

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas iridescentes promotoras do
crescimento vegetal**

Henrique Pereira Guimarães
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

HENRIQUE PEREIRA GUIMARÃES

**Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas iridescentes promotoras do
crescimento vegetal**

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

Orientador: Mauricio Dutra Costa

Coorientadores: Mateus Ferreira Santana
Francisco C. L. de Freitas

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

T

G963i
2025

Guimarães, Henrique Pereira, 2000-
Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas iridescentes
promotoras do crescimento vegetal / Henrique Pereira
Guimarães. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (76 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2025.

Referências bibliográficas: f. 61-69.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.696>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bactérias nitrificantes. 2. Feijão - Microbiologia.
3. Milho - Microbiologia. 4. Iridescência. I. Costa, Maurício
Dutra, 1966-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 631.847

HENRIQUE PEREIRA GUIMARÃES

Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas iridescentes promotoras do crescimento vegetal

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

APROVADA: 7 de agosto de 2025.

Assentimento:

Henrique Pereira Guimarães
Autor

Mauricio Dutra Costa
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 24/10/2025 às 22:10:43 e pelo orientador em 28/10/2025 às 14:47:30. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **GKBC.F920.UHPU** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosa, por sempre estar ao meu lado, apoiando-me e motivando-me a seguir meus sonhos. Sua presença e seu apoio foram fundamentais para que eu chegasse aqui e ir ainda muito mais longe.

Aos meus avós, Ana e Geraldo, pelo carinho, pelo afeto, pelas suas orações e por sempre acreditarem que eu poderia ir além.

Ao Darlison, por todo seu apoio e pelo companheirismo, sempre me motivando a seguir e me alegrando nos dias difíceis.

Ao meu orientador, Maurício Dutra Costa, por todos os ensinamentos, pelo apoio e pela confiança ao longo desses semestres.

Aos meus coorientadores, Mateus Ferreira Santana e Francisco Cláudio Lopes de Freitas, por sempre estarem à disposição.

A Ana Paula, por estar sempre me ajudando nos meus experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana, por todo apoio e pela colaboração. Em especial, ao Marcos e à Gilma, por toda ajuda. À Jaqueline, por todo apoio e pela paciência quando iniciei os experimentos, e que, mesmo longe do laboratório, sempre esteve preocupada e mandando boas energias.

Ao Prof. Fabiano Gama, orientador de graduação, que me apresentou o universo da Microbiologia. À Profa. Dany Roberta e ao Vanderley, por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos Ghabriely, Nayara, Janaina, João Henrique e Leiliane.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

GUIMARÃES, Henrique Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2025. **Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas iridescentes promotoras do crescimento vegetal.** Orientador: Mauricio Dutra Costa. Coorientadores: Mateus Ferreira Santana e Francisco Claudio Lopes de Freitas.

Em alguns sistemas biológicos, a iridescência está relacionada a diversas funções, a exemplo do reconhecimento de indivíduos da mesma espécie, a escolha de parceiros para reprodução, o mimetismo, a termorregulação e a fotoproteção. A iridescência em microrganismo tem sido ignorada na literatura com poucos registros de isolamento de bactérias que apresentem essa característica. Estudos sugerem que a iridescência pode oferecer vantagens sob condições de alta salinidade, estresse hídrico e variações de temperatura e exposição à luz. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi o de isolar bactérias diazotróficas iridescentes, selecioná-las quanto à capacidade de promoção do crescimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e de milho (*Zea mays* L.) e caracterizá-las quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*. O isolamento foi realizado a partir de amostras de solo rizosférico de e raízes de plantas de *Phyllostachys aurea* L. (bambu), *Pennisetum setaceum* L. (capim-texas), *Pennisetum setaceum rubrum* L. (capim-texas roxo) e *Melinis minutiflora* L. (capim-gordura) utilizando-se os meios de cultura NFB e JNFB. Após o isolamento, realizou-se a caracterização fenotípica e, em seguida, a seleção dos isolados quanto à promoção de crescimento de plantas de feijão e de milho em casa de vegetação. Por fim, a caracterização dos mecanismos de promoção do crescimento pelos isolados obtidos foi realizada. Foram obtidos o total de 43 isolados, sendo 40 iridescentes. A inoculação dos isolados em sementes de feijão e de milho apresentaram efeitos neutro, de promoção ou de inibição do crescimento vegetal. Todos os isolados foram capazes de produzir auxinas, solubilizar diferentes fontes de fosfatos e produzir amônio. A produção de ácido indol-3-acético variou de 1,03 a 232,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ácido indol-3-butírico, de 1,57 a 761,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os isolados foram capazes de solubilizar os fosfatos tricálcico, de ferro e de Araxá, sendo o primeiro a fonte mais eficientemente solubilizada, com a liberação de 374 mg L^{-1} de P solúvel. Os isolados foram ainda capazes de produzir enzimas hidrolíticas, sideróforos, HCN e mineralizar nitrogênio. Os isolados RPA03, RPA04, RPS09 e EMM19 foram os que apresentaram melhor desempenho na promoção do crescimento do feijão. Já para o milho o isolado EPA20 foi o de maior destaque. Os isolados bacterianos obtidos têm o potencial de utilização em bioinoculantes de interesse agronômico. Este constitui o

primeiro relato do isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas iridescentes do Brasil.

Palavras-chave: Rizosfera, fixação biológica de nitrogênio, bioinoculantes, iridescência

ABSTRACT

GUIMARÃES, Henrique Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2025. **Isolation and selection of iridescent diazotrophic bacteria that promote plant growth.** Adviser: Mauricio Dutra Costa. Co-advisers: Mateus Ferreira Santana and Francisco Claudio Lopes de Freitas.

In some biological systems, iridescence is associated with several functions, such as recognition of conspecifics, mate selection, mimicry, thermoregulation, and photoprotection. Iridescence in microorganisms has been overlooked in the literature, with few records of bacterial isolation exhibiting this characteristic. Studies suggest that iridescence may offer advantages under conditions of high salinity, water stress, and variations in temperature and light exposure. Therefore, the objective of this study was to isolate iridescent diazotrophic bacteria, select them for their ability to promote the growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.) plants, and characterize their mechanisms for plant growth promotion *in vitro*. The isolation was performed from rhizosphere soil samples and roots of *Phyllostachys aurea* L. (bamboo), *Pennisetum setaceum* L. (Texas grass), *Pennisetum setaceum rubrum* L. (purple Texas grass), and *Melinis minutiflora* L. (gordura grass) using NFB and JNFB culture media. After isolation, phenotypic characterization was performed, and then the isolates were screened for growth promotion of bean and corn plants in a greenhouse. Finally, the growth promotion mechanisms of the obtained isolates were characterized. A total of 43 isolates were obtained, 40 of which were iridescent. Inoculation of the bean and corn seeds isolates showed neutral, growth-promoting, or growth-inhibiting effects. All isolates were capable of producing auxins, solubilizing different phosphate sources, and producing ammonium. Indole-3-acetic acid production ranged from 1.03 to 232.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and indole-3-butyric acid from 1.57 to 761.42 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The isolates were able to solubilize tricalcium, iron, and Araxá phosphates, with Araxá being the most efficiently solubilized source, releasing 374 mg L^{-1} of soluble P. The isolates were also able to produce hydrolytic enzymes, siderophores, HCN, and mineralize nitrogen. Isolates RPA03, RPA04, RPS09, and EMM19 performed best in promoting bean growth. For corn, isolate EPA20 was the most effective. The bacterial isolates obtained have a potential for use in bioinoculants of agronomic interest. This constitutes the first report of the isolation and characterization of iridescent diazotrophic bacteria from Brazil.

Keywords: Rhizosphere, biological nitrogen fixation, bioinoculants,

iridescence

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. A iridescência	11
2.2. Iridescência em procariotos	12
2.3. Bactérias promotoras do crescimento vegetal	14
2.3.1. Fixação Biológica de Nitrogênio	14
2.3.2. Solubilização de fosfato	15
2.3.3. Auxinas	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Isolamento de bactérias diazotróficas	18
3.2. Seleção de isolados de bactérias diazotróficas iridescentes	19
3.3. Caracterização fenotípica dos isolados obtidos	19
3.4. Seleção de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento do plantas de feijão e de milho	19
3.5. Caracterização dos mecanismos de promoção de crescimento <i>in vitro</i>	20
3.5.1. Produção de auxinas	20
3.5.2. Solubilização de fosfato	21
3.5.3. Produção de amônia	21
3.5.4. Produção de enzimas hidrolíticas	21
3.5.5. Produção de sideróforos	23
3.5.6. Produção de cianeto de hidrogênio	23
3.6. Análise de Coordenadas Principais (PCoA)	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Isolamento de bactérias diazotróficas	25
4.2. Seleção de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento de feijão	25
4.3. Seleção de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento do milho	40
4.4. Caracterização dos mecanismos de promoção de crescimento <i>in vitro</i>	44
4.4.1. Produção de auxinas	44
4.4.2. Solubilização de fosfatos	44
4.4.3. Produção de amônio	47
4.4.4. Produção de enzimas hidrolíticas	47
4.4.5. Produção de sideróforos	47
4.4.6. Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)	47
4.4.7. Análise de Coordenadas Principais (PCoA)	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS	61
8. ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

A utilização das cores em sistemas biológicos é essencial para a fauna e a flora, desempenhando funções na comunicação intra- e interespecífica, na camuflagem, na atração de polinizadores e na proteção contra a luz ultravioleta (UV) (BHUSHAN, 2018). As cores podem ser produzidas através de pigmentos ou da bioluminescência. Ainda, muitos organismos geram cores brilhantes por meio da iridescência, que corresponde à característica atribuída à superfície que muda de cor de acordo com o ângulo de visão, sendo resultante da interação da luz com estruturas em micro- e nanoescala (DOUCET e MEADOWS, 2009; KOLLE, 2011; SUN, BHUSHAN, E TONG, 2013). Grande parte dos estudos desenvolvidos para compreender a iridescência vem de trabalhos com insetos, porém essa característica pode também ser observada em animais, plantas e bactérias (DOUCET e MEADOWS, 2009; SUN, BHUSHAN, e TONG, 2013).

A iridescência em procariotos tem sido pouco estudada, com número reduzido de relatos em microrganismos, isolados principalmente de ambientes marinhos. A iridescência em bactérias é verificada somente em colônias quando submetidas à transiluminação ou epi-iluminação. A iridescência microbiana pode ser do tipo arco-íris difuso, arco-íris de borda, metálica ou pontilhista, onde as cores emitidas vão depender do arranjo das células bacterianas e da motilidade do tipo deslizamento. A função da iridescência em procariotos ainda não está bem definida. Essa característica pode trazer vantagens ao microrganismo sob estresses abióticos, a exemplo das variações de temperatura e de luminosidade (KIENTZ *et al.*, 2012 e ZOMER *et al.* 2024).

O isolamento de procariotos iridescentes tem sido feito a partir de amostras procedentes de diversos ambientes (ZOMER *et al.*, 2024). Em face da reduzida disponibilidade de relatos sobre microrganismos que possuam essa característica, pouco se conhece sobre o seu potencial de uso na indústria e na agricultura. Em alguns casos, a iridescência tem sido observada em microrganismos já amplamente estudados, a exemplo do *Bacillus subtilis*, utilizado como promotor de crescimento vegetal e no controle de fitopatógenos (SAXENA *et al.*, 2020). No contexto agrícola, os procariotos iridescentes podem representar grupo pouco explorado e com

potencial de uso para o desenvolvimento de bioinoculantes visando à maior produtividade e à tolerância das culturas aos estresses bióticos e abióticos do meio.

A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) na agricultura tem sido crescente no Brasil e no mundo. Esses microrganismos desempenham papel importante para o melhor rendimento das culturas, podendo beneficiar as plantas por meio de diversos processos, tais como a fixação biológica de nitrogênio, a produção de hormônios vegetais, enzimas líticas e sideróforos, a solubilização de fosfato, o controle de pragas e doenças, dentre outros (SANTOYO *et al.*, 2019). A maior disponibilização de nitrogênio e fósforo pelas BPCV são de especial destaque, uma vez que esses dois nutrientes são, frequentemente, os mais limitantes à produtividade agrícola nos solos brasileiros.

A fixação biológica de nitrogênio pode ser feita por bactérias de vida livre, rizosféricas, endofíticas ou mutualistas, que realizam o processo por meio do complexo enzimático da nitrogenase, o qual converte o N_2 atmosférico a NH_3 (TIMOFEEVA, *et al.*, 2023). Bactérias fixadoras de nitrogênio, também denominadas diazotróficas, podem suprir parte ou toda a demanda de nitrogênio da planta. Em relato recente, a fixação biológica de nitrogênio realizada em diversos sistemas agrícolas no mundo foi responsável pelo aporte de 50 Tg do nutriente, sendo 34,4 Tg oriundas da simbiose entre bactérias diazotróficas e plantas leguminosas, e 15,6 Tg, da fixação realizada por microrganismos não mutualistas (LADHA *et al.*, 2022). Esses dados demonstram o papel significativo da microbiota associada à planta no suprimento de recursos necessários ao desenvolvimento e à produtividade.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o de isolar bactérias iridescentes diazotróficas a partir da endosfera e da rizosfera de *Phyllostachys aurea* L. (bambu), *Pennisetum setaceum* L. (capim-texas), *Pennisetum setaceum rubrum* L. (capim-texas roxo) e *Melinis minutiflora* L. (capim-gordura), caracterizá-las quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro* e selecioná-las quanto à capacidade de promoção do crescimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e de milho (*Zea mays* L.).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A iridescência

A utilização das cores em sistemas biológicos é de suma importância. Na fauna, elas são usadas para a comunicação entre indivíduos da mesma espécie com a finalidade de seleção sexual, na camuflagem, no mimetismo, ou como sinal de advertência ou para dissuadir predadores. Podem auxiliar na termorregulação do indivíduo, na fotoproteção e no aprimoramento da visão e, ainda, aumentar a resistência de estruturas como conchas de moluscos e penas de aves (DOUCET e MEADOWS, 2009). Na flora, as cores, em geral, são importantes para atrair polinizadores às flores. Algumas plantas utilizam estruturas refletoras para proteger flores e folhas da luz UV (KOLLE, 2011; SUN, BHUSHAN, e TONG, 2013). A forma pela qual os seres vivos se relacionam com a luz é essencial para a sobrevivência e envolve efeitos ópticos, a exemplo do brilho e da iridescência (KOLLE, 2011; SUN, BHUSHAN e TONG, 2013; SHAWKEY e D'ALBA, 2017; OSPINA-ROZO *et al.*, 2022 e ABALOS *et al.*, 2025).

A iridescência pode ser descrita como característica atribuída à superfície que muda de cor de acordo com o ângulo de visão, sendo produzida a partir da interação da luz com estruturas complexas em micro- e nanoescala. Grande parte dos estudos desenvolvidos para compreender a iridescência advém de trabalhos com insetos, porém, essa característica pode ser observada em animais, plantas e bactérias (DOUCET e MEADOWS, 2009 e SUN, BHUSHAN, e TONG, 2013).

A iridescência, também denominada de cor estrutural, tem sido estudada em pássaros, peixes e invertebrados, tais como crustáceos, moluscos e insetos, enquanto em répteis, mamíferos e plantas, existem poucos relatos (SEAGO, *et al.*, 2008; ABALOS, *et al.*, 2025). Os mecanismos pelos quais a iridescência é gerada são diversos. Em pássaros, por exemplo, o fenômeno é geralmente produzido por conjuntos laminares ou cristalinos de grânulos de melanina embutidos na queratina, os quais conduzem à difração da luz (SHAWKEY, *et al.*, 2009; SHAWKEY e D'ALBA, 2017).

A iridescência em plantas pode contribuir para a manutenção ou o aumento da fotossíntese. Por exemplo, a espécie *Begonia pavonina* apresenta iridescência azul em suas folhas graças à presença de cloroplastos adaptados (iridoplastos), que contêm estrutura em forma de cristal fotônico, formado por duas camadas de tilacoides. Em condições de sombreamento, essas estruturas aumentam a captura de luz nos comprimentos de ondas disponíveis e o rendimento da fotossíntese (JACOBS, *et al.*, 2016).

2.2. Iridescência em procariotos

A iridescência em procariotos tem sido pouco estudada, com relatos escassos sobre o isolamento desses microrganismos. A maior parte dos registros de bactérias iridescentes são oriundos da Europa e da Ásia. Na América, há apenas dois registros, sendo um proveniente do Panamá e outro, dos Estados Unidos. No Brasil, os estudos com bactérias iridescentes foram realizados com isolados de uma esponja marinha coletada durante expedição à Antártida marítima (SILVA *et al.*, 2019 e CHATRAGADDA e DUFOSSÉ, 2021). Os atuais estudos têm-se concentrado em bactérias do gênero *Cellulophaga*, isoladas principalmente de ambientes marinhos (KIENTZ *et al.*, 2016; CHATRAGADDA e DUFOSSÉ, 2021). Em bactérias, a iridescência manifesta-se apenas nas colônias ou em suspensões concentradas de células quando observadas sob transiluminação ou epi-iluminação (KIENTZ *et al.*, 2012).

A iridescência pode ser classificada em quatro categorias: 1) metálica – quando apresenta brilho prateado; 2) semelhante a glitter ou pontilhista – consistindo de coloração verde iridescente no meio da colônia, e vermelho e violeta nas bordas; 3) arco-íris difuso – colônias com cores difusas, de todo o espectro; 4) arco-íris de borda – colônias apresentam cores difusas, de todo o espectro, somente nas bordas (KIENTZ *et al.*, 2012). Os comprimentos de onda refratados pelas colônias iridescentes são alterados pelo espaçamento e pela morfologia celular, sendo que as regiões da colônia não associadas à iridescência contêm células orientadas aleatoriamente (KIENTZ *et al.*, 2016; SCHERTEL *et al.*, 2020). As células presentes em regiões não iridescentes apresentam formas diversas, enquanto nas regiões iridescentes, elas mantêm a morfologia e dimensões homogêneas (SULLIVAN *et al.*, 2023). Algumas cepas de *Cellulophaga lytica* são capazes de se auto-organizar

quando formam biofilmes (KIENTZ *et al.*, 2012; SULLIVAN, *et al.*, 2023). As células tornam-se alinhadas de forma organizada, gerando a iridescência característica do gênero. Esse alinhamento ocorre graças à motilidade coordenada por deslizamento, o qual facilita a disposição das células no biofilme (KIENTZ *et al.*, 2012; SULLIVAN, *et al.*, 2023)

Colônias bacterianas que apresentam iridescência do tipo arco-íris difuso e arco-íris de borda podem ser observadas apenas por transiluminação. Alguns autores já utilizavam essas características para diferenciar cepas capsuladas de *Haemophilus influenzae* das não capsuladas (GUILLOT, 1941).

Diversos isolados bacterianas apresentam iridescência do tipo arco-íris difuso, tais como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*, *Alcanivorax balearicus*, *Haemophilus influenzae* e *Pasteurella multocida*. Já isolados de *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae* e *Aneurinibacillus migulanus* apresentam iridescência do tipo arco-íris de borda (KIENTZ *et al.*, 2012).

Estudos recentes, englobando 13 mil metagenomas oriundos de diferentes habitats do planeta, revelaram a distribuição de procariotos iridescentes (ZOMER *et al.* 2024). Os habitats em que a iridescência bacteriana é mais comum correspondem às superfícies dos oceanos, zonas costeiras, praias intertidais e superfícies de lagoas ou lagos rasos. Todos esses ambientes apresentam alta exposição solar e ampla variação ambiental, o que favorece o surgimento da iridescência como forma de proteção ou de adaptação. Os ambientes em que a iridescência é rara são o intestino de animais, as superfícies de plantas, o interior de tecidos, ou seja, ambientes com pouca luminosidade. Contrariamente, este mesmo estudo revelou a presença de iridescência em microrganismos encontrados em águas profundas, onde a luz é escassa (ZOMER *et al.* 2024).

Não há estudos que demonstrem o papel funcional da iridescência em microrganismos, nem tampouco se ela ocorre em ambientes naturais. Algumas pesquisas sugerem que essa característica pode fornecer vantagens em condições extremas, a exemplo de ambientes com alta salinidade, estresse hídrico, variações significativas de temperatura e exposição à luz (KIENTZ *et al.*, 2012; ZOMER *et al.* 2024). Pesquisas futuras deverão ser conduzidas com o objetivo de verificar se a

deposição de bactérias iridescentes na superfície vegetal pode contribuir para a redução de danos causados pelo excesso de luz ou por altas temperaturas.

2.3. Bactérias promotoras do crescimento vegetal

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) pertencem a um grupo benéfico e heterogêneo de microrganismos que podem ser isolados da rizosfera, do rizoplane, da filosfera ou da endosfera, e que são capazes de potencializar o crescimento das plantas e protegê-las de estresses bióticos e abióticos (GLICK, 2012; LADHA *et al.*, 2022).

As BPCV podem promover o crescimento da planta por mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos são definidos como aquelas atividades bacterianas que resultam na promoção direta do crescimento da planta. Incluem a produção de auxina, ACC desaminase, citocinina, giberelina, a fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfato e o sequestro de ferro por sideróforos (COMPANT, *et al.*, 2010; BATISTA, *et al.*, 2021; LADHA *et al.*, 2022; KULKOVA, *et al.*, 2023). Os mecanismos indiretos referem-se a atividades bacterianas que inibem o funcionamento de um ou mais organismos patogênicos de plantas, tanto fungos quanto bactérias. Os mecanismos indiretos incluem a produção de antibióticos, de enzimas de degradação da parede celular, a competição por recursos do meio, a produção de cianeto de hidrogênio e a resistência sistêmica induzida (BALOGH *et al.*, 2010; FRAMPTON *et al.*, 2014; GLICK, 2015; OLEŃSKA, *et al.*, 2020).

2.3.1. Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é realizada por procariotos denominados diazotróficos e corresponde ao segundo processo mais importante para a biosfera depois da fotossíntese (LADHA, *et al.*, 2022). A fixação biológica de nitrogênio consiste na conversão do dinitrogênio (N_2) em formas utilizáveis pelas plantas, como a NH_3 , por meio da combinação do N_2 com íons hidrogênio (SOUMARE, *et al.*, 2020). A fixação biológica de nitrogênio ocorre graças ao complexo enzimático da nitrogenase, composto por duas proteínas, a dinitrogenase (proteína FeMo) e a dinitrogenase redutase (proteína Fe), codificadas pelos genes *nif* (MAHMUD, *et al.*, 2020). O processo de fixação biológica de nitrogênio é relativamente caro, pois são necessárias 16 moléculas de ATP para realizar a redução de uma molécula de N_2 .

Posteriormente, serão necessárias mais 12 moléculas de ATP para a assimilação e transporte de NH_4^+ na planta (SOUMARE, *et al.*, 2020).

