Entretanto, existem poucos trabalhos evidenciando a diversidade microbiana do EM e seu papel na promoção de crescimento de plantas. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização bioquímica e a identificação de isolados bacterianos do EM provenientes de um fragmento florestal e de sistemas de cultivo de milho, visando a obtenção de microrganismos com potencial aplicação biotecnológica. A obtenção dos microrganismos do EM foi realizada a partir de um fragmento florestal (M), uma área de cultivo convencional de milho (C) e uma área de cultivo orgânico de milho (O) na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão Coimbra da Universidade Federal de Viçosa, selecionados em arroz cozido, seguido por fermentação em melaço de cana-de-açúcar; além do EM<sup>®</sup> comercial (P) reativado conforme instruções do fabricante. As etapas de isolamento e caracterização possibilitaram a obtenção de 15 isolados de cada tratamento, totalizando 60 bactérias, que foram selecionadas em meio sólido Nfb e conservadas em NBY com glicerol a - 80 °C. O DNA dos isolados foi extraído, amplificado na região 16S do rDNA,

sequenciado e realizado a filogenia de cada gênero previamente identificado. Para a caracterização bioquímica foram realizados testes de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol-acético (AIA). Três isolados não apresentaram crescimento após a conservação e, portanto, dos 57 isolados testados, 43 apresentaram capacidade de fixação biológica de nitrogênio, sendo 11 do tratamento fragmento florestal, 10 do tratamento cultivo de milho convencional, 13 do tratamento cultivo de milho orgânico e 9 do tratamento produto comercial. Dos 57 isolados, 25 apresentaram capacidade de solubilização de fosfato, sendo sete do tratamento fragmento florestal, seis do tratamento cultivo de milho convencional, dois do tratamento cultivo de milho orgânico e 10 do tratamento produto comercial. Dos isolados testados, quatro apresentaram capacidade de produção de AIA. Com o sequenciamento foi possível a identificação de 39 isolados, sendo as espécies *Vibrio sonorensis* e *Acetobacter farinalis* e os gêneros *Burkholderia*, *Bacillus*, *Priestia*, *Acinetobacter*, *Acetobacter*. Assim, evidenciamos que o EM é fonte acessível de bactérias promotoras de crescimento vegetal e que as bactérias isoladas de diferentes formulações de EM têm amplo potencial biotecnológico, o que permite novas formulações artesanais e comerciais.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Biotecnologia. FBN. Solubilização de fosfato. AIA.

## ABSTRACT

PEDROSA, Betania Guilhermina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **EM bacteria (efficient microorganisms) with biotechnological potential isolated in corn crops and forest fragments.** Adviser: João Carlos Cardoso Galvão. Co-advisers: Marliane de Cássia Soares da Silva, Paulo Prates Júnior and Paulo Roberto Cecon.

Corn is the second most produced grain in Brazil and is of great importance in human and animal nutrition, especially in low-income regions, in addition, it is used in the production of beverages, polymers and fuels. Most small corn producers do not have access to adequate inputs, infrastructure and logistics, which leads to low crop productivity. Thus, low-cost management practices must be implemented in order to serve this important portion of the Brazilian population. It is recognized that microorganisms play a fundamental role in the construction of productive and healthy agri-food systems, such as Efficient Microorganisms (EM), which have become a social technology used by several peasant families in the Zona da Mata of Minas Gerais. These Microorganisms can improve soil quality, growth and crop production, in addition to controlling soil diseases, improving the absorption of nitrogen, phosphorus and potassium, increasing the mineralization of organic matter, among other benefits. However, there are few studies showing the microbial diversity of EM and its role in promoting plant growth. Thus, the objective of this work was to carry out the biochemical characterization and identification of bacterial isolates of EM from a forest fragment and from corn cultivation systems, aiming at obtaining microorganisms with potential biotechnological application. The EM microorganisms were obtained from a forest fragment (M), an area of conventional corn cultivation (C) and an area of organic corn cultivation (O) in the Teaching, Research and Extension Unit Coimbra, from the Universidade Federal de Viçosa, selected in cooked rice, followed by fermentation in sugarcane molasses; in addition to commercial EM<sup>®</sup> (P) reactivated according to the manufacturer's instructions. The isolation and characterization steps made it possible to obtain 15 isolates from each treatment, totaling 60 bacteria, which were selected in Nfb solid medium and preserved in NBY with glycerol at -80 °C. The DNA of the isolates was extracted, amplified in the 16S region of the rDNA, sequencing and the phylogeny of each previously identified genus performed. For biochemical characterization, biological nitrogen fixation tests, inorganic phosphate solubilization

and indole acetic acid (IAA) production were performed. Three isolates showed no growth after conservation and, therefore, of the 57 isolates tested, 43 showed biological nitrogen fixation capacity, being 11 from the forest treatment, 10 from the conventional corn crop treatment, 13 from the organic corn crop treatment and 9 from the commercial product treatment. Of the 57 isolates, 25 showed phosphate solubilization capacity, seven from the forest treatment, six from the conventional corn crop treatment, two from the organic corn crop treatment and 10 from the commercial product treatment. Of the tested isolates, four showed AIA production capacity. With the sequencing, it was possible to identify 39 isolates, being the species *Vibrio sonorensis* and *Acetobacter farinalis* and the genera *Burkholderia*, *Bacillus*, *Priestia*, *Acinetobacter*, *Acetobacter*. Thus, we show that EM is an accessible source of plant growth-promoting bacteria and that bacteria isolated from different EM formulations have broad biotechnological potential, which allows for new artisanal and commercial formulations.

Keywords: Plant growth promoting bacteria. Biotechnology. FBN. Phosphate solubilization. AIA.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	Obtenção das soluções de EM	13
2.2	Isolamento de bactérias presentes nas soluções de EM	17
2.3	Extração de DNA das bactérias presentes nas soluções de EM	17
2.4	Sequenciamento das bactérias isoladas do EM	19
2.5	Caracterização bioquímica dos isolados	19
2.5.1	Fixação biológica de nitrogênio	19
2.5.2	Solubilização de fosfato inorgânico	20
2.5.3	Produção de Ácido indol-acético (AIA)	20
2.6	Análise estatística	20
3	RESULTADOS	22
4	DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais cultivados no mundo, ocupa 21,375 milhões de hectares de área plantada no Brasil (CANAL RURAL, 2022) e apresenta grande importância econômica por suas qualidades nutricionais e produtividade (GALVÃO *et al.*, 2014). Este cereal é utilizado na alimentação humana e animal, na indústria de alta tecnologia como combustíveis, bebidas e polímeros, além de representar grande importância em regiões de baixa renda (CONTINI *et al.*, 2019; GALATA *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2011; CRUZ *et al.*, 2006), onde 59,84 % dos estabelecimentos produtores de milho consomem a produção na propriedade, mostrando a importância social desse cereal (CRUZ *et al.*, 2011).

Os produtores de milho, em sua maioria, são caracterizados como agricultores familiares com alta variabilidade ecogeográfica, pouco acesso a insumos e recursos que sejam adequados a sua realidade incluindo produção não tecnificada e, normalmente, não possuem grandes extensões de terras (GALATA *et al.*, 2017; ROGATTO, 2013; CRUZ *et al.*, 2011; CRUZ *et al.*, 2006). A produtividade dos pequenos produtores normalmente é baixa, como reflexo da falta de acesso a maquinário, a insumos e apoio técnico qualificado para as operações de cultivo. Além disso, a topografia das lavouras pode dificultar a mecanização, a exemplo da Zona da Mata Mineira que, associada a baixa densidade de plantio, facilita a ocorrência de ervas espontâneas, bem como atrasos e perdas na colheita que é feita manualmente (CRUZ *et al.*, 2011). Esses fatores dificultam a geração de renda e a aquisição de insumos capazes de atender às demandas e realidade técnica dos produtores.

O milho é uma cultura altamente exigente em nutrientes, principalmente o nitrogênio, sendo que sua falta pode reduzir de 10 a 22 % no rendimento de grãos (REPKE *et al.*, 2013). O uso de fertilizantes nitrogenados não é eficiente já que grande parte se perde por lixiviação e volatilização (CANTARELLA & MARCELINO, 2008). Buscam-se alternativas ao uso de fertilizantes devido a altos preços e impactos causados ao meio ambiente e à saúde humana (FERNANDES *et al.*, 2020).

No contexto da Agroecologia, os conhecimentos dos agricultores podem ser alinhados com os conhecimentos acadêmicos (PRATES JÚNIOR *et al.*, 2016), de modo a favorecer o desenvolvimento de tecnologias alternativas, que contribuam para

o equilíbrio das relações ecológicas. Assim, devem-se priorizar as tecnologias voltadas ao controle biológico de doenças e pragas, adubação verde, rotação de cultura e o uso de microrganismos eficientes, entre outras, capazes de aumentar a produtividade e resiliência econômica e ambiental destas propriedades (CRUZ *et al.*, 2011).

Os microrganismos eficientes (EM) são benéficos para o crescimento e saúde das plantas, bem como podem favorecer a qualidade do solo e da água, sendo considerada uma tecnologia social capaz de aumentar a sustentabilidade e autonomia da produção na agricultura familiar, além de ser uma ferramenta na produção de alimentos mais saudáveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2021; MOROCHO & LEIVA-MORA, 2019). O conceito de EM foi desenvolvido pelo Professor Teruo Higa, da Universidade de Ryukyus, Okinawa, Japão e consiste em culturas mistas de microrganismos que podem ser aplicados como inoculantes para aumentar a diversidade microbiana de solos e plantas (HIGA & PARR, 1994). Os efeitos do EM podem ser relatados na germinação de sementes, floração, desenvolvimento de frutos, melhoria da estrutura física e fertilidade química do solo, na supressão de patógenos de solo, na redução da maturação de composto orgânico, no desenvolvimento da raiz e aquisição de água e nutrientes pelas plantas, entre outros (MOROCHO & LEIVA-MORA, 2019; OLLE & WILLIAMS, 2013).

A formulação comercial mais conhecida do EM é composta por leveduras e bactérias ácido-láticas e menor proporção bactérias fotossintéticas, bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos filamentosos e actinobactérias (JOSHI *et al.*, 2019; MOROCHO & LEIVA-MORA, 2019). Contudo, o preparo artesanal do EM consiste na seleção de microrganismos benéficos, presentes em fragmentos florestais ou unidades agrícolas, utilizando arroz cozido sem sal para posterior multiplicação fermentativa destes microrganismos, em substrato orgânico a base de melaço de cana-de-açúcar (BONFIM *et al.*, 2011). Em sua formulação artesanal o número é bastante variável e a maioria são fungos leveduriformes, actinobactérias e bactérias produtoras de ácido lático (SANTOS *et al.*, 2020a).

O efeito benéfico da aplicação de EM já foi relatado na obtenção de maior rendimento e maior teor de proteína do grão de milho quando aplicado com fertilizantes (SHAH *et al.*, 2001); na redução da porcentagem de fibra detergente neutra e aumento de proteína em pastagem quando aplicado juntamente com esterco (SANTOS *et al.*, 2020a); na maior germinação e velocidade de germinação de

sementes de capim-paliçada (*Urochloa brizantha*) (SANTOS *et al.*, 2020b); melhor crescimento, produtividade, concentração de macro e micronutrientes e tolerância ao estresse hídrico de pimenta (*Capsicum annuum*) (EL-MAGEED *et al.*, 2020).

Os microrganismos que compõem o EM podem fornecer hormônios e facilitar a aquisição de nutrientes pelo sistema radicular das plantas (JOSHI *et al.*, 2019). Estes microrganismos são, em sua maioria, bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Synergistetes (SANTOS *et al.*, 2020a), que utilizam substâncias secretadas pelas raízes, matéria orgânica como fontes de energia para sintetizar aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcar que podem ser utilizados pelas plantas ou por outros microrganismos benéficos presentes no solo (OLLE & WILLIAMS, 2013). Esses microrganismos podem ser classificados como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB - *Plant Growth Promoting Bacteria*), uma vez que podem fornecer nutrientes às plantas, como nitrogênio e fósforo, bem como atuar na modulação hormonal, na competição com fitopatógenos e na atenuação do estresse ambiental, favorecendo o crescimento das plantas (GLICK, 2012). Estas bactérias têm grande potencial biotecnológico e são uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos e a construção de uma agricultura sustentável (MARIANO *et al.*, 2004).

Entretanto, na literatura existem o registro de poucos estudos sobre EM, sobretudo relacionados ao isolamento, seleção e identificação destes microrganismos benéficos, capazes de promover o crescimento vegetal (SANTOS *et al.*, 2020a; SANTOS *et al.*, 2020b; DOURADO, 2018). Assim, nesse trabalho assumimos a premissa que o maior entendimento da comunidade microbiana do EM e o seu potencial bioquímico contribuirá para ampliar o uso dessa tecnologia social por muitos agricultores descapitalizados (FIGUEIREDO *et al.*, 2021), de modo a favorecer o manejo da microbiota do solo (PRATES JÚNIOR *et al.*, 2021).

