

MILLENA SALLES ARAÚJO

**ESTUDOS PARA O MELHORAMENTO DE UM CONSÓRCIO MICROBIANO  
COM POTENCIAL BIOESTIMULANTE EM MUDAS DE *EUCALYPTUS***



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
MARÇO/2021

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Caio Tavora Rachid Coelho da Costa e co-orientação do Doutor Eduardo da Silva Fonseca.**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

A663e Araújo, Millena Salles Estudos para o  
melhoramento de um consórcio com potencial  
bioestimulante em mudas de Eucalyptus /  
Millena Salles Araújo. -- Rio de Janeiro,  
2021.  
91 f.

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa.

Coorientador: Eduardo da Silva Fonseca.

Trabalho de conclusão de curso (graduação)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Instituto de Microbiologia, Bacharel em  
Ciências Biológicas: Microbiologia e  
Imunologia, 2021.

1. Florestas Plantadas. 2. Eucalyptus. 3.  
Bactérias endofíticas. 4. Consórcio. 5.  
Bioestimulante. I. da Costa, Caio Tavora Rachid  
Coelho , orient. II. Fonseca, Eduardo da Silva,  
coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Millena Salles Araújo**  
DRE: 118090311

BANCA EXAMINADORA: Profa. Lucy Seldin (Presidente)  
Profa. Laís Feitosa Machado  
Profa. Fernanda de Ávila Abreu

Título da Monografia: “**Estudos para o melhoramento de um consórcio com potencial bioestimulante em mudas de *Eucalyptus***”

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/fth-pjdi-eun>  
Data e hora de início: **19 de março de 2021 às 09:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,7 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 19 de .março de 2021.

NOTA

8,5  
\_\_\_\_\_  
9,0  
8,5

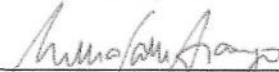
Banca Examinadora:

Profa. Lucy Seldin  
Profa. Deborah Catharine de Assis Leite  
Profa. Laís Feitosa Machado  
Profa. Fernanda de Ávila Abreu


Presidente da banca

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Lucy Seldin


Aluno:

  
\_\_\_\_\_  
Millena Salles Araújo

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa / Coorientador: Dr. Eduardo da Silva Fonseca

Coordenador  
de TCC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Queria agradecer imensamente à banca examinadora pela disponibilidade e por aceitarem contribuir com esse trabalho. Sou muito grata por ter uma banca formada por mulheres tão fortes e importantes.

À minha família e parentes que me auxiliaram em todo o percurso até aqui. Ao meu pai Dioracy por comemorar comigo minhas vitórias e me acolher nas derrotas, a minha mãe Rosana pela ajuda e suporte e aos meus irmãos Kayky e Kamilly. À minha vizinha Rosa que sempre fez de tudo ao seu alcance para me ajudar no que eu necessitasse. Aos meus tios, padrinhos, primos e familiares que sempre fizeram questão de expressar o orgulho que sentiam por mim a cada vitória, meu muito obrigada.

Poderia ficar dias agradecendo a minha tia Cecília e minha prima Luana por me acolherem desde o começo da faculdade e mesmo assim não seria o suficiente para expressar toda minha gratidão. Obrigada por todo carinho, zelo, atenção, lanches, pizza, japonês, açaí, séries, filmes, conversas, orações e todos os momentos juntas que passamos. Minha família é composta por mulheres fortes e vocês me fazem ter mais certeza disso todos os dias.

Não poderia deixar de agradecer por cada professor que passou pela minha vida. Cada um foi fundamental para minha formação profissional e pessoal, do fundamental até o ensino superior. A minha eterna professora Daniele Siqueira que SEMPRE apoiou as minhas escolhas e decisões, meu imenso obrigada. Gostaria de agradecer também a grande parte dos docentes do IMPG pela assistência prestada e pelos conhecimentos compartilhados.

Obrigada a todos os meus amigos da vida que me proporcionaram momentos incríveis e inesquecíveis: Julia Motta, Lara Sanabio, Victória Coutinho, Beatriz Jesus, Ana Paula, Renata Marques, Victória Cecília, Thuany Patrício, Luís Fernando, Milena Melucci, Maria Heloisa e outros mais, até porque sou uma pessoa tagarela.

Aos amigos que o Instituto de Microbiologia me deu, principalmente todos os componentes do grupo AMACROS, Juliana, Giovanna, Adrielly, Marianna, Kathyleen. Obrigada por deixar aquele lugar mais leve e tranquilo mesmo com todas aulas, trabalhos, estudos dirigidos, compromissos e relatórios. Vou agradecer aqui também aos meus grandes companheiros dessa jornada: As festas e os drinks tomados (alguns nem tão drink assim).

Gostaria de agradecer imensamente ao professor Caio Rachid por aceitar me orientar nesse processo. Por todas as palavras, conselhos, orientações, oportunidades. O que me fez mandar um e-mail para você pedindo por orientação na iniciação científica foi saber que tipo de profissional eu gostaria de ser. Você me faz querer ser a melhor. Muito obrigada.

Eduardo Fonseca, ou melhor, Dudu de big field, eu poderia ficar aqui agradecendo e não iria ter palavras para demonstrar toda minha gratidão. Entrei no LABEM no finalzinho dos seus experimentos, mas mesmo assim cada dia era um ensinamento diferente, não só profissional, mas de vida também. Você é um ser de luz, você consegue melhorar qualquer astral ou apaziguar situações de estresse. Obrigada, obrigada e obrigada.

Queria agradecer imensamente a cada pessoa do LABEM. Aos professores Mateus e Diogo, pela ajuda e suporte. Aos mais que amigos, friends: Akai® rainha das marcas, Flavinha dos comentários, Douglas da bioinfo, Fernandinha das conversas e desabafos, Carollzinha das comidas, Ju Fidelis das fofocas, Rodrigo do Crossfit, Karen do melhor pudim e dona de toda doçura do mundo, Isa (Que divide o pódio de doçura com a Karen), Lucas Carvalho, Bianca, Isis e os demais. Agradecimento ao grupo do LGM por toda ajuda, principalmente com a autoclave.

Agradeço imensamente aos órgãos de fomento por proporcionarem a realização desse trabalho. Agradeço também a Universidade Federal do Rio de Janeiro por toda assistência e pela resistência em um momento tão delicado como esse que estamos vivendo. Aos colaboradores e profissionais terceirizados, meu agradecimento.

Por fim, espero que este trabalho seja apenas o começo de uma longa estrada de conhecimento. Minha gratidão por todos que fizeram isso possível.

## RESUMO

MILLENA SALLES ARAÚJO

### Estudos para o melhoramento de um consórcio com potencial bioestimulante em mudas de *Eucalyptus*

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O setor florestal no Brasil apresenta grande importância econômica e ambiental. Aproximadamente 75% dos plantios florestais são cultivados com *Eucalyptus*, que é uma planta de crescimento rápido e alta adaptação. Apesar dos avanços tecnológicos obtidos por aprimoramento do manejo e melhoramento genético, o setor enfrenta desafios na produção, principalmente no crescimento e aproveitamento final de mudas. Para enfrentar esse desafio, podem ser feitas a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB), que podem trazer melhorias no desenvolvimento de plantas, tais como aumento no enraizamento e desenvolvimento da planta, melhor biodisponibilização de nutrientes entre outros. Com esse objetivo, foi desenvolvido um consórcio bacteriano para aplicação em *Eucalyptus*, composto por 4 estirpes, dos gêneros *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Methylobacterium* e *Mesorhizobium*, a partir de isolados endofíticos do mesmo. O atual trabalho visa otimizar a aplicação desse consórcio afim de aumentar sua eficácia e também entender a influência causada pela inoculação do consórcio no microbioma endofítico do *Eucalyptus*. Para isso, foram realizados experimentos para i. avaliar o crescimento das estirpes em diferentes meios de cultura ii. avaliar a viabilidade do consórcio ao longo do tempo, iii. avaliar a melhor concentração do consórcio, iv. Avaliar os efeitos da inoculação de cada componente do consórcio separadamente, v. avaliar os efeitos da refrigeração do consórcio antes da aplicação, e vi. avaliar o desempenho do consórcio frente a formas alternativas de aplicação nas mudas. Em cada experimento, foram utilizados como parâmetro de desempenho a taxa de sobrevivência, altura e biomassa das plantas. Para observar a eficácia da colonização das estirpes do consórcio, foi realizado o sequenciamento massivo do gene que codifica a subunidade 16S rRNA. Os resultados obtidos em laboratório indicaram bom desempenho de crescimento no meio TSB. O experimento de viabilidade foi inconclusivo para algumas estirpes, mas demonstrou pouca redução de viabilidade celular como um todo. Houve variação na resposta das plantas em função da concentração do inóculo, sendo a concentração  $10^7$  a mais promissora. Foi possível observar diferenças no desenvolvimento das mudas de acordo com a estirpe inoculada. A refrigeração do consórcio, não influenciou na taxa de sobrevivência das mudas. O desempenho do consórcio foi bastante variado, em alguns momentos apresentando crescimento abaixo do esperado em relação ao tratamento controle. A forma de inoculação também não pareceu influenciar nos parâmetros de sobrevivência, altura e biomassa analisados. Os resultados obtidos a partir do sequenciamento mostraram uma forte tendência de redução da diversidade, com alteração na estrutura da comunidade. Entre os componentes do consórcio, o gênero *Paraburkholderia* apresentou claro enriquecimento nas mudas inoculadas. Os resultados gerados no atual trabalho podem auxiliar na melhoria de produção de futuros consórcios compostos por PGPB para a aplicação em mudas de *Eucalyptus*.

**Palavras-chave:** Florestas Plantadas; *Eucalyptus*; Bactérias endofíticas; Consórcio; Bioestimulante.

## ABSTRACT

MILLENA SALLES ARAÚJO

### Studies for the improvement of a consortium with biostimulant potential in *Eucalyptus* seedlings

**Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

The forestry sector in Brazil has great economic and environmental importance. Approximately 75% of forest plantations are cultivated with *Eucalyptus*, which is a fast growing and high-adaptation plant. Despite the technological advances obtained by improving management and genetic improvement, the sector faces challenges in production, especially in the growth and final use of seedlings. To meet this challenge, we can use plant growth-promoting bacteria (PGPB), which can bring improvements in plant development, such as increased rooting and plant development, better bioavailability of nutrients among others. To this end, a bacterial consortium was developed for application in *Eucalyptus*, composed of 4 strains, of the genera *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Methylobacterium* and *Mesorhizobium*, from endophytic isolates of the same. The current work aims to optimize the application of this consortium in order to increase its effectiveness and also understand the influence caused by the inoculation of the consortium in the endophytic microbiome of *Eucalyptus*. For this, experiments were carried out to i. evaluate the growth of strains in different culture medium ii. to evaluate the viability of the consortium over time, iii. to evaluate the best concentration of application of the consortium, iv. evaluate the effects of inoculation of each component isolation ally, v. evaluate the effects of the cooling of the intercropping before application, and vi. evaluate the performance of the intercropping against the alternative forms of application in the seedlings. In each experiment, the survival rate, height and biomass of the plants were used as performance parameters. To observe the efficacy of colonization of the consortia strains, massive sequencing of the gene encoding the subunit 16S rRNA was performed. The results indicated good growth performance in the TSB medium. The consortium viability was inconclusive for some strains, but showed little reduction in cell viability as a whole. There was variation in the response of the plants as a function of the inoculum concentration, with the concentration of  $10^7$  being the most promising. There were differences in development according to the inoculated strain. The refrigeration of the intercropping, however, did not influence the survival rate of the seedlings. The performance of the consortium was quite varied, at times presenting less than expected growth in relation to the control treatment. The inoculation format also did not seem to influence the survival parameters, height and biomass analyzed. The results obtained from the sequencing showed a strong tendency to reduce diversity, with changes in the bacterial community. Among the components of the consortium, the genus *Paraburkholderia* showed clear enrichment in the inoculated seedlings. The results generated in the current work can help in the improvement of future consortia composed of PGPB for the application in *Eucalyptus* seedlings.

**Key-words:** Planted Forests; *Eucalyptus*; Endophytic bacteria; Consortium; Biostimulant.



## **RESUMO PARA LEIGOS**

**MILLENA SALLES ARAÚJO**

### **Estudos para aprimorar o uso de bactérias que ajudam o crescimento de plantas em Eucaliptos**

**Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O plantio de árvores no Brasil é bastante importante para a economia e o ambiente. Uma grande parcela desse plantio é de eucalipto, uma planta que se adapta bem a várias regiões e que apresenta um crescimento rápido comparado a outras plantas. Para que o eucalipto mantenha suas boas características de crescimento, uma opção de manejo é a aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB). Essas bactérias são conhecidas por ajudarem o crescimento e desenvolvimento de plantas através de alguns mecanismos como o da disponibilização de nutrientes para as plantas. Foi então desenvolvido um consórcio microbiano composto por 4 bactérias diferentes presentes no interior das raízes de eucalipto que apresentaram essas características benéficas para as plantas. Com isso, o atual trabalho tem como objetivo aperfeiçoar a aplicação desse consórcio a fim de aumentar o crescimento de mudas de eucalipto e também entender as mudanças que acontecem no interior das raízes após a aplicação do consórcio. Para isso, foram feitos alguns experimentos, como: i. Avaliar o crescimento das 4 bactérias em diferentes meios de cultura (utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano) ii. Estimar a viabilidade do consórcio ao longo do tempo, iii. Estabelecer uma concentração adequada de aplicação do consórcio nas mudas, iv. Estimar os possíveis efeitos da inoculação de cada bactéria de forma separada nas plantas, v. Entender os efeitos do consórcio após a refrigeração, e vi. Avaliar o crescimento do eucalipto com uma diferente forma de aplicação do consórcio. Para entender como esses fatores influenciaram o crescimento e desenvolvimento das plantas, foram avaliadas a quantidade de plantas sobreviventes após os experimentos, a altura delas e o peso. Para confirmar se as 4 bactérias do consórcio foram capazes de continuarem presentes nas raízes, foi feito um estudo com o DNA de todas as bactérias encontradas no interior das raízes das plantas após a aplicação do consórcio. Foi observado um maior crescimento das bactérias no meio TSB. A presença de bactérias vivas depois de 32 dias foi confirmada após análise visual em um recipiente que continha elementos necessários para o crescimento das bactérias, porém não há forma de confirmar se todas as 4 bactérias sobreviveram de forma conjunta. A concentração do consórcio que apresentou um melhor desempenho foi a  $10^7$ . A aplicação das bactérias do consórcio separadamente nas mudas apresentou resultados de crescimento diferente entre os tratamentos quando comparados a mudas que receberam o consórcio e as que não receberam. Já a refrigeração do consórcio antes da aplicação não apresentou mudanças na sobrevivência das plantas. As mudanças causadas pela aplicação das bactérias nas plantas variaram entre os experimentos, e a forma de aplicação diferente do consórcio também não interviu no desenvolvimento das plantas. Os eucaliptos que receberam o consórcio apresentaram uma diminuição na variedade de bactérias presentes nas raízes e apresentaram uma mudança de composição bacteriana. Apenas um tipo de bactéria aumentou em eucaliptos que receberam o consórcio. Esse trabalho foi elaborado para ajudar na melhoria de futuros consórcios compostos para aplicação em eucalipto.

**Palavras-chave:** PGPB; Eucalipto; Bactérias; Consórcio.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Área plantada com os vegetais mais utilizados em florestas plantadas para fins comerciais no território brasileiro, sendo esses os gêneros <i>Eucalyptus</i> (verde), <i>Pinus</i> (azul) e outros gêneros (amarelo) entre os anos 2014 e 2019. Dados compilados do Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ) (2020). .....	2
<b>Figura 2.</b> Distribuição, por estado, de <i>Eucalyptus</i> por todo território brasileiro (adaptado de IBÁ, 2020). .....	4
<b>Figura 3.</b> Representação da presença de microrganismos no ambiente rizosférico e no interior da raiz vegetal (ilustração Caio Rachid). .....	9
<b>Figura 4.</b> Foto após 77 dias da inoculação do consórcio nas mudas de <i>Eucalyptus</i> . Da esquerda para direita, os tratamentos consórcio+fertilizante, fertilizante, consórcio e controle, respectivamente. ....	18
<b>Figura 5.</b> Desenvolvimento das mudas de <i>Eucalyptus</i> frente a aplicação do consórcio microbiano e fertilização. (A) Crescimento (cm); (B) Biomassa foliar (g) e (C) Biomassa caulinar (g). .....	18
<b>Figura 6.</b> Curva de sobrevivência das mudas de <i>Eucalyptus</i> , demonstrando a influência do consórcio microbiano e da fertilização. ....	19
<b>Figura 7.</b> Curva de crescimento bacteriano nos 4 meios de cultura diferentes, sendo esses: TSB (azul), <i>Fitato low</i> (laranja), YEPG (verde) e YEPD (amarelo). (A) Crescimento da estirpe 1.2; (B) Crescimento da estirpe 3.1; (C) Crescimento com a estirpe 21A; (D) Crescimento da estirpe 87. ....	29
<b>Figura 8.</b> Curva de sobrevivência das mudas de <i>Eucalyptus</i> (n inicial de 35 mudas) submetidas a 3 diferentes doses do consórcio (Doses X, 10X e 100X) e o controle por 28 dias. ....	30
<b>Figura 9.</b> Altura média das mudas de <i>Eucalyptus</i> submetidas a 3 diferentes doses do consórcio (Doses X, 10X e 100X) e o controle, nos dias 14 e 28 do experimento. Os pontos representam médias (n≅35) e as barras representam a medida de erro padrão. ....	31
<b>Figura 10.</b> Biomassa média radicular das mudas de <i>Eucalyptus</i> submetidas a 3 diferentes doses do consórcio (Doses X, 10X e 100X) e o controle. As barras representam médias (n=15) e as barras de desvio representam a medida de erro padrão. ....	32
<b>Figura 11.</b> Curva de sobrevivência das mudas de <i>Eucalyptus</i> (n inicial de 32 mudas) que foram expostas aos inóculos de cada componente do consórcio de forma isolada (1.2, 3.1, 21A e 87), consórcio e o controle por 84 dias. ....	33