As bactérias diazotróficas podem ser classificadas em três grupos, as de vida livre, as associativas e as simbióticas. Em geral, as bactérias mais eficientes no processo de fixação de nitrogênio pertencem aos dois últimos grupos. As bactérias simbióticas denominadas rizóbios, induzem a formação de nódulos nas raízes de plantas da família Fabaceae, sendo essa relação mutualista a mais conhecida. Em geral, os rizóbios podem contribuir com 20 a 300 $\text{Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N fixado, contribuindo significativamente para a produtividade de leguminosas alimentares e forrageiras (SUZAKI, *et al.*, 2019; SOUMARE, *et al.*, 2020).

Em geral, a fixação de nitrogênio em gramíneas é menos eficiente quando comparada com a das plantas leguminosas que realizam associações simbióticas com rizóbios. Mesmo assim, ainda é capaz de fornecer aportes significativos de nitrogênio para as culturas. Estudos com *Megathyrsus maximus* cv. Mombaça mostram que a inoculação de bactérias diazotróficas promoveram aumentos significativos na produção de matéria seca em relação ao controle sem inoculação (SUZAKI, *et al.*, 2019)

Em estudos realizados com capim Muvuno, híbrido de *Urochloa ruziziensis* e *Urochloa brizantha*, observou-se que a inoculação de *Azospirillum brasilense*, cepas ab-v5 e ab-v6, juntamente com a aplicação de 50 kg ha^{-1} de N, não diferiram estatisticamente do tratamento com a adubação à dose de 100 kg ha^{-1} de N, demonstrando que a utilização de bactérias diazotróficas podem contribuir para a redução da demanda de fertilizantes nitrogenados sintéticos e para a diminuição dos custos de produção (DUARTE, *et al.*, 2021).

2.3.2. Solubilização de fosfato

O fósforo é macronutriente essencial para as plantas, atuando em processos metabólicos como a divisão celular, a produção de ATP, a síntese de macromoléculas, a transdução de sinais e a fotossíntese (ZHU, *et al.*, 2018; RAWAT, *et al.*, 2021). Esse nutriente pode ser encontrado em grandes quantidades nas camadas superficiais do solo, com teores que variam de 50 à 3000 mg Kg^{-1} de P. No entanto, apenas 0,1% dessa fração está disponível para as plantas em função de processos de comum ocorrência nos solos tropicais, a exemplo da precipitação, da imobilização e da adsorção do elemento ao solo. Como consequência, doses maiores

de fósforo devem ser aplicadas para atender a demanda das culturas, elevando o consumo de fertilizantes fosfatados (ZHU, et al., 2018; RAWAT, et al., 2021).

A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato vem sendo aventada como estratégia para reduzir a dependência por fertilizantes fosfatados. Estudos mostram que a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato, tais como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Pantoea* e *Rhizobia*, juntamente com adubação fosfatada, aumentou o rendimento de grãos de trigo em 22% e a absorção de P em 26%, reduzindo a necessidade de fertilizante fosfatados em 30% (HUSSAIN, et al., 2019). Há grande diversidade de microrganismos solubilizadores de fosfato, incluindo bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Burkholderia* e *Rahnella*, e fungos, a exemplo de *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus niger*, *Acremonium*, *Hymenella* e *Neosartory* (TENG, Z. et al., 2019; RAWAT P. et al., 2020).

A solubilização microbiana de fosfato pode ser efetuada por meio de diferentes mecanismos, como a exsudação de ácidos orgânicos, a extrusão de prótons e a produção de ácidos inorgânicos, (RAWAT, et al., 2020). Os microrganismos podem exsudar diferentes ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico, o oxálico, o glucônico e o málico que atuam reduzindo o pH do meio e quelando os cátions ligados ao fosfato (KISHORE, et al., 2015; RAWAT, et al., 2020)

2.3.3. Auxinas

Os hormônios vegetais são fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Dentre os diversos hormônios essenciais, as auxinas são os mais importantes, fazendo parte de um grupo heterogêneo de moléculas de sinalização necessárias para diversos processos, tais como a divisão, expansão e diferenciação celulares (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2010; TAI, et al., 2017).

Estima-se que cerca de 80% dos microrganismos encontrados na rizosfera são capazes de sintetizar auxinas, influenciando o crescimento e o desenvolvimento das plantas, principalmente das raízes. A síntese de ácido indol-3-acético (AIA) pode ser realizada por diversas vias, porém a principal ocorre pela utilização do triptofano como precursor. Essa via é a mais comum em plantas e microrganismo (WAGI e AHMED, 2019; MORFFY e STRADER, 2020). A atividade de auxina pode ainda ser efetuada

por outros compostos indol, como o indol-3-etanol, o indol-3-acetaldeído, o indol-3-acetonitrila, o ácido indol-3-butírico e o ácido 1-naftaleno acético (BATISTA, *et al.*, 2021).

Em plantas, o triptofano é secretado como exsudato radicular, favorecendo assim a biossíntese de auxinas e promovendo o crescimento da planta. O AIA pode ser sintetizado em duas vias distintas, dependente ou independente de triptofano (KESWANI *et al.*, 2020; BATISTA, *et al.*, 2021). Diversas rizobactérias como *Azospirillum lipoferum*, *Acinetobacter genospecies*, *Bukholderia vietnamiensis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* sintetizam AIA pela via independente, quando o precursor utilizado é o indol-3-glicerol fosfato. Em experimentos com *Azospirillum brasilense* Sp6 e seu mutante Tn5 SpM7918, 90% do AIA sintetizado foi pela via do indol-3-glicerol, na ausência de triptofano (LI *et al.*, 2018).

No Brasil, a demanda por bioinsumos contendo BPCV tem aumentado nos últimos anos em função de programas governamentais que estimulam o uso desses microrganismos com vistas à adoção de práticas de manejo agrícola mais sustentáveis e menos dependentes de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos (FISCHER, *et al.*, 2023). Neste contexto, o isolamento de bactérias iridescentes e a caracterização delas como potenciais agentes de promoção do crescimento vegetal torna-se estratégico. Nesse sentido, os trabalhos deverão envolver o isolamento de bactérias iridescentes diazotróficas, a seleção dos isolados mais eficientes na promoção do crescimento vegetal e a caracterização dos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro*.

A produção de inoculantes multifuncionais com bactérias iridescentes deverá incluir estudos prévios sobre os mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento, a exemplo da fixação biológica de nitrogênio, a produção de auxinas, a solubilização de fosfato, o antagonismo a patógenos e pragas, dentre outros. De especial interesse, podemos citar o potencial desses microrganismos de mitigarem estresses relacionado ao excesso de luminosidade e às temperaturas elevadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), e na casa de vegetação do Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

3.1. Isolamento de bactérias diazotróficas

Para o isolamento de bactérias diazotróficas, raízes e solo rizosférico das espécies *P. aurea* L., *P. setaceum* L., *P. setaceum rubrum* L. e *M. minutiflora* L. foram utilizados. Considerou-se solo rizosférico os agregados de solo que permaneceram aderidos às raízes após forte agitação (HELLIWELL *et al.*, 2017). Para o isolamento, 10 g de solo rizosférico foram suspensos em 90 mL de solução salina (NaCl a 0,85%), agitados em vórtex por 5 min. A suspensão de solo foi então diluída serialmente, em triplicata, nas diluições de 10^{-2} a 10^{-6} , em solução salina. As raízes foram então lavadas em água corrente, seguido de três lavagens com água destilada e desinfestação superficial com etanol a 70% por 3 min. Dez gramas de raízes desinfestadas foram macerados em 90 mL de solução salina, adicionada aos poucos no almofariz. Após a maceração, foram realizadas diluições seriadas, em triplicata, de 10^{-2} a 10^{-6} , em tubos contendo 9 mL de solução salina. Após a diluição do solo rizosférico e do macerado de raízes, alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram inoculadas em tubos de tampa de rosca de 10 mL contendo 5 mL dos meios de cultura semissólidos NFb e JNFb para isolamento de bactérias diazotróficas (DÖBEREINER *et al.* 1995). Os tubos foram transferidos para câmara de incubação tipo B.O.D. a 28°C, sem luminosidade. Após 5 dias de incubação, verificou-se a presença ou não de película característica nos meios de cultivo e a mudança de cor do meio de verde para azul. As películas formadas foram repicadas com auxílio de alça de platina para novos tubos contendo os mesmos meios semissólidos, por quatro vezes sucessivas. Na quarta repicagem, foram retiradas alíquotas das películas e elas foram estriadas em placas contendo o meio sólido correspondente. As placas foram alocadas em câmara de incubação por um período de sete dias a 28°C, sem luz. Após a obtenção de colônias diazotróficas isoladas, elas foram repicadas para novo meio semissólido em tubos de rosca. Após a confirmação da capacidade de fixação de nitrogênio (formação de película), uma alíquota foi estriada em placa contendo meio TSA (Ágar

Triptona de Soja) para obtenção de colônias isoladas e constituição de culturas puras. Os isolados obtidos foram estocados em glicerol a 15 % em ultra-freezer a -70°C.

3.2. Seleção de isolados de bactérias diazotróficas iridescentes

A capacidade de produzir iridescência pelos isolados diazotróficos foi verificada por transiluminação utilizando-se lâmpada led 8 mm, 70 lux, branco neutro, 4000K, de 12V, instalada a 10 cm abaixo da placa de Petri. As colônias iridescentes foram fotografadas com câmera fotográfica Canon EOS Rebel T3i com lente de 58mm. Uma foto adicional com epi-iluminação foi também realizada a título de controle.

3.3. Caracterização fenotípica dos isolados obtidos

Os isolados em cultura pura foram estriados em meio de cultura TSA e cultivados a 28°C por 5 dias. Após o crescimento das colônias, elas foram avaliadas quanto ao tamanho (grande: > 5mm; média: 1 a 5 mm; pequena: < 1 mm), à cor (amarela, bege ou branca), à forma (circular ou puntiforme), à elevação (convexa, papilada, crateriforme, plana ou umbicada), à borda (contínua, ondulada ou dentada), à superfície (lisa, rugosa), à consistência (viscosa, gomosa, seca ou butírica) e aos detalhes ópticos (brilhante, translúcida ou opaca). Além das características morfológicas coloniais, realizou-se a coloração diferencial de Gram para cada isolado (YANO *et al.*, 1993; ANSAR, *et al.*, 2023).

3.4. Seleção de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento de plantas de feijão e milho

Os isolados foram testados em casas de vegetação quanto à capacidade de promoção do crescimento de plantas de feijão e de milho no período de 14/06/2024 a 19/07/2024. Para tal, dois experimentos, um com o feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. BRS Marte) e outro com o milho (*Zea mays* cv. UFVM100), foram montados em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizados, com 44 tratamentos (inoculação com 43 isolados de bactérias diazotróficas e controle sem inoculação bacteriana), com quatro repetições.

Os isolados de bactérias diazotróficas foram inoculados em caldo Casoy e incubados em B.O.D. a 28°C por 24 h. Em seguida, a D.O. foi ajustada para 0,6. O

meio foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi ressuspenso em solução salina para D.O. de 0,6.

As sementes de feijão e milho foram desinfestadas conforme SAKIYAMA (2001). Após a desinfestação, 6 sementes de cada cultura foram imersas, por uma hora, em 2 mL da suspensão de cada isolado de bactéria diazotrófica com D.O. ajustada para 0,6. As sementes foram plantadas em vasos de 1,8 litros, contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças da Vida Verde®, composto à base de casca de pinus, turfa, vermiculita expandida, enriquecido com macro- e micronutrientes. A irrigação foi realizada duas vezes ao dia conforme a necessidade. Uma semana após o plantio, foi feito o desbaste deixando 2 plantas por vaso e uma inoculação de reforço foi realizada imediatamente. Para tal, o inoculante foi preparado conforme descrito anteriormente, sendo aplicados 4 ml da suspensão de células em cada vaso.

O experimento foi conduzido até os 35 DAS (Dias Após o Semeio), quando foram avaliados o índice SPAD, utilizando-se o medidor de clorofila portátil SPAD-502Plus e a altura das plantas. Em seguida, as plantas foram colhidas e procedeu-se à separação da parte aérea das raízes. O material vegetal foi colocado em saco de papel e levado à estufa a 70°C até atingir peso constante. Com os dados obtidos, foram determinados o valor da massa seca total, massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e a relação parte aérea/raiz. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.5. Caracterização dos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro*

3.5.1. Produção de auxinas

A produção de auxinas, ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indol-3-butírico (AIB), foi determinada utilizando-se o método espectrofotométrico baseado no reagente de Salkowski (BRICK *et al.* 1991). Os isolados foram cultivados em caldo Casoy, suplementado com 5 mmol L⁻¹ de L-triptofano, por 96 h a 150 rpm. Em seguida, o sobrenadante do meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. Um mililitro do sobrenadante foi acrescido do reagente de Salkowsky (50 ml de ácido perclórico a 35% e 2 mL de FeCl₃ a 0,5 mol L⁻¹) na razão de 1:1. O desenvolvimento da cor rosa indicou a produção de AIA e AIB. A concentração das auxinas produzidas

foi estimada em relação à curva padrão de AIA, na faixa de 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e a concentração de AIB, em relação à curva padrão desse composto na faixa de 20–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PATEL *et al.*, 2018). A leitura de absorvância foi feita a 530 e 480 nm, respectivamente.

3.5.2. Solubilização de fosfato

Para a avaliação da capacidade de solubilização de fosfato, tubos de ensaio de 15 mL foram adicionados de 5 mL do meio NBRIP (10 g L^{-1} de glicose; 5 g L^{-1} de NH_4Cl ; 1 g L^{-1} de NaCl ; 1 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15 g L^{-1} de ágar; pH 7), suplementado com 5 g L^{-1} com fosfato tricálcico, fosfato de ferro ou fosfato de Araxá (NAUTIYAL, 1999). Em seguida, procedeu-se a inoculação dos tubos com os isolados de forma a se atingir a D.O. inicial de 0,1. Após a inoculação, os tubos foram incubados por 7 dias a 28°C e 150 rpm. Após a incubação, alíquotas de 2 mL do sobrenadante dos meios de cultura foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. O fósforo no sobrenadante foi determinado de acordo com BRAGA e DEFELIPO (1974).

3.5.3. Produção de amônia

Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio de 50 mL, contendo 10 mL de peptona bacteriológica a 1 %, e cloreto de sódio a 0,5%, para a D.O. final de 0,1. As culturas foram incubadas a 28°C por 48 h e a 150 rpm. Após a incubação, alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e um volume de 200 μL do sobrenadante foram adicionados a 1 mL de reagente de Nessler (100 g L^{-1} de HgI_2 , 70 g L^{-1} de KI e 500 mL de NaOH a 32%), seguido de água destilada para o volume final de 8,5 mL (CAPPUCCINO e SHERMAN, 1992). A quantificação da amônia produzida foi feita por espectrofotometria a 450 nm.

3.5.4. Produção de enzimas hidrolíticas

3.5.4.1. Produção de celulase

A produção de celulase foi verificada em placas de Petri contendo 20 mL do meio ágar CMC (2,0 g L^{-1} de celulose carboximetil [CMC], 2,0 g L^{-1} of NaNO_3 , 1,0 g L^{-1} of K_2HPO_4 , 0,5 g L^{-1} of KCl , 0,5 g L^{-1} of MgSO_4 , 0,2 g L^{-1} de peptona e 17,0 g L^{-1} de ágar). Para cada isolado, três microgotas de 5 μL do sobrenadante de cultura realizada em meio TSB a 28°C, por 24 h, foram dispostas equidistantemente na

superfície do meio na placa de Petri. As placas foram incubadas em B.O.D. por 96 h a 28°C. Após a incubação, foram adicionados 4 mL de solução de iodo (2 g de KI e 1 g de iodo em 300 ml de água destilada) sobre a superfície do meio. A formação de halo de clareamento ao redor das colônias indicou a degradação da CMC e, consequentemente, a produção de celulase pelo isolado (BHATTACHARYYA *et al.*, 2020).

3.5.4.2. Produção de Pectinase

A produção de pectinase foi verificada em Placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura (5 g L⁻¹ de ácido péctico, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 6 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,1 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,14 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 15 g L⁻¹ de ágar). Para cada isolado, três microgotas de 5 µL do sobrenadante de cultura realizada em meio TSB a 28°C, por 24 h, foram dispostas equidistantemente na superfície do meio na placa de Petri. As placas foram incubadas em B.O.D. por 96 h a 28°C. Após a incubação, foram adicionados 4 mL de solução de iodo (2 g de KI e 1 g de iodo em 300 ml de água destilada) sobre a superfície do meio. A formação de halo de clareamento ao redor das colônias indicou a degradação do ácido péctico e, consequentemente, a produção de pectinase pelo isolado (TINDALL, *et al.*, 2007)

3.5.4.3. Produção de Amilase

A produção de amilase foi verificada em Placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura para amilolíticos (1 g L⁻¹ amido, 0,5 g L⁻¹ NaNO₃, 1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0,01 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O e 15 g L⁻¹ de ágar). Para cada isolado, três microgotas de 5 µL do sobrenadante de cultura realizada em meio TSB a 28°C, por 24 h, foram dispostas equidistantemente na superfície do meio na placa de Petri. As placas foram incubadas em B.O.D. por 5 dias a 28°C. Após a incubação, foram adicionados 4 mL de solução de iodo (2 g de KI e 1 g de iodo em 300 ml de água destilada) sobre a superfície do meio. A formação de halo de clareamento ao redor das colônias indicou a degradação do amido e, consequentemente, a produção de amilase pelo isolado (HITHA, *et al.*, 2014).

3.5.4.4. Produção de Quitinase

A produção de quitinase foi verificada em Placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura para quitinolíticos (1,0 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1,6 g L⁻¹

K_2HPO_4 , 0,2 g L⁻¹ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g L⁻¹ NaCl, 0,01 g L⁻¹ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 g L⁻¹ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 1,5 % (p/v) de ágar). O meio foi suplementado com 1 % (p/v) de quitina coloidal preparada segundo SKUJINS *et al.* (1965). Para cada isolado, três microgotas de 5 µL do sobrenadante de cultura realizada em meio TSB a 28°C, por 24 h, foram dispostas equidistantemente na superfície do meio na placa de Petri. As placas foram incubadas em B.O.D. por 96 h a 28°C. Isolados que formaram halo translúcido ao redor das colônias foram considerados como produtores de quitinase.

3.5.5. Produção de sideróforos

3.5.5.1 Sideróforos do tipo catecol e hidroxamato

A produção de sideróforos do tipo catecol e hidroxamato foi verificada em Placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura ágar nutriente. Para cada isolado, três microgotas de 5 µL do sobrenadante de cultura realizada em meio TSB a 28°C, por 24 h, foram dispostas equidistantemente na superfície do meio nas placas de Petri, seguido da incubação a 28°C por 16 h. Após a incubação, uma sobrecamada de ágar CAS foi adicionada, seguido de incubação por 4 dias a 28°C. A formação de halo de cor rosa, laranja ou amarelo claro indica a produção de catecol, hidroximato ou carboxilato, respectivamente (CABALLERO-MELLATO, *et al.*, 2007).

3.5.5.2 Sideróforos do tipo pioverdina

A produção de pioverdina foi verificada em Placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura King B (20 g L⁻¹ peptona proteose, 1,5 g L⁻¹ K_2HPO_4 , 1,5 g L⁻¹ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mL L⁻¹ de glicerol e 15 g L⁻¹ de ágar bacteriológico). Para cada isolado, três microgotas de 5 µL do sobrenadante de cultura realizada em meio TSB a 28°C, por 24 h, foram dispostas equidistantemente na superfície do meio na placa de Petri. As placas foram incubadas em B.O.D. por 5 dias a 28°C. Após a incubação, as placas de Petri foram submetidas a luz ultravioleta (366 nm) para verificar a fluorescência das colônias, confirmando a produção de pioverdinas (VISCA, IMPERI e LAMONT, 2007).

3.5.6. Produção de cianeto de hidrogênio

A Produção de cianeto de hidrogênio (HCN) foi observada estriando-se os isolados em placas de Petri contendo 20 mL do meio King B. No lado interno da tampa

da placa de Petri foi adicionada uma tira de papel filtro quantitativos JP42 (Quanty®, com porosidade de 8 µm), de 1 x 3 cm, embebida em solução de ácido pícrico a 0,5 % em solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 a 2 %). Previamente à embebição, as tiras de papel foram esterilizadas em estufa a 180°C por 2 h antes. As placas inoculadas foram seladas com filme de PVC e incubadas em B.O.D. a 28°C por 5 dias. A mudança de cor dos papéis de filtro de amarelo para laranja, marrom ou marrom-avermelhado indicou a produção de HCN (BAKKER, SCHIPPERS, 1987).

3.6. Análise de Coordenadas Principais (PCoA)

Com o objetivo de se agrupar os isolados bacterianos com base nas características bioquímicas e funcionais apresentadas por eles, foi realizada Análise de Coordenadas Principais (PCoA) a partir da matriz de distância de Gower, recomendada para dados mistos, como os deste estudo, que incluem variáveis contínuas e binárias. Os atributos utilizados na análise englobaram as características de promoção de crescimento vegetal de plantas de feijão e de milho, o índice SPAD, a altura de plantas, a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca de raízes (MSR), a massa seca total (MST) e a relação parte aérea/raiz, além de variáveis relacionadas à solubilização de fosfato (fosfato tricálcico, fosfato de Fe e fosfato de Araxá), produção de auxinas (AIA e AIB), produção de amônio (NH_4^+), sideróforos (pioverdinas, hidroxamato e catecol), enzimas hidrolíticas (celulase, pectinase, amilase e quitinase), produção de cianeto de hidrogênio (HCN) e presença de iridescência. Com base na ordenação obtida pela PCoA, foi realizado o agrupamento dos isolados por meio do método k-médias (k-means clustering), com a escolha do número ótimo de grupos orientada por critérios estatísticos. A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada utilizando a análise de variância multivariada por permutação (PERMANOVA), com 999 permutações, aplicada sobre a mesma matriz de distância de Gower. Essa abordagem permitiu testar se os grupos identificados apresentavam padrões significativamente distintos em relação ao conjunto das variáveis avaliadas. As análises foram realizadas no ambiente R (versão 4.3.1) (R Core Team, 2023), com os pacotes vegan, cluster, ggplot2, ggrepel e ggforce.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento de bactérias diazotróficas

Foram obtidos o total de 43 isolados fixadores de nitrogênio, sendo 6 endofíticos e 11 rizosféricos de *P. aurea* L., 8 isolados endofíticos e 3 rizosféricos de *M. minutiflora* L., 4 isolados endofíticos e 3 rizosféricos a partir de *P. setaceum* L., e 8 isolados rizosféricos de *P. setaceum rubrum* L.