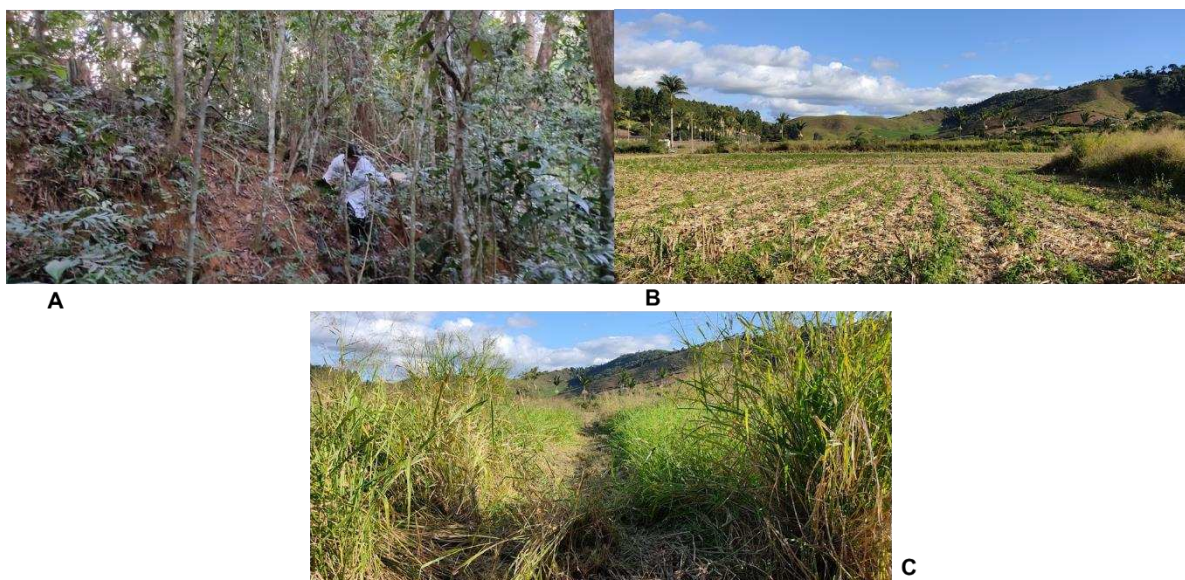
O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização bioquímica e a identificação de isolados bacterianos do EM (microrganismos eficientes) proveniente de um fragmento florestal e de sistemas de cultivo de milho, visando a obtenção de microrganismos com potencial aplicação biotecnológica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das soluções de EM

Os microrganismos do EM foram obtidos de áreas da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão Coimbra, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situada no município de Coimbra, na Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil (Figura 1).

Figura 1: Áreas de obtenção dos microrganismos do EM, sendo a) área de fragmento florestal, b) área de cultivo de milho convencional e c) área de cultivo de milho orgânico.



As soluções de EM foram obtidas de quatro fontes distintas, sendo (1) fragmento florestal; (2) área de cultivo de milho convencional; (3) área de cultivo de milho orgânico; (4) EM comercial (EM 1<sup>®</sup>). Nestas áreas, amostras de solo foram obtidas e enviadas para análise química de rotina (Quadro 1).

Quadro 1: Análise das amostras de solo dos tratamentos fragmento florestal, cultivo de milho convencional e cultivo de milho orgânico.

	pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B
		mg/dm <sup>3</sup>		cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>							%		dag/Kg	mg/L	mg/dm <sup>3</sup>				
F. florestal	4,40	1,80	56	0,98	0,53	0,80	7,92	1,65	2,45	9,57	17,20	32,70	4,30	18,70	1,20	81,00	30,10	1,90	0,50
Convencional	5,50	18,70	130	2,20	1,20	0,00	5,28	3,73	3,73	9,01	41,40	0,00	3,22	23,30	5,70	83,50	41,90	3,10	0,40
Orgânico	6,30	9,20	340	4,41	2,02	0,00	3,30	7,30	7,30	10,60	69,90	0,00	4,97	25,40	10,30	81,60	78,90	2,70	0,20

pH em água, KCl e CaCl - Relação 1:2,5

P - Na - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich 1

Ca - Mg - Al - Extrator: KCl - 1 mol/L

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0

B - Extrator água quente

S - Extrator - Fosfato monocalcico em ácido acético

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

V = Índice de Saturação de Bases

m = Índice de Saturação de Alumínio

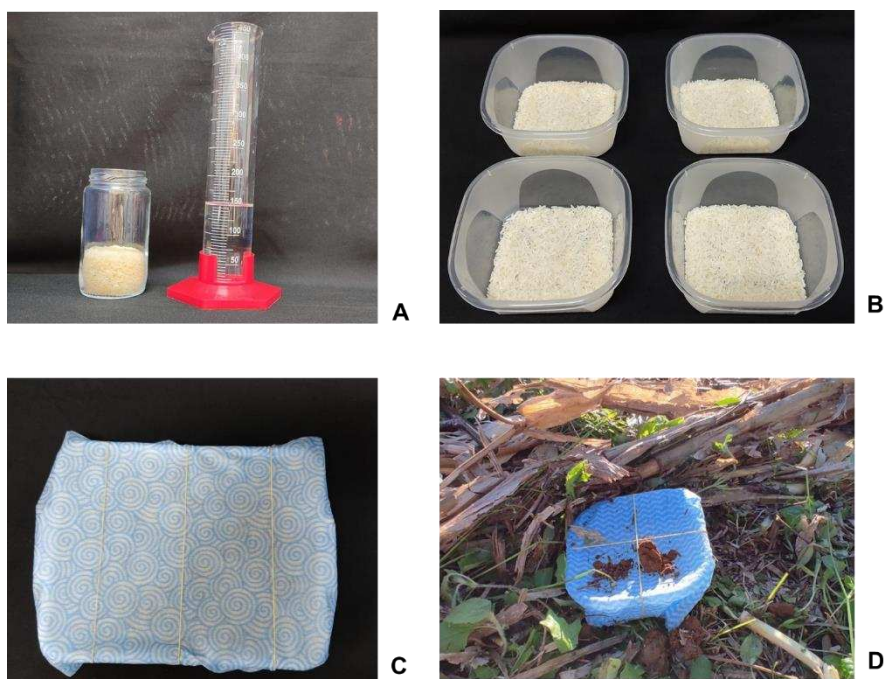
ISNa - Índice de Saturação de Sódio

Mat. Org. (MO) = C.Org x 1,724 - Walkley-Black

P-rem = Fósforo Remanescente

A etapa inicial para a obtenção das soluções de EM artesanal ocorreu a partir do cozimento de 50 g de arroz com 150 mL de água destilada (Figura 2a) em autoclave, durante 20 min, temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm, em recipientes de plástico (14,5 x 6,5 cm) coberto com pano de limpeza tipo Perflex fixado com elástico (Figura 2b e 2c). Em campo, os recipientes com arroz cozido foram envoltos em malha de aço para proteger de pequenos animais e alocados nas respectivas áreas: 1) fragmento florestal (S20.82785° W042.76901°), 2) cultivo de milho convencional (S20.82752° W042.76530°) e 3) cultivo de milho orgânico (S20.82733° W042.76564°) (COELHO *et al.*, 2021). Cada tratamento foi conduzido com 4 repetições, totalizando 12 recipientes com o substrato de arroz que foram mantidos em pequenas aberturas no solo feitas com enxada, sendo recobertos com serapilheira e uma fina camada de solo presente em cada uma das áreas, onde permaneceram por dez dias (Figura 2d).

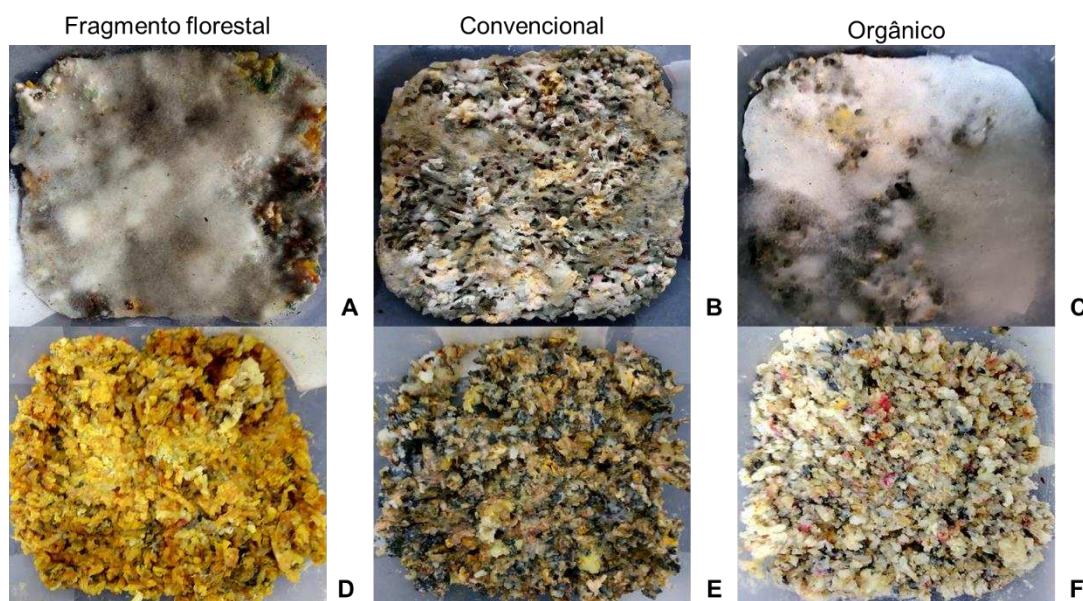
Figura 2: Obtenção dos microrganismos: a) 50 g de arroz e 150 mL de água destilada; b) disposição do arroz em recipientes de plástico; c) fixação do pano de limpeza tipo Perflex com elástico; d) alocação dos recipientes plásticos nas áreas para seleção dos microrganismos.



A etapa de fermentação, isolamento e caracterização dos microrganismos foi realizada no Laboratório de Associações Micorrízicas, Departamento de

Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO). Para a fermentação foi preparada uma solução com aproximadamente 114 g de arroz colonizado por microrganismos que foi previamente homogeneizado (Figura 3d, e, f), 50 mL de melaço de cana-de-açúcar comercial e água em volume final de 500 mL. A solução foi agitada e mantida em erlenmeyers com um litro de volume em BOD a 26 °C no escuro. Após 15 dias de fermentação, as quatro repetições de cada um dos três tratamentos foram homogeneizadas durante 10 minutos a 100 rpm e filtradas com peneiras de plástico (aproximadamente 1 mm de abertura) em câmara de fluxo laminar. Aproximadamente 200 mL de cada repetição foi armazenada em frascos de vidro, em geladeira (4 °C), para análise bromatológica; 15 mL foram armazenadas em tubos falcon a -20 °C para análises moleculares; 50 mL foram armazenadas em geladeira para a reativações futuras e o restante da solução de cada repetição dos tratamentos individualizados formou uma amostra composta. A solução de EM comercial foi obtida junto à empresa Ambiem Brasil Ltda e foi reativada em erlenmeyers utilizando-se 5 % do produto comercial, 5 % de melaço de cana-de-açúcar e 90 % de água destilada. A solução foi agitada, fechada com tampões de tecido e fermentada durante sete dias.

Figura 3: Arroz colonizado por microrganismos obtidos nas áreas de a) fragmento florestal, b) cultivo de milho convencional, c) cultivo de milho orgânico. Arroz colonizado e homogeneizado das áreas de d) fragmento florestal, e) cultivo de milho convencional e f) cultivo de milho orgânico.



## 2.2 Isolamento de bactérias presentes nas soluções de EM

As bactérias foram isoladas a partir das quatro soluções de EM: fragmento florestal (M), cultivo de milho convencional (C), cultivo de milho orgânico (O) e produto comercial (P), separadamente, após diluição seriada e plaqueamento em meio seletivo Nfb para fixação de nitrogênio. As diluições seriadas foram realizadas até  $10^{-5}$  em solução salina ( $8,5 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl) e foram agitadas em vórtex por 5 s a 180 rpm, em temperatura ambiente. De cada uma das diluições, alíquotas de 0,1 mL foram distribuídas em placas de Petri contendo 20 mL do meio sólido NFb, sendo realizada quatro repetições por diluição (DÖBEREINER *et al.*, 1992). As placas foram incubadas a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 h e foram escolhidas 15 colônias da diluição de  $10^{-4}$  de cada tratamento, totalizando 60 isolados. Estas colônias foram observadas em lupa e foram escolhidas colônias de diferentes formas e tamanho. As colônias foram transferidas para placas com meio NFb e, após 3 dias de crescimento, transferidas para placas com meio BDA, onde cresceram por cerca de 72 h. Após esse período, as bactérias foram transferidas para tubos de rosca inclinados com 5 mL de meio BDA e cresceram por aproximadamente 72 h. Em seguida, foi adicionado meio NBY com glicerina aos tubos, que foram agitados por alguns segundos no vórtex. Alíquotas de 1,5 mL e 300  $\mu\text{L}$  foram transferidas para microtubos de plástico que foram congelados em nitrogênio líquido ( $-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e depois conservados em ultrafreezer a  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o período de armazenamento, aproximadamente 30 dias, 57 dos 60 isolados tiveram crescimento satisfatório em meio BDA e foram avaliados nos testes bioquímicos e moleculares.