- Figura 12.** Altura média das mudas de *Eucalyptus* que foram expostas aos inóculos de cada componente do consórcio de forma isolada (1.2, 3.1, 21A e 87), consórcio e o controle por 28, 56 e 84 dias. Os pontos representam médias ( $n \cong 32$ ) e as barras representam a medida de erro padrão. .... 34
- Figura 13.** Biomassa média aérea das mudas de *Eucalyptus* submetidas aos inóculos de cada componente do consórcio de forma isolada (1.2, 3.1, 21A e 87), consórcio e o controle. As barras representam médias ( $n \cong 35$ ) e as barras de desvio representam a medida de erro padrão. .... 35
- Figura 14.** Curva de concentração média de Unidade Formadora de Colônias por mililitros na diluição  $10^{-3}$  no período 7 a 32 dias de experimento. .... 36
- Figura 15.** Curva de sobrevivência das mudas de *Eucalyptus* ( $n$ =inicial de 90 mudas) que foram expostas ao consórcio não refrigerado, refrigerado e o controle por 84 dias. .... 37
- Figura 16.** Altura média das mudas de *Eucalyptus* que foram expostas ao consórcio não refrigerado, refrigerado e o controle por 28, 56 e 84 dias. ( $n$  inicial de 90 mudas). .... 38
- Figura 17.** Biomassa média aérea das mudas de *Eucalyptus* submetidas aos inóculos do consórcio não refrigerado, refrigerado e o controle. As barras representam médias ( $n \cong 90$ ) e as barras de desvio representam a medida de erro padrão. .... 39
- Figura 18.** Curva de sobrevivência das mudas de *Eucalyptus*, sendo o tratamento inóculo o consórcio aplicado diretamente no substrato e o controle, por 84 dias. .... 40
- Figura 19.** Altura média das mudas de *Eucalyptus*, por 28, 56 e 84 dias ( $n$  inicial de 96 mudas). .... 41
- Figura 20.** Biomassa média aérea das mudas de *Eucalyptus*, sendo o tratamento inóculo o consórcio aplicado diretamente no substrato e o controle e as barras de desvio representam a medida de erro padrão. .... 42
- Figura 21.** Riqueza de espécies ( $\alpha$ -diversidade) (A) e índice de *Shannon* (B) das amostras derivadas de raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras de desvio padrão representam as medidas de erro padrão ( $n=3$ ). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos. .... 43
- Figura 22.** Curva de rarefação das OTUs presentes nas amostras do Controle e Consórcio ( $n=3$ ). .... 44
- Figura 23.** Abundância relativa dos principais filos do domínio Bacteria encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento consórcio analisado após o

- sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras representam as médias (n=3) e as barras de desvio são medidas de desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos, para o filo destacado (teste t,  $p < 0.05$ ). ..... 45
- Figura 24.** Abundância relativa das principais ordens do domínio Bacteria encontradas nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras representam as médias (n=3) e as barras de desvio são medidas de desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos, para os filios destacados (teste t,  $p < 0.05$ ). ..... 46
- Figura 25.** Mapa de calor representando a abundância relativa das principais famílias do domínio Bacteria encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal..... 47
- Figura 26.** Mapa de calor representando a abundância relativa dos principais Gêneros do domínio Bacteria encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal..... 48
- Figura 27.** Abundância relativa dos gêneros componentes do consórcio encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras representam as médias (n=3) e as barras de desvio são medidas de desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos..... 49
- Figura 28.** Ordenação multidimensional não métrica (NMDS) em 3 dimensões, baseada no índice de Bray-Curtis de similaridade, realizada após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal presente nas amostras do Controle (Azul) e do tratamento que recebeu o consórcio (Amarelo). Nessa figura são apresentados apenas os eixos 1 e 2..... 50
- Figura 29.** Cladograma com a análise discriminante linear do tamanho do efeito (LEfSe). Cada anel representa um nível taxonômico (de dentro para fora, de reino a gênero) e cada círculo colorido representa um táxon. Taxons marcados de verde são significativamente mais associados ao controle e táxons marcados de vermelho são significativamente mais associados com o tratamento consórcio. Foram consideradas significativas, diferenças com valor de p inferior à 0.05 de acordo com os testes Kruskal-Wallis e Wilcoxon rank-sum, e com tamanho de efeito superiores a 3 na análise de discriminante linear..... 51

## Sumário

1 – Introdução .....	1
1.1– Florestas plantadas .....	1
1.1.1 – <i>Eucalyptus</i> .....	3
1.2 – Manejo Florestal .....	4
1.3 – Interação planta-solo-microrganismos .....	6
1.4 - Bioinoculantes .....	13
1.5 - Resultados anteriores .....	17
2 - Justificativa .....	20
3 - Objetivo .....	21
3.1 – Objetivos específicos .....	21
4 - Materiais e Métodos .....	22
4.1 – Desenho experimental.....	22
4.1.1 Obtenção do consórcio.....	22
4.1.2 – Cultivo e manutenção do consórcio .....	22
4.1.3 – Preparo do experimento em casa de vegetação .....	22
4.1.4 - Monitoramento Vegetal.....	23
4.2 – Experimento 1 - Avaliação de diferentes meios de cultivo para a manutenção das estirpes do consórcio.....	23
4.3 - Experimento 2 – Avaliação da concentração mais adequada do consórcio bacteriano.....	24
4.4 – Experimento 3 – Aplicação de cada componente do consórcio separadamente....	24
4.5 – Experimento 4 - Teste de tempo de prateleira .....	25
4.6 – Experimento 5 – Avaliação da efetividade do consórcio após refrigeração .....	26
4.7 – Experimento 6 - Avaliação das mudas inoculadas de maneira alternativa à inoculação .....	26
4.8 - Experimento 7 - Avaliação da eficácia de inoculação por sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S rRNA.....	26
4.8.1 – Extração de DNA radicular.....	27
4.8.2 – Sequenciamento .....	27
4.8.3 - Análise de bioinformática.....	27
4.8.4 - Análises estatísticas .....	28
5 - Resultados.....	29
5.1 - Experimento 1 - Avaliação de diferentes meios de cultivo para a crescimento das estirpes do consórcio.....	29

5.2 - Experimento 2 – Avaliação da melhor concentração de inoculação do consórcio bacteriano.....	30
5.3 – Experimento 3 – Aplicação de cada componente do consórcio separadamente....	32
5.4 – Experimento 4 - Teste de tempo de prateleira .....	35
5.5 – Experimento 5 – Avaliação da efetividade do consórcio após refrigeração .....	36
5.6 – Experimento 6 – Avaliação das mudas com condição alternativa de inoculação inicial .....	39
5.7 – Experimento 7 - Avaliação da eficácia de inoculação por sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S rRNA.....	42
6 – Discussão .....	52
7 – Conclusões .....	64
8 - Referências Bibliográficas.....	65
9 –Anexos .....	73

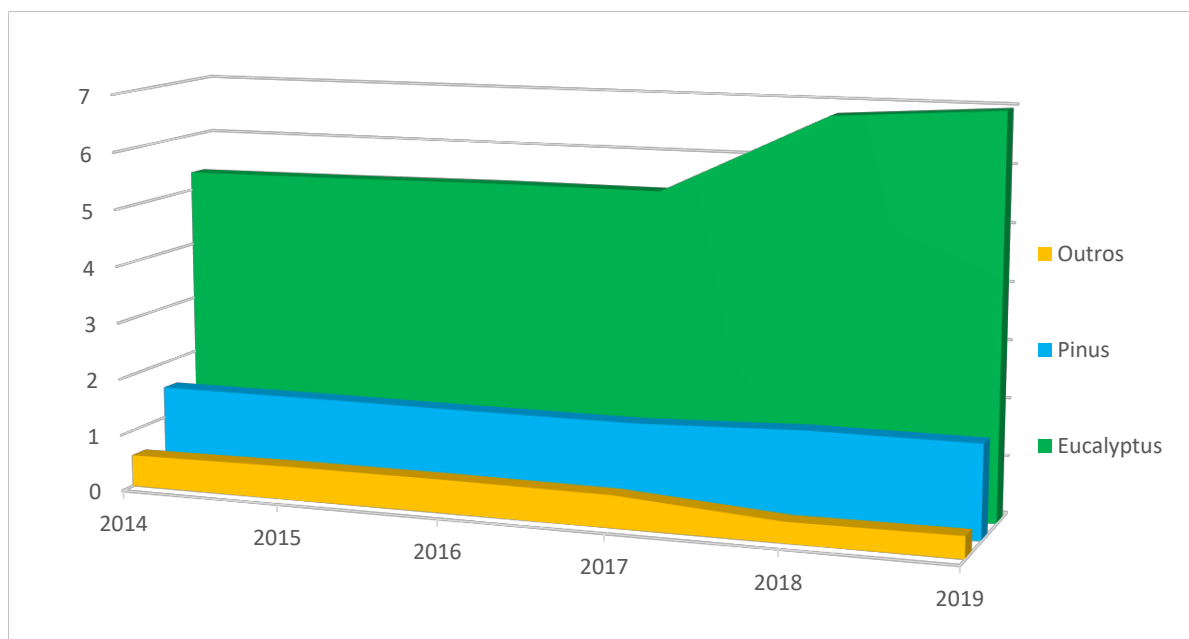
## 1 – Introdução

### 1.1– Florestas plantadas

A carência por matéria prima para a produção de insumos derivados de madeira para a população e a necessidade de uma produção mais sustentável não são novidades na agricultura (Koebel *et al.*, 2016). Desde o final do século XIX até o ano de 2010, a indústria de celulose e papel no Brasil vem sofrendo constantes transformações (Montebello, 2010). As transformações sofriam influencia tanto das políticas públicas internas com a intenção de exportar a celulose, como também pelo aumento de capital estrangeiro no setor. O desmatamento de áreas nativas é um grande problema e está relacionado a diferentes causas, dentre elas a expansão da produção agrícola (Lawrence, Vandecar, 2015). Estima-se uma perda de 420 milhões de hectares de área florestal desde 1990 em todo o mundo, segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2020). Com a demanda crescente de matéria-prima florestal, fruto do aumento da população global, é necessária a criação de alternativas para a produção florestal, para que florestas nativas não sejam afetadas (Fox, 2000).

A produção de madeira vem crescendo a cada ano (Moreira, Simioni e Oliveira, 2017) e isso pode ser atribuído às florestas plantadas. Florestas plantadas são áreas de reflorestamentos com a implementação de uma ou mais espécies arbóreas. Estudos apontam que é possível balancear a relação entre o desenvolvimento econômico e a preservação das diversas espécies encontradas em uma floresta plantada, sendo esse processo realizado com o manejo adequado, com abordagens mais sustentáveis e mesmo assim mantendo a produtividade. A rotação de colheitas, redução do uso de fertilizantes e pesticidas, utilização de esterco no lugar de insumo químico são alguns exemplos já adotados na agricultura sustentável (Parrotta, Yeo-Chang e Camacho, 2016; Mishra *et al.*, 2018; Eggers *et al.*, 2020).

Dentro desse cenário, as florestas plantadas se destacam como opção de exploração sustentável de recursos florestais não advindos de florestas nativas. Majoritariamente, esse plantio é destinado ao comércio ou para a recuperação de uma área que foi anteriormente devastada por razões naturais ou antropogênicas. Nos plantios comerciais, normalmente são utilizadas espécies de crescimento rápido, tal como *Eucalyptus* spp. e o *Pinus* spp., cuja produção no território nacional superou 7,53 milhões de hectares em 2018 (IBÁ, 2019), com expectativas de aumento devido ao avanço em tecnologias de melhoramento do plantio direcionado a silvicultura (Badalamenti *et al.*, 2020) (Figura 1).



**Figura 1.** Área plantada com os vegetais mais utilizados em florestas plantadas para fins comerciais no território brasileiro, sendo esses os gêneros *Eucalyptus* (verde), *Pinus* (azul) e outros gêneros (amarelo) entre os anos 2014 e 2019. Dados compilados do Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ) (2020).

Na economia, o setor de produção de madeira proveniente de florestas plantadas – a silvicultura – representou 5% das exportações totais do país e 10% das exportações do agronegócio brasileiro em 2017 (MAPA, 2018). Este setor é responsável por 91% de toda produção de matéria prima florestal, apesar de ocupar apenas 1% do território brasileiro.

Em 2018, 1,3% do produto interno bruto (PIB) e 6,9% do PIB industrial vinham do segmento de produção de árvores com finalidade fabril, segundo dados fornecidos pela Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ, 2019). Além disso, o crescimento progressivo nesse setor tem interferência direta na economia local, gerando empregos e impactando a vida de 3,8 milhões de pessoas de forma direta ou indireta. Esses dados mostram a importância dessa área no desenvolvimento socioeconômico brasileiro (IBÁ, 2019).

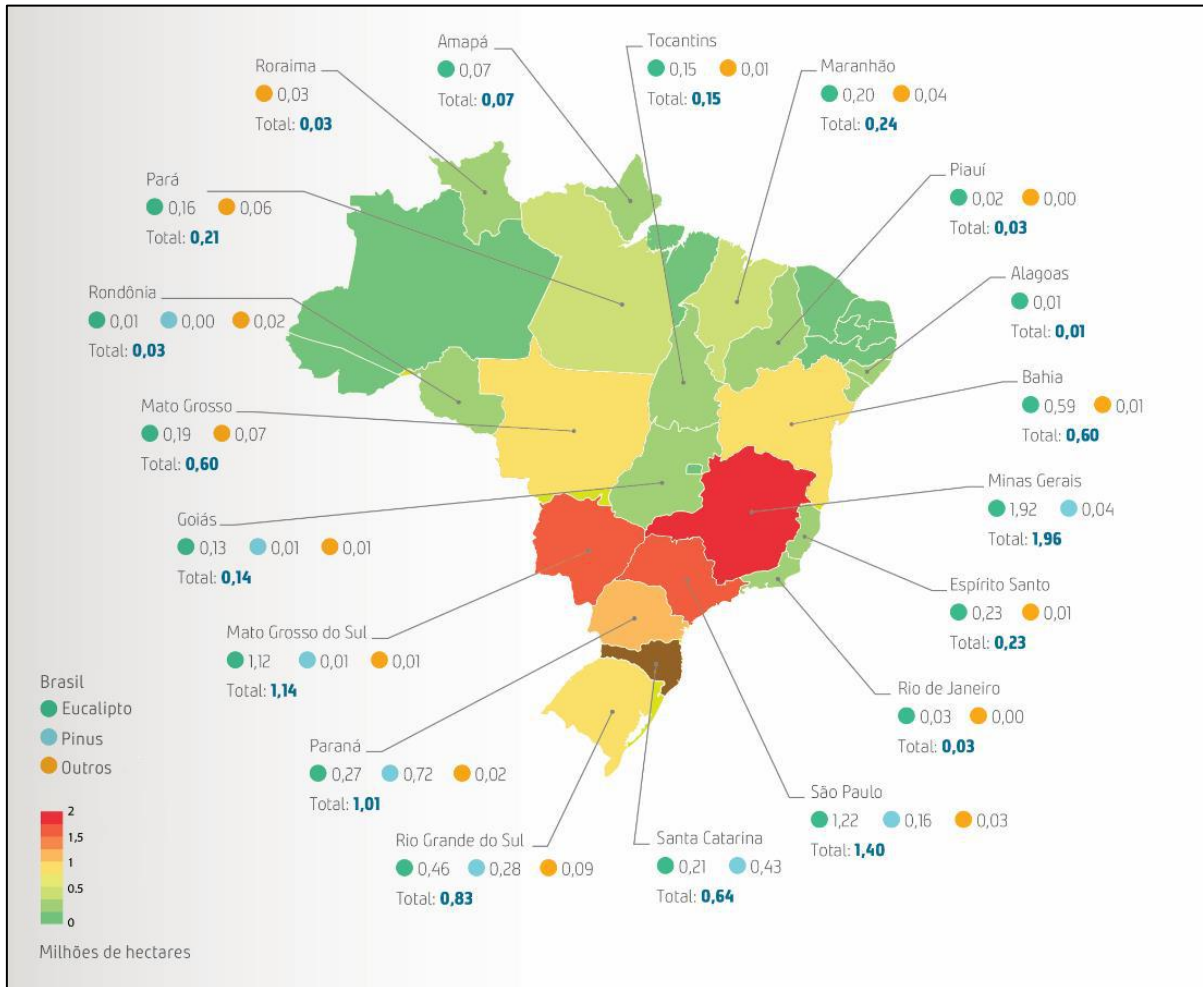
Além de contribuir com uma parcela significativa da economia nacional, o plantio florestal pode gerar benefícios para o ecossistema. O sequestro de gases que acentuam o efeito estufa por meio de florestas plantadas é pautado como benefício gerado ao meio ambiente. Há estudos relatando uma alta taxa de sequestro de carbono atmosférico, um dos principais elementos encontrados nos gases que intensificam o efeito estufa, na silvicultura (Dixon, Winjum e Schroeder, 1993; Ferez, 2015).



### 1.1.1 – *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* faz parte da família das Myrtaceae que constitui o grupo da ordem Myrtales, natural da Austrália. Não há registros concretos da sua entrada em território brasileiro, mas documentos indicam que foi entre 1855 e 1865 (Andrade, 1911). Dentro do gênero são descritas 890 espécies (EUCLID, 2006) que podem ser encontradas em diferentes climas, solos e regiões. Apesar do grande número de espécies, poucas são utilizadas comercialmente, como *E. alba*, *E. saligna*, *E. grandis* e *E. urophylla*. O que influencia a escolha de qual espécie utilizar é o seu destino. Alguns exemplos de uso são a fabricação de postes, produção de móveis, painéis, óleos essenciais, carvão, papel, celulose e outros (Embrapa, 2000).

Dos 9 milhões de hectares de árvores plantadas no Brasil atualmente, 6,97 milhões são utilizados para a plantação de *Eucalyptus*, seguido do gênero *Pinus*, que é de 1,64 milhões de hectares e os outros 390 mil hectares são pertencentes as demais espécies como *Acacia* spp. e *Hevea* spp., popularmente conhecida como seringueira (Figura 1). As plantações dessas espécies estão espalhadas por todo território brasileiro, tendo maior concentração na região sudeste, nos estados de Minas gerais (28%) e São Paulo (17%). Outra região que se destaca no plantio de *Eucalyptus* é a região centro-oeste, no estado do Mato Grosso do Sul (16%) (IBÁ, 2020).