Com relação às características morfológicas das colônias (Tabela 1), a maioria das colônias apresentaram tamanho entre grande e médio, com apenas três colônias de tamanho pequeno (EPA21, EMM34, RMM37). A forma das colônias predominante foi a circular, sendo que apenas as colônias dos isolados EMM34 e do RMM37 foram classificadas como puntiformes (Tabela 1). A elevação das colônias variou entre os isolados, sendo classificada como convexa, papilada, plana, crateriforme e umbilicada (Tabela 1). Com relação às bordas das colônias, a maioria apresentou a do tipo contínuo (Tabela 1). A superfície para a maioria dos isolados foi classificada como lisa (Tabela 1). As consistências predominantes foram a gomosa, viscosa e butírica (Tabela 1). Apenas as colônias do isolado RMM38 apresentou consistência seca (Tabela 1). Por fim, a coloração dos isolados variou entre amarela ou bege claro (Tabela 1). Com relação a coloração diferencial de Gram, 88,37% dos isolados foram classificados como gram-negativos (Tabela 1). Apenas os isolados RPA06, RPR13, EMM33, RPR 27 foram classificados como gram-positivos.

Noventa e três por cento dos isolados obtidos (43) apresentaram iridescência quando submetidos à transiluminação (Tabela 1). Essa característica foi observada tanto para os isolados obtidos da rizosfera quanto para aqueles oriundos das raízes (Tabela 1). A iridescência predominante foi a do tipo arco-íris difuso, com colônias coloridas em todo o espectro de cores (Tabela 1, Figuras 1 e 2).

4.2. Seleção de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento de feijão

Dos 43 isolados avaliados, 42 afetaram positivamente o índice SPAD, resultando em valores superiores aos do controle (Figura 3A). A análise de agrupamento por Skott Knott separou os 43 isolados em 6 grupos estatisticamente distintos, entre os quais o grupo A foi o que apresentou maior média geral para esse índice (40,33) e englobou os isolados com maior capacidade de promover a atividade

Tabela 1 - Características morfológicas coloniais, iridescência e coloração diferencial de Gram de isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., cultivadas em meio TSA por 5 dias a 28°C.

Isolado	Tamanho	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia	Consistência da colônia	Detalhes ópticos	Cor da Colônia	Iridescência	Coloração de Gram
RPA01	Média	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPA02	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	bege claro	-	Negativo
RPA03	Média	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPA04	Média	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	bege claro	+	Negativo
RPA05	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	-	Negativo
RPA06	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Butírica	Brilhante	Amarela	+	Positivo
RPS07	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPS08	Grande	Circular	Plana	Contínua	Lisa	Butírica	Brilhante	bege claro	+	Negativo
RPS09	Média	Circular	Plana	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPS10	Grande	Circular	Crateriforme	Contínua	Lisa	Butírica	Brilhante	Bege	+	Negativo
RPR11	Média	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	bege claro	+	Negativo

Obs.: Tamanho das colônias: grande (diâmetro > 5 mm), médio (diâmetro entre 1 e 5 mm) e pequeno (diâmetro < 1 mm). RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.). *(continua)*

Tabela 1 - (Continuação) Características morfológicas coloniais, iridescência e coloração diferencial de Gram de isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., cultivadas em meio TSA por 5 dias a 28°C.

Isolado	Tamanho	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia	Consistência da colônia	Detalhes ópticos	Cor da Colônia	Iridescência	Coloração de Gram
RPR 12	Grande	Circular	Plana	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	bege claro	+	Negativo
RPR 13	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	bege claro	+	Positivo
RPR 14	Grande	Circular	Convexa	Ondulada	Lisa	Butírica	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EPS 15	Média	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EPS 16	Grande	Circular	Umbilicada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EPS 17	Grande	Circular	Convexa	Ondulada	Lisa	Aquosa	Brilhante	Branca	+	Positivo
EMM 18	Grande	Circular	Convexa	Dentada	Lisa	Aquosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EMM 19	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Branca	+	Negativo
EPA 20	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EPA 21	Pequena	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Translúcido	Bege	+	Negativo
EPA 22	Grande	Circular	Papilada	Ondulada	Rugosa	Gomosa	Brilhante	Amarela	-	Negativo

Obs.: Tamanho das colônias: grande (diâmetro > 5 mm), médio (diâmetro entre 1 e 5 mm) e pequeno (diâmetro < 1 mm). RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.). (*continua*)

Tabela 1 - (Continuação) Características morfológicas coloniais, iridescência e coloração diferencial de Gram de isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., cultivadas em meio TSA por 5 dias a 28°C.

Isolado	Tamanho	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia	Consistência da colônia	Detalhes ópticos	Cor da Colônia	Iridescência	Coloração de Gram
EPA 23	Grande	Circular	Papilada	Ondulada	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EPA 24	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	bege claro	+	Negativo
EPA 25	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPR 26	Grande	Circular	Plana	Contínua	Lisa	Butírica	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPR 27	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Positivo
RPR 28	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	bege claro	+	Negativo
RPR 29	Média	Circular	Plana	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EMM 30	Média	Circular	Plana	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EMM 31	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EMM 32	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Branca	+	Negativo
EMM 33	Grande	Circular	Plana	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Branca	+	Positivo

Obs.: Tamanho das colônias: grande (diâmetro > 5 mm), médio (diâmetro entre 1 e 5 mm) e pequeno (diâmetro < 1 mm). RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.). (continua)

Tabela 1 - (*Continuação*) Características morfológicas coloniais, iridescência e coloração diferencial de Gram de isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., cultivadas em meio TSA por 5 dias a 28°C.

Isolado	Tamanho	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia	Consistência da colônia	Detalhes ópticos	Cor da Colônia	Iridescência	Coloração de Gram
EMM 34	Pequena	Puntiforme	-	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
EMM 35	Média	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Branca	+	Negativo
RMM 36	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Viscosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RMM 37	Pequena	Puntiforme	-	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RMM 38	Grande	Circular	Plana	Ondulada	Rugosa	Seca	Opaco	bege claro	+	Negativo
RPA 39	Grande	Circular	crateriforme	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Branca	+	Negativo
RPA 40	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPA 41	Grande	Circular	Convexa	Contínua	Lisa	Butírica	Brilhante	Branca	+	Negativo
RPA 42	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Butírica	Brilhante	Amarela	+	Negativo
RPA 43	Grande	Circular	Papilada	Contínua	Lisa	Gomosa	Brilhante	Amarela	+	Negativo

Obs.: Tamanho das colônias: grande (diâmetro > 5 mm), médio (diâmetro entre 1 e 5 mm) e pequeno (diâmetro < 1 mm). RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.).

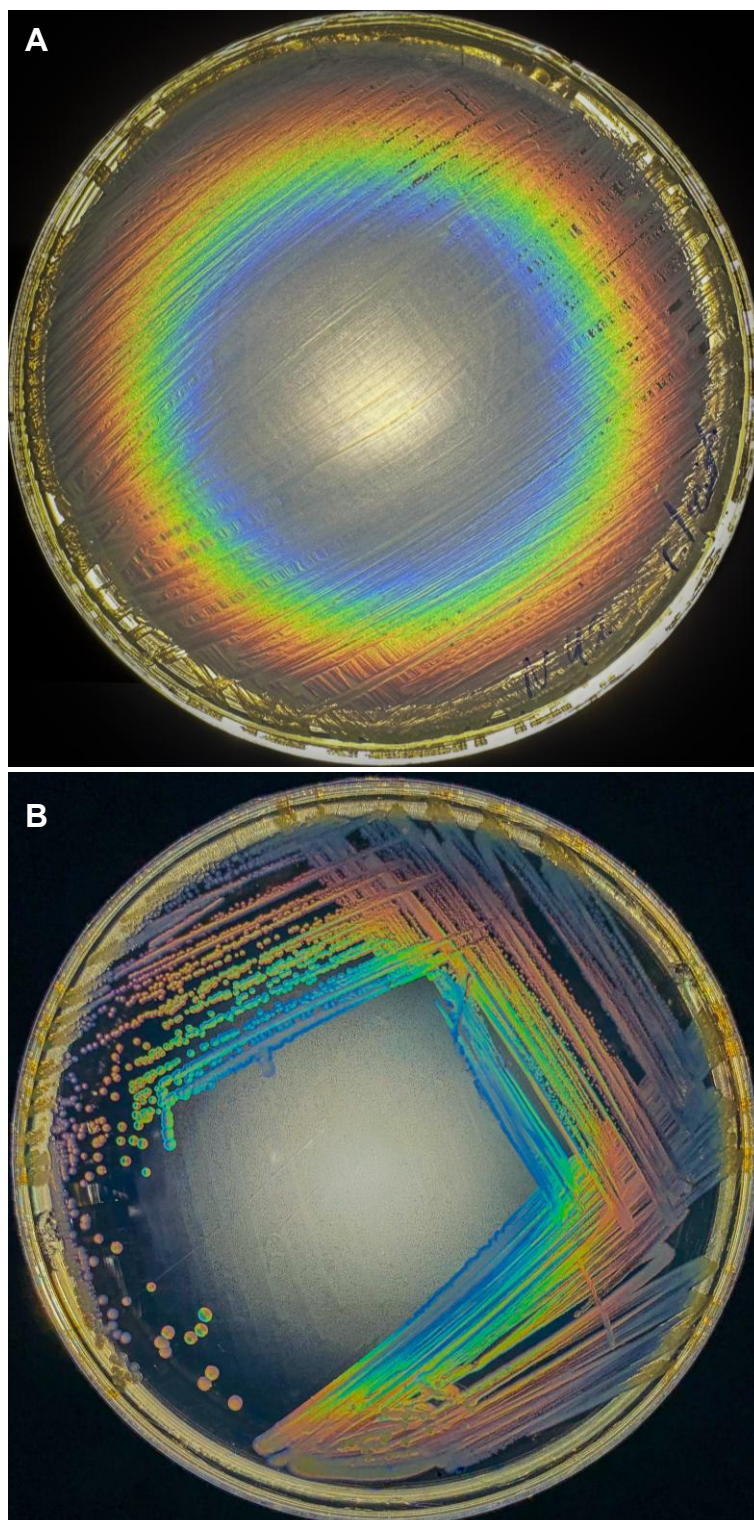


Figura 1 - Iridescência do tipo arco-íris difuso produzida por bactéria diazotrófica cultivada em meio TSA após 24h de incubação a 28°C. A) Iridescência produzida durante a transiluminação de colônias confluentes do isolado RPA42, crescidas em estrias simples por toda a superfície do meio. B) Iridescência produzida durante a transiluminação de colônias do isolado RPA42 crescidas em estrias compostas na superfície do meio.

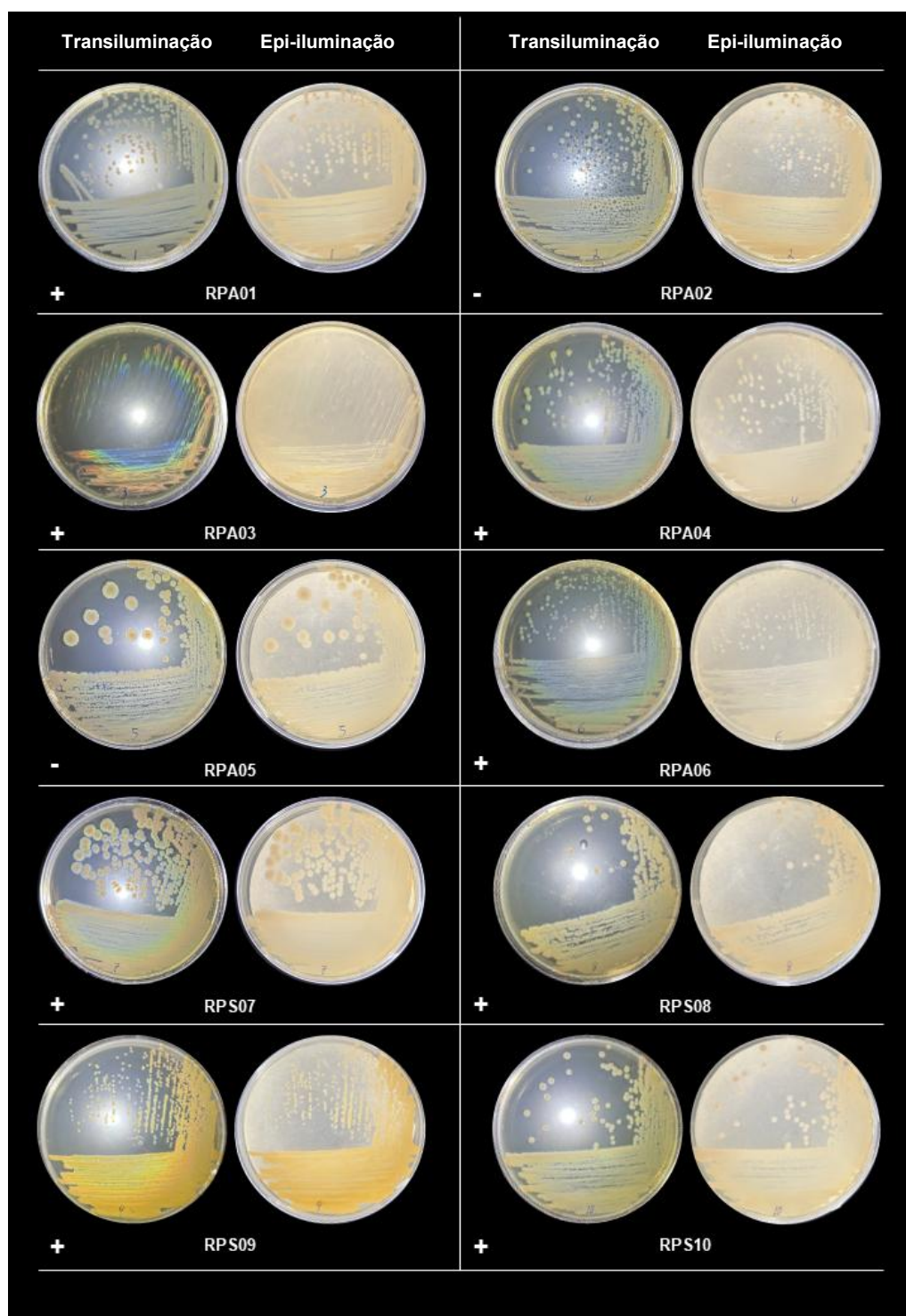


Figura 2 - Padrão de iridescência de colônias de isolados rizosféricos e endofíticos de bactérias diazotróficas, cultivados em meio de cultura TSA a 28°C por 24 h e submetidos à transiluminação e à epi-iluminação, evidenciando a emissão de iridescência (+) e a ausência dessa característica (-).

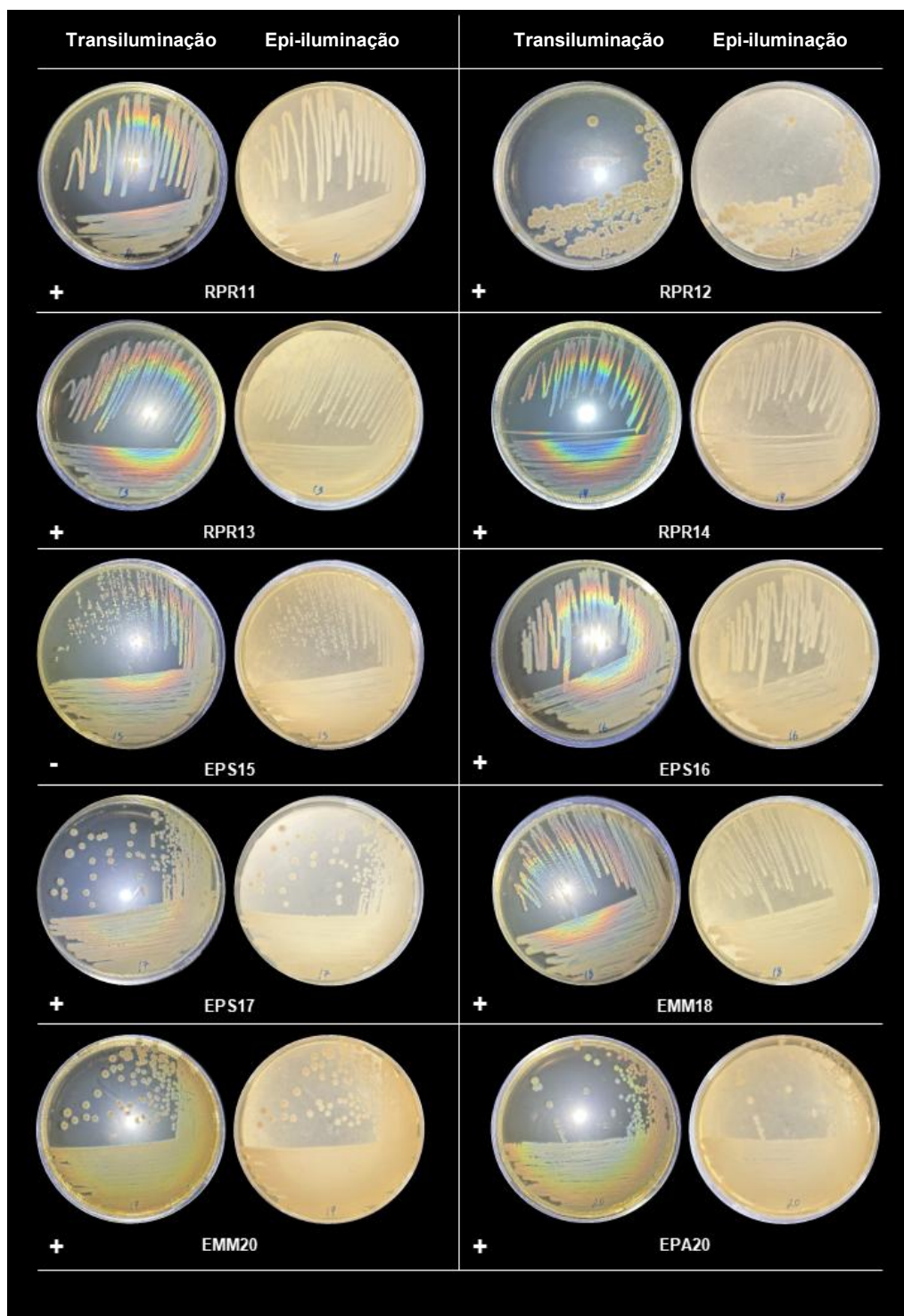


Figura 2 - (Continuação) Padrão de iridescência de colônias de isolados rizosféricos e endofíticos de bactérias diazotróficas, cultivados em meio de cultura TSA a 28°C por 2 h e submetidos à transiluminação e à epi-iluminação, evidenciando a emissão de iridescência (+) e a ausência dessa característica (-).

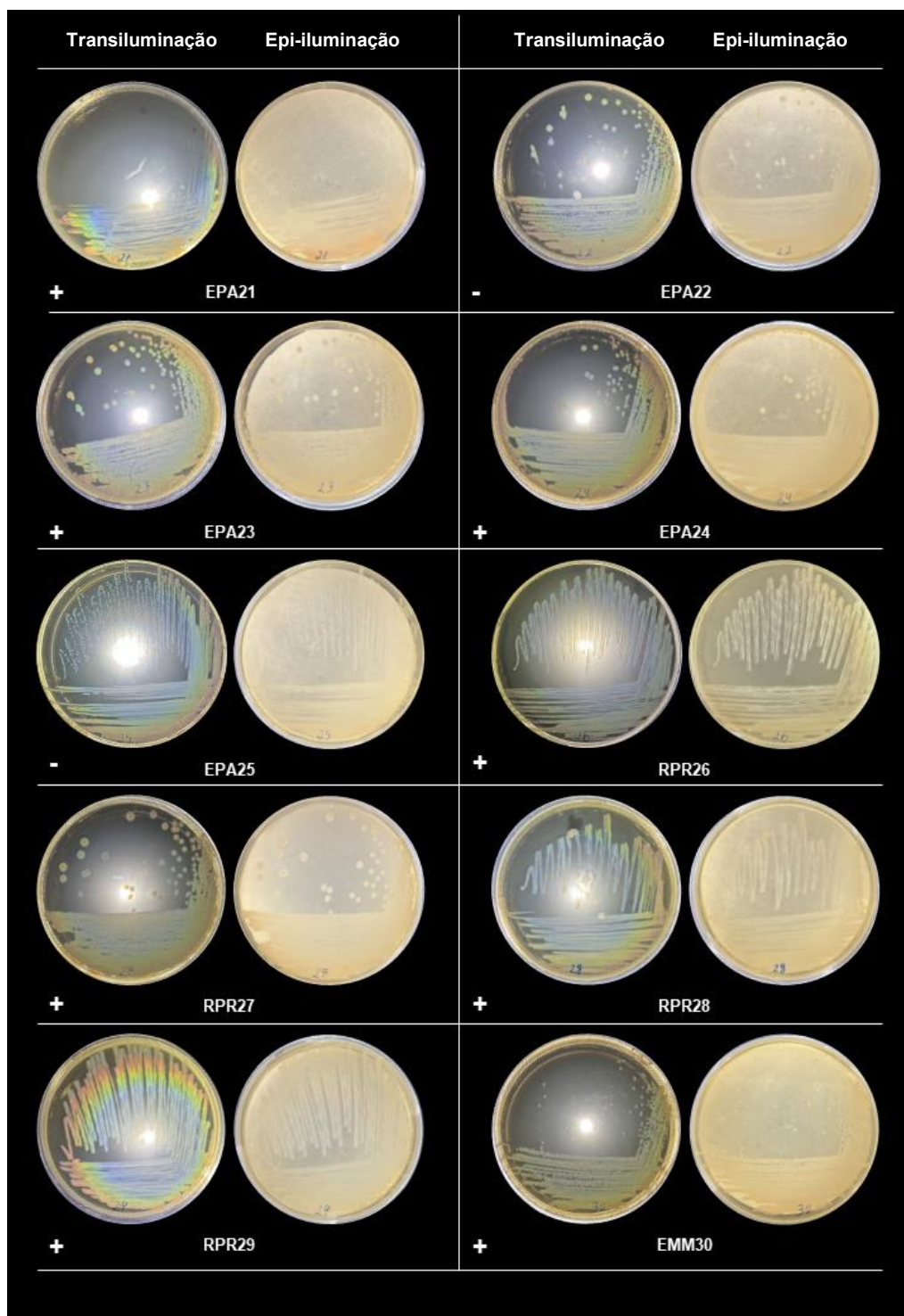


Figura 2 - (*Continuação*) Padrão de iridescência de colônias de isolados rizosféricos e endofíticos de bactérias diazotróficas, cultivados em meio de cultura TSA a 28°C por 24 h e submetidos à transiluminação e à epi-iluminação, evidenciando a emissão de iridescência (+) e a ausência dessa característica (-).