## 2.3 Extração de DNA das bactérias presentes nas soluções de EM

A extração de DNA dos isolados M-01, M-09, C-16, C-17, C-18, C-21, C-25, O-39, P-48, P-50, P-52, P-54, P-57 e P-59 foi feita a partir do método de lise térmica. As bactérias foram reativadas em placas contendo 20 mL de meio BDA e cresceram por 72 h. Após esse período, uma colônia de cada placa foi transferida para um microtubo contendo 1 mL de água ultra-pura e levado a banho-maria por 5 min a  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, ao banho de gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados na velocidade de 10.000 rpm durante 5 min e uma alíquota de 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi retirada e armazenada a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A extração de DNA dos isolados M-02, M-03, M-04, M-05, M-06, M-07, M-08, M-10, M-11, M-12, M-13, M-14, M-15, C-19, C-20, C-22, C-23, C-24, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30, O-31, O-32, O-33, O-34, O-35, O-36, O-37, O-38, O-40, O-41, O-42, O-43, O-45, P-46, P-49, P-51, P-53, P-55, P-56, P-58, e P-60 foi feita a partir de lise enzimática (POSPIECH & NEUMANN, 1995). As colônias foram transferidas para tubos com 1 mL de água ultrapura e foram centrifugadas por 10 min a 6.000 g. As células foram ressuspendidas em 500 µL de tampão SET (20 mM de Tris, 75 mM de NaCl e 25 mM de EDTA, pH 7,5). Foi adicionado lisozima na concentração final de 1 mg/mL e incubados a 37 °C por 30 min. Foi adicionado 50 µL de SDS 10 % e proteinase k na concentração final de 0,5 mg/mL e incubados por uma hora. Foi adicionado clorofórmio e homogeneizados por 30 s no vórtex em temperatura ambiente. Foram centrifugados por 10 min a 12000 rpm e recolhido o sobrenadante para um novo tubo. Foi adicionado isopropanol e incubados por 2 h a -20 °C. Em seguida, foram centrifugados por 10 min a 12.000 rpm e descartado o isopropanol. Foram adicionados 500 µL de etanol gelado e centrifugados a 12000 rpm por 1 min. O DNA permaneceu secando em temperatura ambiente por aproximadamente 30 min e depois foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura. Foram adicionados 0,25 µL de RNase para concentração final de 50 µg mL<sup>-1</sup> e deixado em 37 °C por uma h.

A avaliação da qualidade do DNA total foi realizada em eletroforese horizontal em gel de agarose (0,8 %, m:v) e a quantificação foi realizada pela técnica da espectrofotometria UV, variando de 250 a 350 nm (Thermo®, NanoDrop 2000).

O DNA das amostras foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). A região correspondente ao 16S rDNA da comunidade bacteriana foi amplificada utilizando-se os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-') (LANE, 1991), originando um fragmento de aproximadamente 1500 pb.

A mistura da PCR foi preparada para o volume final de 25 µL, contendo 1, 5 ou 10 µL (20 ng) de DNA total; 1,0 µL (0.2 µM) de cada primer; 5 µL (20 nM) do tampão GoTaq Buffer; 1,0 µL (200 µM) de desoxinucleosídeos trifosfatados; 0,25 µL (0.5 mg/mL) de BSA e 0,25 µL (1.25 unidades) da enzima Taq DNA polimerase #POL-100S (Cellco) e água deionizada (Milli-Q) esterilizada para se atingir o volume final.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler ep Gradient), utilizando as seguintes condições operacionais: ciclo inicial de 94 °C a

4 min para a desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 50 °C a 60 s, 72 °C a 90 s, e uma extensão final de 72 °C durante 7 min (SANTOS *et al*, 2020).

## 2.4 Sequenciamento das bactérias isoladas do EM

Os produtos de PCR amplificados de fragmentos de genes bacterianos foram sequenciados pela empresa MACROGEN, Seul, Coreia. As sequências obtidas foram comparadas com a base de dados do NCBI através de pesquisas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Nesta comparação, foram anotadas as espécies mais relacionadas com as sequências dos isolados e foi feita uma busca em artigos pelas estirpes tipo de cada gênero observado no NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando o Mafft, e as árvores filogenéticas foram reconstruídas para cada gênero separadamente. Para cada árvore filogenética foi escolhido o melhor modelo de substituição de nucleotídeos. O melhor modelo (Tabela 1) foi escolhido tendo como base o menor valor de BIC (*Bayesian Information Criterion*). Em seguida, a reconstrução filogenética foi realizada utilizando o método de Máxima Verossimilhança, 1000 bootstraps e comparando todos os sítios de alinhamento. Foi utilizado o programa MEGA 11 para a reconstrução das árvores filogenéticas.

Quadro 2: Modelo utilizado na reconstrução das árvores filogenéticas referentes a cada gênero.

Gênero	Modelo	Gênero	Modelo
<i>Acetobacter</i>	HKY+G+I	<i>Chroococcidiopsis</i>	GTR+G+I
<i>Acinetobacter</i>	K2+G+I	<i>Micrococcus</i>	TN93+G+I
<i>Bacillus</i>	K2+G+I	<i>Staphylococcus</i>	K2+G+I
<i>Burkholderia</i>	TN93+G+I	<i>Vibrio</i>	K2+G+I

Abreviações: TR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; K2: Kimura-2-parameter.

## 2.5 Caracterização bioquímica dos isolados

### 2.5.1 Fixação biológica de nitrogênio

As bactérias foram inoculadas em tubos de rosca contendo 15 mL do meio semi sólido NFb, sem nitrogênio, sendo duas repetições cada. O tempo de incubação foi de cinco dias a 28 °C, sendo feitas duas avaliações no período com a observação da formação de película de crescimento indicando a capacidade de fixar nitrogênio (BODDEY *et al.*, 1995).

### **2.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico**

As bactérias foram inoculadas em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, sendo duas placas por isolado e cada placa contendo duas repetições. O crescimento foi observado durante sete dias, onde foi observado a formação do halo de solubilização ao redor das colônias. O halo e as colônias foram medidos usando paquímetro digital para o cálculo do índice de solubilização de fosfato (Verma *et al.*, 2001).

### **2.5.3 Produção de Ácido indol-acético (AIA)**

As bactérias foram reativadas em placas contendo meio BDA e depois foram transferidas para tubos de rosca contendo meio TSA (sem ágar) e incubadas no escuro a 28 °C por 72 h a 150 rpm. Após esse período, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 min e foram transferidos 150 µL para microplacas de 96 poços e adicionado 100 µL do reagente de Salkowski (1,0 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M em 50 mL de HClO<sub>4</sub> a 35 %) (BRIC *et al.*, 1991), incubando-se por 30 min a temperatura ambiente. Foram realizadas leituras no Espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. As leituras foram normalizadas pela curva padrão com concentrações de 0 a 1000 µM mL<sup>-1</sup> de AIA. Os testes foram realizados com três repetições para cada um dos 57 isolados.

## **2.6 Análise estatística**

Para a capacidade de fixação biológica de nitrogênio foi utilizada a estatística descritiva. As variáveis solubilização de fosfato e AIA foram analisadas por análise de variância. As médias foram testadas quanto à normalidade e foram comparadas

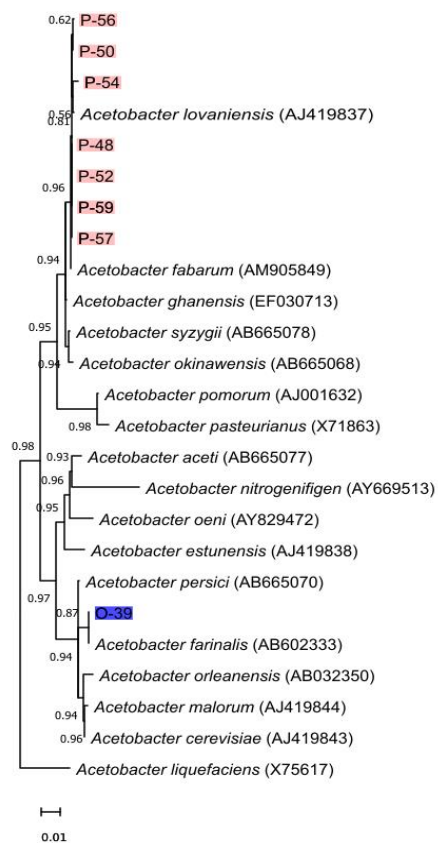
utilizando o critério de Scott-Knott utilizando o programa SAEG, adotando-se o nível de 10 % de probabilidade. A variável AIA foi analisada considerando um delineamento em blocos casualizados.

### 3 RESULTADOS

Em relação à identificação baseada no gene 16S, foi possível a identificação de 39 isolados bacterianos. Alguns isolados apresentaram dificuldade na extração do DNA ou na amplificação dos produtos da PCR, não sendo possível a identificação após o sequenciamento. Foi possível a identificação de duas espécies (*Vibrio sonorensis*, *Acetobacter farinalis*) e de seis gêneros (*Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Micrococcus* e *Priestia*).

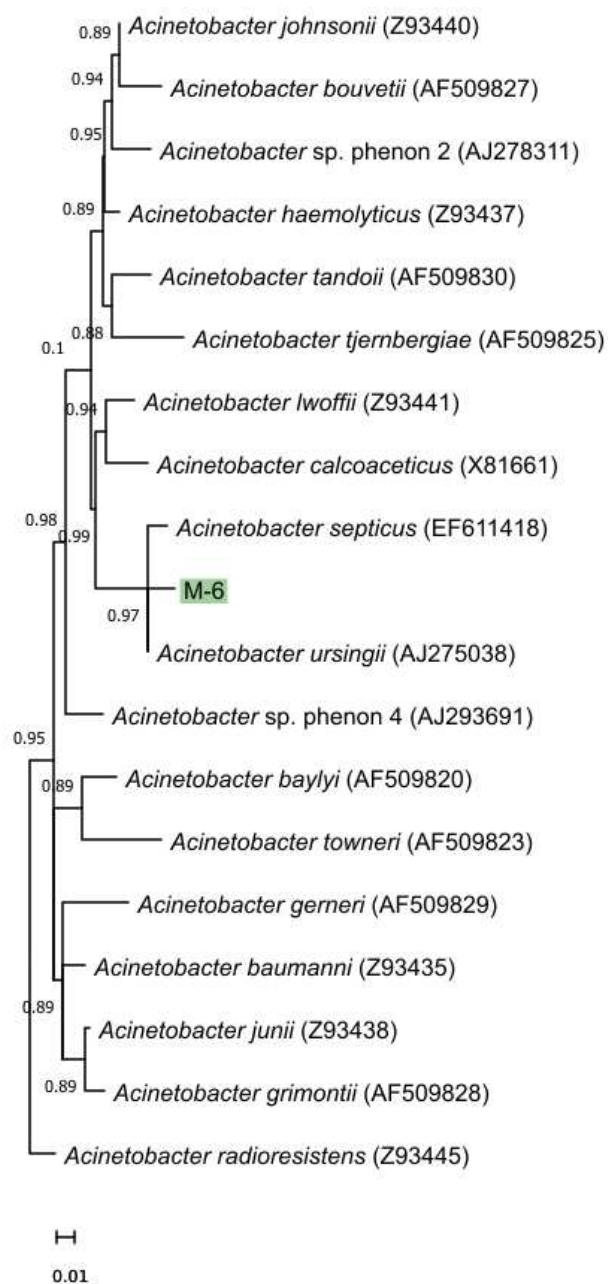
Dos isolados identificados, o isolado O-39 foi identificado com *Acetobacter farinalis* (Figura 4), enquanto os isolados P-56, P-50, P-54, P-48, P-52, P-59 e P-57 foram identificados como *Acetobacter* sp. (Figura 4), já que o bootstrap deste clado não foi bem suportado (valores abaixo de 70 %), e é preciso estudos mais detalhados para identificação a nível de espécie.

Figura 4: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para os isolados que mostraram semelhança ao gênero *Acetobacter*. Os isolados em rosa representam o tratamento produto comercial, enquanto o isolado em azul representa o tratamento cultivo de milho orgânico.