**Figura 2.** Distribuição, por estado, de *Eucalyptus* por todo território brasileiro (adaptado de IBÁ, 2020).

O gênero *Eucalyptus* é formado por espécies vegetais exóticas e é utilizado no território brasileiro por fatores como o seu crescimento rápido, a capacidade em se adaptar em diferentes regiões e fatores ambientais, o baixo custo de plantio e um alto retorno. Além disso, a sua madeira pode ser utilizada para diferentes finalidades, tais quais produção de celulose, carvão, construção civil, equipamento para casa e escritório, papel, como já citado anteriormente (IBÁ, 2019).

## 1.2 – Manejo Florestal

O manejo florestal pode ser definido como uma gestão racional de recursos florestais a partir de compensações entre a extração de produtos ambientais e técnicas de manejo visando ganhos econômicos e equilibrando ganhos e perdas ecológicas a longo prazo (Chen, 2017). O interesse nessas práticas surgiu com o propósito de tornar contínuo o uso de matéria prima florestal e ainda assim causar o mínimo impacto ambiental possível. E para otimizar a obtenção

de matéria prima, novas tecnologias são empregadas continuamente com o intuito de aprimorar o plantio.

A extração de madeira e produtos florestais pode ocasionar alterações nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Colombo *et al.*, 2016; Matos, Barreto-Garcia e Scoriza, 2019). Nesse contexto, a união de práticas de manejo e princípios de conservação é o que pode garantir o sucesso da produção tanto no viés econômico como no ambiental (Ontl *et al.*, 2019). Para esse sucesso acontecer, é necessário a elaboração de um Plano de Manejo Florestal Sustentável (PMFS). O plano deve seguir três princípios básicos: Ser ecologicamente correto, socialmente justo e economicamente viável segundo a *Forest Stewardship Council* (FSC), uma organização não governamental que promove o manejo florestal mundialmente de forma positiva e duradoura. O Instituto de Conservação e Desenvolvimento Sustentável da Amazônia (IDESAM, 2018), um órgão responsável por valorizar o uso de recursos naturais, buscando alternativas de conservação e mitigação de regiões impactadas por planos de manejo, elaborou um documento com recomendações de como esses manejos devem ser realizados, a fim de diminuir os efeitos causados pela utilização dos recursos florestais.

Com o avanço da tecnologia e do conhecimento científico, são elaboradas formas de manejo que buscam um equilíbrio entre as necessidades econômicas e ambientais. Um estudo com o gênero *Eucalyptus*, cujo objetivo era descobrir os principais distúrbios que reduzem a produtividade de um plantio, mostrou que o déficit hídrico, o manejo inadequado, fatores climáticos e o uso de genótipos inadequados para a região são os pontos mais críticos quando se trata de um plano para uma colheita bem sucedida (Elli *et al.*, 2019).

O sucesso do plantio é diretamente ligado à qualidade das mudas e são buscadas maneiras de otimizar esse processo. Há alguns obstáculos enfrentados pelas empresas do segmento de florestas plantadas para o melhoramento do desenvolvimento inicial de mudas. Saha e colaboradores (2019) estudaram as perdas no plantio pela dessecação causada pelo transplante do viveiro ao campo e o não enraizamento, gerando uma perda econômica. Os valores extremos de temperatura também podem interferir no enraizamento inicial, afetando no alongamento radicular de mudas de *Eucalyptus* (Misra, 1998). Algumas linhagens de *Eucalyptus* que são de grande interesse industrial possuem taxas de enraizamento muito baixas, chegando até 70% de perda durante a fase de propagação (dados obtidos com técnicos da Suzano, via comunicação pessoal em 2019). Além disso, a baixa resistência das mudas proporciona a alta ocorrência de pragas, tal como a causada por bactérias do gênero *Ralstonia* (dados obtidos com técnicos da Bracell, via comunicação pessoal). Assim, a otimização do manejo na fase de propagação de mudas é de grande importância.

Um tipo de manejo já aplicado, depois do conhecimento prévio do plantio, é o controle e precisão no uso de pulverizadores e irrigadores adequados, evitando desperdício de água (Mishra *et al.*, 2018). Além disso, é de grande importância suprir a necessidade de nutrientes nessa fase inicial para que se alcance um desenvolvimento pleno das raízes. Plantas de crescimento rápido, como *Eucalyptus*, requerem aquisição rápida de nutrientes para o aumento radicular e o manejo tem papel fundamental nesse desenvolvimento (Pinheiro *et al.*, 2016).

Uma das formas de aumentar a taxa de nutrientes para o crescimento de plantas é pela aplicação de fertilizantes, principalmente por fertilizantes compostos por elementos nitrogenados, importante no desenvolvimento de uma plantação. Ferez e colaboradores (2015) mostraram que a aplicação de fertilizante nitrogenado e herbicida em diferentes concentrações, de acordo com a região demográfica e do solo resultam em uma maior biomassa vegetal gerada. Um estudo relatou os avanços nas tecnologias para que haja a disponibilização de nitrogênio, porém sem aplicação de fertilizantes nitrogenados (Good, 2018). Marron e colaboradores (2019) utilizaram o plantio misto entre plantas que tem relação simbiótica com microrganismos fixadores de nitrogênio e plantas que não apresentam simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio para obter uma maior disponibilização de nitrogênio, e os resultados mostraram resultando um aumento de biomassa gerada.

### 1.3 – Interação planta-solo-microrganismos

O solo é um reservatório que comporta de micro a macro nichos, e é conhecido pelo seu perfil heterogêneo e dinâmico. Ele é composto por diversos minerais, gases, líquidos, matéria orgânica e organismos fotossintéticos e não fotossintéticos (Kumar, 2016). Esse dinamismo tem grande influência dos microrganismos, principalmente dos fungos e bactérias, que desempenham um papel fundamental no solo e estão intimamente ligados à formação de matéria orgânica, ciclagem e disponibilização de nutrientes, entre outros (Brevik *et al.*, 2015). O solo comporta diversos organismos que assimilam e transformam os nutrientes ali presentes e embora a microbiota do solo componha uma pequena fração da matéria orgânica, ela conduz a ciclagem dos vários compostos orgânicos e inorgânicos (Spohn, 2016).

Diversos organismos são dependentes do solo. As plantas, por exemplo, são seres vivos majoritariamente fotossintéticos e se utilizam de elementos nutritivos do solo para seu crescimento em associação com fotoassimilados. Parte dos compostos produzidos são liberados na forma de exsudatos radiculares e voltam para o solo (FAO, 2003). Na literatura, é bem conhecido que a disponibilidade de nutrientes no solo pode modular o desempenho e crescimento radicular (Duchene, Vian e Celette, 2017).

Ademais, embora se observe a presença abundante desses compostos no solo, para que haja disponibilização de fato dos nutrientes desses compostos, é necessária a atuação da comunidade microbiana. Jacoby e colaboradores (2017) mostraram que nutrientes como nitrogênio, fósforo e enxofre, importantes no desenvolvimento vegetal, antes de serem assimilados pelas plantas, são primariamente assimilados pelos microrganismos.

Santos e colaboradores (2016) demonstraram que há diferentes tipos de interação entre os microrganismos, tais como: competitivas, positivas, negativas, neutras, comensais, simbióticas; e que algumas delas provavelmente são frutos de processos de co-evolução. Para entender melhor esse processo de interação, é fundamental que haja uma maior compreensão da função e diversidade dos microrganismos desse solo, sendo grande parte da interação feita em um lugar específico do solo, a rizosfera (Shi *et al.*, 2016).

A rizosfera é uma interface físico-química que liga as raízes vegetais com o solo e fornece um ambiente propício para a vivência de microrganismos. Nesse ambiente há liberação de metabólitos primários e secundários das plantas pelas raízes que interferem na microbiota (conjunto de microrganismos que vivem de forma associada a um hospedeiro em um determinado espaço) e na microfauna da rizosfera (Mendes, Garbeva e Raaijmakers, 2013). A troca de nutrientes entre microrganismos e plantas na rizosfera confere um ambiente complexo próxima à raiz, permitindo a interação da comunidade microbiana ali presente (Shi *et al.*, 2016).

Entre os tipos de interações microbianas que acontecem na rizosfera, existem: i) sinalização entre plantas e microrganismos, que gera relações simbióticas que resultam em benefícios para ambos e ii) sinalização intra e interespecies de bactérias que se comunicam por *quorum sensing*, que é a percepção e resposta de sinais extracelulares gerados pela densidade celular. Estudos recentes mostraram que esse tipo de interação permite que haja um sincronismo na expressão gênica das bactérias, podendo atuar coletivamente em processos relacionados à ciclagem de nutrientes (Venturi e Keel, 2016; Jung *et al.*, 2017; Mukherjee e Bassler, 2019).

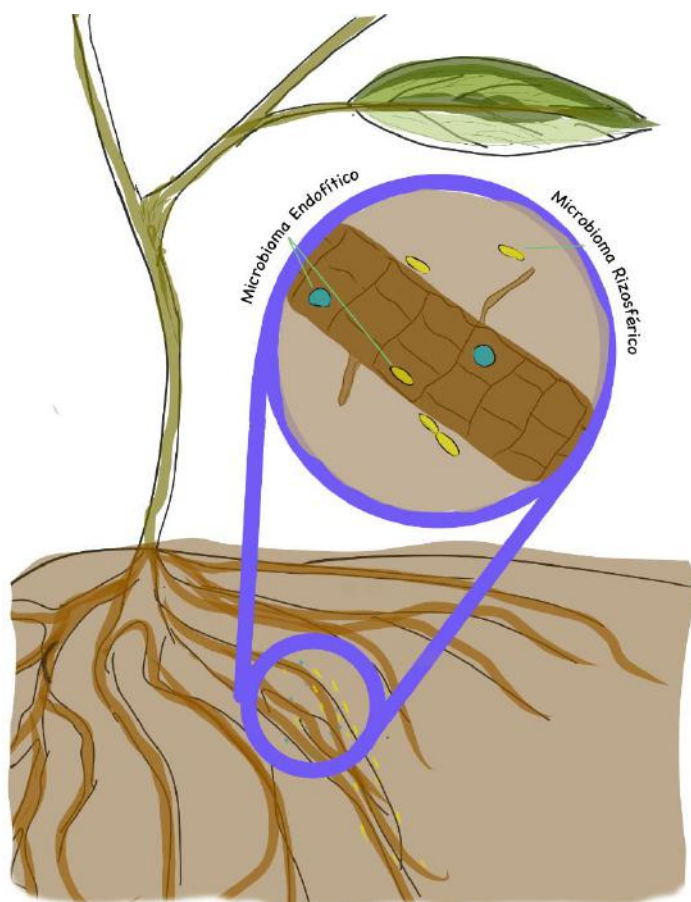
Estudo relata uma grande concentração de biomassa microbiana na rizosfera (Olanrewaju, Glick e Babalola, 2017), superior à do solo circundante. Isso ocorre principalmente pela maior disponibilidade de matéria orgânica nessa região, fruto da liberação de compostos orgânicos pelas raízes das plantas. Os microrganismos são atraídos para essa região por quimiotaxia, que é dada por uma diferença de estímulo químico. No caso dos microrganismos, isso geralmente se dá pela oferta de carbono derivado da rizodeposição e de exsudatos radiculares (Haichar *et al.*, 2014). Há uma discussão na literatura sobre como ocorre o favorecimento das espécies, se é de acordo com o perfil de elementos bióticos e abióticos presentes na rizosfera ou se há uma atração de microrganismos para a região. Alguns estudos

abordam a modulação da composição microbiana na rizosfera devido à influência da rizodeposição, tendo uma atração de determinados grupos de microrganismos presentes no solo para regiões próximas as raízes (Kloepper e Beauchamp, 1992; Lopes, Pereira e Andreote, 2016). Um outro estudo apontou que essa seleção microbiana acontece pela planta, liberando um perfil de substâncias específicas para recrutamento de microrganismos específicos, podendo assim favorecer um determinado grupo de microrganismos que forneça elementos favoráveis para o desenvolvimento vegetal (Jacoby *et al.*, 2017). A concordância de fatores bióticos e abióticos presentes entre raiz e microrganismos, gera uma relação simbiótica, propiciando metabólitos acessíveis para a planta e um ambiente favorável para crescimento de microrganismos. Alguns trabalhos na literatura mostraram que um grupo diverso de microrganismos vem se destacando, principalmente no meio da agricultura, pelo impacto que estão causando no aumento da produtividade em larga escala de vegetais de interesse industrial, sendo essas bactérias chamadas de promotoras de crescimento vegetal (Huang, 2018).

Parte dos microrganismos presente na rizosfera e que tem contato direto com as raízes vegetais são bactérias caracterizadas como promotoras de crescimento vegetal (PGPB – do inglês *plant growth-promoting bacteria*). O termo foi introduzido em 1978 por Kloepper e Schroth, que estudaram os efeitos desses microrganismos em *Raphanus* spp. Esse grupo, por meio de mecanismos diretos ou indiretos, consegue influenciar no desenvolvimento e crescimento das plantas (Ramakrishna, Yadav e Li, 2019). Os mecanismos diretos são relacionados ao crescimento das plantas, como a produção de fitormônios, fixação de nitrogênio, disponibilização de nutrientes e captura de moléculas. Já os mecanismos indiretos envolvem a produção de metabólitos bacterianos que inibem o crescimento de organismos patogênicos para as plantas e ativam o sistema de defesa vegetal, produção de substâncias capazes de capturar íons e produção de moléculas análogas aos fitormônios, entre outros (Cardoso e Andreote, 2016; Olanrewaju, Glick e Babalola, 2017).

As PGPB podem se localizar na filosfera (parte aérea da planta), no rizoplano (na superfície da raiz), na rizosfera (região próxima e sob influência das raízes) e na endosfera (parte interna das raízes) (Bhattacharyya e Jha, 2011). As bactérias que se localizam dentro das raízes ou são encontradas de forma facultativa na parte interna do tecido radicular são denominadas bactérias endofíticas (Figura 3) e podem ser classificadas em três categorias: i) endofíticas obrigatórias – que são bactérias que não se proliferam em um ambiente externo à planta, ii) endofíticas facultativas – que são bactérias que transitam entre o solo e o tecido vegetal e iii) endofíticas passivas – que são bactérias que entram em contato com o meio interno

por meio de fissuras e aberturas na epiderme vegetal, como estômatos e hidatódios (Gaiero *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Representação da presença de microrganismos no ambiente rizosférico e no interior da raiz vegetal (ilustração Caio Rachid).

São realizadas pesquisas direcionadas à agricultura para entender as PGPB e seus mecanismos benéficos de ação para a planta (Bhattacharyya e Jha, 2011). Elas mostraram que os benefícios são variáveis de acordo com a estirpe utilizada e com os hospedeiros (Gouda *et al.*, 2018). As bactérias promotoras de crescimento vegetal podem influenciar as plantas de três formas: i) fitoestimulação, ii) biofertilização e iii) biocontrole. Essas aplicações se mostram promissoras tendo em vista uma plantação mais sustentável.

A fitoestimulação consiste na liberação por microrganismos de moléculas sintéticas análogas a reguladores de crescimento, conhecidos como fitormônios, importantes para impulsionar o crescimento e desenvolvimento vegetal (Vejan *et al.*, 2016). Essas bactérias modulam os níveis de auxina, etileno, giberelina, citocinina e outros fitohormônios das plantas. A auxina é uma classe de hormônio vegetal sendo o ácido indolacético um dos mais comuns, produzidas por algumas bactérias e fungos. O fitohormônio está envolvido principalmente com

o alongamento e divisão celular, promoção do crescimento do sistema foliar, radicular e envelhecimento de frutos. Os microrganismos que se destacam na produção desse hormônio são dos gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Streptomyces* (Ali, Charles e Glick, 2017). Um experimento que visava observar os efeitos do ácido indolacético em mudas de trigo apresentou uma redução de 25% no desenvolvimento radicular de mudas que receberam uma cepa de *Pseudomonas* no qual o gene foi silenciado para a produção do ácido indolacético comparado a mudas que receberam uma cepa selvagem (Kudoyariva *et al.*, 2019).

O etileno é um hormônio gasoso de pequena estrutura molecular que, em baixas quantidades, pode atuar no amadurecimento do fruto, germinação de sementes, na ativação de outros fitormônios e no início do crescimento radicular (Govind *et al.*, 2015). Quando encontrado em grandes quantidades, o etileno inibe a divisão celular. Para que haja a diminuição dos níveis de etileno para o crescimento celular, algumas bactérias utilizam mecanismos para diminuir a concentração dessa molécula. Um exemplo é a produção da enzima ACC deaminase (aminociclopropano-1-carboxilato desaminase) que são produzidas por alguns gêneros, como: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* e *Variovorax*. A liberação dessa enzima pode impedir a inibição do crescimento das plantas causadas pelos altos níveis de etileno (Noumavo *et al.*, 2016). Foi observado após a inoculação de uma cepa de *Burkholderia* silenciada para o gene envolvido na atividade da ACC deaminase, a diminuição no crescimento da planta quando comparada a uma cepa selvagem (Souza e Passaglia, 2015).

Outros exemplos de classes de fitormônio são as citocininas e giberelinas. Elas também atuam na divisão celular, no crescimento das raízes e influenciam nos processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal. As citocinas afetam também o atraso da senescência e da produção de clorofila e as giberelinas atuam na floração e no estabelecimento de frutos (Goswami, Thakker e Dhandhukia, 2016). Bactérias promotoras de crescimento que produzem citocinas e giberelinas, como *Azospirillum* e *Pseudomonas* spp., são alguns exemplos encontrados em estudos que apresentam resultados positivos na aquisição de ferro, além de outros nutrientes necessários para o processo de desenvolvimento (Hayat, Ahmed e Sheirdil, 2012).