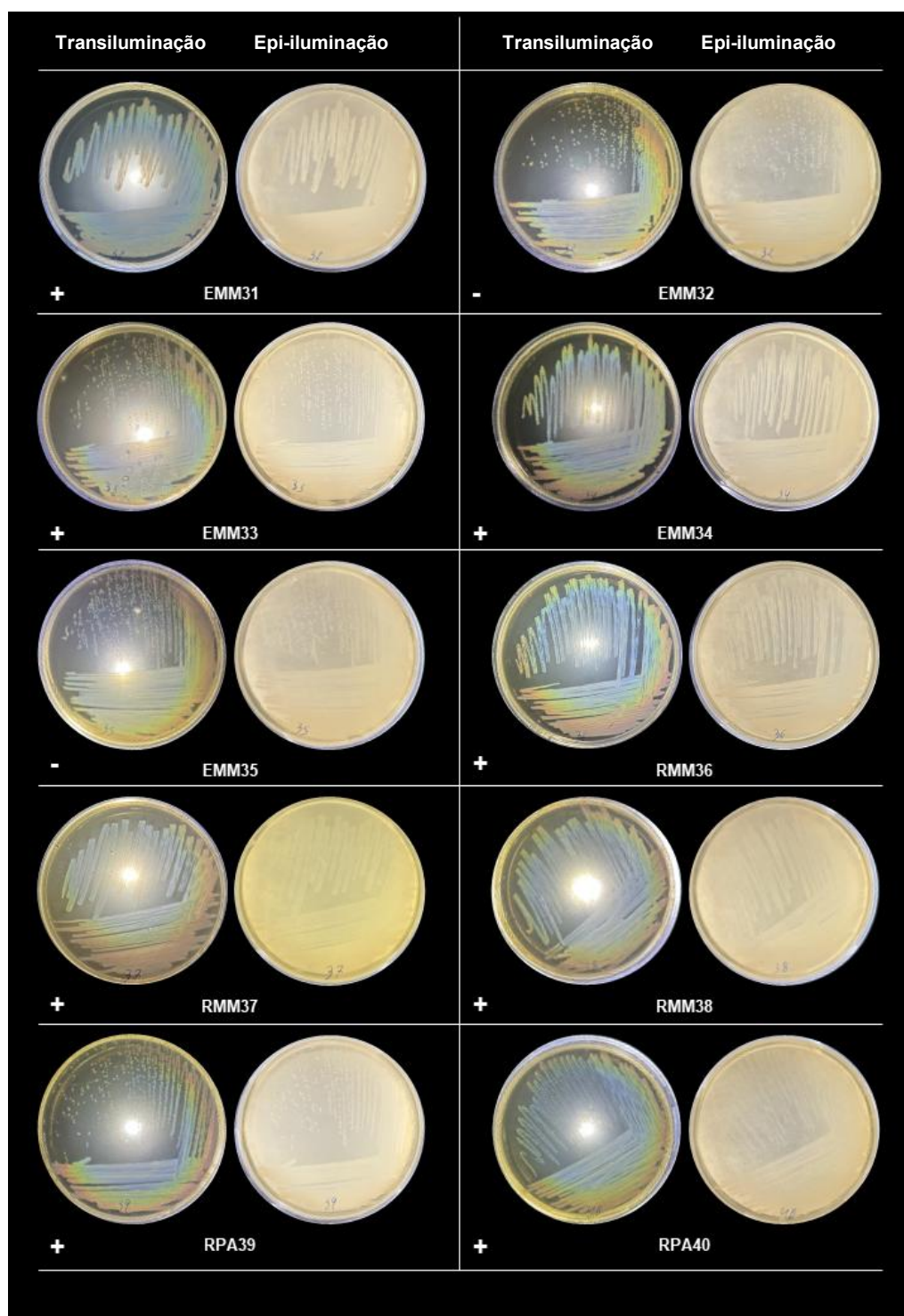


Figura 2 - (Continuação) Padrão de iridescência de colônias de isolados rizosféricos e endofíticos de bactérias diazotróficas, cultivados em meio de cultura TSA a 28°C por 24 h e submetidos à transiluminação e à epi-iluminação, evidenciando a emissão de iridescência (+) e a ausência dessa característica (-).

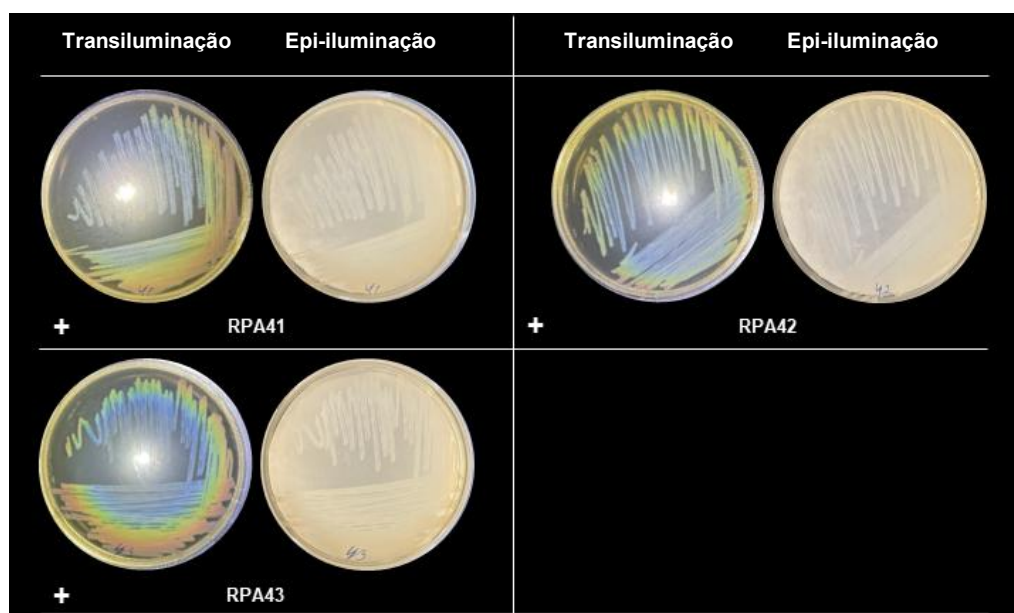


Figura 2. (*Continuação*) Padrão de iridescência de colônias de isolados rizosféricos e endofíticos de bactérias diazotróficas, cultivados em meio de cultura TSA a 28°C por 24 h e submetidos à transiluminação e à epi-iluminação, evidenciando a emissão de iridescência (+) e a ausência dessa característica (-).

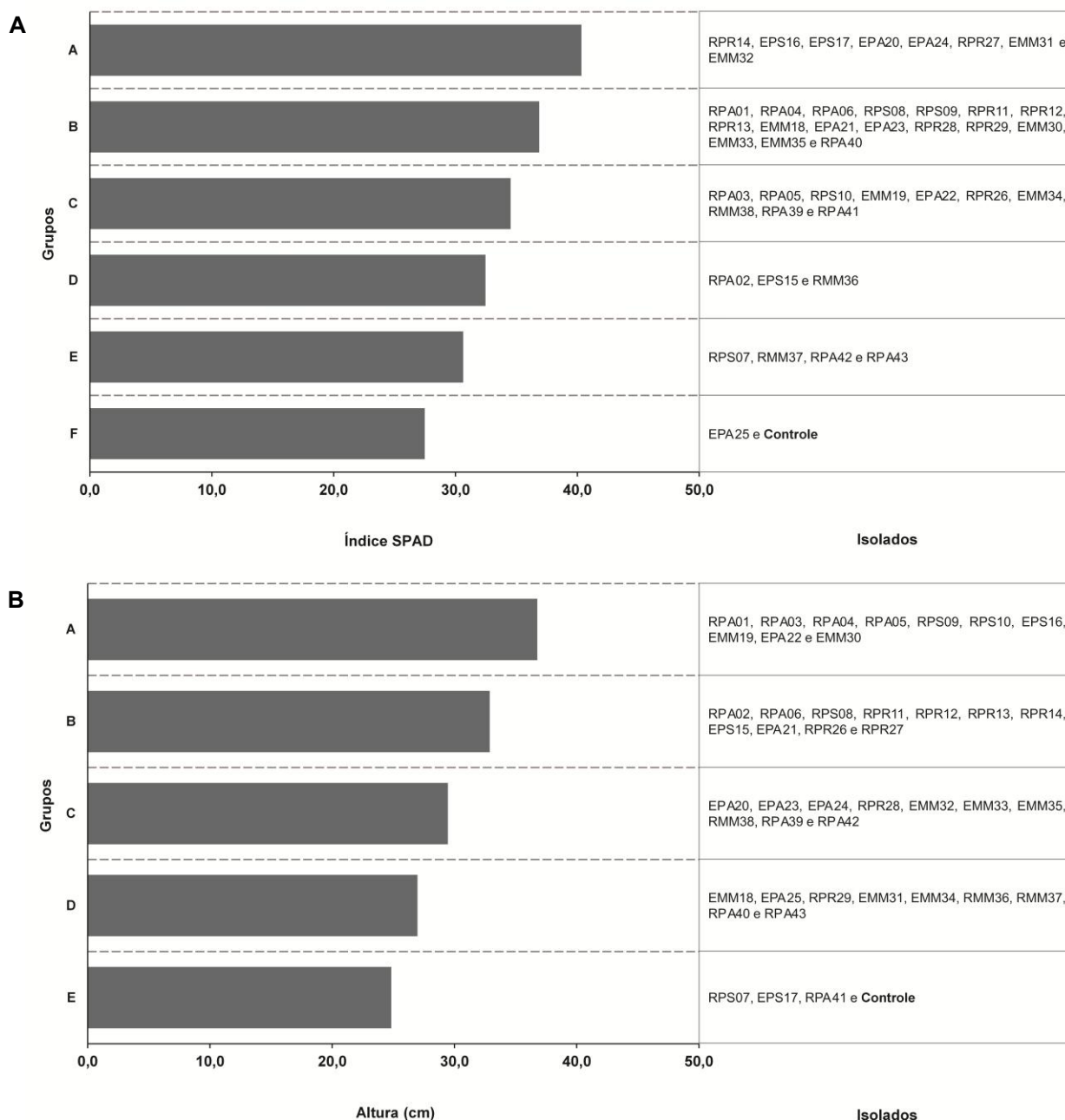


Figura 3. Índice SPAD (A), altura (B) de *Phaseolus vulgaris* L. cv. BRS Marte, inoculado com diferentes isolados bacterianos, cultivado por 35 dias em casa de vegetação. As barras representam a média dos grupos obtidos pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle corresponde às plantas de *P. vulgaris* L. não inoculadas.

fotossintética das plantas. Já o grupo F (isolado EPA25 e controle) apresentou os menores valores de índice SPAD, com média geral de 27,48 (Figura 3A).

A maioria dos isolados de bactérias diazotróficas promoveram aumento da altura das plantas de feijão (Figura 3B e Figura 4). Os isolados foram divididos em cinco grupos cujas médias gerais corresponderam a 36,8; 32,9; 29,4; 27,0 e 24,8 cm (Figura 3B). Os isolados RPS07, EPS17 e RPA41 foram agrupados juntamente com o tratamento controle sem inoculação bacteriana, com média geral de 24,8 cm (Figura 3B).

Em relação à produção de massa seca da parte aérea, o teste de Scott-Knott dividiu os isolados em 5 grupos distintos (Figura 5A). A inoculação das plantas de feijão com a maioria dos isolados de bactérias diazotróficas promoveu maiores acúmulos dessa variável (Figura 5A). O grupo de melhor desempenho foi o dos isolados RPA01, RPA03, RPA04, RPA06, RPS09, RPR11, RPR12, RPR14, EPS15, EMM19, EPA21, EPA22 e EMM30, com média de 7,9 g. Sete dos 43 isolados foram agrupados junto com o controle, com média de acúmulo de massa seca da parte aérea de 5,6 g (Figura 5A). A inoculação com os isolados RPS07, EPA25 e RPA43 promoveu menor acúmulo dessa variável, resultando na produção de 4,5 g de massa seca (Figura 5A).

A maioria dos isolados testados promoveram menor acúmulo de massa seca das raízes (Figura 5B). As médias dessa variável para os tratamentos com a inoculação dos isolados RPA04, EPS15, EMM35, RMM36, RMM38, RPA42 não diferiram estatisticamente do controle [2,04 g] (Figura 5B).

Os isolados testados foram agrupados em 5 grupos estatisticamente distintos em relação ao acúmulo de massa seca total (Figura 5C). O grupo A, constituído dos isolados RPA03, RPA04, RPA06, RPS09, RPR12, EPS15 e EMM19, foi o que apresentou melhor desempenho, com média geral de 10,2 g de massa seca total. Vinte isolados foram agrupados com o tratamento controle sem inoculação (Figura 5C). Dois grupos, o D e E, reuniram isolados cuja inoculação nas plantas de feijão resultou em menor acúmulo de massa seca total (Figura 5C).

A relação parte aérea/raiz não sofreu efeitos da inoculação com as bactérias diazotróficas ou foi reduzida, a depender do isolado testado (Figura 5 D).



Figura 4 - Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. BRS Marte) inoculadas com o isolado bacteriano EMM30 e cultivadas em casa de vegetação por 35 dias. Observar a diferença de tamanho entre as plantas inoculadas e a do controle sem inoculação.

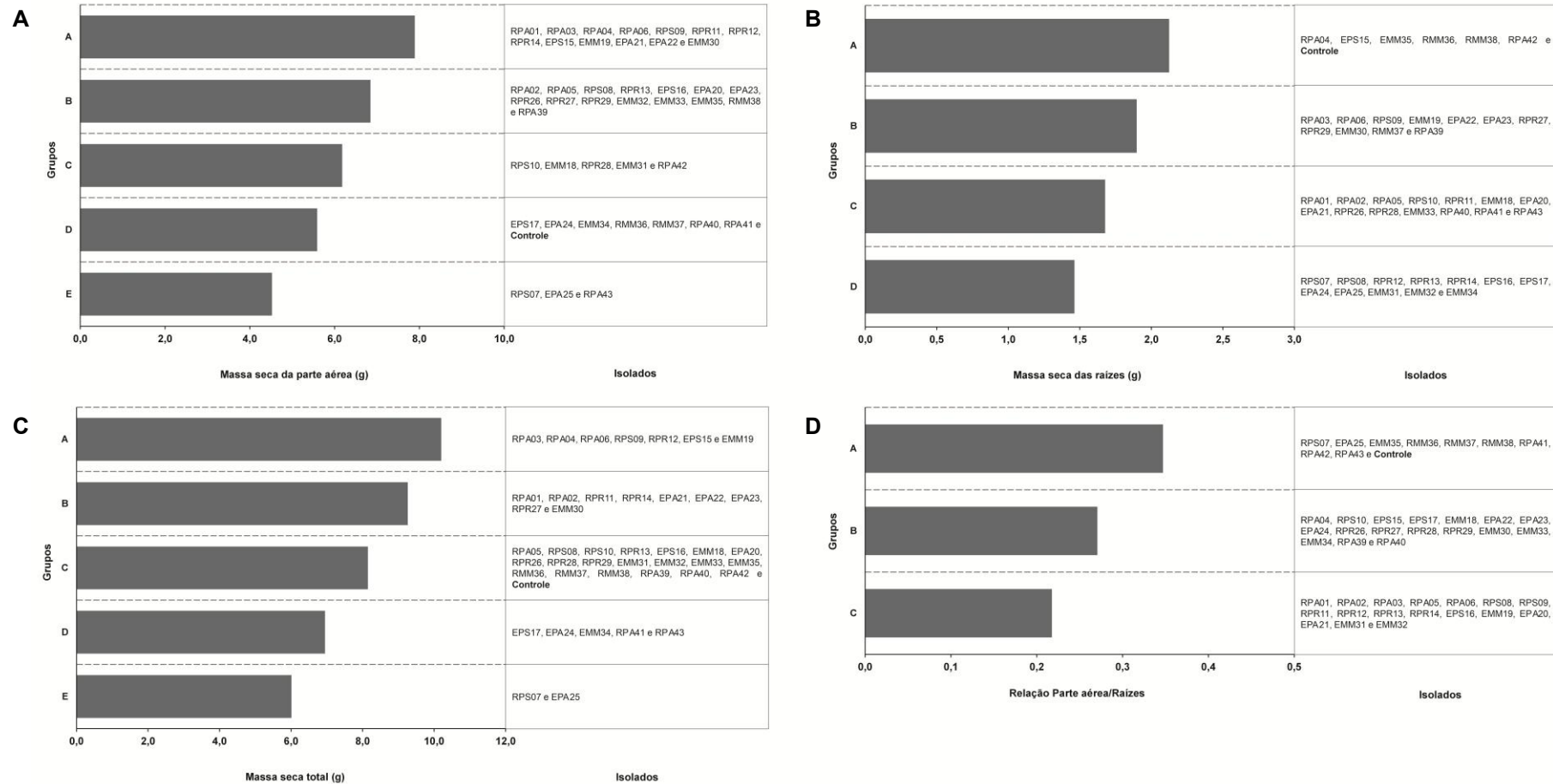


Figura 5 - Massa seca da parte aérea (A), massa seca das raízes (B), massa seca total (C) e relação parte aérea/raiz (D) de *Phaseolus vulgaris* L. cv. BRS Marte, inoculado com diferentes isolados bacterianos, cultivadas por 35 dias em casa de vegetação. As barras representam a média dos grupos obtidos pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle corresponde às plantas de *P. vulgaris* L. não inoculadas.

4.3. Seleção de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento do milho

O índice SPAD foi afetado positiva ou negativamente pela inoculação das plantas de milho com os isolados de bactérias diazotróficas testados (Figura 6A). O teste de Scott-Knott separou os isolados em quatro grupos estatisticamente diferentes, sendo o grupo A, composto pelos isolados RPA04, RPA05, RPS07, RPR12, EPA21, EPA22, EPA24, RPR26, RPR28, RPR29 e EMM30, aquele que apresentou a maior média geral para essa variável [42,36] (Figura 6A). Já o tratamento controle foi incluído no grupo C (Figura 6 A), cuja média geral foi de 37,08. Nesse grupo foram também incluídos os isolados RPA06, RPR11, RPR14, RMM36, RMM37, RMM38 e RPA39. Curiosamente, a inoculação do milho com alguns dos isolados levou à redução dos valores de índice SPAD (Figura 6A).

A inoculação do milho com a maioria dos isolados testados levou a aumentos da altura das plantas (Figura 6B e 7). Os isolados foram agrupados em cinco grupos, sendo o grupo A, composto por RPA06, RPR12, EPS16, EPS17, EPA20, EPA21, RMM36 e RPA39, o que apresentou maior média geral de altura, 24,8 cm. Oito isolados agruparam-se com o controle, não afetando a variável em questão (Figura 6 B). A inoculação com os isolados RPS09 e RPA40 levaram à redução da altura do milho (Figura 6 B).

Somente os isolados RPA01, RPA06, EMM19, EPA20, EMM32, EMM33, EMM34, RPA39 e RPA43 promoveram aumentos no acúmulo de massa seca da parte aérea, com média de 6,4 g (Figura 8B). A inoculação do milho com os isolados RPA03, RPR12, EMM18 e RPR29 resultou no acúmulo de massa seca da parte aérea semelhante ao controle sem inoculação (Figura 8B). Os demais isolados compuseram os grupos C, D, e E, indicando que a inoculação desses no milho diminuiu o acúmulo de massa seca da parte aérea (Figura 8A)

Com relação ao acúmulo de massa seca das raízes, três isolados se destacaram, RPR13, EPA20 e RPA43, compondo o grupo A, com uma média de 2,09 g (Figura 8B). Embora evidenciando o maior acúmulo de massa seca das raízes a valores acima do controle, a maioria dos isolados foi agrupada no grupo B (Figura 8B). A inoculação do milho com seis isolados pertencentes ao grupo D levou ao menor acúmulo de massa seca das raízes (Figura 8 B).

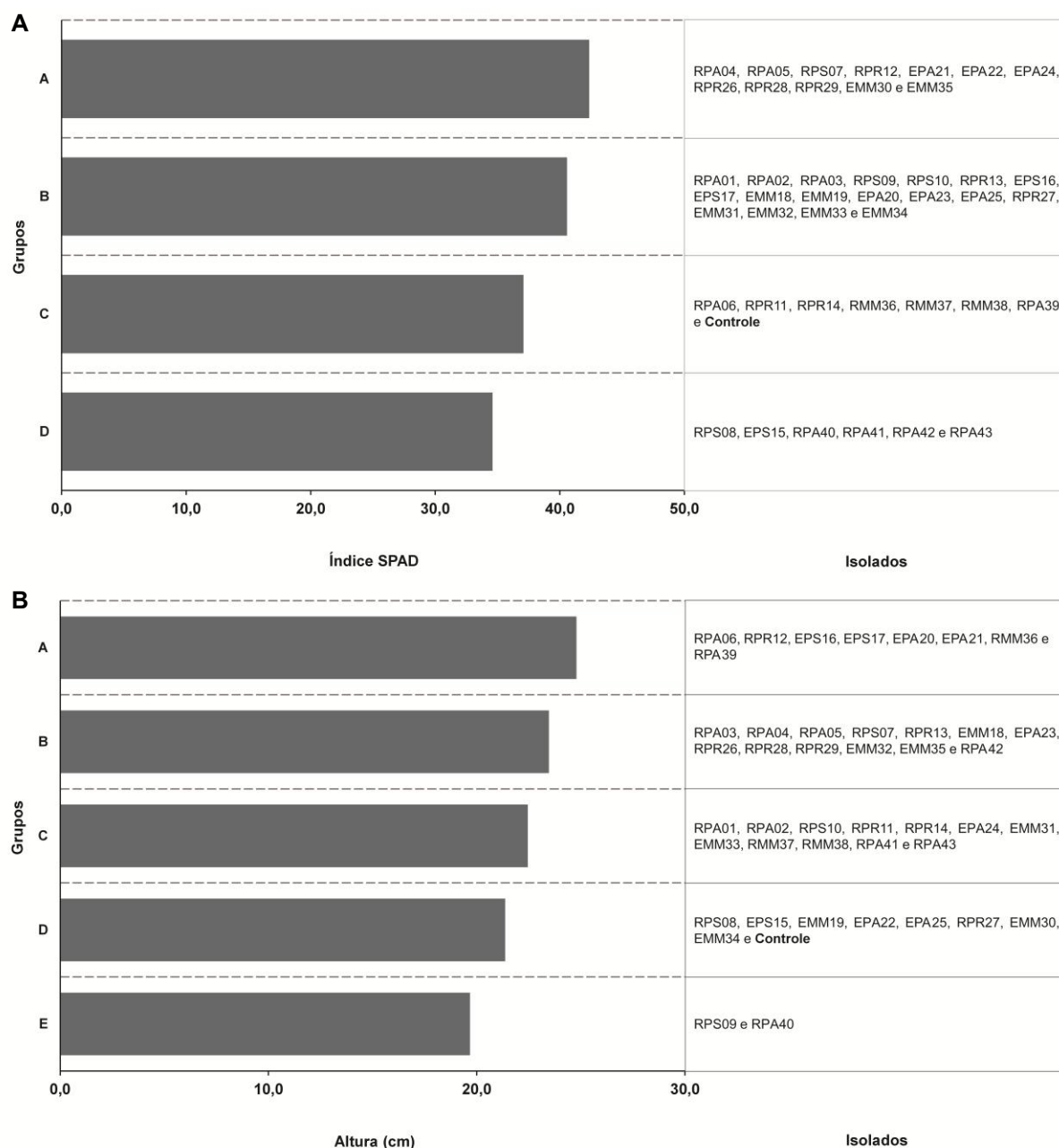


Figura 6 - Índice SPAD (A) e altura (B) de *Zea mays* L. cv. UFVM100, inoculado com diferentes isolados bacterianos, cultivadas por 35 dias em casa de vegetação. As barras representam a média dos grupos obtidos pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle corresponde às plantas de *Zea mays* L. não inoculadas.