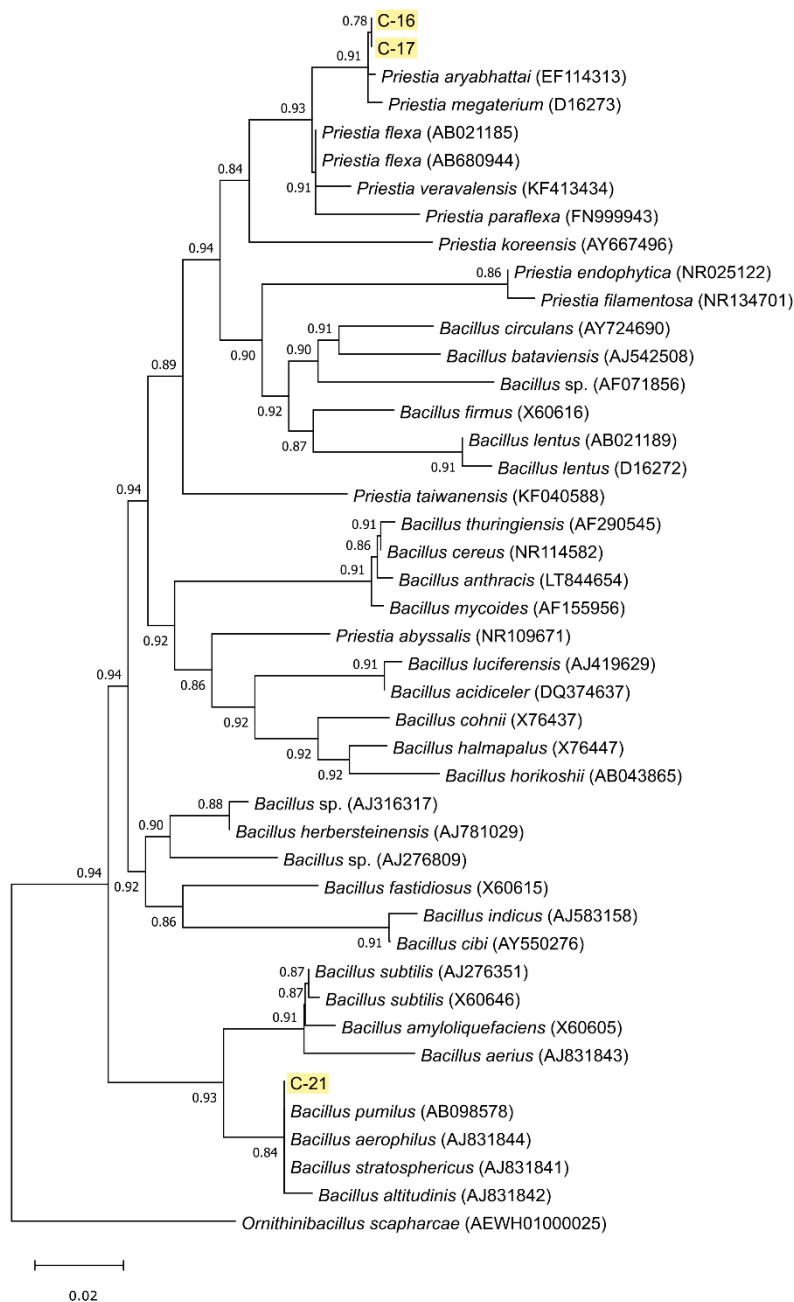
O isolado M-06 apresentou posicionamento filogenético mais próximo às espécies *Acinetobacter septicus* e *Acinetobacter ursingii*, sendo sua identificação como *Acinetobacter* sp. (Figura 5). São necessários estudos mais detalhados para identificação a nível de espécie.

Figura 5: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para o isolado que mostrou semelhança ao gênero *Acinetobacter*. O isolado em verde representa o tratamento fragmento florestal



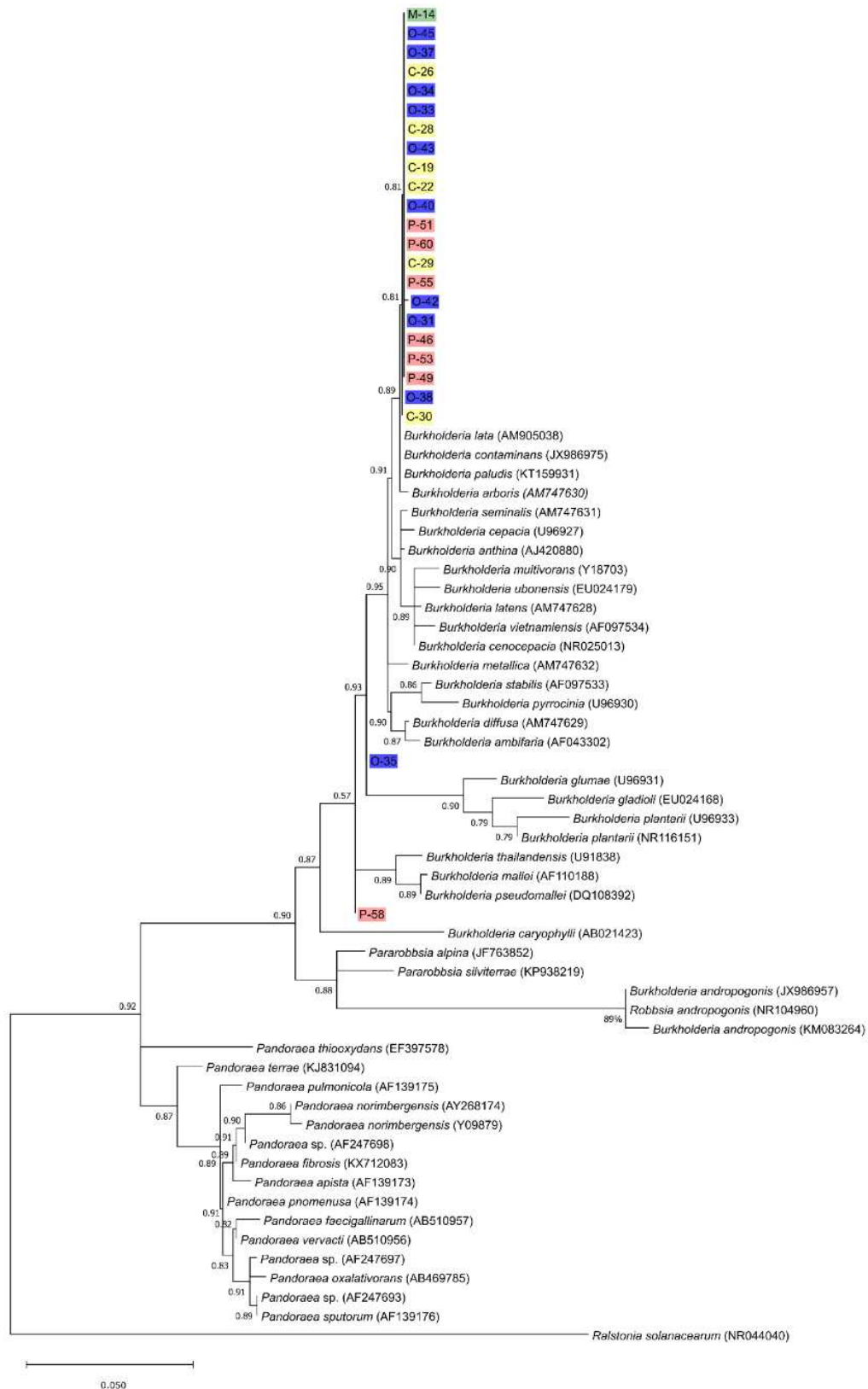
O gênero *Bacillus* é muito diverso, o que dificulta a identificação a nível de espécie. A partir do gênero *Bacillus* foram descritos novos gêneros como *Priestia* (GUPTA *et al*, 2020). O isolado C-21 foi identificado como *Bacillus* sp. (Figura 6), enquanto os isolados C-16 e C-17 foram identificados como *Priestia* sp. (Figura 6), de acordo com a filogenia.

Figura 6: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para os isolados que mostraram semelhança aos gêneros *Bacillus* e *Priestia*. Isolados em amarelo representam o tratamento cultivo de milho convencional.



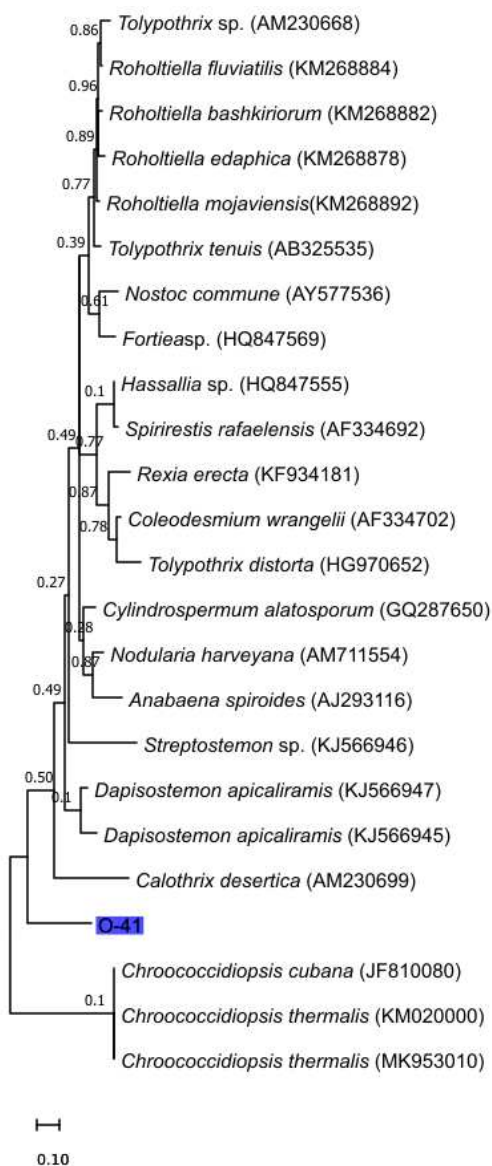
Assim como o gênero *Bacillus*, o gênero *Burkholderia* também é muito diverso (COENYE *et al.*, 2000) e a partir deste gênero formaram-se o gênero *Pandoraea* e *Robbsia*. Os isolados M-14, O-45, O-37, C-26, O-34, O-33, C-28, O-43, C-19, C-22, O-40, P-51, P-60, C-29, P-55, O-42, O-31, P-46, P-53, P-49, O-38, C-30 formaram um clado independente com alto bootstrap e mais próximo da espécie *Burkholderia lata* (Figura 7), sendo identificados como *Burkholderia* sp.. Os isolados O-35 e P-58 não agruparam com nenhuma das espécies previamente similares no BLAST, sendo identificados como *Burkholderia* sp.

Figura 7: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para os isolados que mostraram semelhança ao gênero *Burkholderia*, *Pandoraea* e *Robbsia*. Isolados em verde representam tratamento fragmento florestal, isolados em amarelo representam o tratamento cultivo de milho convencional, isolados em azul representam tratamento cultivo de milho orgânico e isolados em rosa representam tratamento produto comercial.



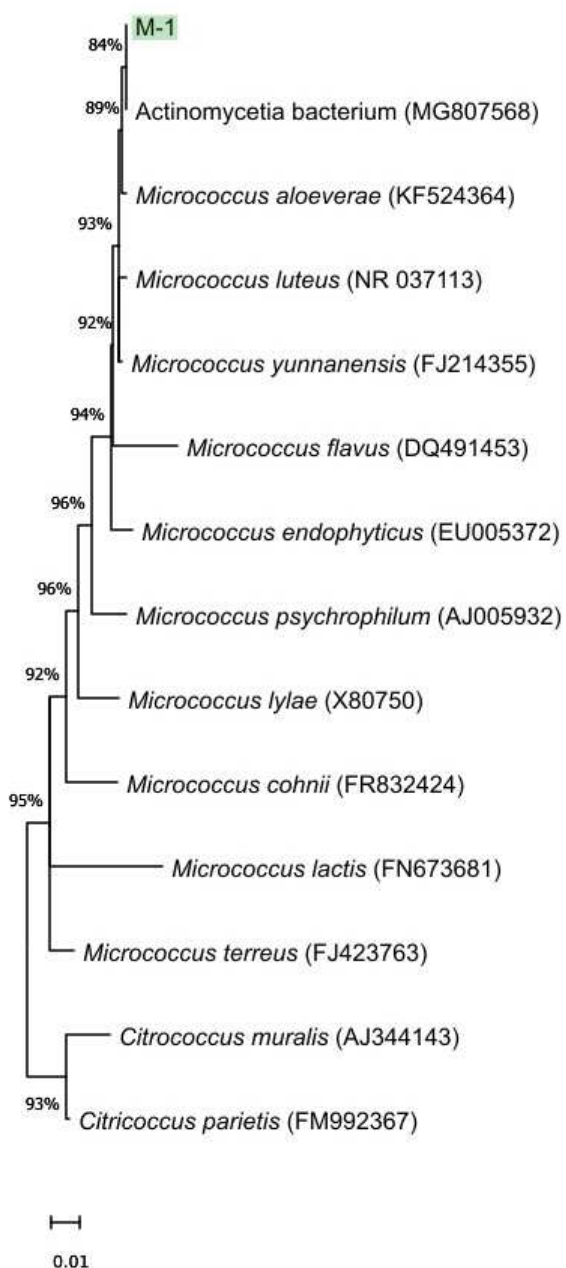
Embora o isolado O-41 tenha apresentado similaridade a espécie *Chroococcidiopsis* sp. ao realizar o BLAST, a identificação filogenética desta foi imprecisa, podendo ser uma espécie de um gênero ainda não descrito (Figura 8).