A biofertilização realizada por microrganismos é o processo que pode potencializar diretamente o acesso a compostos ou também pode realizar a disponibilização de compostos químicos por meios biológicos, atuando na fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo, produção de sideróforos, entre outros (Backer *et al.*, 2018). O nitrogênio é um elemento vital no crescimento das plantas e embora esteja presente na atmosfera em forma de N<sub>2</sub>



(dinitrogênio), ele precisa ser convertido em uma forma utilizável para que seja feita a incorporação do mesmo na planta (Ahemad e Kibret, 2014). Os organismos que realizam essa fixação são os chamados fixadores de nitrogênio ou diazotróficos e são divididos em duas classes: os de vida livre e os simbióticos, ambos detendo um complexo enzimático chamado de nitrogenase. Esse complexo é composto por duas proteínas que são capazes de reduzir o  $N_2$  a  $NH_4^+$  (amônio), permitindo a assimilação de nitrogênio (Martínez-Viveros *et al.*, 2010). O nitrogênio é utilizado na síntese de enzimas celulares, ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), proteínas, clorofila entre outros. Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* são alguns dos microrganismos utilizados na fixação biológica de nitrogênio no cultivo de leguminosas (Hayat *et al.*, 2010). Em leguminosas, o processo de fixação é um assunto amplamente explorado na agricultura, que é beneficiada pela relação simbiótica entre raízes de plantas e microrganismos, reduzindo a necessidade de uma alta aplicação de produtos nitrogenados no solo (Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

O fósforo é um nutriente presente no solo e muitas vezes ele está presente na forma de fosfato inorgânico insolúvel. A assimilação desse elemento é essencial para processos como a respiração, a biossíntese molecular, fotossíntese e vários outros processos metabólicos. As bactérias promotoras de crescimento vegetal têm um papel importante nas estratégias de solubilização do fosfato (Prasad *et al.*, 2019). Uma das estratégias é a produção de ácidos de baixo peso molecular, como ácido carboxílico, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, ácido láctico, ácido fórmico, o que resulta na diminuição do pH do microambiente e favorece a solubilização do fosfato inorgânico (Sayyed *et al.*, 2012). Uma outra estratégia feita por microrganismos é a geração e secreção de enzimas extracelulares que atuam no mecanismo de solubilização de fosfato, como fosfatases, liases e outros (Matilla e Krell, 2018). Na revisão feita por Singh (2013), a inoculação de *Rhizobium leguminismarum* e *Pseudomonas* spp. em trigo demonstraram melhores resultados no rendimento no crescimento e absorção de fósforo do que plantas que não receberam o inóculo.

O ferro é outro micronutriente fundamental no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Ele faz parte da biossíntese da clorofila, da fotossíntese, na assimilação do  $N_2$ , redução de dióxido de nitrogênio e outros processos (Hayat, Ahmed e Sheirdil, 2012). Para que o ferro esteja fisiologicamente disponível, uma forma de obtenção maior desse elemento é por meio de sideróforos. Os sideróforos são substâncias que podem ser produzidas por microrganismos, apresentando baixo peso molecular e uma alta afinidade com o ferro na forma férrica ( $Fe_3^+$ ). Essa grande afinidade faz com que os sideróforos tenham um perfil molecular quelante

(compostos que atuam complexando e inativando íons metálicos) e além desse sequestro, eles também são capazes de fazer o transporte de ferro complexado pelas membranas celulares (Benite, Machado e Machado, 2002), permitindo a diminuição de necessidades metabólicas de ferro, tanto para os microrganismos, quanto para as plantas (Mustafa *et al.*, 2019). São relatados mais de 500 tipos de sideróforos produzidos tanto por fungos, como por bactérias já descritos na literatura, com composições variadas, sendo relatado em trabalhos realizados com diversos vegetais. Em um trabalho com alguns vegetais como milhos, rabanetes, batatas e beterrabas que visava observar as diferentes concentrações de ferro de acordo com os microrganismos presentes no solo próximo as raízes mostrou um aumento na concentração de ferro nas colheitas na presença de *Pseudomonas* spp., pela produção de sideróforos peptídicos, que são também produzidos pelos gêneros *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Scavino e Pedraza, 2013). Além dessa captação de ferro por meio de sideróforos produzidos pelas bactérias promotoras de crescimento gerando uma competição pelo elemento ferro, esse mecanismo de competição também pode ser visto como um impedimento de proliferação de microrganismos patogênicos, mas por nutrientes (Kumar *et al.*, 2015).

Além da inibição do crescimento de fitopatógenos pela competição de captação de ferro, há outras formas de suprimir este crescimento, como a produção de antibióticos e por antagonismo, sendo esses mecanismos de biocontrole os mais eficientes para a supressão de possíveis doenças em plantas (Siddiqui, 2005). As composições dos antimicrobianos varia de compostos difusíveis à voláteis (Berg, 2009; Kour *et al.*, 2019). Uma das classes de antibióticos difusíveis mais conhecidas é a dos lipopeptídeos. Esses metabólitos secundários agem na ruptura da membrana, perdendo assim a viabilidade da célula microbiana. Esses metabólitos podem ser encontrados em *Bacillus* e *Paenibacillus* spp., no qual foi demonstrada atividade antimicrobiana em alguns trabalhos realizados com ênfase em bactérias endofíticas (Cochrane e Vederas, 2014; Tiwari, Prasad e Lata, 2019). Outra bactéria que é aplicada no plantio com o intuito de produção de antibióticos é da espécie *Pseudomonas*, que além dos difusíveis, produzem antibióticos voláteis como cianeto de hidrogênio (Panpatte *et al.*, 2016). Por antagonismo, essa espécie bacteriana pode agir de dois modos: Produzindo antibióticos e/ou enzimas líticas ou favorecendo os microrganismos nativos que já produzem antibióticos (Babalola, 2010).

Por fatores citados anteriormente, a relação entre essas bactérias rizosféricas e as plantas resultam em vantagens, como: i) controle maior de fitopatógenos, ii) melhor nutrição vegetal e iii) maior produção de fitormônios. Sabendo dos efeitos benéficos pela introdução de

microrganismos e visando a uma agricultura mais sustentável, é proposta a utilização de bioinoculantes (Sahu e Brahma Prakash, 2016).

#### 1.4 - Bioinoculantes

Há várias definições para a palavra bioinoculante na literatura. Atualmente este termo é utilizado para descrever um produto que promova o crescimento vegetal, porém que não seja nutriente, pesticida ou algum tipo de produto que corrija o solo (Du Jardin, 2015). Para a formulação de bioinoculantes, são geralmente utilizados microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras ou produtos derivados dos mesmos, que apresentem algum benefício para o crescimento dos vegetais (Yakhin *et al.*, 2017). Um dos primeiros relatos feitos sobre a aplicação de bioinoculante aconteceu no século XIX no qual foi observado o papel da *Beauveria bassiana* no controle das pragas que acometiam as colheitas (Vandana *et al.*, 2017). Desde então, são elaborados inóculos fundamentados no metabolismo e metabólitos gerados por microrganismos com a intenção de reduzir os impactos causados pela aplicação de produtos químicos no solo, gerando uma agricultura mais sustentável, além de tornar o processo mais rentável pela diminuição do uso de insumos (Bona, Lingua e Todeschini, 2016).

Considerando o sucesso de um futuro bioinoculante, é essencial que os microrganismos promotores de crescimento vegetal não sejam patogênicos para os humanos, que tenham uma alta taxa de multiplicação em laboratório e que apresentem 3 características intrínsecas: i) sejam capazes de colonizar a rizosfera/tecido vegetal, ii) além de colonizar, devem sobreviver e se multiplicar pelo tempo necessário para expressar a sua molécula alvo ou ser capaz de exercer sua função alvo e iii) devem conferir proteção e/ou crescimento vegetal (Kumar, 2016).

Para a elaboração de um bioinóculo, há uma maior preferência que os microrganismos sejam isolados de uma amostra retirados da espécie vegetal-alvo, pois estirpes microbianas ali presentes toleram as diferentes condições climáticas e o manejo do solo. Além disso, conhecer o potencial genético dos microrganismos isolados é fundamental para um inóculo bem sucedido (Gosal e Kaur, 2017). Após a escolha dos microrganismos isolados, são realizados testes como de armazenamento, determinação de um meio de cultura que ofereça nutrição necessária para crescimento dos microrganismos, estabelecimento de um tempo médio de viabilidade do produto e outros (Oliveira *et al.*, 2014). Produtos compostos por microrganismos esporulantes são preferíveis pela maior resistência a estresses bióticos e abióticos quando aplicados no ambiente. Já produtos líquidos geralmente tendem a ter um período menor de sobrevivência e necessitam de refrigeração. O próximo passo são testes em casas de vegetação para observar os efeitos da introdução do inóculo nas plantas. As condições oferecidas em ambientes controlados

diferem muito das condições oferecidas em campo. A complexidade oferecida pelo solo deve ser observada e compreendida para que a funcionalidade do bioinoculante não seja perdida devido a estresses encontrados em campo (Mitter *et al.*, 2019).

Para que haja o estabelecimento do bioinóculo no vegetal-alvo, é fundamental que o mesmo tenha resistência a estresses bióticos e abióticos e que não seja específico para apenas um tipo de solo. A utilização do inóculo provavelmente terá uma melhor adaptação em regiões que ofereçam condições semelhantes às da região de onde foram selecionados os microrganismos, porém que não sejam necessariamente específicos a região. Embora a elaboração de um produto exclusivo para um determinado espaço seja mais eficiente, pelo conhecimento prévio das condições oferecidas no solo, do ponto de vista econômico, é mais custoso. Além disso, eles devem apresentar resistência aos componentes dos insumos químicos que geralmente são utilizados na agricultura, para que não haja inviabilidade dos mesmos quando aplicados (Kaminsky *et al.*, 2018). O passo seguinte é o reconhecimento da função do componente (Microrganismos isolados) do bioinoculante através dos efeitos apresentados na planta após o tempo de inoculação em campo. A seleção realizada na primeira etapa serve para a identificação de possíveis genes alvos dos microrganismos que forneçam o crescimento das plantas. Já nessa etapa, é mostrado o desenvolvimento do inóculo frente às diversidades e estresses do local e este reconhecimento pode ser feito por técnicas cultiváveis ou não cultiváveis, sendo cultiváveis os microrganismos que são capazes de formar colônias em meios de cultura e os não cultiváveis os microrganismos que não formam colônias em meio de cultura, porém são detectados por outros métodos (Supaphol *et al.*, 2006). O último passo é o monitoramento e triagem do comportamento desses microrganismos ao longo do tempo de cultivo. Almeja-se que os inóculos testados apresentem uma elevada taxa de sobrevivência e que se mantenham viáveis sendo este um fator fundamental para tornar o produto comercializável (Oliveira *et al.*, 2014).

Os inoculantes microbianos podem ser divididos em 3 principais categorias: i) inoculantes bacterianos, composto por bactérias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato, e outros elementos ii) inoculantes fúngicos, composto por fungos micorrízicos arbusculares e fungos solubilizadores de fosfato ou promotores de biocontrole e iii) consórcios, composto por 2 ou mais inóculos microbianos (Gosal e Kaur, 2017). Os bioinoculantes comercializados atualmente são compostos por rizóbios (79%), seguidos por mobilizadores de fosfato (15%) e produtos micorrízicos (7%) (Suyal *et al.*, 2016).

Pioneiros em estudos sobre o solo apontam uma grande diferença entre número de células observadas ao microscópio em comparação ao crescimento observado em meios de cultivo.

Como uma forma de solucionar essa problemática de microrganismos não cultiváveis, os métodos não cultiváveis (métodos moleculares) vieram como uma proposta de aumentar o conhecimento desses microrganismos (Ritz, 2007). Análises moleculares são importantes para entender melhor o funcionamento dos recursos biológicos e a interação íntima entre a estrutura do microbioma e o hospedeiro (Qiu *et al.*, 2019). Um exemplo para aplicação dos métodos moleculares é para um maior conhecimento de microrganismos endofíticos, que são menos explorados pela dificuldade de cultivo (Berg, 2009). O avanço na tecnologia também permite um maior conhecimento de uma diversidade de microrganismos ainda não explorados e abordagens “ômicas” (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) oferecem uma maior compreensão dessa interação (Mitter *et al.*, 2019). Com um maior entendimento das interações, podem surgir novos microrganismos alvos, como microrganismos participantes de ciclos importantes para o desenvolvimento vegetal, e esses serem explorados no mercado de inoculantes microbianos.

No entanto, o processo de desenvolvimento de inoculantes ainda tem suas limitações e necessita de um maior entendimento. Os mecanismos de ação dos bioinoculantes não são muito bem elucidados, tendo uma menor aceitabilidade (Alori, Dare e Babalola, 2017). Um obstáculo na elaboração de um bioinoculante é a introdução e multiplicação desses microrganismos no solo e atividade efetiva que se busca dos microrganismos. Mesmo com sucesso já documentado, é importante ressaltar que as características do solo não são permanentes, sofrendo alterações ao longo do tempo, como variações de pH, temperatura, teor de umidade e é importante que o inóculo seja resistente a essas alterações (Timmusk *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2019). Outra questão que é levantada por alguns ecologistas é a introdução de microrganismos exóticos em um habitat, o que pode apresentar riscos ao ecossistema ali presente. Embora o solo tenha a capacidade de resiliência, a implementação de novos componentes, mesmo que tenham funções positivas, pode provocar distúrbios à comunidade residente, precisando de um maior estudo sobre impactos de comunidade microbiana após a introdução de bioinoculantes (Mawarda *et al.*, 2020).

O método de aplicação apropriado dos bioinoculantes também é fundamental para o sucesso de um plantio. Poucos estudos são realizados para métodos de aplicação de bioinoculantes, o que acarreta em protocolos diferentes de aplicação e reaplicações não necessárias. Máquinas disponíveis no mercado são geralmente para distribuição de fórmulas granuladas. Há estratégias de aplicação como pulverização que já foram testadas, mas apresentaram uma perda de 50% de viabilidade das células do inóculo, necessitando de mais

trabalhos e o desenvolvimento de um padrão de aplicação (Malusà, Pinzari e Canfora, 2016). Já em relação à proporcionalidade de células, um trabalho feito por Chen e colaboradores (2015) ressalta a problemática da flutuação das populações de cada microrganismo dentro de um consórcio microbiano, podendo acarretar em uma super multiplicação de uma determinada estirpe se sobressaindo as demais. Além disso são feitas buscas para entender a dinâmica ao nível de população e regulação no nível genético dentro desses consórcios microbianos.

Para uma melhor comercialização, os inóculos secos seriam a melhor alternativa. O crescimento microbiano para obtenção de massa microbiana, são predominantemente utilizados meios de culturas líquidos. Há produtos, atualmente, comercializados na textura em gel, contudo, são mais propensos a contaminações durante o processo e na aplicação, além de apresentarem uma vida útil curta. Portanto, para uma de aplicação mais abrangente em outras espécies e homogênea, a formulação seca seria uma melhor opção, necessitando assim de técnicas que permitam a elaboração de um produto viável nesse tipo de formulação (Summauria *et al.*, 2020). Outro ponto em questão é a restrição na qualidade de bioinoculante e a falta de consistência nas regulamentações. As regras são variáveis em diferentes regiões e diferentes países, o que ocasiona uma inconsistência na formulação de um protocolo. Além disso, os processos de regulamentação documental são demorados, complexos, sendo mais um desafio para o registro de um bioinoculante (Timmusk *et al.*, 2017).

No Brasil, o potencial de inoculação comercial não é explorado em sua totalidade por problemas na falta de tecnologias de inoculação, pouca variabilidade dos inoculantes já existentes, em especial para aplicação em mudas de *Eucalyptus*, com poucas metodologias de identificação, seleção e validação de estirpes bacterianas com alto potencial para uso, sendo utilizadas abordagens massivas e generalistas (Oliveira *et al.*, 2014). No cultivo de *Eucalyptus*, Rizolyptus® é um inóculo biológico anteriormente comercializada, no qual é composta por duas espécies, sendo elas as espécies *Bacillus subtilis* e *Frateruria aurantia*. Esse bioinoculante era indicado para otimização no desenvolvimento de raiz, composto por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, com evidências científicas de eficácia testadas (Zarpelon *et al.*, 2016). Embora pioneiro, o bioinoculante Rizolyptus® é um produto incipiente e a fim de ampliar o conhecimento sobre a produção de bioinoculantes para aplicação de mudas de *Eucalyptus*, se faz necessária a elaboração de novas metodologias e ferramentas e/ou otimização dos métodos já existentes.

## 1.5 - Resultados anteriores

O atual trabalho é uma vertente dos estudos realizados para a tese de doutorado do aluno Eduardo da Silva Fonseca, do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana – LABEM da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (Fonseca, 2020).

A tese foi desenvolvida sob a problemática do excessivo uso de insumos agrícolas, como fertilizantes químicos, no plantio de *Eucalyptus* e a busca por alternativas mais sustentáveis que diminua o uso desses insumos.

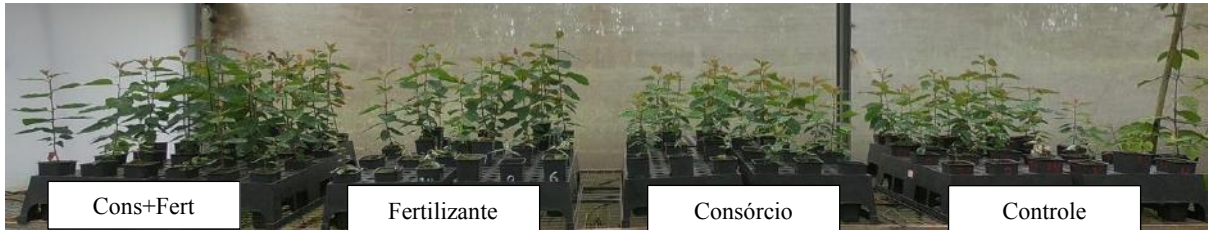
Para isso, o desenvolvimento do trabalho se pautou na elaboração de um consórcio microbiano, composto por microrganismos que apresentam potencial para solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e produzir ácido indolacético. A partir do isolamento de 172 bactérias endofíticas de *Eucalyptus*, 4 delas foram selecionadas para compor o consórcio, após apresentarem um bom desempenho em testes laboratoriais. Os 4 isolados são pertencentes aos gêneros *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Methylobacterium* e *Mesorhizobium*.