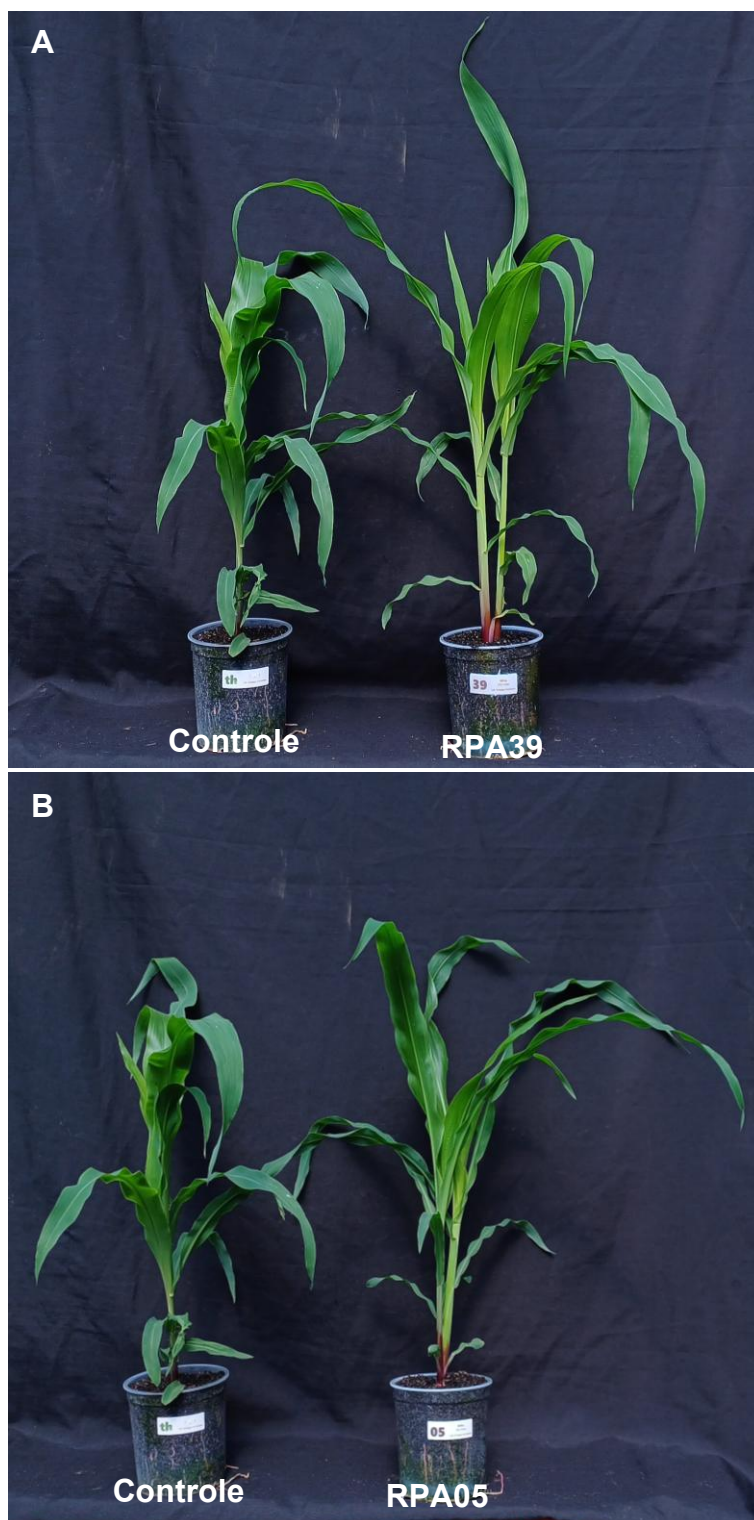


Figura 7 - Plantas de milho (*Zea mays* L.) inoculadas com os isolados de bactérias diazotróficas RPA39 (A) e RPA05 (B) e cultivadas em casa de vegetação por 35 dias. Observar a diferença de tamanho entre as plantas inoculadas e as do controle sem inoculação.

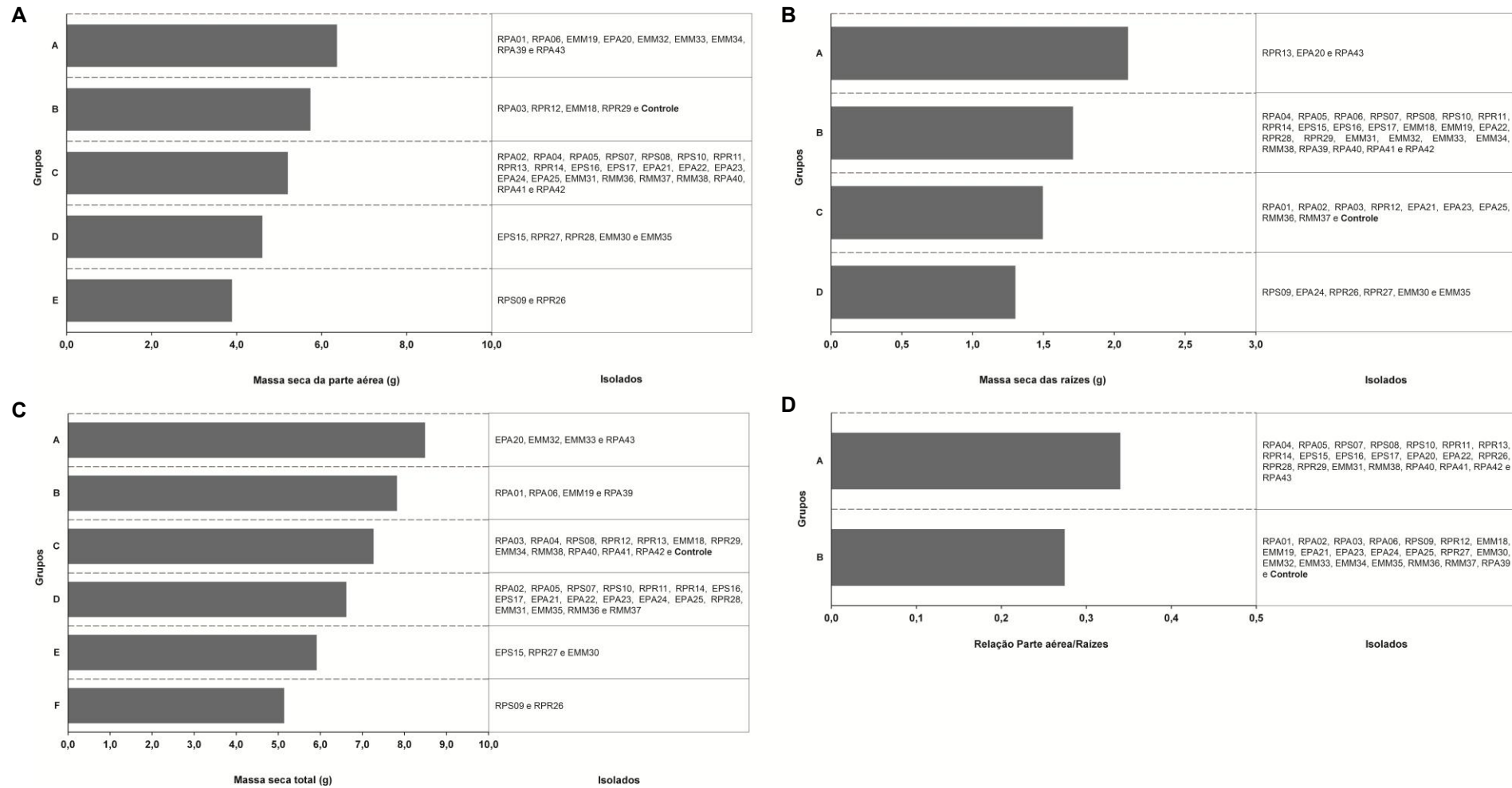


Figura 8 - Massa seca da parte aérea (A), massa seca das raízes (B), massa seca total (C) e relação parte aérea/raiz (D) de *Zea mays* L. cv UFVM100, inoculado com diferentes isolados bacterianos, cultivadas por 35 dias em casa de vegetação. As barras representam a média dos grupos obtidos pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle corresponde às plantas de *Zea mays* L. não inoculadas.

A inoculação das plantas de milho com os isolados de bactérias diazotróficas possibilitou a identificação de bactérias com efeito neutro, de promoção ou de diminuição do acúmulo de massa seca total (Figura 8C). O teste de Scott-Knott permitiu agrupar os isolados em 6 grupos, sendo que os grupos A e B contêm os isolados que aumentaram o acúmulo de matéria seca total (Figura 8C). O grupo C englobou os isolados cuja inoculação não resultou em aumentos da variável (Figura 8C). Os grupos D, E e F reuniram os isolados que levaram a menor acúmulo de massa seca total das plantas de milho (Figura 8C). O grupo A foi composto dos isolados EPA20, EMM32, EMM33 e RPA43, com média de 8,49 g de massa seca total (Figura 8C). A média de produção do grupo B, composto pelos isolados RPA01, RPA06, EMM19 e RPA39, foi de 7,82 g. O grupo C, que continha o tratamento controle, juntamente com outros 12 isolados, apresentou a média de 7,26 g (Figura 8C).

Os isolados testados foram divididos em dois grupos quanto à relação parte aérea/raiz (Figura 8D). Em geral, metade dos isolados de bactérias diazotróficas foi capaz de promover aumentos dessa variável (Figura 8D).

4.4. Caracterização dos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro*

4.4.1. Produção de auxinas

Todos os isolados testados foram capazes de produzir auxinas (Figura 9A e B). A produção de ácido indolacético variou de 1,03 a 232,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Anexo 3). Os isolados foram divididos em cinco grupos quanto à produção desse composto (Figura 9A). A média de produção de ácido indolacético para o grupo A, composto pelos isolados EMM19, EPA25, EPS17, RPA04, RPA41 e RPS07, foi de 223,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto a média para o grupo E, o de menor produção, foi de 9,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 9A).

Em relação ao ácido indol-3-butírico, a produção variou de 1,57 a 761,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Anexo 3). O total de nove grupos foram definidos, sendo os isolados mais eficientes na produção de ácido indol-3-butírico o EPS17 e o EPA20 (Figura 9).

4.4.2. Solubilização de fosfatos

Todos os isolados de bactérias diazotróficas testadas foram capazes de solubilizar os fosfatos tricálcico, de ferro e de Araxá (Figura 10A, B e C). A fonte de fósforo mais

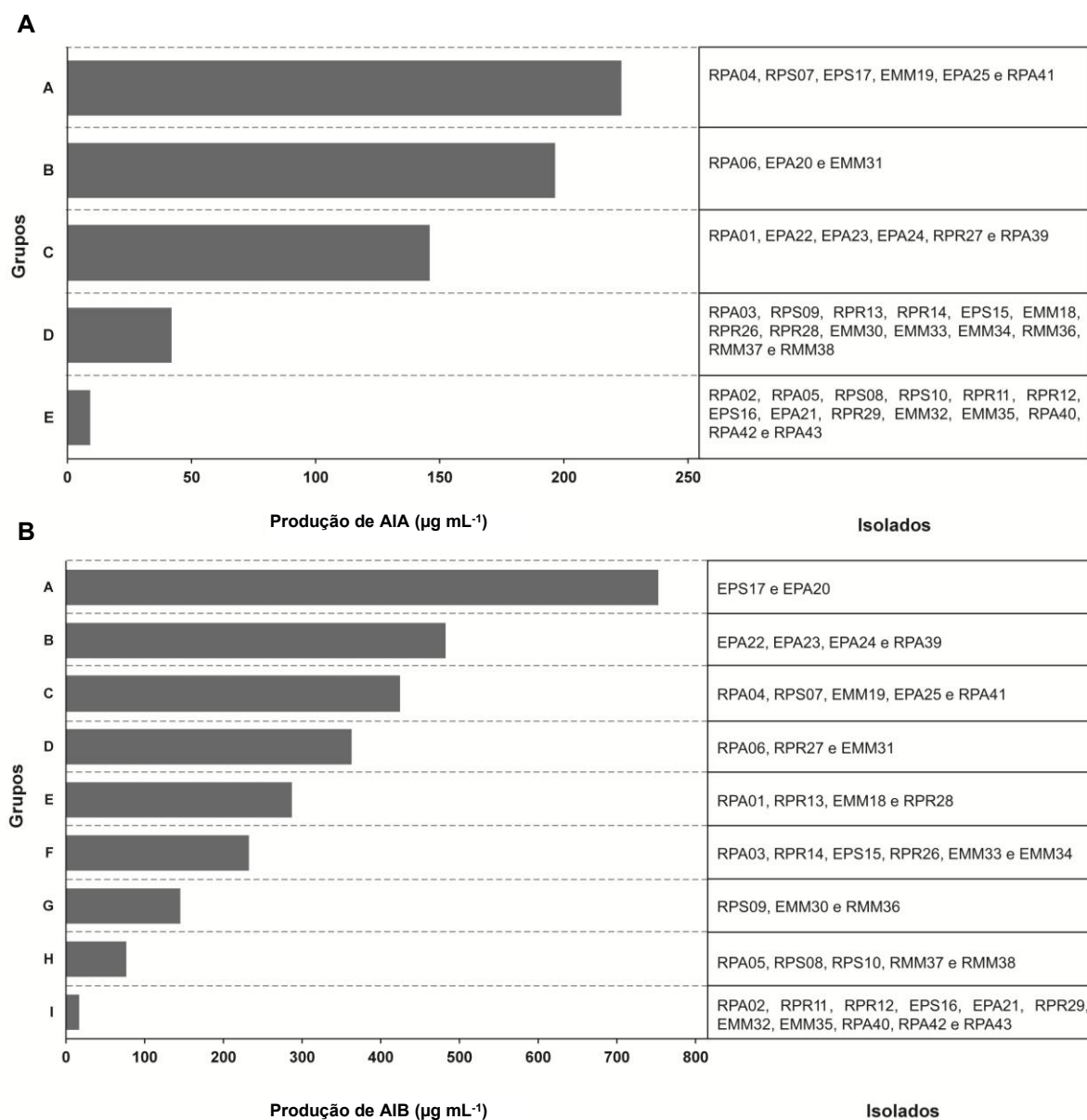


Figura 9 - Ácido indol-3-acético (AIA) (A) e ácido indol-3-butírico (AIB) (B), medidos no sobrenadante do meio TSB suplementado com triptofano, após o cultivo de isolados bacterianos rizosféricos e endofíticos por 96 h a 28°C e 150 rpm.

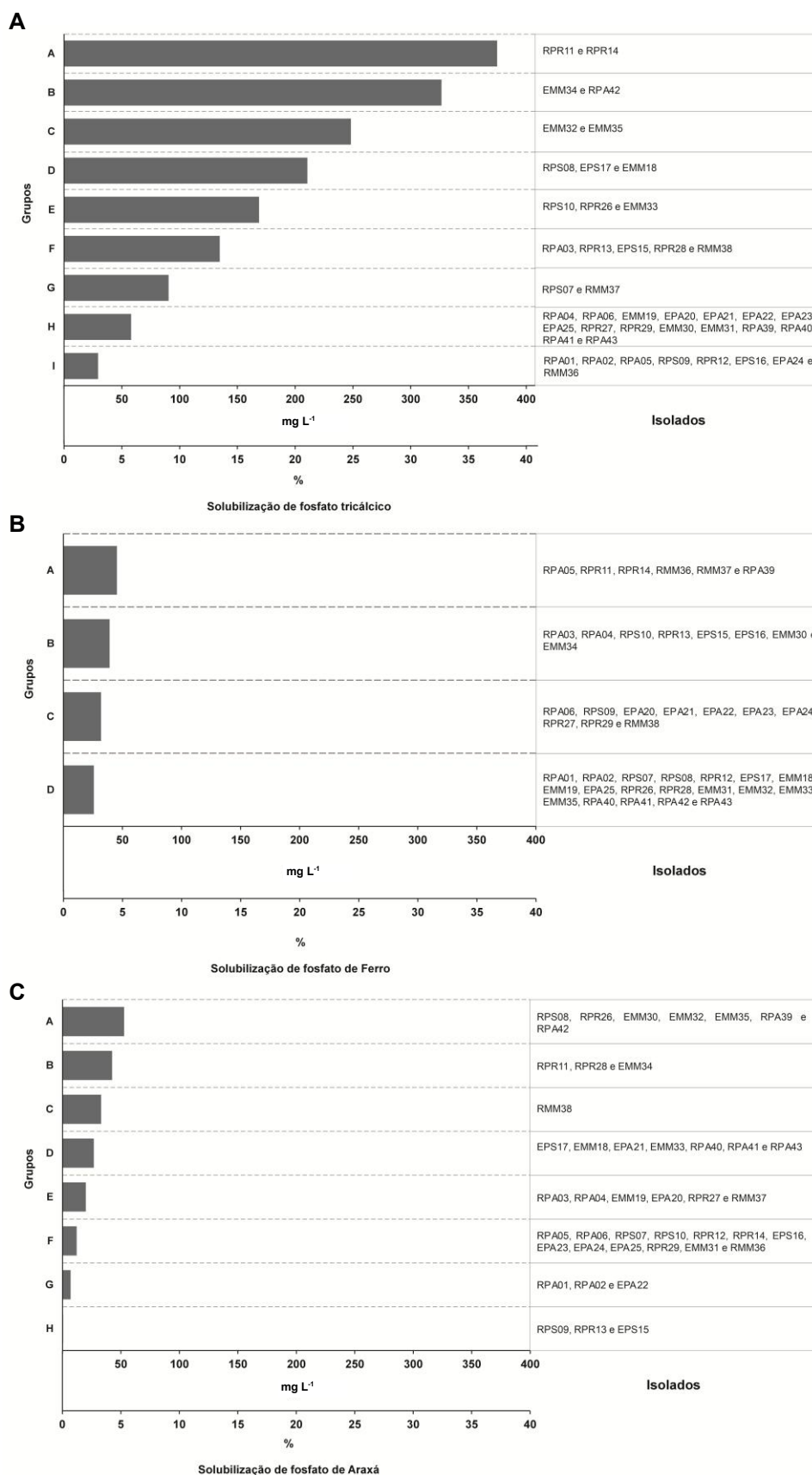


Figura 10 - Fósforo solúvel (mg L^{-1}) e porcentagem de solubilização (%) medidos no sobrenadante do meio NBRIP, suplementado com fosfato tricálcico (A), fosfato ferro (B) e fosfato de Araxá (C), após o cultivo de isolados bacterianos rizosféricos e endofíticos por 7 dias a 28°C e 150 rpm.

eficientemente solubilizada foi o fosfato tricálcico, seguido pelo fosfato de ferro e o fosfato de Araxá (Figura 10A, B e C).

Os isolados RPR11 e o RPR14 foram os mais eficientes na solubilização de fosfato tricálcico, com 374 mg L^{-1} de P solúvel, valor que corresponde à liberação de 37,5% do fósforo contido nessa fonte (Figura 10A). Já para o fosfato de ferro, os isolados do grupo A liberaram $45,4 \text{ mg L}^{-1}$ de P solúvel, o que corresponde a 5,4% do total de P do fosfato de ferro (Figura 10B). O fosfato de Araxá foi solubilizado em menor escala, sendo que os isolados mais eficientes levaram à concentração de P solúvel no meio de $52,7 \text{ mg L}^{-1}$, valor correspondente à solubilização de 7,6 % do fósforo do fosfato de Araxá (Figura 10C).

4.4.3. Produção de amônio

Todos os isolados bacterianos testados foram capazes de produzir amônio quando cultivados em água peptonada (Figura 11). O isolado RPS09 destacou-se como o maior produtor, com média de $1,79 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de amônio (Figura 11).

4.4.4. Produção de enzimas hidrolíticas

Os isolados de bactérias diazotróficas testadas mostraram-se capazes de produzir diferentes enzimas líticas nos meios de cultura testados (Tabela 2). Destacam-se os isolados RPA05, EPA21, RPR28, EMM32 e RPA40, que foram positivos para a produção de todas as enzimas (Tabela 2). A amilase e a pectinase foram produzidas por 42% dos isolados, enquanto a celulase, por 40 %, e a quitinase, por 91 %. Não foi possível detectar a produção dessas enzimas pelos isolados RPA01 e RPS07 (Tabela 2).

4.4.5. Produção de sideróforos

Os sideróforos do tipo catecol foram produzidos por 53,5% dos isolados (Tabela 2). Já os do tipo hidroxamato, por 34,9%, e as pioverdinas, por 7 % (RPS08, RPS10 e RMM38) (Tabela 2).

4.4.6. Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)

Quanto à produção do HCN, somente o isolado RMM38 foi capaz de produzir esse composto (Tabela 2).