Figura 8: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para o isolado que mostrou semelhança ao gênero *Chroococcidiopsis*. O Isolado em azul representa o tratamento cultivo de milho orgânico.



O isolado M-01 foi identificado como *Micrococcus* sp. (Figura 9), de acordo com a reconstrução filogenética.

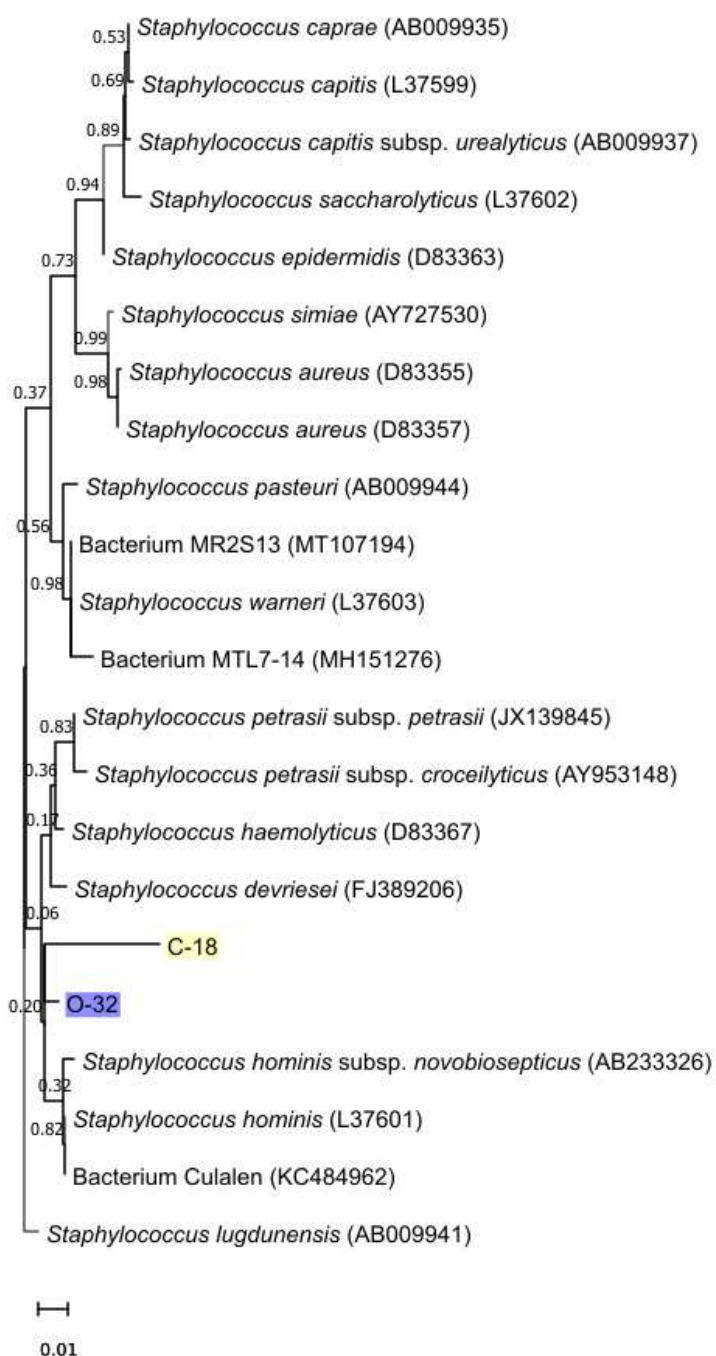
Figura 9: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para o isolado que mostrou semelhança ao gênero *Micrococcus*. O Isolado em verde representa o tratamento fragmento florestal.



Os isolados C-18 e O-32 mostraram alta similaridade com espécies do gênero *Staphylococcus* ao realizar o BLAST, mas não se aproximaram de nenhuma espécie na análise filogenética, podendo ser novas espécies (Figura 10).

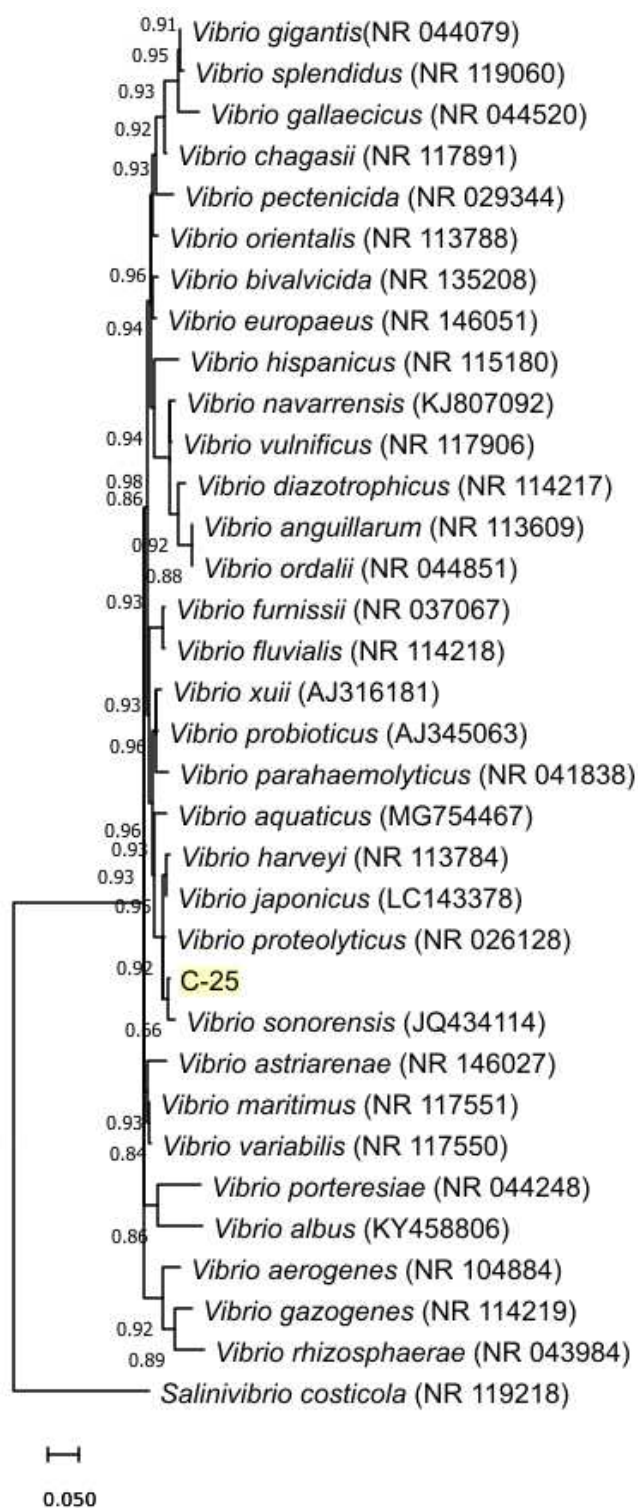
Figura 10: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para os isolados que mostraram semelhança ao gênero

*Staphylococcus*. O Isolado em azul representa o tratamento cultivo de milho orgânico e o isolado em amarelo representa o tratamento cultivo de milho convencional.



A partir da análise filogenética podemos identificar o isolado C-25 como *Vibrio sonorensis*, já que este isolado se agrupou com a estirpe de referência (Figura 11).

Figura 11: Filogenia de máxima verossimilhança com base na análise da sequência de 16S rRNA das cepas tipo para o isolado que mostrou semelhança ao gênero *Vibrio*. O isolado em amarelo representa o tratamento cultivo de milho convencional.



Dos 57 isolados testados, 43 (88,7 %) apresentaram capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Tabela 2). Dos 15 isolados testados do tratamento fragmento florestal, 11 (73,33 %) apresentaram capacidade de FBN. Dos 13 isolados testados do tratamento cultivo de milho convencional, 9 (69,23 %) apresentaram FBN. Dos 14 isolados testados do tratamento cultivo de milho orgânico, 13 (92,8 %)

apresentaram FBN. Dos 15 isolados testados do tratamento produto comercial, 9 (60 %) apresentaram FBN.

Os 43 isolados positivos para o teste de FBN foram identificados como *Micrococcus* sp. (M-01), *Acinetobacter* sp. (M-06), *Burkholderia* sp. (M-14, C-22, C-26, C-28, C-29, C-30, O-31, O-33, O-34, O-35, O-37, O-38, O-40, O-42, O-43, O-45, O-46, P-49, P-55) *Bacillus* sp. (C-21), *Acetobacter farinalis* (O-39), *Acetobacter* sp. (P-50, P-52, P-54, P-56, P-57, P-59).

Tabela 1: Isolados que apresentaram fixação biológica de nitrogênio, sendo (++) película muito visível (+) película visível e (-) não apresentou película. As letras representam os tratamentos, sendo M (fragmento florestal), C (cultivo de milho convencional), O (cultivo de milho orgânico) e P (produto comercial). As repetições correspondem a R1 e R2.

Isolado	R1	R2	Isolado	R1	R2	Isolado	R1	R2	Isolado	R1	R2
M-01	+	++	C-16			O-31	++	++	P-46	-	-
M-02	-	-	C-17			O-32	++	++	P-47	++	++
M-03	++	++	C-18	-	-	O-33	+	+	P-48	-	-
M-04	++	++	C-19	-	-	O-34	++	++	P-49	+	+
M-05	++	++	C-20	+	+	O-35	++	++	P-50	+	+
M-06	++	++	C-21	+	+	O-36	+	++	P-51	-	-
M-07	++	++	C-22	++	++	O-37	++	++	P-52	+	+
M-08	-	-	C-23	+	++	O-38	++	++	P-53	-	-
M-09	++	++	C-24	++	++	O-39	+	+	P-54	+	+
M-10	++	++	C-25	-	-	O-40	++	++	P-55	+	+
M-11	-	-	C-26	+	++	O-41	-	-	P-56	+	+
M-12	++	++	C-27	++	++	O-42	++	++	P-57	+	+
M-13	-	-	C-28	+	++	O-43	+	+	P-58	-	-
M-14	+	++	C-29	++	++	O-44			P-59	+	+
M-15	++	++	C-30	+	+	O-45	+	+	P-60	-	-

Figura 12: Formação de película (setas vermelhas) devido a fixação biológica de nitrogênio do isolado 47 do tratamento produto comercial e o isolado 48, tratamento produto comercial, que não apresentou FBN.



Dos isolados testados, 25 apresentaram capacidade de solubilização de fosfato (58,1 %) (Tabela 2), que é representada pela formação de halo ao redor da colônia (Figura 13). Dos 15 isolados testados do tratamento fragmento florestal, sete (46,67 %) apresentaram capacidade de solubilizar fosfato. Dos 13 isolados testados do tratamento cultivo de milho convencional, seis (46,15 %) solubilizaram fosfato. Dos 14 isolados testados do tratamento cultivo de milho orgânico, dois (14,29 %) solubilizaram fosfato. Dos 15 isolados testados do tratamento produto comercial, 10 (66,67 %) solubilizaram fosfato.

Os isolados que testaram positivo para a solubilização de fosfato foram identificados como *Burkholderia* sp. (M-14, C-19, C-28, C-29, O-38, P-49, P-51, P-53, P-55, P-58), *Acetobacter farinalis* (O-39), *Acetobacter* sp. (P-48, P-50, P-54, P-57, P-59).

Os isolados M-15, O-39, P-57, P-48 e P-54 representam o grupo com maiores médias (Tabela 2), diferindo do segundo grupo a 10 % de probabilidade, e são pertencentes aos tratamentos fragmento florestal (M), cultivo de milho orgânico (O), e produto comercial (P), respectivamente.