Para observar os efeitos da aplicação do consórcio em mudas de *Eucalyptus*, foram realizados testes em casa de vegetação para observar o crescimento e desenvolvimento das mudas de *Eucalyptus* e de análise microbiológica para observar as mudanças que ocorrem no microbioma das mudas após a aplicação do consórcio. O experimento foi composto por 4 tratamentos, sendo eles: i) controle (Ctrl); ii) adição de fertilizante de liberação lenta Osmocote (NPK, 19-06-10) (F); iii) adição do consórcio bacteriano (C) e iv) adição do consórcio mais fertilizante (C+F). O experimento foi monitorado por 77 dias (Figura 4) e teve como parâmetros avaliados a taxa média de sobrevivência, biomassa e altura. A análise metagenômica demonstrou a estrutura taxonômica da comunidade microbiana da rizosfera das mudas de *Eucalyptus*, sendo importante para entender como a aplicação do consórcio afeta a microbiota rizosférica.

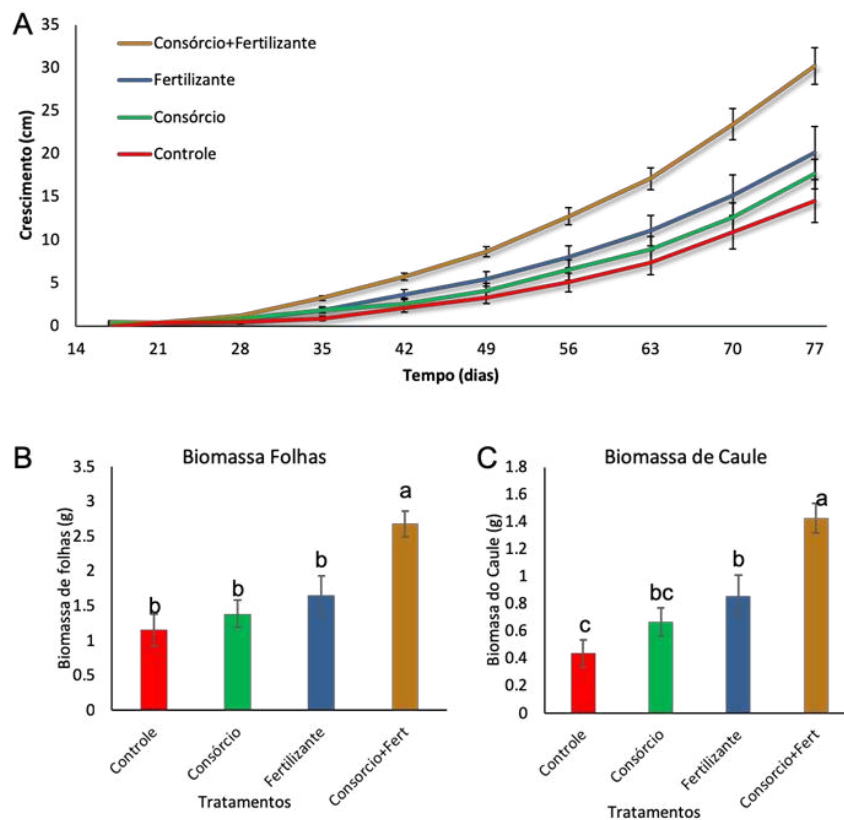
O experimento na casa de vegetação mostrou que mudas que receberam o consórcio+fertilizante apresentaram média de altura maior do que a média de altura das mudas que receberam só o fertilizante, mudas que receberam só o consórcio e o controle (Figura 5). Também foi observado um efeito similar à da altura na biomassa foliar e caular das mudas (Figura 5).

Em relação a sobrevivência das mudas, o tratamento consórcio apresentaram uma média superior aos demais tratamentos até o dia 56º de experimento. Após esse período, a média de altura se igualou ao tratamento consórcio+fertilizante, seguido pelo tratamento com fertilizante e o tratamento controle (Figura 6).

O experimento mostrou que mudas que receberam o consórcio tiveram uma maior taxa de sobrevivência comparadas às mudas de outros tratamentos e também foi observada uma maior taxa de desenvolvimento em mudas que receberam o consórcio+fertilizante, demonstrando um grande potencial biotecnológico no plantio de *Eucalyptus*.

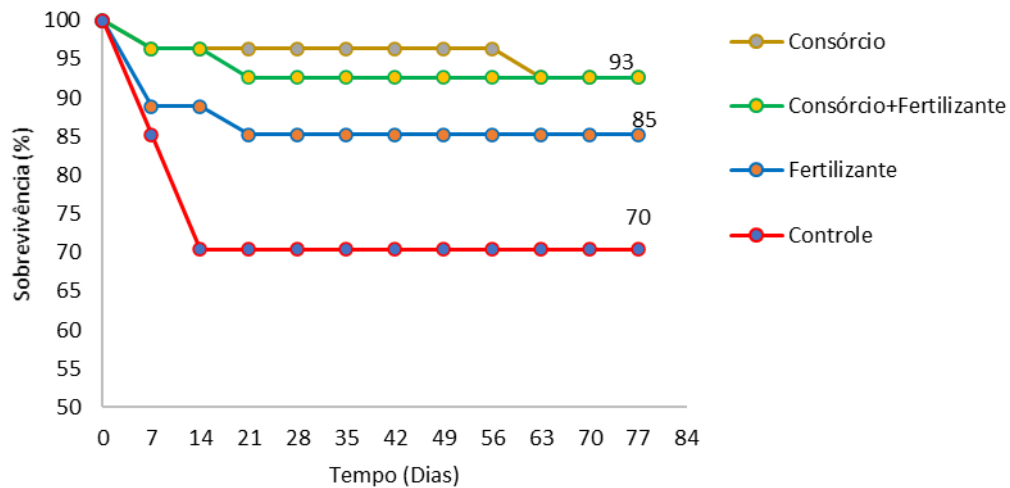


**Figura 4.** Foto após 77 dias da inoculação do consórcio nas mudas de *Eucalyptus*. Da esquerda para direita, os tratamentos consórcio+fertilizante, fertilizante, consórcio e controle, respectivamente.



**Figura 5.** Desenvolvimento das mudas de *Eucalyptus* frente a aplicação do consórcio microbiano e fertilização. (A) Crescimento (cm); (B) Biomassa foliar (g) e (C) Biomassa caulinar (g).





**Figura 6.** Curva de sobrevivência das mudas de *Eucalyptus*, demonstrando a influência do consórcio microbiano e da fertilização.

Nesse pequeno resumo dos resultados obtidos por Fonseca (2020), ficou evidente o potencial de promoção do crescimento vegetal promovido pelo consórcio bacteriano. Contudo, o trabalho foi composto por um ensaio em casa de vegetação, surgindo assim novas perguntas, como: i. qual a melhor concentração do inóculo, ii. qual o efeito das estirpes bacterianas isoladamente nas mudas, iii. qual a capacidade do inóculo de permanecer viável após dias de crescimento bacteriano, iv. qual possível perda de eficácia do consórcio por refrigeração, v. avaliação da efetiva colonização dos isolados nas mudas. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de sanar essas questões, de modo a avançar no desenvolvimento do consórcio bacteriano promotor do crescimento vegetal.

## 2 - Justificativa

O Brasil é um grande produtor de *commodities* e parte dessa economia advém do setor florestal, com ênfase no plantio de *Eucalyptus*. Com o objetivo de ampliar a produtividade do plantio e de melhorar o das plantas, atualmente são utilizados fertilizantes, hormônios e insumos químicos que são caros e podem ser nocivos ao meio ambiente.

O setor florestal utiliza pouco o potencial da associação entre microrganismos e plantas para a otimização da produção de mudas e para a melhoria da adaptação das plantas em campo, quando comparado a outros setores agrícolas mais tradicionais, tais como a produção de soja, milho, feijão, cana e forrageiras. Os setores citados acumulam diversos estudos com o uso de inoculantes microbianos, porém há uma escassez quando se trata do setor florestal necessitando de estudos e tecnologias que atendam essas áreas.

Com o propósito de encontrar uma alternativa mais sustentável, baseada em biotecnologia microbiana, foi elaborado um consórcio bacteriano composto por 4 estirpes com características das bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB), em estudo prévio. Dados prévios sugerem que a aplicação desse consórcio tem potencial de aumentar o crescimento de muda de *Eucalyptus*, provavelmente pela maior disponibilização de nutrientes (Fonseca *et al.*, 2017; Fonseca, 2020).

Contudo, o trabalho supracitado fez apenas um teste em casa de vegetação, e promoveu a inoculação microbiana em uma única condição. Dessa forma, existem ainda muitas oportunidades de aperfeiçoamento do produto e de avanço no conhecimento sobre a microbiologia do *Eucalyptus*. Assim, para entender melhor a reprodutibilidade do efeito da inoculação do consórcio PGBP em *Eucalyptus* e aperfeiçoar o consórcio e sua aplicação, esse trabalho tem como proposta.

### 3 - Objetivo

Otimização do uso de um consórcio bacteriano bioestimulante de mudas de *Eucalyptus*.

#### 3.1 – Objetivos específicos

- Estabelecer o meio de cultura adequado para crescimento de cada bactéria componente do consórcio;
- Analisar a taxa de sobrevivência, desenvolvimento e biomassa média das mudas com diferentes concentrações do consórcio bacteriano, em casa de vegetação;
- Analisar a taxa de sobrevivência, desenvolvimento de raiz e biomassa média das mudas de *Eucalyptus* após a aplicação das estirpes que compõem o consórcio individualmente, em casa de vegetação;
- Avaliar o tempo de viabilidade do consórcio bacteriano *in vitro*;
- Analisar a influência da refrigeração sobre a efetividade do consórcio;
- Avaliar o desenvolvimento das mudas inoculadas de maneira alternativa à inoculação inicial;
- Avaliar a efetividade da colonização das mudas pelas bactérias do consórcio através do sequenciamento massivo do gene que codifica a subunidade do 16S rRNA de bactérias endofíticas de raiz.

## 4 - Materiais e Métodos

### 4.1 – Desenho experimental

#### 4.1.1 Obtenção do consórcio

O consórcio bacteriano utilizado nesse trabalho foi obtido da coleção de bactérias endofíticas do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana - LABEM, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A seleção das 4 estirpes que compõem o consórcio foi realizada por Fonseca (2020), e foram previamente identificadas como *Paenibacillus* sp. (Do filo Firmicutes), *Paraburkholderia* sp. (Do filo Proteobacteria), *Methylobacterium* sp. (Do filo Proteobacteria) e *Mesorhizobium* sp. (Do filo Proteobacteria), sendo identificadas no laboratório com os códigos 3.1, 1.2, 21A e 87, respectivamente.

#### 4.1.2 – Cultivo e manutenção do consórcio

Para fins de cultivo, as estirpes do consórcio foram submetidas individualmente ao crescimento em meio líquido *Fitato low* para crescimento. O meio *Fitato low* tem uma redução de 75% da concentração do reagente fitato de cálcio em relação à concentração do meio *Fitato* utilizado no trabalho de Fonseca (2020). As estirpes foram inoculadas e incubadas a 30°C durante 48 horas sob agitação constante de 150 rpm.

As culturas com crescimento bacteriano foram mantidas em placas de Petri contendo o meio *Fitato low* solidificado (ágar a 1,5%) pela técnica de esgotamento em estrias, utilizando alça de platina estéril para obtenção de colônias isoladas. Foram então incubadas a 30°C durante 48 horas na estufa e posteriormente foram refrigeradas, com o intuito de retardar o crescimento bacteriano.

#### 4.1.3 – Preparo do experimento em casa de vegetação

Para os experimentos em casa de vegetação, foram utilizadas matrizes do clone CNB001, híbrido das espécies *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, gentilmente doadas pela empresa Celulose NipoBrasileira S.A. (CENIBRA). O sistema de produção de muda foi realizado pela técnica de miniestaquia, que é uma técnica de propagação vegetativa, que se utiliza do potencial de enraizamento do broto. Como recipiente, foram utilizados tubetes com comprimento de 12 cm, diâmetro superior externo com 3,5 cm, diâmetro superior interno 2,8 cm e capacidade de volume interno total de 55 mL, feitos de polipropileno. Os tubetes foram preenchidos com o substrato comercial Carolina Soil® junto com o fertilizante de liberação

lenta Osmocote (NPK, 19-06-10). O fertilizante foi utilizado na proporção de 5 g/L do substrato. Os dois produtos foram homogeneizados e inseridos nos tubetes.

Durante os experimentos, os processos de irrigação aconteceram por aspersão e microaspersão, tendo diferentes ciclos de irrigação, de forma automatizada. As variações dos ciclos se deram pelas modificações climáticas de cada estação, sempre mantendo alta a umidade no solo.

#### 4.1.4 - Monitoramento Vegetal

O monitoramento das mudas ocorreu de forma periódica (14 e 28 dias) acordo com o experimento a ser realizado. A duração média para os experimentos foi de até 3 meses, contando a partir do dia do plantio. Quando necessário, foi realizada a aplicação de defensivos agrícolas para eliminação de pragas que vieram a acometer as mudas.

Ao longo de cada experimento foram feitas avaliações de sobrevivência das mudas (por seleção visual) e a altura da parte aérea (medida com uma trena, sendo considerado desde a parte basal até a parte apical). No final dos experimentos, foi analisada a biomassa aérea seca. Para tanto, toda a parte aérea foi separada da parte radicular e o material foi seco a 60°C por 48 horas em uma estufa de circulação forçada. Todo o material seco foi pesado em uma balança analítica.

#### 4.2 – Experimento 1 - Avaliação de diferentes meios de cultivo para a manutenção das estirpes do consórcio

Este experimento teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes meios de cultura na manutenção e cultivo das estirpes do consórcio bacteriano. O cultivo inicial das bactérias foi feito conforme o explicado no item 4.1.2. As placas contendo crescimento das 4 estirpes foram repicadas em frascos com 20 mL dos seguintes meios de cultura: Trypticase Soy Broth (TSB) comercial da empresa Kasvi®, *Fitato low* (Anexos), Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YEPD) (Anexos) e Yeast Extract-Peptone-Glucose (YEPG) (Anexos), com o auxílio de uma alça microbiológica estéril. Os frascos com os meios foram incubados a 30°C sob agitação a 150 rpm por 48 horas.

O crescimento das estirpes que compõem o consórcio bacteriano nos diferentes meios de cultura foi medido pela densidade ótica (DO) com o uso de um espectrofotômetro, verificado a 600 nm e utilizando-se 2 mL de meio de cultura com bactéria a cada leitura. As 4 estirpes com meio foram diluídas e/ou concentradas com solução salina PBS (Anexos) e padronizadas. A

cada 2 horas, foram realizadas leituras de DO, sendo realizado 3 vezes, a partir das primeiras 2 horas de inoculação. O processo teve duração de 6 horas e observou o crescimento inicial de cada estirpe nos 4 meios de culturas testados.

### 4.3 - Experimento 2 – Avaliação da concentração mais adequada do consórcio bacteriano

O experimento teve a finalidade de estabelecer qual a concentração mais adequada do consórcio para inoculação em miniestacas de *Eucalyptus*. O cultivo das bactérias foi feito em meio líquido, conforme descrito no item 4.1.2. O crescimento das estirpes que compõem o consórcio bacteriano foi medido pela densidade ótica com o uso de um espectrofotômetro, verificado a 600 nm, utilizando-se 2 mL de meio de cultura com bactéria a cada leitura. Após a leitura no espectrofotômetro, as 4 estirpes com meio foram padronizadas em 3 concentrações diferentes: DO 0,04, 0,4 e 4. Assim, quando foram reunidas, as bactérias estavam em concentrações individuais de DO 0,01, 0,1 e 1. Essas concentrações equivalem a concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) como previamente determinado para essas bactérias, em curvas de crescimento realizadas no trabalho de Fonseca (2020), no qual 0,04 correspondia a  $10^6$  UFC/mL, 0,4 correspondia a  $10^7$  UFC/mL e 4 correspondia a  $10^8$  UFC/mL.

Após a padronização, as 4 estirpes de cada concentração foram reunidas, formando assim o consórcio. Para o experimento, foram utilizados 4 tratamentos, sendo um controle (sem adição do consórcio), e os demais denominados 1X 10X e 100X, de acordo com as concentrações crescentes do inóculo.

A montagem dos tubetes foi realizada como descrito no item 4.1.3. Após a retirada das miniestacas das matrizes, as mesmas foram postas em uma bandeja com água para evitar o ressecamento durante o processo. Para a inoculação do consórcio, a base de cada miniestaca foi imersa nas soluções contendo o consórcio e então transplantadas para os tubetes. O monitoramento ocorreu conforme descrito no item 4.1.4.

### 4.4 – Experimento 3 – Aplicação de cada componente do consórcio separadamente

O experimento teve o propósito de avaliar se as bactérias funcionariam melhor na forma de consórcio ou na forma individualizada. Para a realização deste, o cultivo das bactérias foi

feito conforme o explicado no item 4.1.2. As estirpes que compõem o consórcio foram padronizadas individualmente na concentração 0,4, conforme previamente descrito (item 4.2).

Foram utilizados 6 tratamentos, sendo estes i) o consórcio completo, ii) apenas a estirpe 1.2. iii) apenas a estirpe 3.1, iv) apenas a estirpe 21A, v) apenas a estirpe 87 e vi) controle. A inoculação, monitoramento e análises dos tratamentos foram executados de acordo com o descrito nos itens 4.1.4 e 4.2.

#### 4.5 – Experimento 4 - Teste de tempo de prateleira

O experimento teve a intenção de avaliar, *in vitro*, o tempo de viabilidade do consórcio mantido em meio líquido. O cultivo das bactérias foi feito conforme o explicado no item 4.1.2. A padronização foi realizada conforme descrito no item 4.2, na concentração 0,4 e também foi feita a montagem do consórcio. O consórcio foi distribuído em 10 tubos de centrífuga de 2 mL contendo 1 mL cada. Os frascos foram refrigerados com temperatura variando de 4 a 7°C.

A cada semana, durante três semanas (18/02/2019, 25/02/2019 e 15/03/2019), foi retirado um tubo da refrigeração e 0,1 mL do conteúdo do frasco foi diluído a  $10^{-3}$ . O conteúdo foi plaqueado em placa de Petri contendo meio de cultura *Fitato low* (Anexos), em triplicata, com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas. A análise do crescimento das estirpes foi realizada visualmente e foi feita a contagem de UFC/mL que cresceram na superfície do meio de cultura.

Após 48h da inoculação de cada alíquota, foi realizada a contagem de unidade formadora de colônias de cada placa, sendo o cálculo:

$$\frac{\text{Número de colônias} \cdot \text{Fator de Diluição}}{\text{Volume}} = \text{UFC/mL}$$

Onde:

UFC/mL: Unidade formadora de colônias por mililitro.