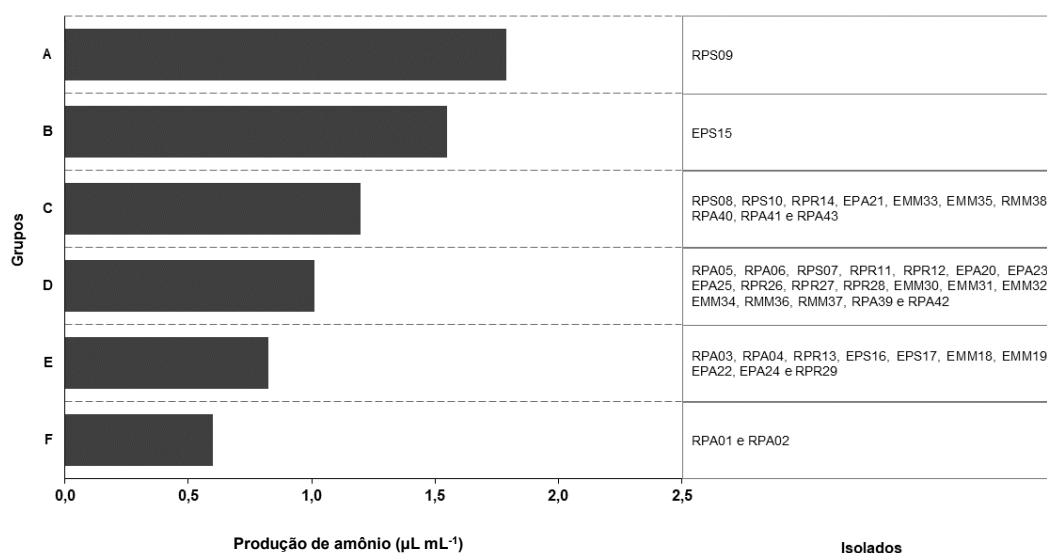


Figura 11 - Amônio medido no sobrenadante de meio de cultura contendo peptona bacteriológica (1%) e cloreto de sódio (0,5%), após o cultivo de isolados bacterianos rizosféricos e endofíticos por 48 h a 28°C e 150 rpm.

Tabela 2 - Produção de enzimas hidrolíticas (celulase, pectinase, amilase e quitinase), sideróforos do tipo pioverdinas, hidroxamato e catecol, e produção de cianeto de hidrogênio por isolados endofíticos ou rizosféricos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L.

Isolado	Produção de enzimas hidrolíticas				Produção de sideróforos			Produção de HCN
	Celulase	Pectinase	Amilase	Quitinase	Pioverdinas	Hidroxamato	Catecol	
RPA01	-	-	-	-	-	+	-	-
RPA02	-	-	+	+	-	+	-	-
RPA03	-	-	-	+	-	-	+	-
RPA04	-	-	+	-	-	-	+	-
RPA05	+	+	+	+	-	+	-	-
RPA06	-	-	-	+	-	-	+	-
RPS07	-	-	-	-	-	+	-	-
RPS08	+	+	-	+	+	+	-	-
RPS09	+	-	+	+	-	-	+	-
RPS10	+	-	-	+	+	-	+	-
RPR11	-	-	-	+	-	+	-	-
RPR12	-	-	+	+	-	+	-	-
RPR13	-	+	-	+	-	+	-	-
RPR14	-	-	-	+	-	-	+	-
EPS15	-	+	+	+	-	-	+	-

+ Positivo para a produção

- Negativo para a produção

RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.).

(continua)

Tabela 2 - Produção de enzimas hidrolíticas (celulase, pectinase, amilase e quitinase), sideróforos do tipo pioverdinas, hidroxamato e catecol, e produção de cianeto de hidrogênio por isolados endofíticos ou rizosféricos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L.

Isolado	Produção de enzimas hidrolíticas				Produção de sideróforos			Produção de HCN
	Celulase	Pectinase	Amilase	Quitinase	Pioverdinas	Hidroxamato	Catecol	
EPS16	+	-	-	+	-	-	+	-
EPS17	+	-	+	+	-	-	-	-
EMM18	+	+	-	+	-	-	-	-
EMM19	+	+	-	+	-	+	-	-
EPA20	-	-	-	+	-	-	+	-
EPA21	+	+	+	+	-	-	+	-
EPA22	-	-	-	+	-	-	+	-
EPA23	-	-	-	+	-	-	-	-
EPA24	-	-	-	+	-	-	-	-
EPA25	-	+	-	+	-	-	+	-
RPR26	+	-	-	+	-	-	+	-
RPR27	-	+	-	+	-	-	-	-
RPR28	+	+	+	+	-	+	-	-
RPR29	-	-	-	+	-	+	-	-
EMM30	-	+	+	+	-	+	-	-

+ Positivo para a produção

- Negativo para a produção

RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.).

(continua)

4.4.7. Análise de Coordenadas Principais (PCoA)

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA), realizada com base na matriz de distância de Gower, permitiu a separação dos 43 isolados bacterianos em seis grupos funcionais distintos (Figura 12). Os agrupamentos foram definidos com base na similaridade dos isolados considerando todas as características quantitativas e qualitativas binárias avaliadas, incluindo aspectos de promoção de crescimento em milho e feijão, solubilização de fosfato, produção de auxinas e amônio, enzimas hidrolíticas, sideróforos e ácido cianídrico. Os dois primeiros eixos explicaram, juntos, 42,1% da variação total entre os isolados, sendo 23,2% atribuídos ao eixo 1 (PCoA1) e 18,9% ao eixo 2 (PCoA2).

A representação gráfica revelou a formação de seis agrupamentos distintos, conforme identificado pelo método de agrupamento k-means (Figura 12), refletindo variações nos perfis funcionais dos isolados bacterianos. O grupo 1 (Figura 12) compreendeu isolados que produziram apenas sideróforos do tipo hidroxamato. O grupo 2 (Figura 12) incluiu produtores de quitinase e isolados que apresentaram aumento no índice SPAD do feijão. O grupo 3 (Figura 12) englobou isolados produtores de sideróforos do tipo catecol, mas que não produziram celulase nem pectinase. O grupo 4 (Figura 12) estão os isolados que produzem ácido indol-3-acético em alta quantidade, catecol e quitinase, porém que apresentam efeito negativo ou neutro na promoção do crescimento de plantas de feijão. O grupo 5 (Figura 12) estão isolados que produzem celulase, pectinase e quitinase. O grupo 6 (Figura 12) compreende isolados produtores de sideróforos do tipo catecol e enzima quitinase, além do único produtor de HCN e isolados sem um traço predominante.

A análise de variância multivariada por permutação (PERMANOVA), baseada na matriz de distância de Gower, indicou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos formados ($R^2 = 0,394$; $F = 4,81$; $p = 0,001$). O modelo explicou aproximadamente 39,4% da variação total nos dados, demonstrando que os agrupamentos refletem distinções relevantes nas características multivariadas dos isolados. A significância obtida a partir de 999 permutações reforça a robustez do resultado e a validade dos agrupamentos identificados.

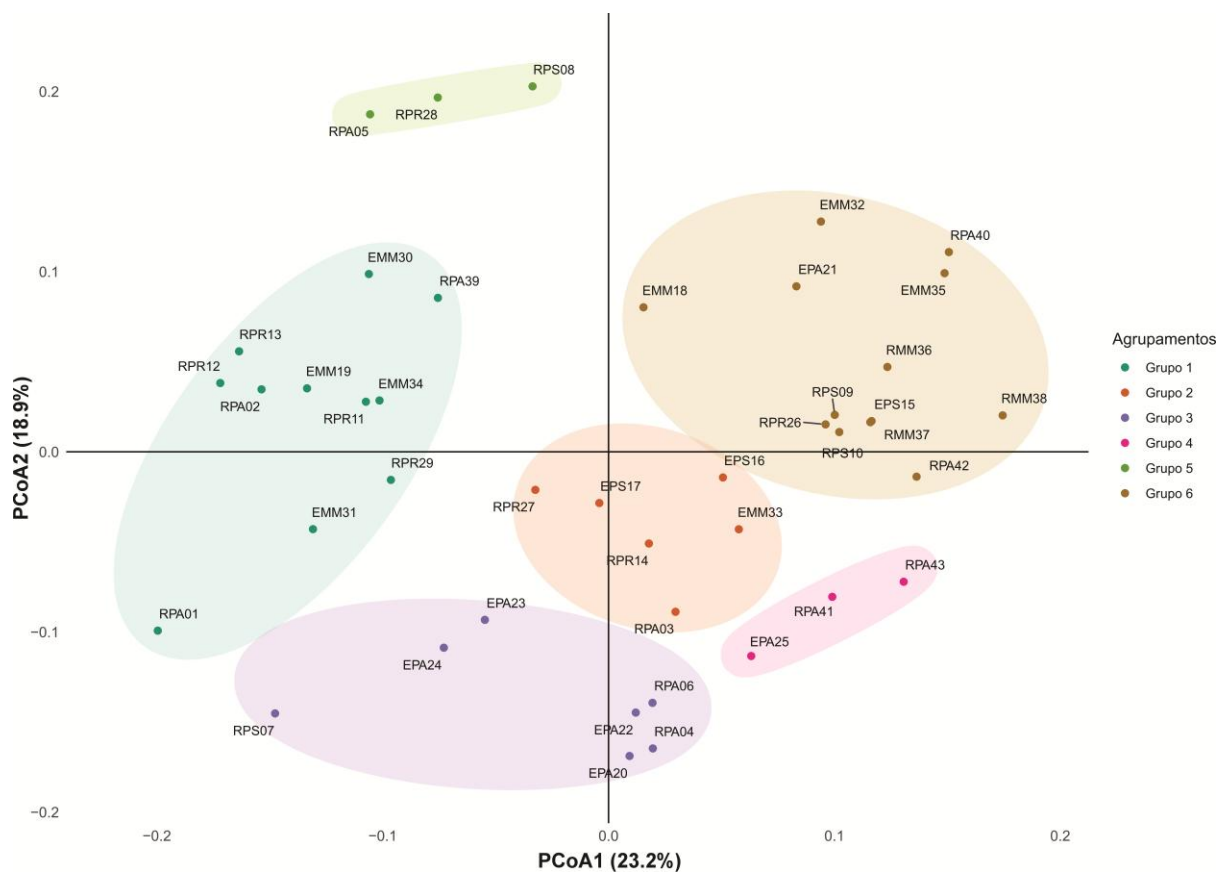


Figura 12 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) englobando as características dos 43 isolados quanto à promoção de crescimento vegetal do feijão e do milho e os mecanismos de promoção de crescimento *in vitro*.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram obtidos 43 isolados de bactérias diazotróficas, de hábito rizosférico ou endofítico, com características morfológicas distintas, de plantas de *P. aurea* L., *M. minutiflora* L., *P. setaceum* L. e *P. setaceum rubrum* L. Este resultado demonstra a capacidade de bactérias fixadoras de nitrogênio de colonizar diferentes espécies vegetais, em especial da família Poaceae, como já relatado (PATEL e ARCHANA, 2017; PATEL, *et al.*, 2020). Estudos conduzidos com vinte genótipos de *Urochloa* relataram a obtenção de mais de 200 isolados de bactérias diazotróficas, obtidos a partir da rizosfera ou da endosfera das plantas. Dentre essas, os gêneros *Nitrospirillum* e *Azospirillum* foram os mais comuns, estando presentes em todos os genótipos avaliados (RIBEIRO, *et al.*, 2020).

Os isolados obtidos foram, em sua maioria, bactérias gram-negativas (88,37%) e apresentaram ampla variação de morfologia colonial. De fato, durante o processo de isolamento em cultura pura, privilegiou-se selecionar colônias com características morfológicas distintas, visando aumentar a diversidade taxonômica dos isolados. Colônias com morfologias semelhantes foram, em geral, descartadas. A caracterização morfológica dos isolados obtidos revelou a predominância de colônias circulares, com bordas contínuas, superfícies lisas e consistência variando entre gomosa, viscosa e butírica. As características morfológicas das colônias podem sofrer variação em função das condições de cultivo (ALVES-JÚNIOR, *et al.*, 2021). No entanto, elas são úteis para agrupar os isolados antes da identificação taxonômica e funcional. Estudos adicionais serão realizados visando caracterizar taxonomicamente os isolados obtidos e estabelecer relações entre as propriedades dos mesmos e suas relações filogenéticas.

No presente trabalho, a iridescência estava amplamente distribuída entre os isolados obtidos, com 93% deles sendo capazes de manifestar essa característica quando submetidos à transiluminação. Em geral, a iridescência tem sido observada em isolados oriundos da superfície de oceanos, zonas costeiras, praias interditaes e superfície de lagoas e lagos rasos (ZOMER *et al.*, 2024). No presente trabalho, a iridescência foi registrada para bactéria endofíticas e rizosféricas, indicando que essa característica é mais amplamente distribuída e que, possivelmente, tem sido negligenciada durante o isolamento. Estudos com 13 mil metagenomas ambientais, oriundos de diferentes habitats, propuseram que a iridescência deva estar mais

presente em habitats que recebem grandes quantidades de luz, servindo como mecanismo de proteção ou adaptação a essas condições (ZOMER *et al.* 2024). É possível que esses microrganismos, quando presentes na rizosfera, possam ser transportados para a parte aérea das plantas onde poderiam exercer efeitos protetores contra o excesso de luz. Em procariotos, a iridescência é hipotetizada como representando mecanismo de tolerância a essas condições (KIENTZ, *et al.*, 2012 e ZOMER *et al.* 2024). Este trabalho constitui o primeiro relato do isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas iridescentes isoladas do solo e da endosfera de *P. aurea* L., *P. setaceum* L., *P. setaceum rubrum* L. e *M. minutiflora* L.

Os isolados avaliados, quando inoculados em plantas de feijão e no milho, apresentaram efeitos neutros, de promoção ou de inibição do crescimento vegetal. A promoção do crescimento de plantas por microrganismos rizosféricos tem sido atribuída à expressão *in planta* de mecanismos diretos e indiretos, a exemplo da fixação biológica de nitrogênio, da solubilização de fosfato, da produção de auxinas, dentre outros (SOUMARE *et al.*, 2020; OLEŃSKA, *et al.*, 2020; BATISTA, *et al.*, 2021; RAWAT *et al.*, 2021; LADHA *et al.*, 2022; KULKOVA, *et al.*, 2023; WANG, *et al.*, 2024b). Já a inibição do crescimento tem sido atribuída à produção microbiana de HCN, AIA, fitotoxinas, etileno, jasmonato e pela regulação da disponibilidade de nutrientes (PHUKAN, *et al.*, 2021; SOUMYA *et al.*, 2023; FUKAZAWA, *et al.*, 2023). No entanto, no presente trabalho, não foi realizada a quantificação da expressão desses mecanismos durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Em trabalhos semelhantes, com a inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal, os benefícios para planta decorrentes da presença do microrganismo podem também estar relacionados à maior absorção nutrientes, ao sistema radicular mais amplo, e à eficiência de uso de nutrientes (ADELEKE, *et al.*, 2021; LOPES, *et al.*, 2021; CHENG, *et al.*, 2025). Os isolados testados interferiram na produção de massa seca das raízes, da parte aérea ou total, sugerindo a operação de distintos mecanismos de promoção ou inibição do crescimento.

Os isolados de bactérias diazotróficas iridescentes caracterizaram-se por formarem simbiose associativa com o milho e o feijão, uma vez que não induziram nas plantas estruturas características das simbioses mutualistas (simbiossomo). No entanto, baseados nos resultados obtidos, esses isolados apresentam potencial de utilização na agricultura como bioinoculantes. Alguns estudos já demonstraram a eficiência de bactérias diazotróficas em promover o crescimento e aumentar a

produtividade de plantas de feijão e milho (CUNHA, *et al.*, 2021; FILIPINI, *et al.*, 2021). Por exemplo, a inoculação com *Rhizobium tropici*, uma bactéria simbiótica mutualista, e *Azospirillum brasilense*, uma bactéria simbiótica associativa, trouxe aumentos significativos de biomassa, nitrogênio acumulado, massa de mil grãos e produtividade de grãos (MARTINS, *et al.*, 2024 e FILIPINI, *et al.*, 2021). Estudos demonstraram que a inoculação do milho com *A. brasiliense* ou *B. japonicum* mais a adubação com 40 kg/ha de N proporcionou produtividade de grãos de 11.862,7 kg ha⁻¹ e 11.281 kg ha⁻¹, respectivamente, enquanto no tratamento sem inoculação, com adubação de 80 kg ha⁻¹ de N, a produtividade obtida foi de 11.049,7 kg ha⁻¹, demonstrando a eficiência do uso de bactérias diazotróficas (CUNHA, *et al.*, 2021).

Diversos isolados mostraram-se eficientes em promover o crescimento de plantas de feijão, com destaque para RPA03, RPA04, RPS09 e EMM19 que foram classificados no grupo A nas avaliações de altura, acúmulo de massa seca da parte aérea e acúmulo de massa seca total, demonstrando alto potencial para promover o crescimento de plantas de feijão. O isolado EPA20 destacou-se na promoção de crescimento de plantas de milho, estando classificado no grupo A nas avaliações de altura, acúmulo de massa seca da parte aérea, acúmulo de massa seca de raízes, acúmulo de massa seca total e relação parte aérea/raízes.

Todos os isolados obtidos neste trabalho foram capazes de produzir as auxinas ácido indol-3-acético e ácido indol-3-butírico. A produção de auxinas parece ser atividade comum em microrganismos rizosféricos, tanto em fungos quanto em bactérias (Santos, 2011; MORFFY e STRADER, 2020). As concentrações de auxinas medidas no sobrenadante variaram de acordo com os grupos de isolados determinados pelo teste de Scott-Knott. Os isolados mais eficientes produziram 223,19 e 752,78 µg mL⁻¹ de ácido indol-3-acético e ácido-indol-3-butírico, respectivamente. Em estudo anterior com 213 bactérias diazotróficas, a produção de ácido indol-3-acético esteve entre 13,96 a 470,53 µg mL⁻¹, indicando ampla variação na capacidade dos microrganismos testados de produzir esse fitormônio (RIBEIRO, *et al.*, 2020). A produção de ácido indol-3-acético é tida como mecanismo direto de promoção do crescimento vegetal, podendo estimular a rizogênese e, assim, aumentar a aquisição de nutrientes pela planta (BATISTA, *et al.*, 2021). O aumento da rizogênese pode ser inferido pela diminuição da relação parte aérea/raiz, como observado no presente trabalho. Embora a atividade de fixação biológica das bactérias iridescentes não tenha sido quantificada, a capacidade de síntese de ácido

indol-3-acético está, em alguns casos, diretamente relacionada com o processo de fixação biológica de nitrogênio (DEFEZ *et al.*, 2017).

Os isolados de bactérias diazotróficas foram capazes de solubilizar fontes sintéticas (fosfato tricálcico e fosfato de ferro) e naturais de fosfatos (fosfato de Araxá). A fonte solubilizada com maior eficiência foi o fosfato tricálcico. Em geral, essa fonte é a mais susceptível à solubilização microbiana, uma vez que a simples acidificação do meio via extrusão de prótons e, ou dissociação de grupos carboxílicos já é suficiente para liberar o fósforo a partir dela (MENDES, *et al.*, 2013; MENDES, *et al.*, 2020; NASCIMENTO, *et al.*, 2021). A solubilização de fosfato de ferro e de fosfato de Araxá depende, em parte, da acidificação do meio, mas requer adicionalmente a produção de ácidos orgânicos capazes de complexar os cátions acompanhantes do fosfato (MENDES, *et al.*, 2013; MENDES, *et al.*, 2020; MENDES, *et al.*, 2021). O fosfato de Araxá foi a fonte de fósforo menos solubilizada. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a liberação de flúor durante a solubilização dessa rocha inibe o crescimento microbiano e a produção de ácidos orgânicos, impactando negativamente o processo de solubilização (MENDES, *et al.*, 2014; SILVA, *et al.*, 2014). A solubilização das fontes de fósforo avaliadas no presente trabalho foi realizada *in vitro*. Estudos adicionais deverão ser realizados para se determinar o potencial dos isolados de bactéria diazotróficas em melhorar a nutrição fosfatada das plantas, com ênfase na capacidade de solubilização de fosfato *in situ* e na liberação do fósforo fixado ao solo, como já realizado para o fungo *Aspergillus niger* (NASCIMENTO, *et al.*, 2021; MENDES, *et al.*, 2021; MUNDIM, *et al.*, 2022).

As bactérias diazotróficas isoladas foram capazes de mineralizar o nitrogênio orgânico *in vitro*, com a consequente liberação de amônia no sobrenadante do meio de cultura. Potencialmente, essas bactérias podem suprir nitrogênio para as plantas tanto pela fixação biológica de nitrogênio quando pela mineralização da matéria orgânica do solo. A ampla distribuição dessa característica entre as bactérias diazotróficas obtidas pode, em parte, ser explicada, como sendo um reflexo do ambiente rizosférico e endofítico de onde foram obtidas. Em geral, a rizosfera das plantas é enriquecida com bactérias mineralizadoras de nitrogênio, que liberam o nutriente para a plantas ao oxidarem a matéria orgânica nesse ambiente (SHAMEEM *et al.*, 2023; LIU *et al.*, 2024; XIE, *et al.*, 2024).

A produção das enzimas hidrolíticas (amilase, celulase, pectinase e quitinase) evidenciou ampla capacidade dos isolados obtidos de degradar resíduos orgânicos

no solo. Destacam-se os isolados RPA05, EPA21, RPR28, EMM32 e RPA40, que obtiveram resultados positivos nos testes de produção de todas as enzimas avaliadas. A produção de quitinase foi a atividade mais frequente entre os isolados, com 91% deles apresentando resultados positivos para a produção dessa enzima. A produção de enzimas hidrolíticas por microrganismos está ligada à capacidade de mineralização da matéria orgânica do solo, com a consequente liberação de macro- e micronutrientes para as plantas (ZHOU e STAYER, 2019; JILLING *et al.*, 2021). Já a produção de quitinases pode conferir ao microrganismo a capacidade de atuar no controle de pragas e doenças (DAS, *et al.*, 2024) por meio da degradação parcial ou total do exoesqueleto de insetos e da parede celular fúngica. Estudos futuros deverão ser conduzidos para estimar o potencial das bactérias diazotróficas obtidas neste trabalho para atuarem como agentes de controle biológico.

Os tipos mais comuns de sideróforos produzidos pelas bactérias diazotróficas foram os catecois e os hidroxamatos. A pioverdina foi produzida somente por três isolados, a saber o RPS08, o RPS10 e o RMM38. Esse sideróforo fluorescente é geralmente produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas* (RINGEL e BRÜSER, 2018). A produção de sideróforos tem sido observada em bactérias de diferentes gêneros, a exemplo de *Rhizobium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Delftia* e *Paenibacillus* (VASQUES, *et al.*, 2021; JOSHI e DHINGANI, 2020). Dentre esses, *Pseudomonas* foi predominante, com 12 estirpes positivas para a produção desses compostos (VASQUES, *et al.*, 2021). A identificação das bactérias diazotróficas obtidas neste trabalho poderá contribuir para a elucidação da distribuição da produção de sideróforos em diferentes gêneros bacterianos.

Surpreendentemente, somente um isolado de bactéria diazotrófica, o RMM38, foi capaz de gerar resultado positivo no teste para a produção de HCN. A produção desse composto é considerada como mecanismo microbiano de inibição do crescimento de plantas (PHUKAN *et al.*, 2021; SOUMYA *et al.*, 2023) e tem sido aventada como estratégia para o controle de plantas daninhas usando microrganismos. No entanto, o isolado RMM38 não foi capaz de reduzir a produção de massa seca de raízes e da parte aérea do feijão e do milho indicando que tal mecanismo não estava operante nas condições de cultivo analisadas. Esses resultados não descartam a possibilidade de que o HCN produzido possa atuar no controle de fitopatógenos em outras situações, como proposto por SANDIKAR (2018).