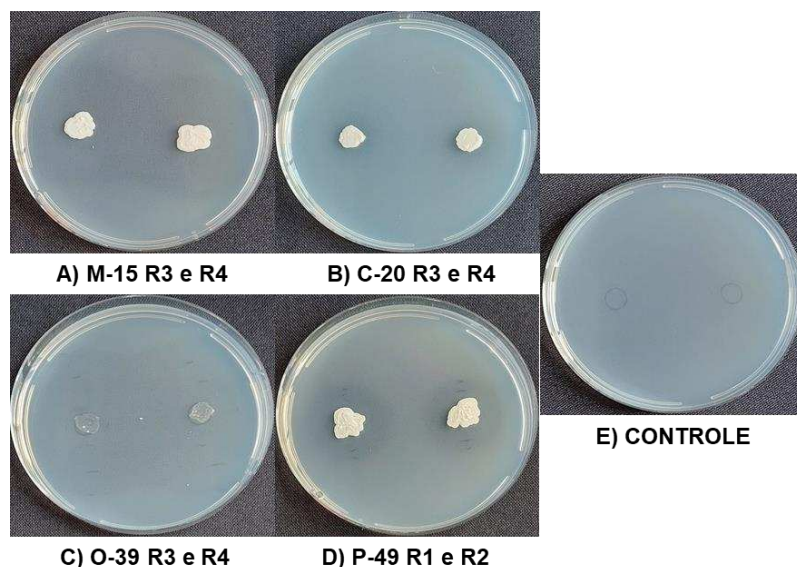
Tabela 2: Índice de solubilização (IS) obtido pelos isolados. As letras representam os tratamentos, sendo M – fragmento florestal, C - cultivo de milho convencional, O - cultivo de milho orgânico, P - produto comercial.

Isolado	IS	Isolado	IS
O-39	3.98 A	C-18	1.55 B
M-15	3.89 A	C-20	1.53 B
P-57	3.20 A	P-55	1.48 B
P-48	3.19 A	M-05	1.37 B
P-54	3.05 A	P-58	1.37 B
P-49	2.10 B	P-53	1.31 B
M-14	2.08 B	P-59	1.26 B
P-51	2.08 B	C-23	1.20 B
P-46	2.04 B	C-28	0.83 B
M-04	1.98 B	M-13	0.80 B
M-12	1.98 B	C-24	0.77 B
O-38	1.91 B	M-10	0.68 B
C-19	1.56 B		

IS= diâmetro do halo (mm) / diâmetro da colônia (mm). Grupos de média com a mesma letra são semelhantes ao nível de 10 % pelo critério de Scott-Knott.

\* F significativo a 10 % de probabilidade.

Figura 13: Formação de halo de solubilização de fosfato dos isolados dos tratamentos a) fragmento florestal, b) cultivo de milho convencional, c) cultivo de milho orgânico e d) produto comercial.



Dos isolados testados, quatro (7 %) apresentaram capacidade de produção de AIA após 72 h de incubação no escuro (Tabela 3). Os isolados foram identificados como *Micrococcus* sp. (M-01), e *Burkholderia* sp. (O-37, O-38).

Os isolados M-01, O-37, O-38 e M-08 formaram o grupo com maior produção de AIA (467,79 a 381,07  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) (Tabela 3), diferindo do segundo grupo a 10 % de probabilidade, sendo os isolados 1 e 8 pertencentes ao tratamento fragmento florestal e os isolados 37 e 38 ao tratamento cultivo de milho orgânico.

Tabela 3: Produção de ácido indolacético (AIA) em  $\mu\text{M}/\text{mL}$  pelos isolados bacterianos. As letras representam os tratamentos, sendo M - fragmento florestal, C - cultivo de milho convencional, O - cultivo de milho orgânico, P - produto comercial.

Isolado	AIA	Isolado	AIA	Isolado	AIA	Isolado	AIA
M-01	467,79 A	O-36	197,81 B	O-42	186,76 B	M-14	181,52 B
O-37	442,15 A	M-12	195,88 B	P-57	186,10 B	C-24	181,37 B
O-38	441,71 A	M-02	195,46 B	0	185,91 B	C-29	181,00 B
M-08	381,07 A	M-15	193,50 B	P-48	185,83 B	C-22	180,68 B
O-31	272,63 B	C-20	191,40 B	P-52	185,39 B	O-39	179,50 B
M-05	214,93 B	O-32	190,75 B	O-45	185,14 B	M-13	179,15 B
M-10	208,55 B	C-19	190,74 B	P-55	184,76 B	O-41	178,98 B

M-04	206,24 B	P-60	190,42 B	O-43	184,63 B	C-25	178,94 B
O-35	205,02 B	C-30	190,30 B	M-11	184,60 B	C-28	175,98 B
M-07	204,27 B	P-59	190,04 B	O-40	183,33 B	P-54	175,87 B
C-21	203,58 B	P-51	189,67 B	P-49	183,03 B	P-53	174,12 B
M-09	202,03 B	O-33	189,50 B	C-18	182,60 B	C-27	172,31 B
C-26	201,97 B	P-56	188,50 B	P-46	182,22 B		
P-58	200,05 B	M-03	187,53 B	C-23	182,10 B		
M-06	198,57 B	P-50	187,24 B	O-34	181,64 B		

Grupos de médias com a mesma letra são semelhantes ao nível de 10 % pelo critério de Skott-Knott. Valores de AIA em  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ .

\* F significativo a 10 % de probabilidade.

Dos 57 isolados testados, 21 apresentaram dois mecanismos de promoção de crescimento, sendo que 19 apresentaram capacidade de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato e dois apresentaram capacidade de fixação de nitrogênio e produção de AIA (Quadro 3). Apenas 1 isolado apresentou os três mecanismos de crescimento.

Quadro 3: Isolados bacterianos promotores de crescimento vegetal (PGPR) quanto a capacidade de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato (SF) e produção de ácido indolacético (AIA). As cores indicam atividade positiva para cada característica.

Isolados			Mecanismos de promoção de crescimento de planta		
Código	Origem	Identificação 16 S	FBN	SF	AIA
01	F. florestal	<i>Micrococcus</i> sp.			
02	F. florestal				
03	F. florestal				
04	F. florestal				
05	F. florestal				
06	F. florestal	<i>Acinetobacter</i> sp.			
07	F. florestal				
08	F. florestal				
09	F. florestal				
10	F. florestal				
11	F. florestal				
12	F. florestal				

13	F. florestal				
14	F. florestal	<i>Burkholderia</i> sp.			
15	F. florestal				
16	Convencional	<i>Priestia</i> sp.			
17	Convencional	<i>Priestia</i> sp.			
18	Convencional	<i>Staphylococcus</i> sp.			
19	Convencional	<i>Burkholderia</i> sp.			
20	Convencional				
21	Convencional	<i>Bacillus</i> sp.			
22	Convencional	<i>Burkholderia</i> sp.			
23	Convencional				
24	Convencional				
25	Convencional	<i>Vibrio sonorensis</i>			
26	Convencional	<i>Burkholderia</i> sp.			
27	Convencional				
28	Convencional	<i>Burkholderia</i> sp.			
29	Convencional	<i>Burkholderia</i> sp.			
30	Convencional	<i>Burkholderia</i> sp.			
31	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
32	Orgânico	<i>Staphylococcus</i> sp.			
33	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
34	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
35	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
36	Orgânico				
37	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
38	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
39	Orgânico	<i>Acetobacter farinalis</i>			
40	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
41	Orgânico				
42	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
43	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
45	Orgânico	<i>Burkholderia</i> sp.			
46	Comercial	<i>Burkholderia</i> sp.			
47	Comercial				
48	Comercial	<i>Acetobacter</i> sp.			
49	Comercial	<i>Burkholderia</i> sp.			
50	Comercial	<i>Acetobacter</i> sp.			
51	Comercial	<i>Burkholderia</i> sp.			
52	Comercial	<i>Acetobacter</i> sp.			
53	Comercial	<i>Burkholderia</i> sp.			
54	Comercial	<i>Acetobacter</i> sp.			
55	Comercial	<i>Burkholderia</i> sp.			
56	Comercial	<i>Acetobacter</i> sp.			
57	Comercial	<i>Acetobacter</i> sp.			
58	Comercial	<i>Burkholderia</i> sp.			
59	Comercial	<i>Acetobacter</i> sp.			
60	Comercial	<i>Burkholderia</i> sp.			

## 4 DISCUSSÃO

O isolamento de bactérias ocorreu a partir das diferentes formulações de EM e verificou-se que dos 60 isolados apenas 3 não apresentaram crescimento após congelamento rápido em nitrogênio líquido (-196 °C) e conservação em ultrafreezer a - 80 °C em glicerol por 30 dias. Embora a criopreservação possa manter uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas (-20 °C a -80 °C) (CANHOS *et al.*, 2004), sendo eficiente na manutenção da integridade celular, em alguns casos pode comprometer a qualidade das amostras devido a variação de temperaturas em freezers (SOLA *et al.*, 2012). Fatores como taxa de congelamento, tamanho e desidratação da célula, taxa de descongelamento e a capacidade de regeneração celular podem afetar a sobrevivência das células na criopreservação (MAZUR, 1984). No congelamento rápido ocorre menor desequilíbrio osmótico, mas pode ocorrer injúria celular devido a formação de gelo intracelular, com conseqüente rompimento das membranas celular e plasmática (ROJAS, 2007). Assim, recomenda-se a adoção de mais de um método de preservação para evitar a perda de isolados.

A obtenção de 43 isolados (88,7 %), de diferentes tratamentos, capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio é relativamente alta, uma vez que foi utilizado meio seletivo para esse processo.

A presença de bactérias fixadoras de nitrogênio em soluções de EM não havia sido relatada na literatura até o momento. Entretanto, havia informações do aumento da nodulação em *Phaseolus vulgaris* e *Vigna radiata*, indicando a capacidade do EM de favorecer a nodulação em leguminosas (SANGAKKARA & HIGA, 1994), bem como do aumento do número de bactérias fotossintetizantes e fixadoras de nitrogênio (HIGA & WIDIDANA, 1991).

As quatro diferentes formulações de EM permitiram o isolamento de BFN, sendo 11 do tratamento fragmento florestal, 10 do tratamento cultivo de milho convencional, 13 do tratamento cultivo de milho orgânico e 9 do tratamento produto comercial. As bactérias fixadoras de nitrogênio são encontradas em associação com diferentes espécies vegetais, incluindo o milho (BALDANI & BALDANI, 2005). A porcentagem de bactérias capazes de fixar nitrogênio pode ser alta em milho, como nos trabalhos de Ikeda *et al.* (2020), onde 59 (63,4 %) de 93 isolados bacterianos das raízes de milho foram capazes de fixar nitrogênio no meio JNFb semi-sólido; e Richard

*et al.* (2018), onde sete (63,63 %) dos 11 isolados bacterianos da rizosfera de milho apresentaram FBN. Ao avaliar a rizosfera de milho de diferentes localidades no México, 31 (57 %) de 54 isolados foram capazes de crescer em placas com meio NFb, porcentagem menor que a observada no tratamento cultivo de milho convencional (69,23 %) e cultivo de milho orgânico (92,8 %) (TORIBIO-JIMÉNEZ *et al.*, 2017).

As espécies diazotróficas já conhecidas em associação com a cultura do milho são pertencentes principalmente aos gêneros *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Rhizobium* (VINHAL-FREITAS & RODRIGUES, 2010), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus* (SILVA *et al.*, 2016) e as espécies *Pseudomonas* sp., *Klebsiella terrigena*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus circulans* (BERGE *et al.*, 1991), *Enterobacter asburiae* e *Bacillus* sp. (SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014) também já foram relatadas com capacidade de FBN. No presente estudo os isolados fixadores de nitrogênio foram pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Acetobacter* e *Micrococcus*, com identificação da espécie *Acetobacter farinalis*.

O gênero *Staphylococcus* já foi relatado na fixação de nitrogênio em associação com plantas. Dois isolados da rizosfera e de raízes de milho de diferentes locais em Guerrero, México, identificados como *Staphylococcus aureus*, foram capazes de crescer em placas contendo meio Nfb, indicando capacidade de fixar nitrogênio (TORIBIO-JIMÉNEZ *et al.*, 2017). Outros trabalhos relatam espécies do gênero *Staphylococcus* com capacidade de FBN sendo estas isoladas de raspagem de biofilmes de prédio antigo (JADHAV *et al.*, 2010) e isoladas de ambientes costeiros (YOUSUF *et al.*, 2020), com a identificação das espécies *Staphylococcus caprae*, *S. warneri* e *S. arlettae*.

Espécies do gênero *Acetobacter* são espécies endofíticas conhecidas pela capacidade de fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar, por exemplo (PEDRAZA, 2008). Isolados endofíticos de diferentes espécies de plantas (*Cynodon dactylon*, *Pothos scandens*, *Ipomea batata*, *Saccharum officinarum*, *Musa paradica* e *Zea mays*) foram testados quanto a capacidade de fixação de nitrogênio e identificados como pertencentes aos gêneros *Acetobacter* e *Azospirillum* (JHALA *et al.*, 2014). A espécie *Acetobacter farinalis* (Figura 4) ainda não havia sido descrita como fixadora de nitrogênio.

O gênero *Micrococcus* já foi relatado com a capacidade de FBN (ISLAM *et al.*, 2016). O isolado *Micrococcus luteus* CR03, isolado da superfície de raízes de *Cereus*

*peruvianus*, apresentou capacidade de FBN em meio semi-sólido Nfb (BERALDO-BORRAZZO *et al.*, 2021). Já a espécie *Micrococcus luteus*, isolada de *Coryphantha neglecta*, demonstrou FBN pelo método de redução de acetileno (LOERA *et al.*, 1996). O isolado identificado como *Micrococcus* sp., isolado da rizosfera de milho, apresenta capacidade de FBN no meio GNFM (AGU *et al.*, 2021).