#### 4.6 – Experimento 5 – Avaliação da efetividade do consórcio após refrigeração

O objetivo do experimento foi observar os efeitos nas mudas inoculadas com o consórcio após o período de refrigeração. O cultivo das bactérias foi realizado conforme o explicado no item 4.1.2. As estirpes que compõem o consórcio foram padronizadas individualmente na concentração 0,4, conforme previamente descrito (item 4.2). Foram utilizados 3 tratamentos, sendo estes i. o consórcio sem passar por refrigeração, ii. o consórcio refrigerado por 24 horas em geladeira com temperatura variando de 4 a 7°C. e iii. controle. A inoculação, monitoramento e análises dos tratamentos foram realizados de acordo com o descrito nos itens 4.1.4 e 4.2.

#### 4.7 – Experimento 6 - Avaliação das mudas inoculadas de maneira alternativa à inoculação

O objetivo do experimento foi observar se haveria uma maior abundância dos gêneros bacterianos inoculados em comparação com o tratamento sem o inóculo. O cultivo das bactérias foi realizado conforme o explicado no item 4.1.2 As estirpes que compõem o consórcio foram padronizadas individualmente na concentração 0,4, conforme previamente descrito (item 4.2).

Nesse experimento, foi aplicado 0,1 mL do consórcio diretamente no substrato com o auxílio de uma pipeta, após o preparo dele, como detalhado no item 4.2. O experimento foi composto por 2 tratamentos, i) Com consórcio e ii) Controle e foi monitorado e analisado como descrito (item 4.1.4).

#### 4.8 - Experimento 7 - Avaliação da eficácia de inoculação por sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S rRNA

Para serem utilizados como bioinoculantes, os componentes do consórcio devem apresentar, além da capacidade de multiplicação, a capacidade de se estabelecerem nas raízes das mudas de *Eucalyptus*. Para confirmar a colonização dos componentes do consórcio, foi realizado o sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S rRNA a fim de identificar a presença nas raízes e observar a presença dos gêneros *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Methylobacterium* e *Mesorhizobium* nas mudas que receberam o inóculo e comparar com mudas que não receberam o inóculo.



#### 4.8.1 – Extração de DNA radicular

Foram selecionadas 3 mudas que receberam o consórcio do experimento anteriormente descrito (4.7.1) e 3 mudas do tratamento controle. A parte aérea e a parte radicular foram separadas com o auxílio de uma tesoura. A parte radicular de todas as mudas foi separada e cuidadosamente lavada para retirada do solo, e que posteriormente passaram por um protocolo de desinfecção (Anexos).

As raízes desinfectadas foram maceradas em nitrogênio líquido. O material macerado foi submetido à extração do material genômico através do kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi realizada por fluorometria, com o uso do aparelho Qubit 3.0™, da Thermo Fisher Scientific®.

#### 4.8.2 – Sequenciamento

O material genético adquirido pela extração de DNA foi enviado para sequenciamento massivo da região V3-V4 do gene que codifica o 16S rRNA. Para tanto, o DNA foi submetido à uma reação de PCR, utilizando os iniciadores 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) (Muyzer, 1993) e 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT) (Caporaso *et al.*, 2010), gerando fragmentos com aproximadamente 450 pares de bases. O sequenciamento foi realizado pela plataforma MiSeq™ System - Illumina®, pela empresa NOVOGENE Corporation (Sacramento, CA, USA).

#### 4.8.3 - Análise de bioinformática

O arquivo de leitura foi processado seguindo diferentes critérios do programa Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Com o uso do programa foram realizadas: i) As montagens dos *contigs*, através da união das sequências *forward* e *reverse*; ii) Retirada das sequências de baixa qualidade, removendo sequências ambíguas ( $\text{maxambig}=0$ ), com mais de 8 polímeros e sequências com tamanhos diferentes do tamanho de amplicon esperado ( $\text{minlength}=450$ ,  $\text{maxlength}=480$ ); iii) Alinhamento das sequências utilizando o banco de dados Silva, realizando assim um PCR virtual com os mesmos iniciadores das amostras; iv) Redução de erros, com formação de pré-cluster, sendo retiradas as sequências e colunas não alinhadas; v) Remoção de sequências quiméricas, evitando a concatenação de 2 ou mais genes; vi) Remoção de contaminantes encontrados, como mitocôndrias, cloroplastos, eucariotos, arqueas; vii) Definição de OTUs (Operational Taxonomic Unit), sendo comparadas ao banco de dados

Ribosomal Database Project (RDP) e distribuição de OTUs, sendo esse um segundo PCR virtual com a união das sequências com o banco de dados, necessitando 97% de similaridade para o agrupamento; viii) Retirada de *singletons*, sendo essas leituras com uma sequência; ix) Normalização dos dados, com base nas sequências contidas em cada grupo e subamostragem; x) Geração dos índices de  $\alpha$ -diversidade; xi) Geração da curva de rarefação e rarefação compartilhada, para comparar a riqueza das amostras corrigido pelo número de sequências; xii) Determinação da comunidade microbiana e avaliação dos táxons presentes; xiii) Determinação da identidade das OTUs; xiv) Identificação das OTUs impactadas. O item xiv foi utilizado a plataforma Galaxy para ser feita a análise discriminante linear. Por fim, foram feitas as análises estatísticas de  $\beta$ -diversidade.

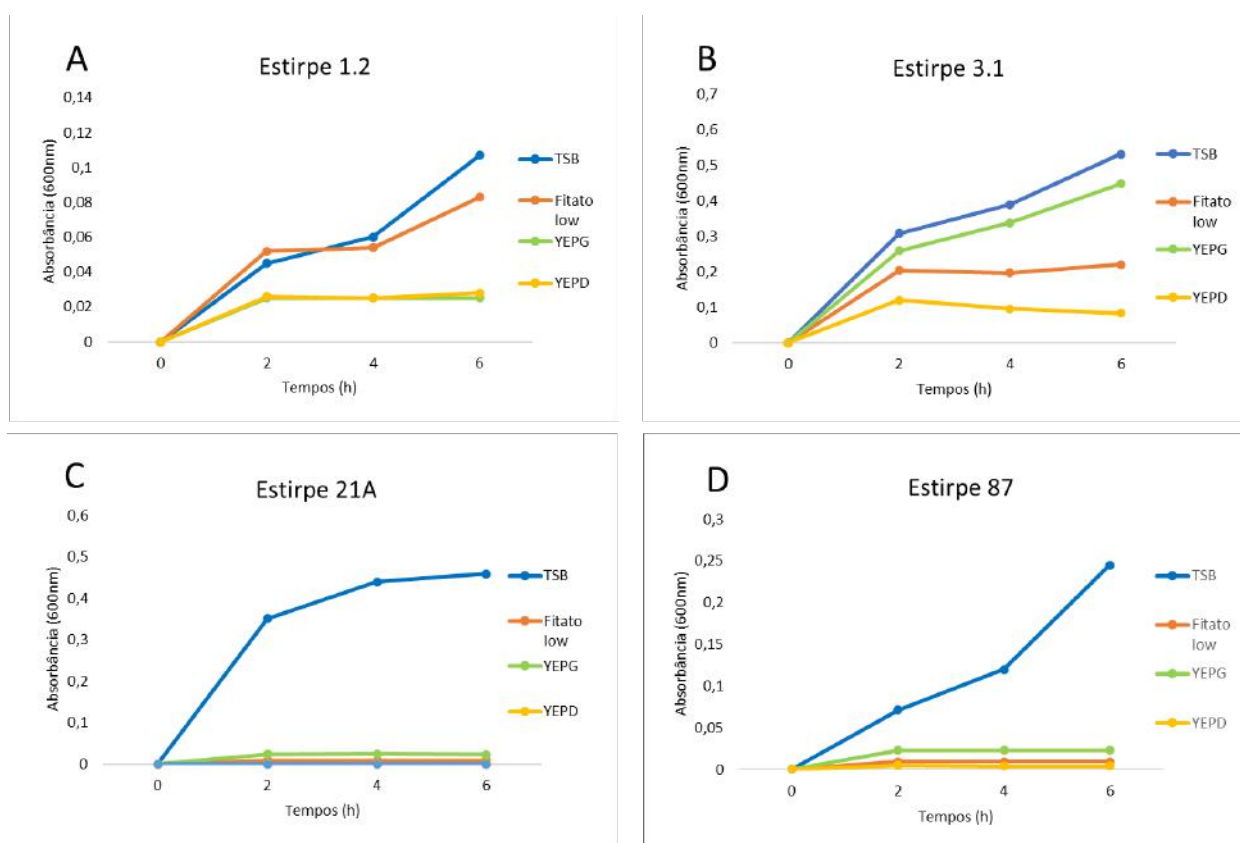
#### 4.8.4 - Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos 2, 3 e 5 foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias e os resultados do experimento 6 foram submetidos ao Teste t seguidos por teste de Tukey, com a verificação de normalidade e a homocedasticidade dos dados, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Foi realizada uma análise de  $\beta$ -diversidade a partir dos resultados obtidos pelo item 4.7.2.3, por um escalonamento multidimensional não métrico (nMDS), em duas dimensões, com distância de Bray-Curtis. Os resultados obtidos em curvas de sobrevivências foram submetidos ao teste de Long-rank. As análises estatísticas e a ordenação foram realizadas no *software* Past 4.03 (Hammer, Harper e Ryan, 2001).

## 5 - Resultados

### 5.1 - Experimento 1 - Avaliação de diferentes meios de cultivo para a crescimento das estirpes do consórcio

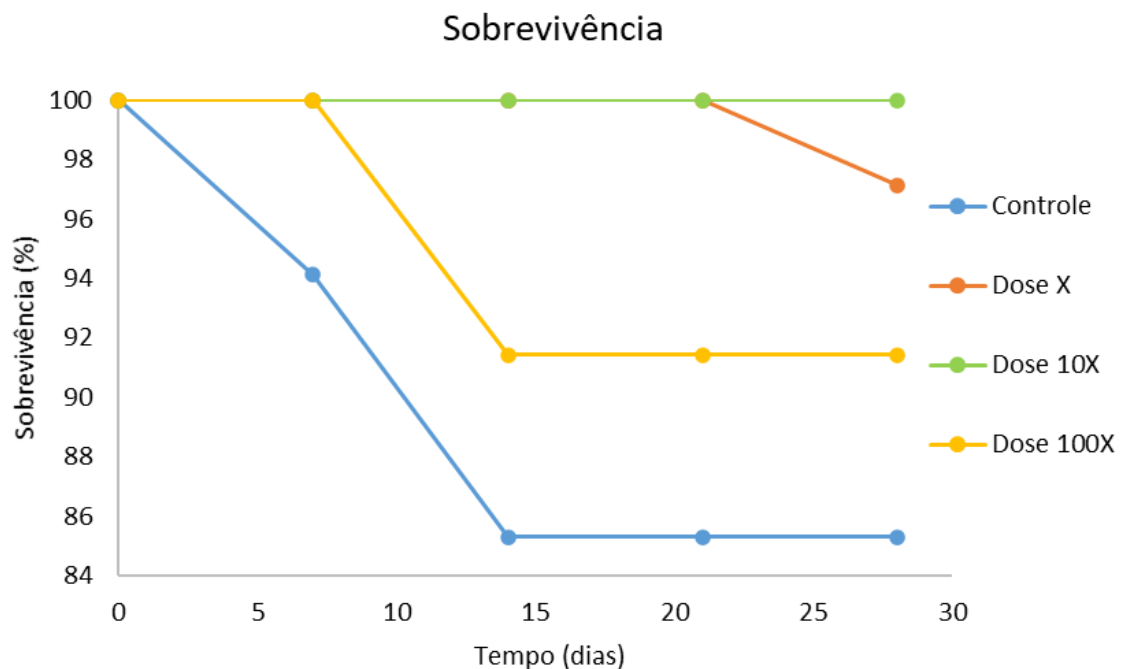
O primeiro experimento teve o objetivo de observar o crescimento das estirpes que compõem o consórcio bacteriano em diferentes meios de cultivo. As curvas de crescimento geradas para cada estirpe, nos diferentes meios estão representadas na Figura 7. Ao final das 6 horas, todas as estirpes crescidas no meio TSB apresentaram um maior crescimento em comparação aos demais meios. Contudo, a diferença de crescimento das estirpes em outros meios, como o *Fitato low* e YEPG foram pequenas para as estirpes 1.2 e 3.1 respectivamente. As estirpes 21A e 87 não saíram da fase lag, nos meios *Fitato low* e YEPG e YEPD durante o experimento.



**Figura 7.** Curva de crescimento bacteriano nos 4 meios de cultura diferentes, sendo esses: TSB (azul), *Fitato low* (laranja), YEPG (verde) e YEPD (amarelo). (A) Crescimento da estirpe 1.2; (B) Crescimento da estirpe 3.1; (C) Crescimento com a estirpe 21A; (D) Crescimento da estirpe 87.

## 5.2 - Experimento 2 – Avaliação da melhor concentração de inoculação do consórcio bacteriano

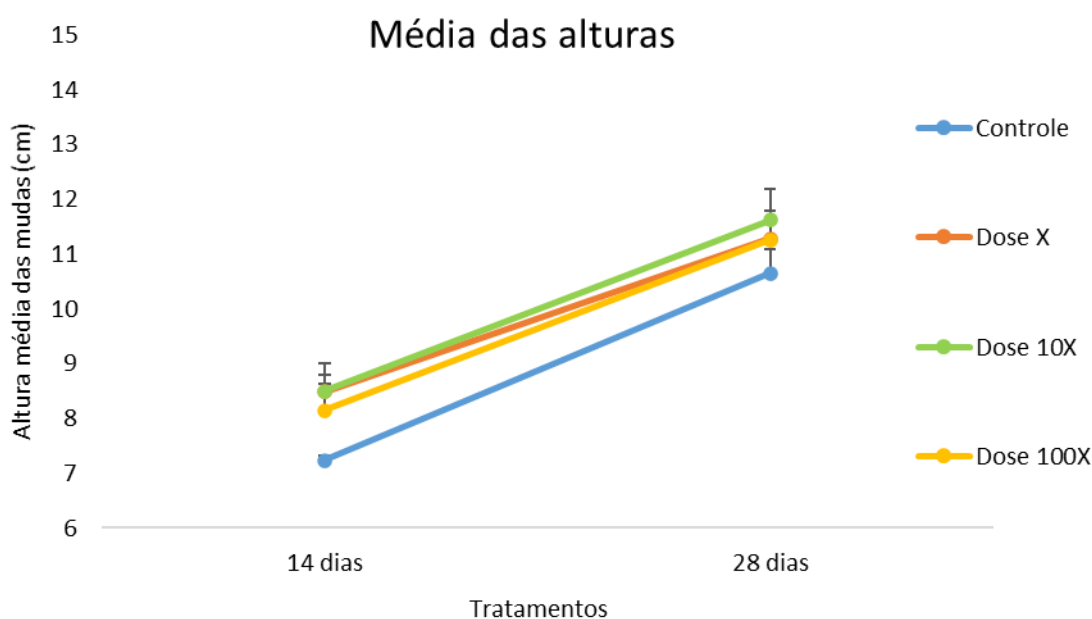
O experimento 2, com duração de 40 dias (16/01/2019 - 25/02/2019), teve como objetivo, avaliar diferentes concentrações do consórcio bacteriano, como inoculante. O experimento foi formado por 4 tratamentos, sendo eles: i) controle, ii) dose X, iii) dose 10X e iv) dose 100X e cada tratamento foi aplicado em 35 mudas. Após os primeiros 28 dias, tempo necessário para determinar se a muda irá se desenvolver ao longo do experimento, foi analisada a taxa de sobrevivência das mudas frente às diferentes doses (Figura 8). A dose 10X apresentou 100% de sobrevivência das mudas, mostrando-se uma boa concentração para este inóculo. A dose X demonstrou um resultado similar à dose 10X, com uma pequena diferença de sobrevivência (97,1%). A dose 100X e o tratamento controle apresentaram uma taxa de sobrevivência de 91,4% e 85,2%, respectivamente.



**Figura 8.** Curva de sobrevivência das mudas de *Eucalyptus* (n inicial de 35 mudas) submetidas a 3 diferentes doses do consórcio (Doses X, 10X e 100X) e o controle por 28 dias.

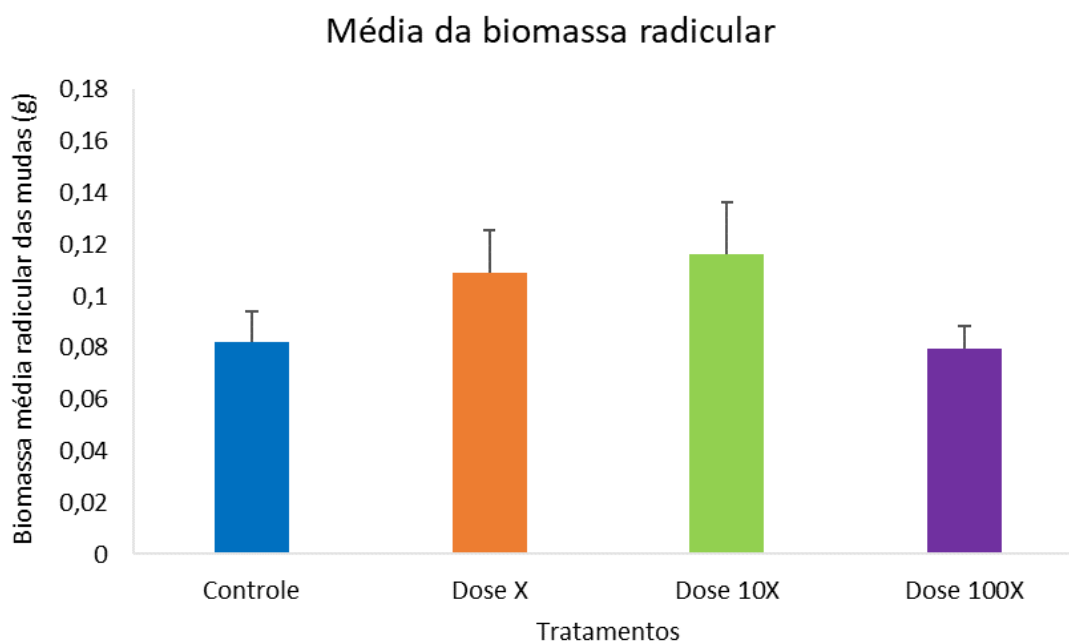
Em relação à altura das mudas, a dose 10X apresentou a maior média entre os tratamentos, sendo essa 11,85 centímetro (cm). Os tratamentos dose 100X, dose X e controle obtiveram as médias 11,78 cm, 11,07 cm e 10,70 cm, respectivamente (Figura 9). Com base em uma ANOVA

de duas vias (tempo x tratamento) ( $p < 0,05$ ), foi possível verificar diferenças significativas entre os tratamentos, sendo as doses 10X e X superiores ao controle.