A análise individual das variáveis quantitativas e qualitativas permitiu identificar isolados com características funcionais relevantes para aplicação como inoculantes agrícolas. O Isolado EMM19 apresentou maior número de variáveis positivas, totalizando 10 indicadores relevantes, incluindo produção de auxinas (AIA) e elevada atividade enzimática (celulase, pectinase, quitinase), além de respostas superiores para variáveis como altura e massa seca da parte aérea do feijão e do milho. Esse perfil sugere que o isolado seja um microrganismo multifuncional, com capacidade potencial de promover melhor nutrição e atuar no biocontrole. Outro isolado que merece destaque é o RPA5, com 9 variáveis positivas, incluindo a produção simultânea das quatro enzimas (celulase, pectinase, amilase, quitinase), produção de sideróforo tipo hidroxamato, solubilização de fosfato de ferro, além de desempenho positivo em variáveis fenotípicas como altura do feijão e SPAD do milho. Esse conjunto sugere boa aptidão para atuar em solos ricos em matéria orgânica complexa. Os Isolados EMM32 e EPA20 também demonstram perfil bastante robusto, somando 9 variáveis, com destaque para a solubilização de fosfato de Araxá, produção enzimática e bom desempenho em relação ao crescimento vegetal.

6. CONCLUSÕES

Bactérias diazotróficas iridescentes fazem parte das comunidades microbianas rizosféricas e endofíticas associadas às plantas *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., sendo passíveis de isolamento e cultivo em cultura pura.

Os isolados de bactérias diazotróficas iridescentes variam quanto às características coloniais e à promoção do crescimento de plantas de feijão e de milho.

Os isolados RPA03, RPA04, RPS09 e EMM19 apresentaram melhor desempenho na promoção do crescimento do feijão. Já para o milho o isolado EPA20 foi o de maior destaque.

Os isolados obtidos variam quanto à expressão de diferentes mecanismos de promoção do crescimento vegetal *in vitro*.

Este constitui o primeiro relato do isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas iridescentes do Brasil. O conjunto de bactérias obtidas têm o potencial de utilização em bioinoculantes de interesse agrônômico.

7. REFERÊNCIAS

- AARTI, C.; KHUSRO, A.; AGASTIAN, P.; DARWISH, N.M.; FARRAJ, D.A. Molecular diversity and hydrolytic enzymes production abilities of soil bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 3235 - 3248, 2020.
- ABBAS, M.M.; ISMAEL, W.H.; MAHFOUZ, A.Y.; DAIGHAM, G.E.; ATTIA, M.S. Efficacy of endophytic bacteria as promising inducers for enhancing the immune responses in tomato plants and managing *Rhizoctonia* root-rot disease. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1331, 2024.
- ADELEKE, B.; BABALOLA, O.; GLICK, B. Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. **Rhizosphere**, v. 20, n. 100433, 2021.
- ALMEIDA, S.M.C.; OLIVEIRA, B.B.; SILVA, T.M.; SANTOS, T.M.C.; MONTALDO, Y.C.; SILVA, J.M.; Selection of non-symbiotic phosphate-solubilizing diazotrophic bacteria. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2025.
- ALVES-JÚNIOR, M.; SOUSA, F.O.; SILVA, T.F.; ALBINO, U.B.; GARCIA, M.G.; MOREIRA, S.M.C.; VIEIRA, M.R.S. Functional and morphological analysis of isolates of phylloplane and rhizoplane endophytic bacteria interacting in different cocoa production systems in the Amazon. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, N. 100039, 2021.
- ANSAR, A.P.; MANJU, S.; MIR, M.A.; KAUR, A. Gram Staining: a Brief Review. **International Journal of Research and Review**, v. 10, n. 9, p. 336–341, 2023.
- BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 451-457, 1987.
- BALOGH, B.; JONES, J.B.; IRIARTE, F.; MOMOL, M. Phage therapy for plant disease control. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, p. 48 - 57, 2010.
- BARROS, I.; SANTOS, W.M.; PACHECO, E.P.; SOUZA, H.N.; Uso do Índice SPAD para o Diagnóstico da Nutrição Nitrogenada e Recomendação de Adubação de Cobertura na Cultura do Milho Híbrido Simples AG 7088 em Argissolos dos Tabuleiros Costeiros. **Comunicado Técnico, EMBRAPA**, v. 204, 2017.
- BATISTA, B.D.; DOURADO, M.N.; FIGUEREDO, E.F.; HORTENCIO, R.O.; MARQUES, J.P.R.; PIOTTO, F.A.; BONATELLI, M.L.; SETTLES, M.L.; AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M.C. The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3869–3882, 2021.
- BATISTA, F.C. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato de ferro para incrementar o uso de fósforo em milho. Orientador: Ivanildo Evódio Marriel. 2022. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade Federal de São João Del-Rei, 2022.

- BHATTACHARYYA, C.; BANERJEE, S.; ACHARYA, U.; MITRA, A.; MALLICK, I.; HALDAR, A.; HALDAR, S.; GHOSH, A.; GHOSH, A. Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15536, 2020.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, v. 21, p. 73-85, 1974.
- CABALLERO-MELLADO J.; ONOFRE-LEMUS J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS P.; MARTÍNEZ-AGUILAR L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agricultura and bioremediation. **Applied and environmental microbiology**, v.73 p. 5308-5319, 2007.
- CAPPUCCINO, J.; SHERMAN, N. **Microbiology. A laboratory manual**. Pearson Education, ed. 12, 2014.
- CHATRAGADDA, R.; DUFOSSÉ, O. Ecological and biotechnological aspects of pigmented microbes: A way forward in development of food and pharmaceutical grade pigments. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, 2021.
- CHENG, Y.; SHI, X.; NARAYANAN, M.; Li, Z.; Li, Y. Enhancing nutrient uptake efficiency in *Zea mays*: the role of plant growth-promoting bacteria in modifying root characteristics and mobilizing soil nutrients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 105, p. 5030 - 5039, 2025.
- COMPANT, S; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669 - 678, 2010.
- CUNHA, E.S.L.; SANTOS, M.S.N.; SILVA, J.F.; MORAES, J.R.; SILVEIRA, N.M.; FERREIRA, R.O.; SOUZA, V.L.; LOPES, L.R.; LOPES, P.T.; KNIES, A.E.; ZABOT, G.L.; TRES, M.V. Agronomic and chemical performance of corn cultivars under inoculation and co-inoculation with diazotrophic bacteria. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 11765–11777, 2021.
- DAS, S.; DUTTA, S.; GHOSH, S.; MUKHERJEE, A. Chitinolytic microorganisms for biological control of plant pathogens: A comprehensive review and meta-analysis. **Crop Protection**, v. 185, n. 106888, 2024.
- DEFEZ, R.; ANDREOZZI, A.; BIANCO, C. The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 441–452, 2017.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995.
- DOUCET, S. M. e MEADOWS, M. G. Iridescence: a functional perspective. **Journal of The Royal Society. Interface**, v. 6, p. 115 - 132, 2009.

- DUARTE, A.N.M.; SOARES FILHO, C.V.; CARVALHO, C. L. M. de; TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M.; ISHIY, A.G.; VALVANO, I.M. Inoculation with plant growth-promoting bacteria and reduction of nitrogen fertilizer in herbage accumulation and nutritional value of Mavuno grass. **International Journal for Innovation Education and Research**, v. 9, n. 3, p. 16-34, 2021.
- FILIPINI, L.D.; PILATTI, F.K.; MEYER, E.; VENTURA, B.S.; LOURENZI, C.R.; LOVATO, P.E. Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1033 - 1038, 2020.
- FISCHER, H.; DE ALMEIDA, J.; LIMBERGER, C.; HARAKAVA, R.; SATO, M.; COSTA, V.; SCHOENINGER, K.; LEITE, L.; CHACON-OROZCO, J.; BALDO, F. A ascensão dos bioinsumos na agroindústria brasileira: tendências, casos e obstáculos. **Outlooks on Pest Management**, v. 34, n. 3, 2023.
- FRAMPTON, R.A; TAYLOR, C; MORENO, A.V.H; VISNOVSKY, S.B.; PETTY, N.K.; PITMAN, A.R.; FINERAN, P.C. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, p. 2216 - 2228, 2014.
- GLICK B.R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, n. 963401, p. 1-15, 2012.
- GLICK, B.R. **Biocontrol mechanisms**. In: Beneficial plant-bacterial interactions. Springer, New York, ed. 1, p. 123 - 157, 2015.
- GUILLOT M. Relação entre certas propriedades ópticas de bactérias e sua forma geométrica verdadeira. Difração da luz pelas culturas e simetria da bactéria. **CR Hebd. Sessões Acadêmicas Ciência**. p. 1100–1103. 1941.
- HELLIWELL, J.R. STURROCK, C.J.; MAIRHOFER, S.; CRAIGON, J.; ASHTON, R.W.; MILLER, A.J.; WHALLEY, W.R.; MOONEY, S.J. The emergent rhizosphere: imaging the development of the porous architecture at the root-soil interface. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- HITHA, P. K.; GIRIJA, D. Isolation and screening of native microbial isolates for pectinase activity. **International Journal of Science and Research**. v. 61, p. e18160653, 2014.
- HUSSAIN, A.; ADNAN, M.; HAJIRA; IQBAL, S.; FAHAD, S.; SAEED, M.; MIAN, I.A.; MUHAMMAD, M.W.; ROMMAN, M.; PERVEEZ, R.; WAHID, F.; SUBHAN, F.; RAZA, M.A.; ZAMIN, M.; ULLAH, F.; REHMAN, K.; ANDALEEB, S. Combining phosphorus (P) with phosphate solubilizing bacteria (PSB) improved wheat yield and P uptake in alkaline soil. **Pure and Applied Biology**, v. 8, n. 2, 2019.
- IQBAL, Z. Ahmad, M.; Raza, M.A.; Hilger, T.; Rasche, F. Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. modulate soil exoenzyme activities and improve wheat growth. **Microbial ecology**, v. 87, n. 31, 2024.

- JACOBS, M.; LOPEZ-GARCIA, M.; PHRATHEP, O.; LAWSON, T.; OULTON, R.; WHITNEY, H.M. Photonic multilayer structure of Begonia chloroplasts enhances photosynthetic efficiency. **Nature Plants**, v. 2, n. 16162, 2016.
- JILLING, A. KEILUWEIT, M.; GUTKNECHT, J.L.; GRANDY, A.S.; Priming mechanisms providing plants and microbes access to mineral-associated organic matter. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 158, n. 108265 p. 108265–108265, 2021.
- JOSHI, B.; DHINGANI, R. Assessment and selection of multi-trait plant growth promoting bacteria associated with rice rhizosphere. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 942–948, 2020.
- KESWANI, C.; SINGH S.P.; CUETO, L.; GARCÍA-ESTRADA C.; MEZAACHE-AICHOOR S.; GLARE T.R.; BORRIS, R.; SINGH, S.P.; BLÁZQUEZ, M.A.; SANSINENA, E.; Auxins of microbial origin and their use in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8549 - 8565, 2020.
- KIENTZ, B.; VUKUSIC, P.; LUKE, S.; ROSENFELD, E. Iridescence of a Marine Bacterium and Classification of Prokaryotic Structural Colors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 7. 2012.
- KIENTZ, B.; LUKE, S.; VUKUSIC, P.; A unique self-organization of bacterial sub-communities creates iridescence in *Cellulophaga lytica* colony biofilms. **Scientific Reports**, v. 6, n. 19906, 2016.
- KISHORE, N.; PINDI, P.K.; RAM, R.S. Phosphate-solubilizing microorganisms: A critical review. **Springer eBooks**, p. 307 - 333, 2015.
- KOLLE, M. Structural colours in nature. In: Kolle, M. Photonic structures inspired by nature. **Springer Theses**, p. 29 - 56, 2011.
- KULKOVA, I.; DOBRZYŃSKI, J.; KOWALCZYK, P.; BEŁŻECKI, G.; KRAMKOWSKI, K. Plant growth promotion using *Bacillus cereus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, 2023.
- LADHA, J.K.; PEOPLES, M.B.; REDDY, P.M.; BISWAS, J.C.; BENNETT, A.; JAT, M.L.; KRUPNIK, T.J. Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. **Field Crops Research**, v. 283, 2022.
- LI, M.; GUO, R.; YU, F.; CHEN, X.; ZHAO, H.; LI, H.; WU, J. Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 443, 2018.
- LOPES, M.; DIAS-FILHO, M.; GURGEL, E. Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors. **Frontiers**, v. 5, 2021.
- MAHMUD, K.; MAKAJU, S.; IBRAHIM, R.; MISSAOUI, A. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 97, 2020.
- MARTINS, J.T.; BUZO, F.S.; GARÉ, L.M.; GARCIA, N.F. S.; SALES, L.Z.S.; DO NASCIMENTO, M.V.L.; SANTOS, N.C.B.; SABBAG, O.J.; ARF, O.

- Diazotrophic bacteria increase yield and profitability in organic cultivation of common bean. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 28, n. 2, 2024.
- MENDES, G.O.; DYER, T.; CSETENYI, L.A.; GADD, G. M.I. Rock phosphate solubilization by abiotic and fungal-produced oxalic acid: reaction parameters and bioleaching potential. **Microbial Biotechnology (Online)**, v. 15, n. 4, p. 1751-7915, 2021.
- MENDES, G.O.; FREITAS, A.L.M.; PEREIRA, O.L.; VASSILEV, N.B.; COSTA, M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, 2013.
- MENDES, G.O.; MURTA, H.M.; VALADARES, R.V.; SILVEIRA, W.B.; SILVA, I.R.; COSTA, M.D. Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. **Minerals Engineering**, v. 155, 2020.
- MENDES, G.O.; ZAFRA, D.L.; VASSILEV, N.B.; SILVA, I.R.; RIBEIRO JUNIOR, J.I.; COSTA, M.D. Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. **Applied and Environmental Microbiology (Print)**, p. 3081-3085, 2014.
- MORFFY, N.; STRADER, L.C. Old town roads: routes of auxin biosynthesis across kingdoms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 21 - 27, 2020.
- MUNDIM, G.S M.; MACIEL, G.M.; MENDES, G.O. *Aspergillus niger* as a biological input for improving vegetable seedling production. **Microorganisms**, v. 10, p. 674, 2022.
- NASCIMENTO, J.M.D.; VIEIRA NETTO, J.A.F.; VALADARES, R.V.; MENDES, G.D.O.; SILVA, I.R.D.; VERGÜTZ, L.; COSTA, M.D. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 156, 2021.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.
- OLEŃSKA, E.; MAŁEK, W.; WÓJCIK, M.; ŚWIĘCICKA, I.; THIJS, S., e VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **The Science of the total environment**, v. 743, 2020.
- PATEL, D.; PATEL, A.; VORA, D.; MENON, S.; VADAKAN, S.; ACHARYA, D.; GOSWAMI, D. A resourceful methodology to profile indolic auxins produced by rhizofungi using spectrophotometry and HPTLC. **3 Biotech**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2018.
- PATEL, J.K.; AGRAWAL, R.; SIDHDHAPARA, R. Root associated bacterial endophytes from *Poaceae* plants: identification, characterization and plant growth promotion. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 10, n. 3, p. 478 - 483, 2020.

- PATEL, J. K.; ARCHANA, G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from *Poaceae* plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. **Plant and Soil**, v. 417, p. 99 - 116, 2017.
- PHUKAN, J.; DEKA, J.; KURMI, K.; KALITA, S. deleterious rhizobacteria as a potential bioherbicide - a review. **International Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 8, n. 2, p. 1–5, 2021.
- RAWAT, P.; DAS, S.; SHANKHDHAR, D.; SHANKHDHAR, E.S.C. Phosphate-solubilizing microorganisms: Mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, 2020.
- RAWAT, P.; DAS, S.; SHANKHDHAR, D.; SHANKHDHAR, S.C. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49–68, 2021.
- RIBEIRO, N.V.S.; VIDAL, M.S.; BAIROS, S.C.L.; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and growth promoting characteristics of diazotrophic bacteria isolated from 20 genotypes of *Brachiaria* spp. **Plant and Soil**, v. 451, p. 187 - 205, 2020.
- RINGEL, M. T.; BRÜSER, T. The biosynthesis of pyoverdines. **Microbial Cell**, v. 5, n. 10, p. 424 - 437, 2018.
- RODRIGUES, G.L. ; MATTEOLI, F.P. ; GAZARA, R.K. ; RODRIGUES, P.S. ; DOS SANTOS, S.T. ; PEDROSA-SILVA, F. ; OLIVEIRA-PINHEIRO, I. ; CANEDO-ALVARENGA, D. ; OLIVARES, F.L. ; VENANCIO, T.M. Characterization of cellular, biochemical and genomic features of the diazotrophic plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* sp. UENF-412522, a novel member of the *Azospirillum* genus. **Microbiological Research**, v. 254, 2021.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 155-161, 2000.
- SAKIYAMA, C.C.H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. 2001. 72f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- SANDIKAR, B. M. Hydrogen cyanide in *Pseudomonas* antifungal activity against *Pythium*, *Fusarium*. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, 2018.
- SANTOYO, G.; GUZMAN-GUZMAN, P.; PARRA-COTA, F.I.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; GLICK, B.R. Plant growth stimulation by microbial consortia. **Agronomy**, v. 11, n. 219. 2021.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análise química em plantas**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56p. 1974.

- SAXENA, A.K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D.J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1583 - 1594, 2020.
- SCHERTEL, L.; KERKHOF, G.T.V.; JACUCCI, G.; CATÓN, L.; OGAWA, Y.; WILTS, B.D.; INGHAM, C.J.; VIGNOLI, S.; JOHANSEN, V.E. Complex photonic response reveals three-dimensional self-organization of structural coloured bacterial colonies. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 17, n. 177, 2020.
- SEAGO, A.E.; BRADY, P.; VIGNERON, J.P.; SCHULTZ, T.D. Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural colour mechanisms in beetles (Coleoptera). **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. 165 - 184, 2008.
- SHAMEEM, R.M.; SONALI, M.I.J.; KUMAR, P.S.; RANGASAMY, G.; GAYATHRI, K.V.; PARTHASARATHY, V. *Rhizobium mayense* sp. Nov., an efficient plant growth-promoting nitrogen-fixing bacteria isolated from rhizosphere soil. **Environmental Research**, v. 220, p. 115200, 2023.
- SHAWKEY, M.D.; MOREHOUSE, N.I.; VUKUSIC, P. A protean palette: colour materials and mixing in birds and butterflies. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. 221 - 231, 2009.
- SILVA, T. R.; CANELA-GARAYOA, R.; ERAS, J.; RODRIGUES, M.V.N.; DOS SANTOS, F.N.; EBERLIN, M.N. Pigments in an iridescent bacterium, *Cellulophaga fucicola*, isolated from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, p. 479 - 490, 2019.
- SILVA, U.C.; MENDES, G.O.; SILVA, N.M.R.M.; DUARTE, J.L.; SILVA, I.R.; TÓTOLA, M.R; COSTA, M. D. Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. **Plos One**, v. 9, 2014.
- SOUMARE, A.; DIEDHIOU, A.G.; THUITA, M.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOUISNI, L. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. **Plants, Basel**, v. 9, n. 1011, 2020.
- SULLIVAN, C. J. SULLIVAN, C.J.; BROWN, K.; HUNG, C., TANG, J.K.; DESIMONE, M.; CHEN, V.; LLOYD, P.F.; GUPTA, M.; JUHL, A.; VASUDEV, M.; DENNIS, P.B. Iridescent biofilms of *Cellulophaga lytica* are tunable platforms for scalable, ordered materials. **Scientific Reports**, v. 13, n. 13192, 2023.
- SULLIVAN, C.J.; BROWN, K.; HUNG, C.; TANG, J.K.; DESIMONE, M.; CHEN, V.; LLOYD, P.F.; GUPTA, M.; JUHL, A.; VASUDEV, M.; DENNIS, P.B. Iridescent biofilms of *Cellulophaga lytica* are tunable platforms for scalable, ordered materials. **Scientific Reports**, v. 13, n. 13192, 2023.
- SUN, J.; BHUSHAN, B. e TONG, J. Structural coloration in nature. **The Royal Society of Chemistry**, p. 14862 - 14889, 2013.
- SUZAKI, T.; TAKEDA, N.; NISHIDA, H.; HOSHINO, M.; ITO, M.; MISAWA, F.; HANDA, Y.; MIURA, K.; KAWAGUCHI, M. Correction: Lack of symbiont accommodation controls intracellular symbiont accommodation in root nodule and arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 1, 2019.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. ArtMed, ed. 6, 2017.
- TENG, Z.; CHEN, Z.; ZHANG, Q.; YAO, Y.; SONG, M.; LI, M. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 33, p. 33976 - 33987, 2019.
- TINDALL, B. J.; SIKORSKI, J.; SMIBERT, R. A.; KRIEG, N. R. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: **Methods for General and Molecular Microbiology**, American Society of Microbiology, ed. 3, p. 330-393, 2007.
- VASQUES, N. C.; CEREZINI, P.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Produção de sideróforos por bactérias promotoras do crescimento de plantas *in vitro*. Encontro internacional de produção científica da UNICESUMAR, 2021.
- VISCA, P.; IMPERI, F.; LAMONT, I.L. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. **Trends Microbiol.** v. 15, p. 22 - 30, 2007.
- WAGI, S.; AHMED, A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. **PeerJ**, v. 7, 2019.
- WANG, P.; ZHANG, H.; HU, X.; XU, L.; AN, X.; JIN, T.; MA, R. Comparing the potential of silicon nanoparticles and conventional silicon for salinity stress alleviation in soybean (*Glycine max* L.): Growth and physiological traits and rhizosphere/endophytic bacterial communities. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 72, n. 19, 2024.
- WANG, Y.; SHI, P.; QIAN, Y.; CHEN, G.; XIE, J.; GUAN, X.; SHI, W.; XIANG, H. Enhancing nitrogen nutrition index estimation in rice using multi-leaf SPAD values and machine learning approaches. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 2024.
- XIE, Z.; YU, Z.; LI, Y.; WANG, G. H.; TANG, C.; MATHESIUS, U.; LIU, X.; LIU, J.; LIU, J.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; HERBERT, S. J.; WU, J.; JIN, J. Rhizosphere-induced shift in the composition of bacterial community favors mineralization of crop residue nitrogen. **Plant and Soil**, v. 502, p. 135-148, 2023.
- YANO, D.M.Y.; FARRIS, M.G.; UMINO, C.Y. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1993.
- ZHOU, Y.; STAVER, C.A. Enhanced activity of soil nutrient-releasing enzymes after plant invasion: a meta-analysis. **Ecology**, v. 100, n. 11, 2019.
- ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **Science of The Total Environment**, v. 612, p. 522–537, 2018.
- ZOMER, A.; INGHAM, C.J.; VON MEIJENFELDT, F.A.; ESCOBAR DONCEL, Á.T.G.; HAMIDJAJA, R.; SCHOUTEN, S.; SCHERTEL, L.; MÜLLER, K.H.; CATÓN, L.; HAHNKE, R.L.; BOLHUIS, H.; VIGNOLINI, S.; DUTILH, B.E. Structural color in

the bacterial domain: The ecogenomics of a 2-dimensional optical phenotype.
Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 121, n. 29, 2024.