Apesar dos isolados terem sido obtidos em meio NFb sólido, sem nitrogênio, nem todos apresentaram capacidade de FBN em meio NFb semi-sólido, pH 6,8. Isto pode ter ocorrido devido à condição de anaerobiose apresentada pelo meio semi-sólido, ou por alguns isolados não fixadores crescerem em associação com isolados fixadores de nitrogênio e, durante o isolamento, estes perderam a capacidade de crescimento. Resultado contrastante foi encontrado por Arsita *et al.* (2020), em que dos 20 isolados bacterianos da rizosfera de milho todos foram capazes de crescer em meio NFb sólido e de formar película em meio NFb semi-sólido em pH 8.

Outra importante função das bactérias avaliadas é a capacidade de solubilização de fosfato, sendo que dos 57 isolados bacterianos testados, 25 (58,1 %) apresentaram capacidade de solubilização de fosfato, sendo 7 do tratamento fragmento florestal, 6 do tratamento cultivo de milho convencional, 2 do tratamento cultivo de milho orgânico e 10 do tratamento produto comercial. A presença de bactérias solubilizadoras de fosfato em soluções de EM não havia sido relatada até o momento, mas a aplicação de EM ao solo levou ao incremento de fósforo inorgânico, mostrando que os microrganismos presentes podem aumentar as quantidades de fósforo no solo (HIGA & WIDIDANA, 1991). Estes microrganismos com capacidade de solubilizar fosfato já foram relatados na rizosfera de milho (RAMOS *et al.*, 2018). Gomes *et al.* (2014) relataram que, de 46 bactérias isoladas da rizosfera de milho, 51 % foram classificadas como eficientes na solubilização de fosfato de rocha, porcentagem próxima ao que foi observado no tratamento cultivo de milho convencional (46,15 %) e maior que a observada no tratamento cultivo de milho orgânico (14,29 %). Manzoor *et al.* (2017) observaram que 11 (19,3 %) dos 57 isolados bacterianos da rizosfera de milho foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico e apresentaram alto índice de solubilização variando de 1,94 e 3,69. Valores semelhantes de índices de solubilização de fosfato foram encontrados no presente trabalho (0,68 a 3,98) (Tabela 2).

Os isolados O-39, M-15, P-57, P-48 e P-54 apresentaram maior índice de solubilização de fosfato. Embora o tratamento cultivo de milho convencional tenha

apresentado alta porcentagem de isolados com capacidade de solubilização de fosfato estes não apresentaram altos valores de índice de solubilização.

Os isolados que apresentaram maiores índices de solubilização de fosfato foram identificados como *Acetobacter farinalis* (O-39), e *Acetobacter* sp. (P-57, P-48 e P-54). Outras espécies isoladas da rizosfera de milho já haviam sido descritas como solubilizadoras de fosfato, como *Bacillus flexus*, *B. megaterium* e *Sinorhizobium meliloti* (IBARRA-GALEANA *et al.*, 2017), além das estirpes KNU17B12 e KNU17B13, isoladas da rizosfera de milho cultivado na Coreia do Sul, identificadas como *Burkholderia cenocepacia* e *Burkholderia contaminans* (TAGELE *et al.*, 2019). Espécies do gênero *Acetobacter* e *Azospirillum* isolados dos tecidos de várias espécies de plantas (*Cynodon dactylon*, *Pothos scandens*, *Ipomea batata*, *Saccharum officinarum*, *Musa paradica* e *Zea mays*) mostraram capacidade de solubilização de fosfato em meio Pikovskaya (JHALA *et al.*, 2014).

A produção de AIA por microrganismos isolados de EM não havia sido relatada até o momento, porém os isolados M-01, O-37, O-38 e M-08 foram capazes de produzir AIA (467,79, 442,15, 441,71 e 381,07  $\mu\text{M mL}^{-1}$ , respectivamente). No entanto, a utilização do EM pode promover o aumento de AIA nas plantas, como em feijão, sob diferentes níveis de salinidade, tratado com EM apresentou maiores concentrações de AIA nas folhas (TALAAT, 2019).

Foram obtidos isolados produtores de AIA das formulações de EM de fragmento florestal e de cultivo de milho orgânico, sendo o cultivo de milho um ambiente onde comumente se encontram microrganismos produtores de AIA. Um total de 286 isolados de raízes e rizosfera de milho de diferentes locais no estado do Rio Grande do Sul foi capaz de produzir AIA *in vitro* no meio King B suplementado com L-triptofano (ARRUDA *et al.*, 2013). 15 isolados bacterianos de milho e trigo mostraram capacidade de produção de AIA em caldo succinato com e sem triptofano (KARNWAL, 2012). De 27 isolados das raízes de milho, 18 (66,7 %) foram capazes de produzir AIA no método de detecção utilizando reagente de Salkowsky (PEDRINHO *et al.*, 2010).

Os isolados produtores de AIA no presente trabalho foram identificados como *Micrococcus* sp. (M-01) e *Burkholderia* sp. (O-37, O-38). O isolado M-08 não foi identificado no sequenciamento do gene 16S. A espécie *Burkholderia phytofirmans* estirpe PsJN foi relatada como uma rizobactéria que coloniza a rizosfera e tecidos internos da planta e promove o crescimento e produção de diferentes culturas por meio de diferentes mecanismos (NAVEED *et al.*, 2015). A inoculação desta PGPR foi

responsável por melhorar a sobrevivência de plantas de milho, melhorar a biomassa de raízes e parte aérea, além de produzir ácido indol acético. As estirpes KNU17B12 e KNU17B13, isoladas da rizosfera de milho cultivado na Coreia do Sul, também mostraram capacidade de produzir AIA em meio LB, independente da adição de L-triptofano, e foram identificadas como *Burkholderia cenocepacia* e *Burkholderia contaminans* (TAGELE *et al.*, 2019). Os isolados da rizosfera de banana, trigo e de milho, identificados como *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus casei*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *Lactobacillus acidophilus*, respectivamente, também apresentaram capacidade de produção de AIA (MOHITE, 2013). Isolados da rizosfera e de raízes de milho de cinco regiões do estado do Rio Grande do Sul também mostraram capacidade de produzir AIA na presença de triptofano, sendo a maioria dos isolados pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Enterobacter* (ARRUDA *et al.*, 2013).

O gênero *Micrococcus* já foi relatado com capacidade de produção de AIA (ISLAM *et al.*, 2016). Esse gênero já foi encontrado na rizosfera de floresta na costa oeste da Índia e apresentou capacidade de produzir AIA em meio com e sem suplementação com L-triptofano (DASTAGER *et al.*, 2010). Isolados da rizosfera de *Panicum maximum*, identificados como *Micrococcus* sp., também apresentaram capacidade de produzir AIA na presença de L-triptofano, com valores de 10 e 7 mg/L (MIKE-ANOSIKE *et al.*, 2018). Um isolado de solo/areia costeiro e rizosfera de plantas pantanosas das proximidades das praias da Ilha Diu, Índia, identificado como *Micrococcus aloeverae*, mostrou capacidade de produzir AIA em meio com e sem adição de triptofano (AHMAD *et al.*, 2020).

As propriedades do solo, como pH e matéria orgânica, afetam a comunidade microbiana do solo e da rizosfera (ANDERSON *et al.*, 2018; ROUSK *et al.*, 2010). O manejo adequado do solo é essencial para a manutenção e diversidade dos microrganismos, sendo que o manejo mais conservacionista, como o cultivo orgânico, possibilita melhores características de solo, como pH, água, matéria orgânica, exsudatos radiculares, oferecendo melhores condições para o recrutamento de microrganismos e seu metabolismo (FIGUEIREDO *et al.*, 2021; PRATES JÚNIOR *et al.*, 2021). O uso de fertilizantes orgânicos e de composto orgânico pode aumentar a biomassa microbiana do solo, evolução de dióxido de carbono e atividade enzimática, além de alterar positivamente a atividade e diversidade de microrganismos do solo (LIU *et al.*, 2021), enquanto a adição de fertilizantes químicos ao solo pode levar à

diminuição do pH e da diversidade microbiana (DAI *et al.*, 2018). Desta forma, pode-se perceber a importância do manejo para manter boas características físico-químicas do solo, além da influência destas características na microbiota local. Sendo assim, ambientes mais conservados, como fragmento florestal, e ambientes de cultivo orgânico, como a área de cultivo de milho com mais de 30 anos de manejo orgânico, podem favorecer o metabolismo e a diversidade de microrganismos que podem exercer funções importantes no crescimento das plantas e na estabilidade do ecossistema.

Dos 60 isolados obtidos a partir de soluções de EM provenientes de um fragmento florestal, uma área de cultivo de milho convencional, uma área de cultivo de milho orgânico e do produto comercial observou-se três mecanismos de promoção de crescimento (Quadro 3). Apenas um isolado (O-38), isolado do tratamento cultivo de milho orgânico e identificado como *Burkholderia* sp., apresentou os 3 mecanismos de promoção de crescimento. O gênero *Burkholderia* já foi relatado como uma PGPR presente na rizosfera de milho (ARRUDA *et al.*, 2013).

O isolamento e caracterização de microrganismos com vários mecanismos de promoção de crescimento é uma estratégia na obtenção de microrganismos com potencial biotecnológico para o aumento da produção das culturas (KENNEDY *et al.*, 2004). O emprego destes microrganismos torna a agricultura mais sustentável, reduzindo a quantidade de fertilizantes químicos aplicados que, além de poluentes, encarecem a produção (GUPTA *et al.*, 2022).

A colonização do arroz cozido para a fabricação do EM artesanal normalmente é feita em áreas de mata sem intervenção humana. Com o presente trabalho podemos observar que áreas de cultivo menos intensivo também podem ser utilizadas para a obtenção destes microrganismos, mas não podemos descartar a importância das áreas de mata para a construção de uma agricultura sustentável e limpa.

## 5 CONCLUSÃO

As diferentes formulações de EM artesanais e comercial possuem bactérias promotoras de crescimento vegetal, e isolados que apresentam mais de um

mecanismo de promoção de crescimento, como o isolado O-38 (*Burkholderia* sp.), tem alto potencial biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

AGU, G. C.; EJIGBO, E. A; EZAKA, E. Isolation and characterization of bacteria with biofertilizer potential. **FUW Trends in Science & Technology Journal**, v. 6, n. 2, 2021.

AHMAD, E.; SHARMA, S. K.; SHARMA, P. K. Deciphering operation of tryptophan-independent pathway in high indole-3-acetic acid (IAA) producing *Micrococcus aloeverae* DCB-20. **FEMS Microbiology Letters**, v. 367, n. 24, 2020.

ANDERSON, C. R.; PETERSON, M. E.; FRAMPTON, R. A.; BULMAN, S. R.; KEENAN, S.; CURTIN, D. Rapid increases in soil pH solubilise organic matter, dramatically increase denitrification potential and strongly stimulate microorganisms from the *Firmicutes* phylum. **PeerJ** 6:e6090, 2018. <https://doi.org/10.7717/peerj.6090>

ARRUDA, L. *et al.* Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, 15–22, 2013.

ARSITA, R.; KARIM, H.; HALA, Y.; IRIANY, N.; JUMADI, O. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacteria in the corn rhizosphere (*Zea mays* L.) originating from Jeneponto Regency, South Sulawesi. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, **484**, 012051, 2020 doi:10.1088/1755-1315/484/1/012051

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BERALDO-BORRAZZO, J. *et al.* Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae) plants obtained from seeds and from in vitro-regenerated somaclone. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 335-343, 2021.

BERGE, O.; HEULIN, T.; BALANDREAU, J. Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. **Biol Fertil Soils**, 11, 210-215, 1991.

BODDEY, R. M.; De OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; DEOLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen-fixation associated with sugar-cane and rice - contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, **174**, 195 - 209. 1995

BONFIM, F. P. G.; HONÓRIO, I. C. G.; REIS I. L.; PEREIRA A. J; Souza, D. B. Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia; 2011. 32p.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Applide and Environmental Microbiology*, 57: 535-538. 1991.

CANAL RURAL. **Milho: Safras eleva estimativa de produção do Brasil para 118 mi de toneladas**. Disponível em:  
<https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/milho-safras-eleva-estimativa-de-producao-do-brasil-para-118-mi-de-toneladas/>

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.

CANTARELLA, H.; MARCELINO, R.. Fontes alternativas de nitrogênio para a cultura do milho. **Informações Agronômicas**, v. 122, p. 12-14, 2008.