**Figura 9.** Altura média das mudas de *Eucalyptus* submetidas a 3 diferentes doses do consórcio (Doses X, 10X e 100X) e o controle, nos dias 14 e 28 do experimento. Os pontos representam médias ( $n \cong 35$ ) e as barras representam a medida de erro padrão.

Para analisar a biomassa radicular seca, foram selecionadas 15 mudas sobreviventes de cada tratamento no final do experimento (Figura 10). O tratamento dose 10X obteve o peso médio numericamente maior que os demais, sendo esse 0,116 gramas (g). As doses X (0,109 g), controle (0,082 g) e dose 100X (0,079 g). Apesar do tratamento 10X ter média 40% superior ao controle, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,20$ ). Há de se considerar que em modelos biológicos submetidos a testes *in vivo*, há grande variabilidade intrínseca, e que este teste foi feito com um número amostral ( $n = 15$ ) menor que o teste de altura. Assim, apesar dos valores terem uma relevância em termos de produtividade, o efeito não é detectável dentro do modelo estatístico adotado.

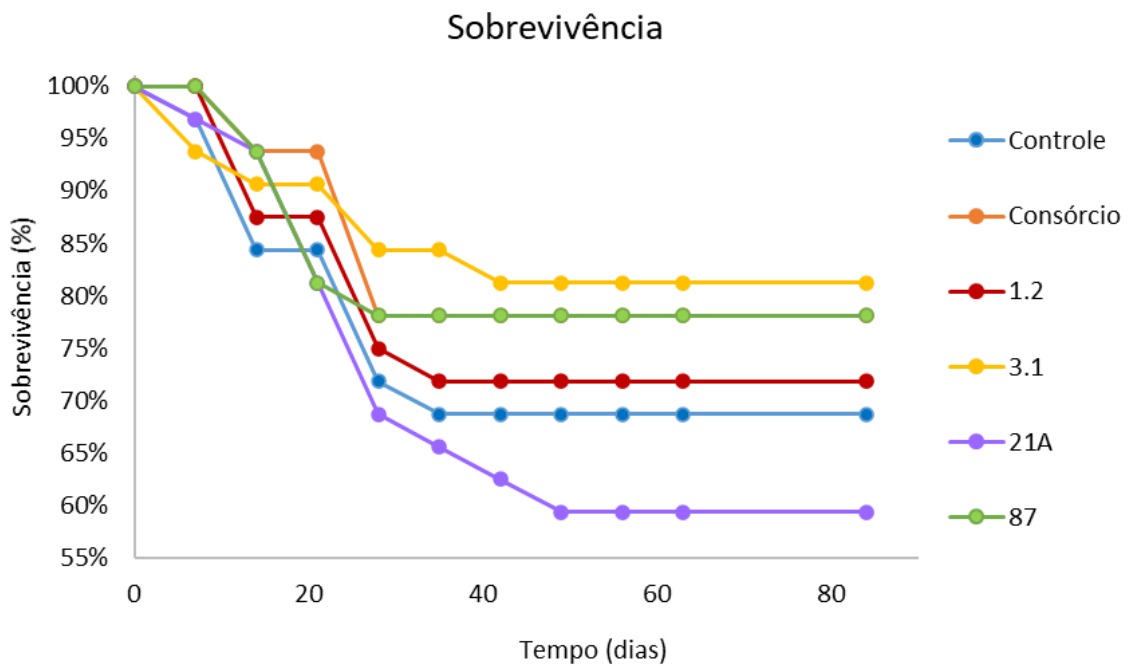


**Figura 10.** Biomassa média radicular das mudas de *Eucalyptus* submetidas a 3 diferentes doses do consórcio (Doses X, 10X e 100X) e o controle. As barras representam médias (n=15) e as barras de desvio representam a medida de erro padrão.

Também é relevante notar que a resposta aos tratamentos apresenta uma tendência de uma parábola negativa, na qual ausência de doses ou doses muito altas tendem a apresentar desenvolvimentos radiculares menores.

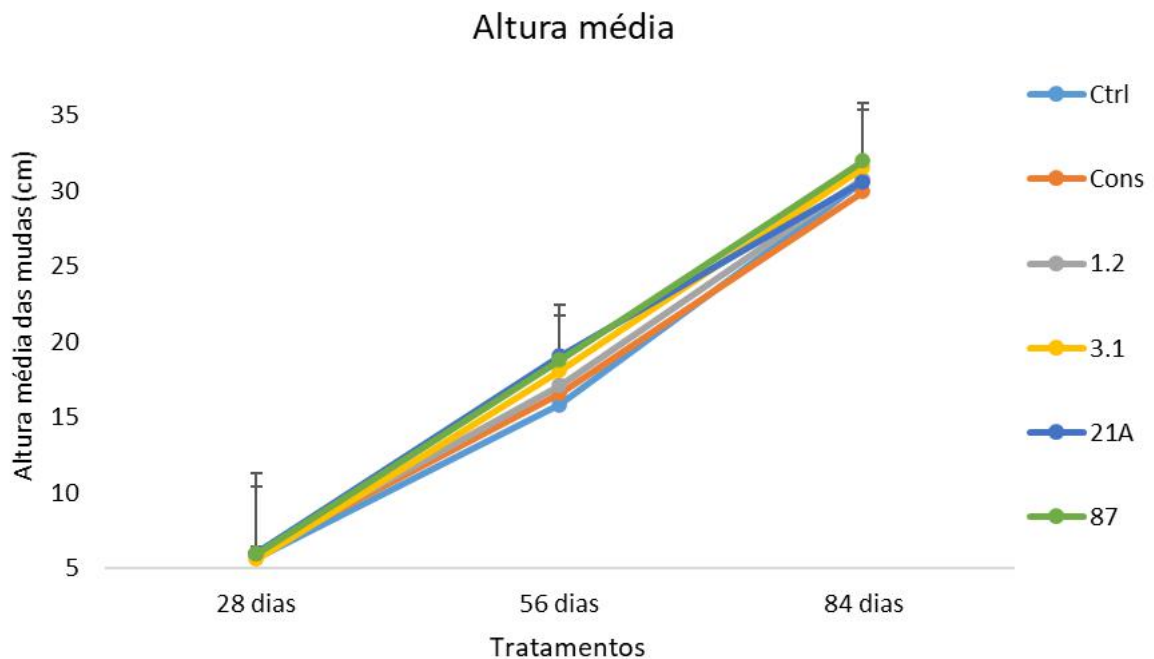
### 5.3 – Experimento 3 – Aplicação de cada componente do consórcio separadamente

O experimento 3, com duração de 84 dias (26/06/2019 – 18/09/2019), teve como finalidade entender a influência das estirpes de modo individual nas mudas de *Eucalyptus*. Ele foi composto por 6 tratamentos, sendo eles: i) controle, ii) consórcio, iii) estirpe 1.2, iv) estirpe 3.1, v) estirpe 21A e vi) estirpe 87, aplicados a 32 mudas cada. Ao final do experimento, a curva de sobrevivência apontou uma maior taxa de sobrevivência para o tratamento com a estirpe 3.1 (81,25%), seguido pelos tratamentos consórcio (78,13%), com a estirpe 87 (78,13%), com a estirpe 1.2 (71,88%) e controle (68,75%). O único tratamento que apresentou uma menor taxa de sobrevivência comparado ao controle foi o tratamento com a estirpe 21A (59,38%), mas sem diferença estatística (Figura 11).



**Figura 11.** Curva de sobrevivência das mudas de *Eucalyptus* (n inicial de 32 mudas) que foram expostas aos inóculos de cada componente do consórcio de forma isolada (1.2, 3.1, 21A e 87), consórcio e o controle por 84 dias.

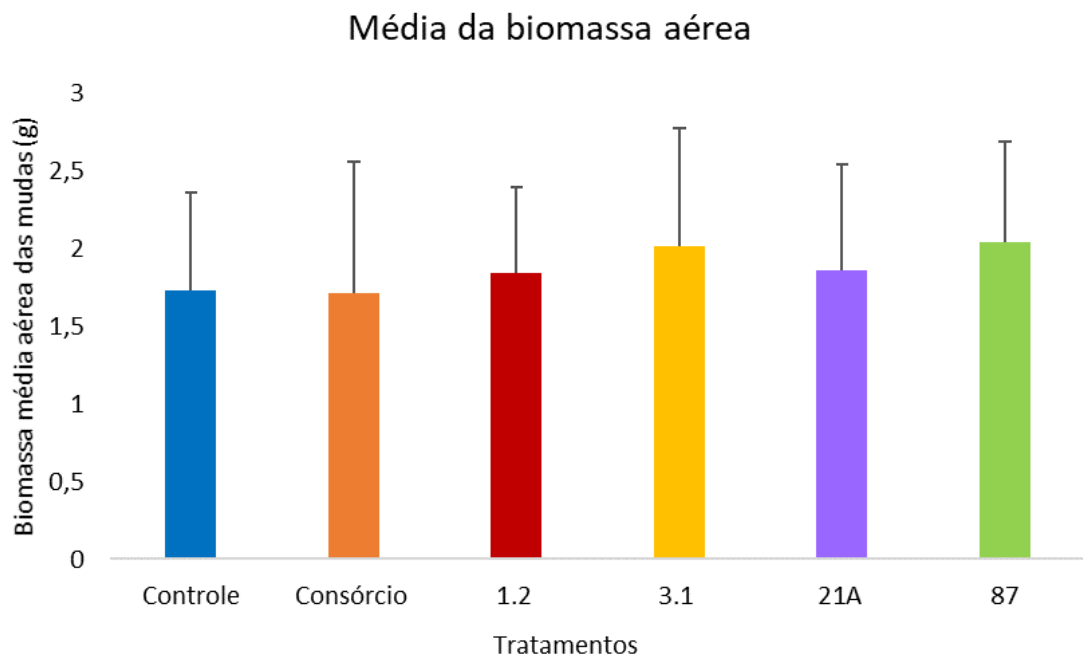
No parâmetro altura, foi realizada a última medição no dia 84 do experimento, no qual o tratamento com a bactéria 87 mostrou o maior tamanho comparado aos demais tratamentos (31,96 cm). O tratamento com a bactéria 3.1 apresentou 31,51 cm, seguindo pelos tratamentos com a bactéria 1.2, controle, com a bactéria 21A e consórcio, com alturas 30,77 cm, 30,63 cm, 30,60 cm e 29,92 cm, respectivamente. Neste experimento, o tratamento consórcio apresentou um valor inferior aos demais tratamentos, apresentando mais de 2 cm de diferença para o tratamento com a estirpe 87, sendo este o tratamento com a maior média de altura (Figura 12), porém sem significância estatística (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Figura 12.** Altura média das mudas de *Eucalyptus* que foram expostas aos inóculos de cada componente do consórcio de forma isolada (1.2, 3.1, 21A e 87), consórcio e o controle por 28, 56 e 84 dias. Os pontos representam médias ( $n \cong 32$ ) e as barras representam a medida de erro padrão.

Na pesagem da biomassa aérea das mudas de *Eucalyptus*, as maiores médias obtidas foram de mudas que receberam os inóculos dos componentes do consórcio separadamente, sendo a maior média o tratamento 87 com média 2,04 g, seguidas pelos tratamentos 3.1 com 2,01 g, 21A com 1,86 g e 1.2 com 1,83 g. Os tratamentos controle e consórcio apresentaram médias de 1,73 g e 1,70 g, respectivamente (Figura 13), sem variações estatísticas entre os tratamentos (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

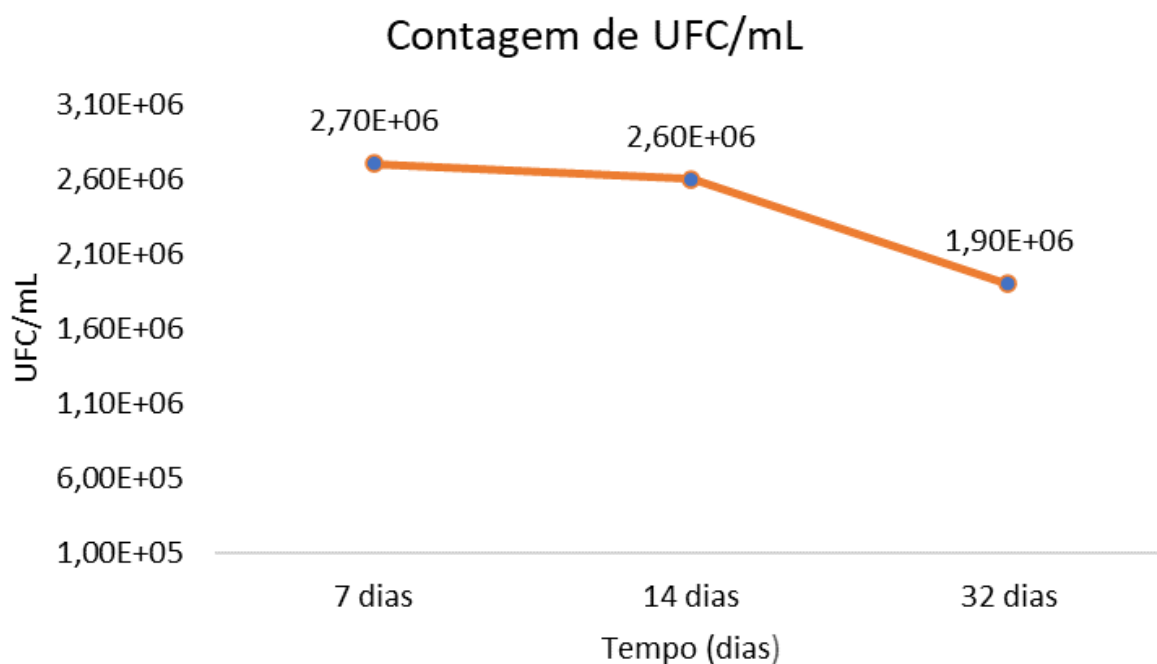




**Figura 13.** Biomassa média aérea das mudas de *Eucalyptus* submetidas aos inóculos de cada componente do consórcio de forma isolada (1.2, 3.1, 21A e 87), consórcio e o controle. As barras representam médias ( $n \cong 35$ ) e as barras de desvio representam a medida de erro padrão.

#### 5.4 – Experimento 4 - Teste de tempo de prateleira

O quarto experimento teve como objetivo avaliar a viabilidade das bactérias do consórcio em meio líquido ao longo do tempo a partir da contagem de unidades formadoras de colônias em placa de Petri. O resultado da primeira alíquota apresentou um valor médio de  $2,7 \times 10^6$  UFC/mL, sendo o valor mais próximo da dose plaqueada no tempo 0 ( $10^7$  UFC/mL). A segunda alíquota, plaqueada 14 dias após o início do experimento apresentou  $2,6 \times 10^6$  UFC/mL, tendo uma pequena variação em relação à primeira alíquota. A terceira alíquota apresentou a menor média entre as demais, sendo essa  $1,9 \times 10^6$  UFC/mL, demonstrado na Figura 14.

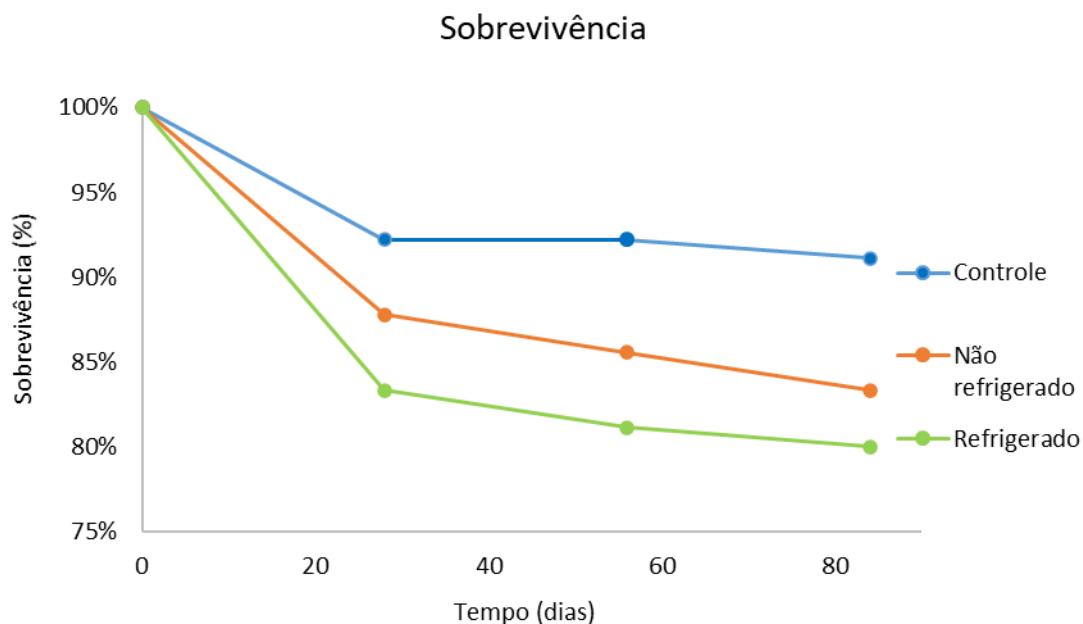


**Figura 14.** Curva de concentração média de Unidade Formadora de Colônias por mililitros na diluição  $10^{-3}$  no período 7 a 32 dias de experimento.