8. ANEXOS

Anexo 1. Índice SPAD, altura, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), massa seca total (MST) e relação parte aérea/raízes (RPA/R) de plantas de milho (*Zea mays* L. cv UFVM100), inoculadas com isolados de bactérias iridescentes e cultivadas em casa de vegetação por 35 dias.

Isolados	SPAD	Altura (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	RPA/R
RPA01	40,87 B	22,5 C	6,16 A	1,57 C	7,8 B	0,25 B
RPA02	41,32 B	22,17 C	5,12 C	1,43 C	6,55 D	0,28 B
RPA03	41,03 B	23,77 B	5,94 B	1,49 C	7,61 C	0,25 B
RPA04	42,98 A	23 B	5,46 C	1,82 B	7,48 C	0,34 A
RPA05	41,93 A	23 B	5,52 C	1,73 B	6,9 D	0,32 A
RPA06	36,65 C	24,33 A	6,15 A	1,66 B	7,82 B	0,27 B
RPS07	42,68 A	24 B	5,02 C	1,64 B	6,52 D	0,33 A
RPS08	33,96 D	20,94 D	5,33 C	1,73 B	7,05 C	0,33 A
RPS09	40,76 B	19,94 E	3,88 E	1,12 D	5 F	0,29 B
RPS10	39,77 B	22,61 C	4,97 C	1,65 B	6,5 D	0,34 A
RPR11	37,4 C	22,4 C	5,1 C	1,63 B	6,53 D	0,32 A
RPR12	41,88 A	25 A	5,71 B	1,52 C	7,4 C	0,27 B
RPR13	41,27 B	23,33 B	5,22 C	1,96 A	7,09 C	0,38 A
RPR14	37,37 C	22 C	5,2 C	1,66 B	6,85 D	0,32 A
EPS15	34,62 D	21,5 D	4,58 D	1,62 B	6,01 E	0,35 A
EPS16	41,23 B	25,67 A	5,04 C	1,79 B	6,64 D	0,36 A
EPS17	39,82 B	25,23 A	5,05 C	1,72 B	6,92 D	0,34 A
EMM18	39,08 B	24,08 B	5,64 B	1,64 B	7,31 C	0,29 B
EMM19	41,08 B	21,33 D	6,25 A	1,7 B	7,9 B	0,27 B
EPA20	40,88 B	24,67 A	6,48 A	2,24 A	8,62 A	0,35 A
EPA21	43,48 A	24,58 A	5,52 C	1,46 C	6,68 D	0,27 B
EPA22	42,95 A	21,67 D	4,9 C	1,87 B	6,72 D	0,39 A
EPA23	41,23 B	23,67 B	4,96 C	1,52 C	6,53 D	0,31 B
EPA24	41,92 A	22,84 C	4,97 C	1,31 D	6,28 D	0,26 B
EPA25	40,82 B	21,63 D	4,96 C	1,5 C	6,52 D	0,3 B
RPR26	41,66 A	23,33 B	3,9 E	1,37 D	5,28 F	0,35 A
RPR27	40,33 B	21,59 D	4,4 D	1,29 D	5,69 E	0,29 B
RPR28	42,58 A	23,2 B	4,64 D	1,67 B	6,31 D	0,37 A
RPR29	42,65 A	23,25 B	5,79 B	1,81 B	7,29 C	0,31 A
EMM30	41,9 A	21,4 D	4,67 D	1,36 D	6,04 E	0,29 B
EMM31	39,44 B	22,25 C	5,14 C	1,73 B	6,8 D	0,34 A
EMM32	41,33 B	23,69 B	6,52 A	1,6 B	8,29 A	0,25 B
EMM33	40,26 B	22,58 C	6,78 A	1,71 B	8,58 A	0,25 B
EMM34	39,93 B	20,83 D	6,14 A	1,6 B	7,49 C	0,26 B
EMM35	41,78 A	23,67 B	4,73 D	1,36 D	6,2 D	0,29 B

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.). (Continua)

Anexo 1. (Continuação) Índice SPAD, altura, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), massa seca total (MST) e relação parte aérea/raízes (RPA/R) de plantas de milho (*Zea mays* L. cv UFVM100), inoculadas com isolados de bactérias iridescentes e cultivadas em casa de vegetação, por 35 dias.

Isolados	SPAD	Altura (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	RPA/R
RMM36	36,89 C	24,33 A	5,45 C	1,57 C	6,97 D	0,29 B
RMM37	36,5 C	22,67 C	5,17 C	1,45 C	6,71 D	0,28 B
RMM38	36,42 C	22,67 C	5,34 C	1,69 B	7,02 C	0,32 A
RPA39	37,28 C	24,5 A	6,42 A	1,75 B	7,77 B	0,27 B
RPA40	35,1 D	19,42 E	5,41 C	1,82 B	7,15 C	0,34 A
RPA41	33,85 D	22,13 C	5,3 C	1,76 B	7,16 C	0,33 A
RPA42	35,66 D	23,08 B	5,54 C	1,72 B	7,25 C	0,32 A
RPA43	34,43 D	22,63 C	6,37 A	2,09 A	8,47 A	0,33 A
Controle	38,13 C	21,42 D	5,6 B	1,45 C	7,16 C	0,26 B
CV (%)	3,83	4,22	7,73	9,22	7,39	11,2

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.).

Anexo 2. Índice SPAD, altura, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), massa seca total (MST) e relação parte aérea/raízes (RPA/R) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. BRS Marte), inoculadas com isolados de bactérias iridescentes e cultivadas em casa de vegetação por 35 dias.

Isolados	SPAD	Altura (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	RPA/R
RPA01	36,3 B	35,65 A	7,41 A	1,58 C	8,99 B	0,21 C
RPA02	32,63 D	33,58 B	7,32 B	1,66 C	8,94 B	0,23 C
RPA03	33,6 C	36,08 A	8,54 A	1,89 B	9,95 A	0,23 C
RPA04	36,03 B	38,08 A	7,88 A	2,19 A	10,51 A	0,28 B
RPA05	35,01 C	37,25 A	6,96 B	1,66 C	8,65 C	0,24 C
RPA06	36,94 B	33,25 B	7,96 A	1,84 B	9,9 A	0,23 C
RPS07	30,82 E	24,5 E	4,33 E	1,48 D	5,77 E	0,34 A
RPS08	37,63 B	33,38 B	6,48 B	1,54 D	8,36 C	0,24 C
RPS09	35,94 B	36,93 A	7,85 A	1,89 B	10,41 A	0,24 C
RPS10	34,98 C	34,96 A	6,24 C	1,59 C	7,83 C	0,26 B
RPR11	36,9 B	33,4 B	7,89 A	1,69 C	9,58 B	0,22 C
RPR12	38,5 B	31,92 B	7,7 A	1,46 D	10,31 A	0,19 C
RPR13	37,26 B	31,44 B	6,75 B	1,36 D	8,05 C	0,2 C
RPR14	40,43 A	34,47 B	7,89 A	1,44 D	9,52 B	0,18 C
EPS15	32,17 D	33,11 B	8,04 A	2,17 A	10,21 A	0,27 B

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.). (Continua)

Anexo 2. (Continuação) Índice SPAD, altura, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), massa seca total (MST) e relação parte aérea/raízes (RPA/R) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. BRS Marte), inoculadas com isolados de bactérias iridescentes e cultivadas em casa de vegetação por 35 dias.

Isolados	SPAD	Altura (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	RPA/R
EPS16	40,8 A	36,92 A	6,69 B	1,3 D	7,84 C	0,2 C
EPS17	39,43 A	24,69 E	5,28 D	1,48 D	6,83 D	0,28 B
EMM18	37,64 B	27,17 D	6,28 C	1,67 C	7,95 C	0,27 B
EMM19	34,77 C	38 A	8,26 A	1,84 B	10,1 A	0,22 C
EPA20	39,14 A	30,6 C	7,32 B	1,58 C	8,64 C	0,22 C
EPA21	35,52 B	33,5 B	8 A	1,72 C	9,54 B	0,21 C
EPA22	34,59 C	36,92 A	7,44 A	1,94 B	9,13 B	0,26 B
EPA23	35,85 B	30,69 C	7,1 B	1,86 B	8,95 B	0,26 B
EPA24	39,87 A	30 C	5,74 D	1,47 D	7,21 D	0,26 B
EPA25	26,97 F	26 D	4,46 E	1,56 D	6,25 E	0,35 A
RPR26	35,06 C	31,69 B	6,54 B	1,75 C	8,35 C	0,27 B
RPR27	40,47 A	32 B	7,01 B	1,97 B	9,13 B	0,28 B
RPR28	37,78 B	29,17 C	6,07 C	1,73 C	8,36 C	0,29 B
RPR29	37,43 B	27,5 D	6,68 B	1,91 B	8,32 C	0,29 B
EMM30	35,63 B	37 A	7,75 A	1,96 B	9,59 B	0,25 B
EMM31	41,35 A	27,25 D	6,35 C	1,47 D	7,61 C	0,23 C
EMM32	41,21 A	29,83 C	7,09 B	1,51 D	8,16 C	0,21 C
EMM33	37,64 B	29,25 C	6,76 B	1,74 C	8,24 C	0,26 B
EMM34	34,28 C	26,5 D	5,47 D	1,48 D	7,06 D	0,27 B
EMM35	36,87 B	28,17 C	6,63 B	2,25 A	8,63 C	0,34 A
RMM36	32,58 D	27 D	5,74 D	2,1 A	8,03 C	0,37 A
RMM37	30,46 E	27,33 D	5,71 D	1,94 B	7,67 C	0,34 A
RMM38	34,33 C	29,42 C	6,55 B	2,04 A	8,5 C	0,31 A
RPA39	34,33 C	29,5 C	6,82 B	1,84 B	8,09 C	0,27 B
RPA40	37 B	26,63 D	5,85 D	1,6 C	8,2 C	0,28 B
RPA41	34,26 C	24,93 E	5,5 D	1,76 C	6,82 D	0,32 A
RPA42	30 E	27,96 C	5,96 C	2,08 A	8,11 C	0,35 A
RPA43	31,23 E	27,37 D	4,78 E	1,75 C	6,83 D	0,37 A
Controle	27,98 F	25,22 E	5,43 D	2,04 A	7,55 C	0,38 A
CV (%)	4,09	5,72	6,6	9,58	6,42	12,14

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.).

Anexo 3. Produção de ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-bútrico e amônio (NH_4^+) por isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., cultivadas em meio TSA suplementado com triptofano por 96 h, a 28°C e 150 rpm. Para o teste de auxinas e cultivadas em meio contendo peptona bacteriológica (1%) e cloreto de sódio (0,5%) por 48 horas a 28°C e 150 rpm para a avaliação de produção de amônio.

Isolados	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	AIB $\mu\text{g mL}^{-1}$	NH_4^+ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Isolados	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	AIB $\mu\text{g mL}^{-1}$	NH_4^+ $\mu\text{g mL}^{-1}$
RPA01	140,52 C	307,72 E	0,58 f	EPA23	148,44 C	469,44 B	0,96 d
RPA02	10,45 E	23,18 I	0,63 f	EPA24	146,56 C	476,23 B	0,79 e
RPA03	33,7 D	204,87 F	0,83 e	EPA25	218,02 A	433,64 C	0,92 d
RPA04	215,1 A	404,63 C	0,83 e	RPR26	35,85 D	225,46 F	0,95 d
RPA05	18,03 E	54,97 H	1,01 d	RPR27	130,73 C	376,85 D	1,02 d
RPA06	194,9 B	363,27 D	1,01 d	RPR28	43,05 D	279,58 E	1 d
RPS07	231,15 A	433,02 C	1,08 d	RPR29	1,12 E	1,62 I	0,84 e
RPS08	21,2 E	66,64 H	1,18 c	EMM30	56,45 D	165,66 G	0,96 d
RPS09	32,49 D	128,24 G	1,79 a	EMM31	191,98 B	348,46 D	1,05 d
RPS10	18,78 E	57,5 H	1,22 c	EMM32	1,5 E	4,43 I	1,01 d
RPR11	11,72 E	30,77 I	1,07 d	EMM33	38,22 D	236,54 F	1,12 c
RPR12	2,17 E	2,77 I	1,05 d	EMM34	44,37 D	258,5 F	1,08 d
RPR13	44,71 D	284,19 E	0,88 e	EMM35	2,84 E	8,8 I	1,18 c
RPR14	41,04 D	248,6 F	1,22 c	RMM36	67,6 D	141,67 G	1,09 d
EPS15	38,51 D	220,17 F	1,55 b	RMM37	38,39 D	114,85 H	1,03 d
EPS16	8,22 E	21,51 I	0,79 e	RMM38	34,51 D	88,8 H	1,16 c
EPS17	228,65 A	761,42 A	0,81 e	RPA39	160,52 C	505,86 B	1 d
EMM18	38,49 D	276,24 E	0,78 e	RPA40	9,51 E	26,45 I	1,33 c
EMM19	226,77 A	431,79 C	0,85 e	RPA41	219,48 A	415,74 C	1,23 c
EPA20	202,6 B	744,14 A	0,97 d	RPA42	1,03 E	1,57 I	0,96 d
EPA21	7,51 E	25,22 I	1,12 c	RPA43	14,15 E	37,56 I	1,22 c
EPA22	147,81 C	478,09 B	0,83 e	CV%	17,04	17,39	11,84

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.).

Anexo 4. Solubilização de fosfato de tricálcico, Araxá e ferro por isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., cultivadas em meio NBRIP por 7 dias a 28°C e 150 rpm.

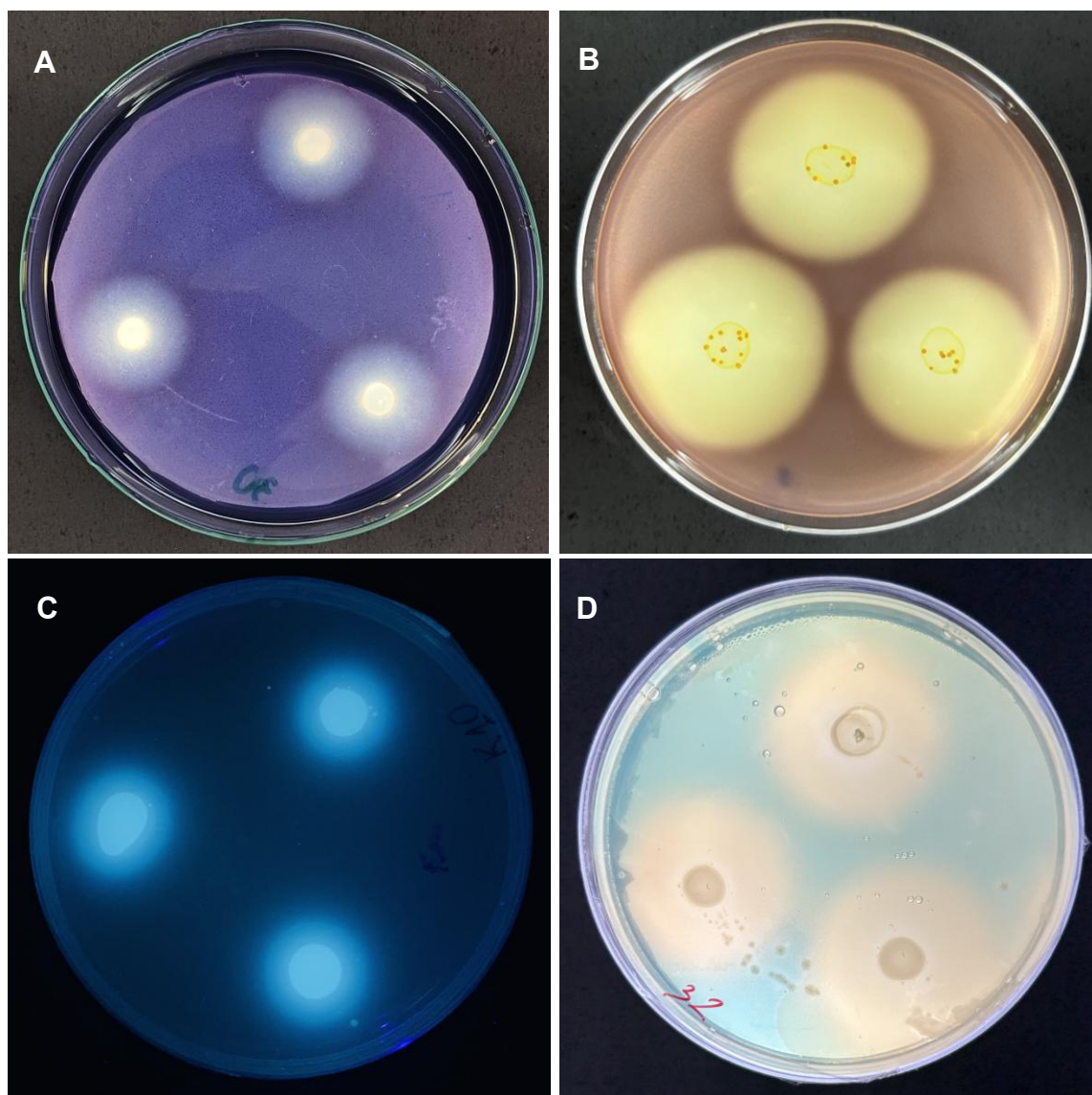
Isolados	Fosfato de tricálcico		Fosfato de Araxá		Fosfato de ferro	
	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%
RPA01	36,58 I	3,66	6,5 G	0,93	26,76 D	3,23
RPA02	31,57 I	3,16	6,82 G	0,98	20,78 D	2,51
RPA03	137,11 F	13,73	21,05 E	3,01	39,17 B	4,73
RPA04	51,25 H	5,13	17,43 E	2,50	39,88 B	4,81
RPA05	36,08 I	3,61	10,26 F	1,47	48,68 A	5,87
RPA06	53 H	5,31	9,86 F	1,41	32,52 C	3,92
RPS07	93,47 G	9,36	12,08 F	1,73	24,72 D	2,98
RPS08	223,05 D	22,34	54,95 A	7,87	25,33 D	3,06
RPS09	38,34 I	3,84	0,12 H	0,02	29,59 C	3,57
RPS10	176,18 E	17,64	10,68 F	1,53	39,17 B	4,73
RPR11	384,2 A	38,47	40,8 B	5,84	47,18 A	5,69
RPR12	17,12 I	1,71	13,28 F	1,90	28,2 D	3,40
RPR13	118,81 F	11,90	0,03 H	0,00	38 B	4,58
RPR14	365,39 A	36,59	12,3 F	1,76	43,42 A	5,24
EPS15	144,01 F	14,42	1,38 H	0,20	39,57 B	4,77
EPS16	26,4 I	2,64	13,37 F	1,91	37,45 B	4,52
EPS17	201,18 D	20,15	26,24 D	3,76	26,37 D	3,18
EMM18	207,55 D	20,78	27,79 D	3,98	26,84 D	3,24
EMM19	65,78 H	6,59	17,37 E	2,49	28,42 D	3,43
EPA20	50,12 H	5,02	21,51 E	3,08	33,35 C	4,02
EPA21	49,74 H	4,98	26,6 D	3,81	30,56 C	3,69
EPA22	46,73 H	4,68	7,54 G	1,08	29,85 C	3,60
EPA23	54,13 H	5,42	15,2 F	2,18	31,96 C	3,86
EPA24	39,59 I	3,96	9,66 F	1,38	31,3 C	3,78
EPA25	48,49 H	4,86	10,36 F	1,48	25,76 D	3,11
RPR26	162,98 E	16,32	52,05 A	7,45	22,09 D	2,67
RPR27	64,03 H	6,41	21,62 E	3,10	33,41 C	4,03
RPR28	122,79 F	12,30	41,98 B	6,01	25,92 D	3,13
RPR29	58,32 H	5,84	15,36 F	2,20	32,8 C	3,96
EMM30	60,84 H	6,09	58,18 A	8,33	40,82 B	4,93
EMM31	59,52 H	5,96	12,12 F	1,74	25,36 D	3,06
EMM32	249,74 C	25,01	52,07 A	7,45	28,28 D	3,41
EMM33	167,22 E	16,75	26,28 D	3,76	27,62 D	3,33
EMM34	336,21 B	33,67	44,43 B	6,36	39,69 B	4,79
EMM35	246,86 C	24,72	47,6 A	6,81	25,78 D	3,11

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.). (Continua)

Anexo 4. (Continuação) Solubilização de fosfato de tricálcico, Araxá e ferro por isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L., cultivadas em meio NBRIP por 7 dias a 28°C e 150 rpm.

Isolados	Fosfato de tricálcico		Fosfato de Araxá		Fosfato de ferro	
	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%
RMM36	9,77 I	0,98	13,92 F	1,99	42,85 A	5,17
RMM37	87,46 G	8,76	20,85 E	2,98	44,02 A	5,31
RMM38	151,24 F	15,15	33,07 C	4,73	34,24 C	4,13
RPA39	80,94 H	8,11	49,54 A	7,09	46,45 A	5,60
RPA40	61,27 H	6,14	27,50 D	3,94	26,39 D	3,18
RPA41	61,02 H	6,11	26,99 D	3,86	26,36 D	3,18
RPA42	317,03 B	31,75	54,82 A	7,85	26,73 D	3,23
RPA43	63,9 H	6,40	26,59 D	3,81	23,82 D	2,87
CV (%)	17,38		17,85		12,57	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RPA (Rizosfera de *P. aurea* L.), RPS (Rizosfera de *P. setaceum* L.), RPR (Rizosfera de *P. setaceum rubrum* L.), RMM (Rizosfera de *M. minutiflora* L.), EPS (Endofítico de *P. setaceum* L.), EMM (Endofítico de *M. minutiflora* L.), EPA (Endofítico de *P. aurea* L.).



Anexo 5. Placas indicando resultados positivos para os testes de amilase (A), quitinase (B), pioverdinas (C) e sideróforos (D). Para isolados rizosféricos e endofíticos obtidos das espécies *Phyllostachys aurea* L., *Pennisetum setaceum* L., *Pennisetum setaceum rubrum* L. e *Melinis minutiflora* L.