CHAUDHARY, H. J.; PENG, G.; HU, M.; HE, Y.; YANG, L.; LUO, Y.; TAN, Z. Genetic Diversity of Endophytic Diazotrophs of the Wild Rice, *Oryza alta* and Identification of the New Diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. **Microb Ecol.** 63, 813–821. 2012. DOI 10.1007/s00248-011-9978-5.

COELHO, S. P. *et al* (2021). *Azospirillum brasilense* increases corn growth and yield in conventional low input cropping systems. **Renewable Agriculture and Food Systems**, 36, 225–233. <https://doi.org/10.1017/S1742170520000241>

CONTINI, E. *et al.* Milho - Caracterização e Desafios Tecnológicos. **SÉRIE DESAFIOS DO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO (NT2)**. Embrapa, 2019.

CRUZ, J. C.; KONZEN, E. A.; PEREIRA FILHO, I. A.; MARRIEL, I. E.; CRUZ, I.; DUARTE, J. de O.; OLIVEIRA, M. F. de; ALVARENGA, R. C. Produção de milho orgânico na agricultura familiar. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2006.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; PIMENTEL, M. A. G.; COELHO, A. M.; KARAM, D.; CRUZ, I.; GARCIA, J. C.; MOREIRA, J. A. A.; OLIVEIRA, M. F. de; GONTIJO NETO, M. M.; ALBUQUERQUE, P. E. P. de; VIANA, P. A.; MENDES, S. M.; COSTA, R. V. da; ALVARENGA, R. C.; MATRANGOLO, W. J. R.. Produção de milho na agricultura familiar. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2011.

DAI, Z. *et al.* Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of *Actinobacteria* and *Proteobacteria* in agro-ecosystems across the globe. **Glob Change Biol**, v. 24, n. 8, 2018. <https://doi.org/10.1111/gcb.14163>.

DASTAGER, S. G.; DEEPA, C. K.; PANDEY, A. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48, 2010.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas: **SBCS**, p. 173- 180. 1992.

DOURADO, E. da R. Microrganismos eficientes (EM) no tratamento de sementes de milho. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. 2018.

EL-MAGEED, T. A. A.; RADY, M. M.; TAHA, R. S.; AZEAM, S. A. E.; SIMPSON, C. R.; SEMIDA, W. M. Effects of integrated use of residual sulfur-enhanced biochar with effective microorganisms on soil properties, plant growth and short-term productivity of *Capsicum annuum* under salt stress. **Scientia Horticulturae**, 261, 2020, 108930.

FERNANDES, P. H; PORTO, D. W. B.; FRANÇA, A. C.; FRANCO, M. H. R.; MACHADO, C. M. M. Uso de fertilizantes organominerais fosfatados no cultivo da alface e de milho em sucessão. **Brazilian Journal of Development**. Vol 6, No 6, 2020.

FIGUEIREDO, N. O. *et al.* Microrganismos eficientes para uma produção sustentável. In: CARMO, D. L. *et al.* (Org.). Diálogos transdisciplinares em Agroecologia: Projeto Café com Agroecologia. Viçosa: **FACEV**, 2021. cap. 19, p. 274-287.

GALATA, R. F.; CARVALHO, A.; CRESPI, D.; CRUZ, M. S. S.; SANTOS, J. D. Soluções agroecológicas para o cultivo do milho: construindo bases para a transição no Extremo Sul da Bahia. In: VI Congresso Latino-Americano de Agroecologia, X Congresso Brasileiro de Agroecologia, V Seminário do DF e Entorno. v. 13 n. 1 (2018): Anais eletrônicos... Brasília/DF, 2017 DF, 2017. Disponível em <http://cadernos.aba-agroecologia.org.br/index.php/cadernos/article/view/1518>.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo do milho. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 61, Suplemento, p. 819-828, 2014.

GLICK, B. R. Review Article. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Hindawi Publishing Corporation Scientifica Volume**, 2012. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>

GOMES, E. A.; SILVA, U de C.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A. de; LANA, U. G. de P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.13, n.1, p. 69-81, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v13n1p69-81>.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SHARMA, S.; ALZHRANI, O. M.; NOURELDEEN, A.; DARWISH, H. Identification, characterization and optimization of phosphate solubilizing rhizobacteria (PSRB) from rice rhizosphere. **Saudi Journal of Biological Sciences**, V. 29, N. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.075>.

GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 70, 5753–5798, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004475.

HIGA, T.; PARR, J. F. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. **International Nature Farming Research Center Atami**. Japan: 1994.

HIGA, T.; WIDIDANA, G. N. Concept and theories of effective microorganisms. In: PARR, J. F.; HORNIC, S. B.; WHITMAN, C. E. (Eds.), *Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming*, US Department of Agriculture, Washington, DC, USA, pp. 118–124. 1991

IBARRA-GALEANA, J. A.; CASTRO-MARTÍNEZ, C.; FIERRO-CORONADO, R.A. *et al.* Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico. **Ann Microbiol**, 67, 801–811, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1308-9>

IKEDA, A. C.; SAVI, D. C. ; KAVA, V. ; GLIENKE, C. ; HUNGRIA, M. ; GALLI-TERASAWA, L. V. . Bioprospecting of elite plant growth-promoting bacteria for the maize crop. **ACTA SCIENTIARUM-AGRONOMY**, v. 42, 2020.

ISLAM, E.; CHAKRABORTY, A.; BHAKAT, K. Characterization of Arsenic Oxidation and Chromium Reduction Potential of *Micrococcus* Sp. with Plant Growth Promoting Traits. **International Conference on Agriculture, Food Science, Natural Resource Management and Environmental Dynamics: The Technology, People and Sustainable Development**, 2016.

JADHAV, G. SALUNKHE, D.; NERKAR, D.; BHADEKAR, R. Novel *Staphylococcus* sp. isolated from wall scrapings of a historical building in India. **Ann Microbiol**, 60, 197–201, 2010. DOI 10.1007/s13213-010-0027-2.

JHALA, Y. K.; SHELAT, H. N.; VYAS, R. V.; PANPATTE, D. G. Endophytic bacteria as biofertilizers for maize (*Zea mays* L.). **The Bioscan**, v. 9, n. 3, p. 1191-1196, 2014.

JOSHI, H.; SOMDUTTAND; CHOUDHARY, P.; MUNDRA, S. L. Role of Effective Microorganisms (EM) in Sustainable Agriculture. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** v. 8, n.3, 172-181. 2019 doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.024>

KARNWAL, A. Screening of plant growth–promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*). **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v.12, n.3. 2012

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, 2004.

LANE D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT E.; GOODFELLOW M, eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, USA. p. 115–175. 1991.

LIU, Y.; LV, Z.; HOU, H.; LAN, X.; JI, J.; LIU, X. Long-term effects of combination of organic and inorganic fertilizer on soil properties and microorganisms in a Quaternary Red Clay. **PLoS ONE**, v. 16, n. 12, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261387>

LOERA, T. M. L.; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M.; PEÑA-CABRIALES. Acetylene reduction activity on the root of cactaceous plants. **Rev. Lat.-Amer. Microbiol.**, 38, 7-15, 1996.

MANZOOR. M.; ABBASI, M. K.; SULTAN, T. Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Maize Rhizosphere and Their Potential for Rock Phosphate Solubilization–Mineralization and Plant Growth Promotion, **Geomicrobiology Journal**, v.34, n. 1, 81-95, 2017 DOI: 10.1080/01490451.2016.1146373

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da.; ASSIS, S. M. P. de.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.

MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and Implications. **The American Journal of Physiology**, v. 247, p. c125-c142, 1984.

MIKE-ANOSIKE, E. E.; BRAIDE, W.; ADELEYE, S. A. Studies on indole acetic acid (IAA) production by rhizobacteria and growth promoting potentials. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci**, v. 5, n. 2, p. 133-140, 2018.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 13, n.3, 2013.

MOROCHO, M. T.; LEIVA-MORA, Michel. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. **Ctro. Agr., Santa Clara** , v. 46, n. 2, p. 93-103, jun. 2019 . Disponível em:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852019000200093&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000200093&lng=es&nrm=iso).

NAVEED, M.; QURESHI, M. A.; ZAHIR, Z. A.; HUSSAIN, M. B.; SESSITSCH, A.; MITTER, B. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Annal of Microbiology**, 65, 1381-1389, 2015. DOI 10.1007/s13213-014-0976-y.

OLLE, M.; WILLIAMS, I. I. Effective microorganisms and their influence on vegetable production – a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 88, n. 4, 380-386, 2013. DOI: 10.1080/14620316.2013.11512979.

PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079>.

PEDRINHO *et al.*, Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p905-911, 2010.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. Versatile quick-prep of genomic DNA from Gram - positive bacteria. **Trends in Genetics**, 11, 217-218, 1995.

PRATES JÚNIOR, P.; ARAÚJO, K. S.; MARTIN, J. G. P. Microbiologia e agroecologia: parceria para a saúde do corpo, dos ecossistemas e da mente. In: CARMO, D. L. et al. (Org.). *Diálogos transdisciplinares em Agroecologia: Projeto Café com Agroecologia*. Viçosa: **FACEV**, 2021. cap. 20, p. 288-304.

RAMOS, R. F.; SOBUCKI, L.; ROHRIG, B.; LUDWIG, J.; DAROIT, D. J. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 17, n. 3, p. 417-427, 2018. DOI: 10.5965/223811711732018417. Disponível em: <https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/9284>.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J. da.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, p. 214-226, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/141168>>.

RICHARD, P. O.; ADEKANMBI, A. O.; OGUNJOBI, A. A. Screening of bacteria isolated from the rhizosphere of maize plant (*Zea mays* L.) for ammonia production and nitrogen fixation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 34, pp. 829-834. 2018.

ROGATTO, L.. Agricultura familiar. **Cienc. Cult.**, São Paulo , v. 65, n. 1, p. 08-10, Jan. 2013 . Disponível em <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252013000100004&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252013000100004&lng=en&nrm=iso)>. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252013000100004>.

ROJAS, E. U. Avaliação da viabilidade e da variabilidade da microbiota salivar armazenada em diferentes temperaturas. 2007. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P. *et al.* Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, 4, 2010.

SANGAKKARA U.R.; HIGA T. Effect of EM on nitrogen fixation by bush bean and mungbean, In PARR J. F.; HORNICK S.B.; SIMPON M. E (eds) Proceeding of the 2nd International Conference on Kyusei Nature Farming U.S Department of Agriculture, Washington DC , USA., 111- 117 (1994)

SANTOS, L. F. dos.; LANA, R. P.; SILVA, M. C. S. da.; VELOSO, T. G. R.; KASUYA, M. C. M.; RIBEIRO, K. G. Effective microorganisms inoculant: Diversity and effect on the germination of palisade grass seeds. **An Acad Bras Cienc** (2020) 92(suppl.1): e20180426 DOI 10.1590/0001-3765202020180426 a

SANTOS, L. F. dos; SILVA, M. de C. S.; LANA, R. de P.; DIOGO, N. V.; KASUYA, M. C. M.; RIBEIRO, K. G. Effective microorganisms: Microbial diversity and its effect on the growth of palisade grass. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 8, n. 3, 177–186, 2020 doi: 10.17138/TGFT(8)177-186 b

SHAH, S. H.; SALEEM, M. F.; SHAHID, M. Effect of Different Fertilizers and Effective Microorganisms on Growth, Yield and Quality of Maize. **Int. J. Agri. Biol.**, v. 3, n. 4, 2001.

SILVA, K. da; PERIN, L.; GOMES, M. de L.; BARAÚNA, A. C.; PEREIRA, G. M. D.; MOSQUEIRA, C. A.; COSTA, I. B. da.; O'HARA, G.; ZILLI, J. E. Diversity and capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon region. **Acta Amaz.**, v. 46, n. 2, 111 - 118, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201502502>

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P. de, FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. e. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.8, n.14; 2012.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **Amb Express**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2014.

TAGELE, S. B.; KIM, S. W.; LEE, H. G.; LEE, Y. S. Potential of Novel Sequence Type of *Burkholderia cenocepacia* for Biological Control of Root Rot of Maize (*Zea mays* L.) Caused by *Fusarium temperatum*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 5, 2019. DOI: 10.3390/ijms20051005.

TALAAT, N. B. Effective microorganisms: An innovative tool for inducing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) salt-tolerance by regulating photosynthetic rate and endogenous phytohormones production. **Scientia Horticulturae**, 250. 254–265. 2019

TORIBIO-JIMÉNEZ, J.; RODRÍGUEZ-BARRERA, M. Ángel; HERNÁNDEZ-FLORES, G.; RUVACABA-LEDEZMA, J. C.; CASTELLANOS-ESCAMILLA, M.; ROMERO-RAMÍREZ, Y. ISOLATION AND SCREENING OF BACTERIA FROM Zea mays PLANT GROWTH PROMOTERS. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, [S. l.], v. 33, p. 143–150, 2017. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.13. Disponível em: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/RICA.2017.33.esp01.13>.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, S. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Bacteriology**, 91, 127-141, 2001

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**. v. 31, n. 2, 2010