### 5.5 – Experimento 5 – Avaliação da efetividade do consórcio após refrigeração

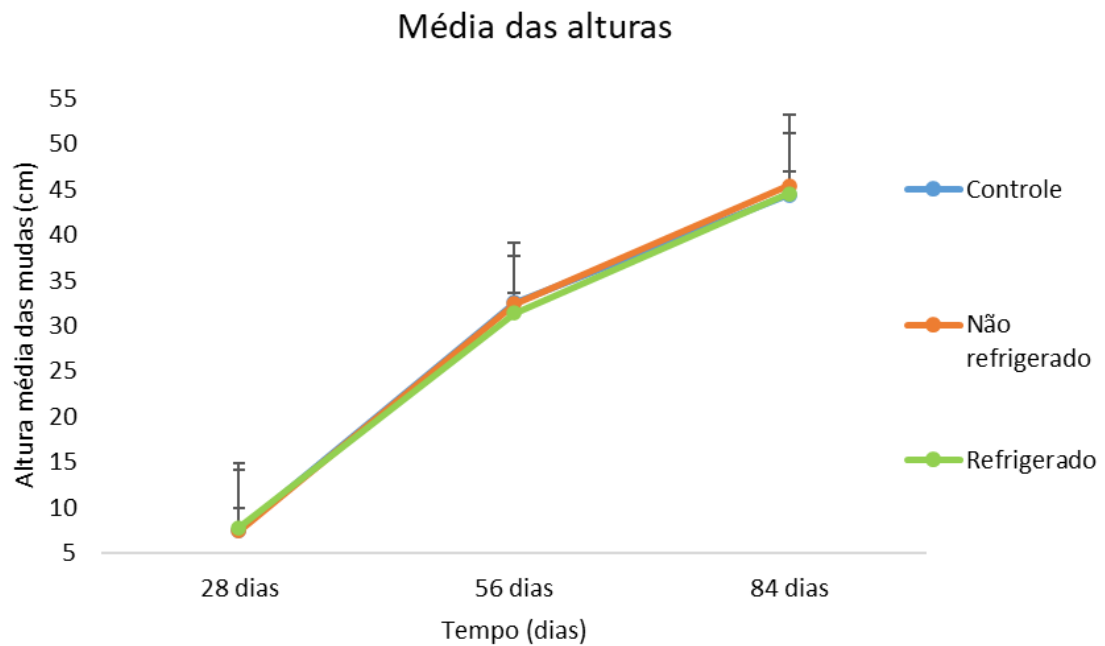
Após os dados obtidos até o experimento 4, um grande ensaio foi feito, em colaboração com a empresa Suzano, no qual aproximadamente 6 mil mudas de *Eucalyptus*, de 3 linhagens genéticas diferentes foram submetidas aos tratamentos com e sem inóculo. Após 90 dias, nenhum atributo mensurado (mortalidade, crescimento e biomassa) apresentou qualquer diferença entre os tratamentos com ou sem inóculo (dados não mostrados). Nesse momento, foram levantadas algumas hipóteses sobre a razão pela qual o experimento não apresentou os resultados esperados. Entre as razões, foi hipotetizada uma possível perda de efetividade devido ao fato do consórcio ter sido submetido à refrigeração. Assim, foi feito o experimento 5, com duração de 84 dias (14/11/2019 - 05/02/2020), que analisou a interferência da refrigeração no consórcio antes da aplicação nas mudas de *Eucalyptus*. O experimento foi estruturado em 3 tratamentos, sendo eles: i) Controle, ii) Tratamento 1 (sem refrigeração do consórcio) e iii) Tratamento 2 (com refrigeração do consórcio de 24 horas em uma geladeira, com temperatura entre 4 a 7°C), sendo composto por 90 mudas de *Eucalyptus* cada tratamento. O tratamento que apresentou a maior porcentagem de sobrevivência das mudas ao final do experimento foi do tratamento controle com 91,1%, seguido do tratamento 1 com 83,33% e tratamento 2 com 80%,

como está relatado na Figura 15, sugerindo uma interferência nas mudas que receberam o inóculo, apresentando diferença estatística.



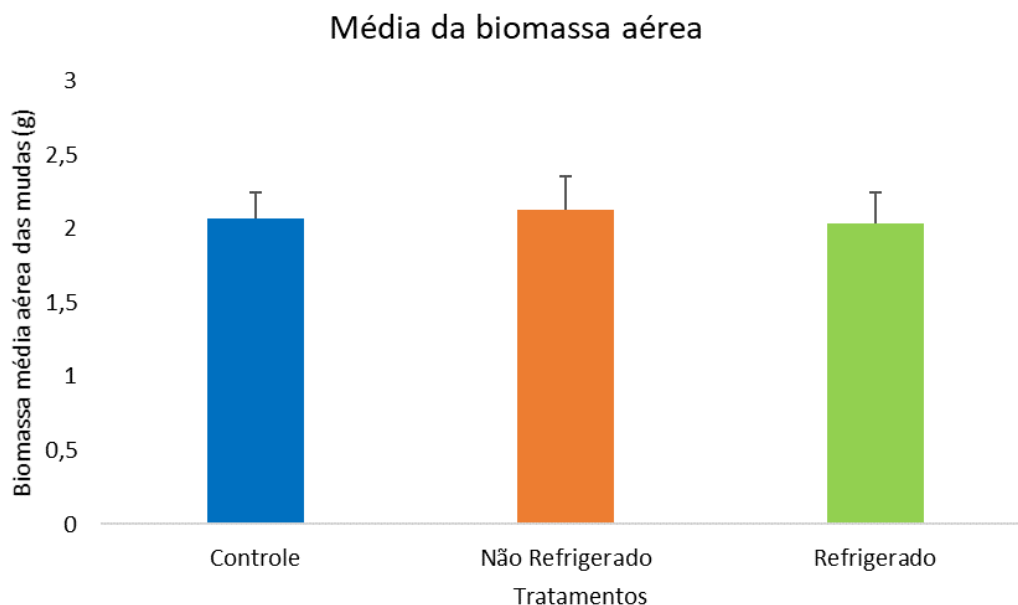
**Figura 15.** Curva de sobrevivência das mudas de *Eucalyptus* (n=inicial de 90 mudas) que foram expostas ao consórcio não refrigerado, refrigerado e o controle por 84 dias.

O segundo parâmetro avaliado foi a altura das mudas, que foi medida ao longo do experimento. No dia 84 do experimento, foi possível observar que todos os tratamentos apresentaram desenvolvimento muito similar (Figura 16), variando entre 44,39 a 45,4 cm em média, não sendo observado diferenças estatísticas entre as 3 condições do tratamento (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Figura 16.** Altura média das mudas de *Eucalyptus* que foram expostas ao consórcio não refrigerado, refrigerado e o controle por 28, 56 e 84 dias. (n inicial de 90 mudas).

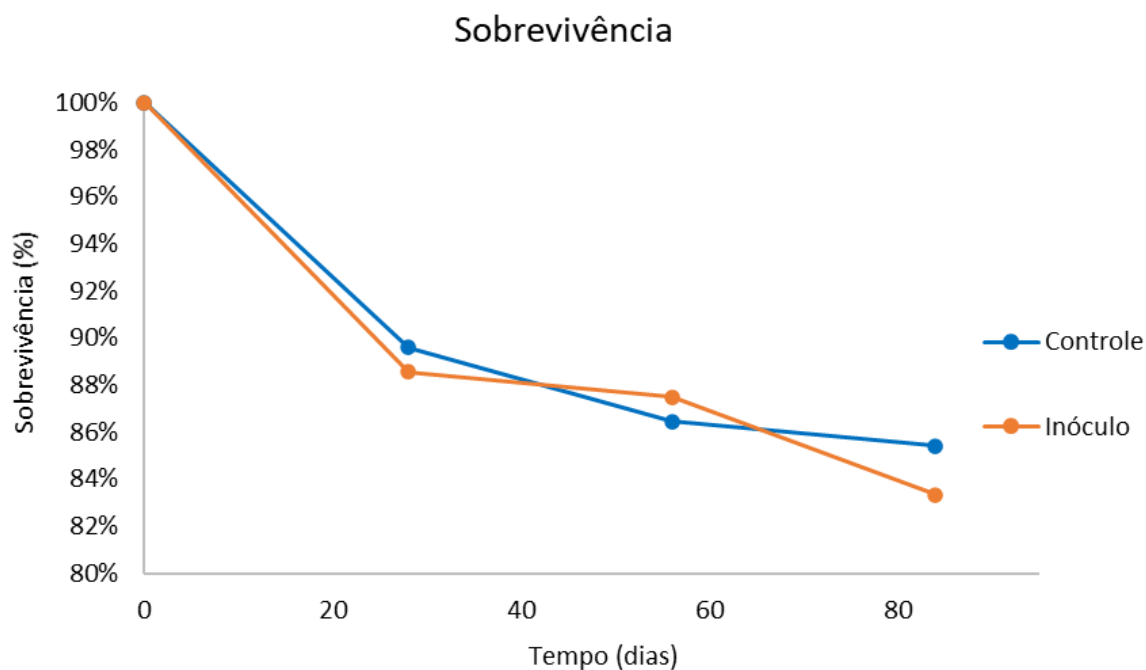
O parâmetro de biomassa aérea das mudas de *Eucalyptus*, o tratamento não refrigerado apresentou um maior valor de biomassa média em comparação aos outros tratamentos (2,13 g), seguido pelo controle (2,07) e tratamento 2 (2,03), porém sem diferenças estatísticas, utilizando ANOVA ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Biomassa média aérea das mudas de *Eucalyptus* submetidas aos inóculos do consórcio não refrigerado, refrigerado e o controle. As barras representam médias ( $n \cong 90$ ) e as barras de desvio representam a medida de erro padrão.

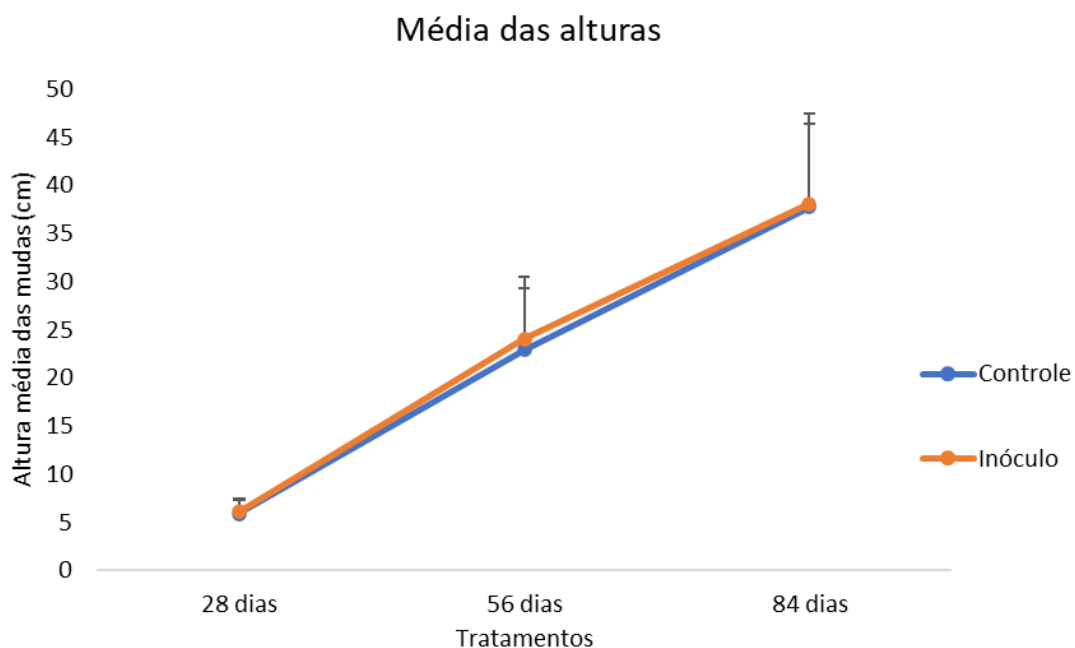
### 5.6 – Experimento 6 – Avaliação das mudas com condição alternativa de inoculação inicial

Além da alteração da refrigeração, foi hipotetizado que uma possível perda de efetividade no experimento instalado na Suzano poderia ser devido ao fato do consórcio ter sido inoculado apenas por submersão das miniestacas, e não adicionado ao substrato, como foi feito no trabalho de Fonseca (2020). Dessa forma, com objetivo de observar o desenvolvimento das mudas com outra forma de inoculação, esse experimento foi composto por 2 tratamentos, durante os 3 primeiros meses após o plantio (09/05/2021- 02/08/2021), sendo composto cada tratamento por 96 mudas de *Eucalyptus*. A dinâmica da curva de sobrevivência de ambos os tratamentos foi muito similar, e ao final do experimento, o tratamento controle apresentou uma média de sobrevivência de 85,42% e o tratamento inóculo de 83,33%, não tendo diferença estatística (Figura 18).



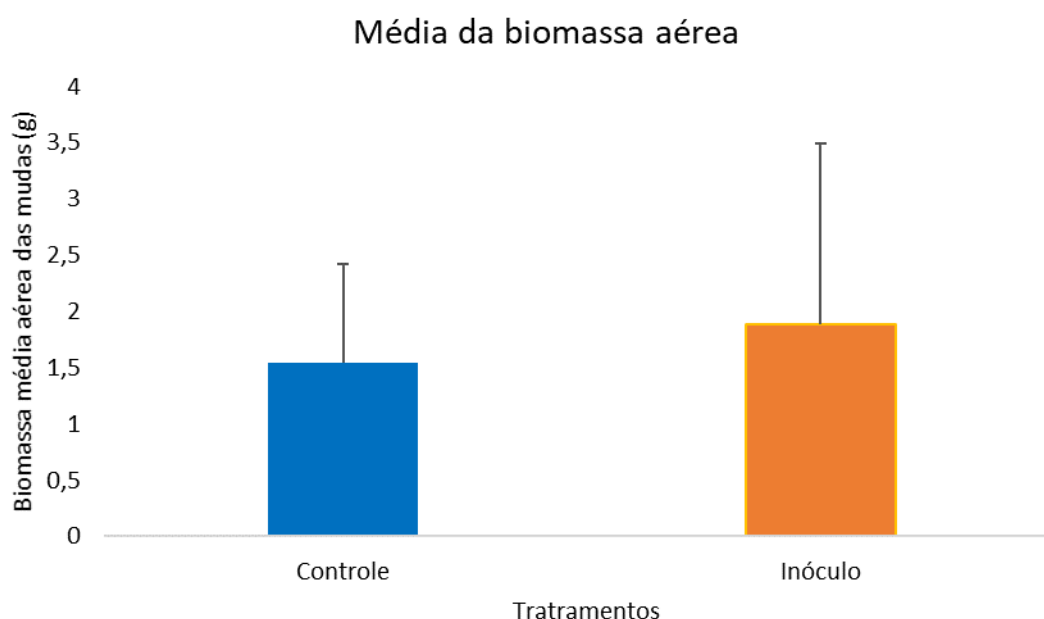
**Figura 18.** Curva de sobrevivência das mudas de *Eucalyptus*, sendo o tratamento inóculo o consórcio aplicado diretamente no substrato e o controle, por 84 dias.

Para ter um maior entendimento da altura média das mudas, foram realizadas três medições com intervalos de 28 dias cada, sendo o dia 84 do experimento o último dia. Nesta avaliação os dois tratamentos também apresentaram um desenvolvimento similar (Figura 19), no qual o tratamento inóculo apresentou média final de 38,03 cm e o tratamento controle de 37,75 cm, sem diferença estatística (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Figura 19.** Altura média das mudas de *Eucalyptus*, por 28, 56 e 84 dias (n inicial de 96 mudas).

A biomassa aérea das mudas de *Eucalyptus* foi analisada no final do experimento (84 dias), tendo o tratamento inóculo um maior peso médio (1,88 g) comparado ao tratamento controle (1,54 g). Entretanto, embora essa diferença entre as médias seja maior do que 0,30 g o que poderia demonstrar um ganho real em campo, não apresentaram diferenças estatísticas após a realização de uma ANOVA ( $p > 0,05$ ) (Figura 20).



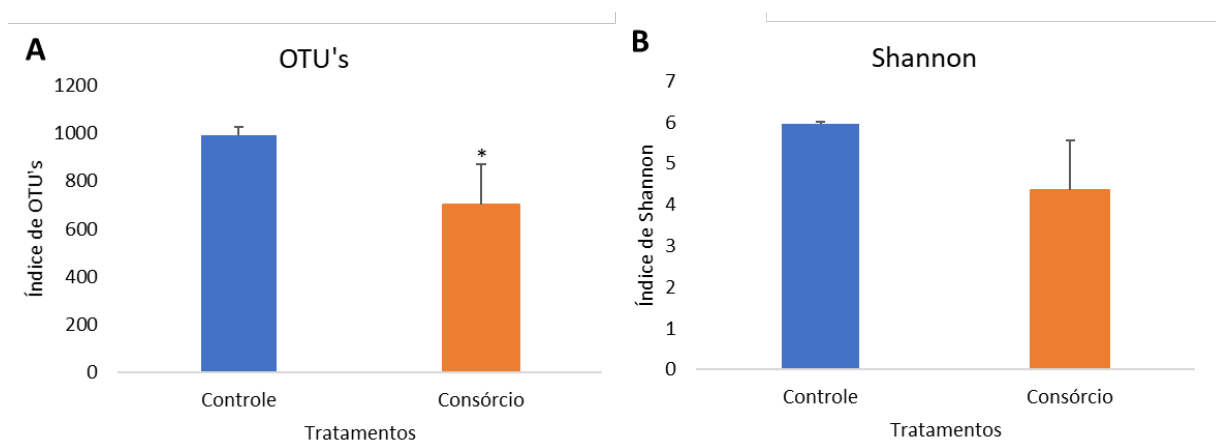
**Figura 20.** Biomassa média aérea das mudas de *Eucalyptus*, sendo o tratamento inóculo o consórcio aplicado diretamente no substrato e o controle e as barras de desvio representam a medida de erro padrão.

### 5.7 – Experimento 7 - Avaliação da eficácia de inoculação por sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S rRNA

Para entender melhor a influência da inoculação nas raízes de mudas de *Eucalyptus*, foi realizado um sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S ribossomal para analisar o bacterioma endofítico das raízes. Foram obtidas centenas de milhares de sequências para cada amostra, contudo, houve uma grande perda de sequências, devido à amplificação do rRNA dos cloroplastos presentes no material genético extraído. Assim, ao final de todos os filtros de qualidade, foram obtidas 3655 sequências por amostra de raiz.

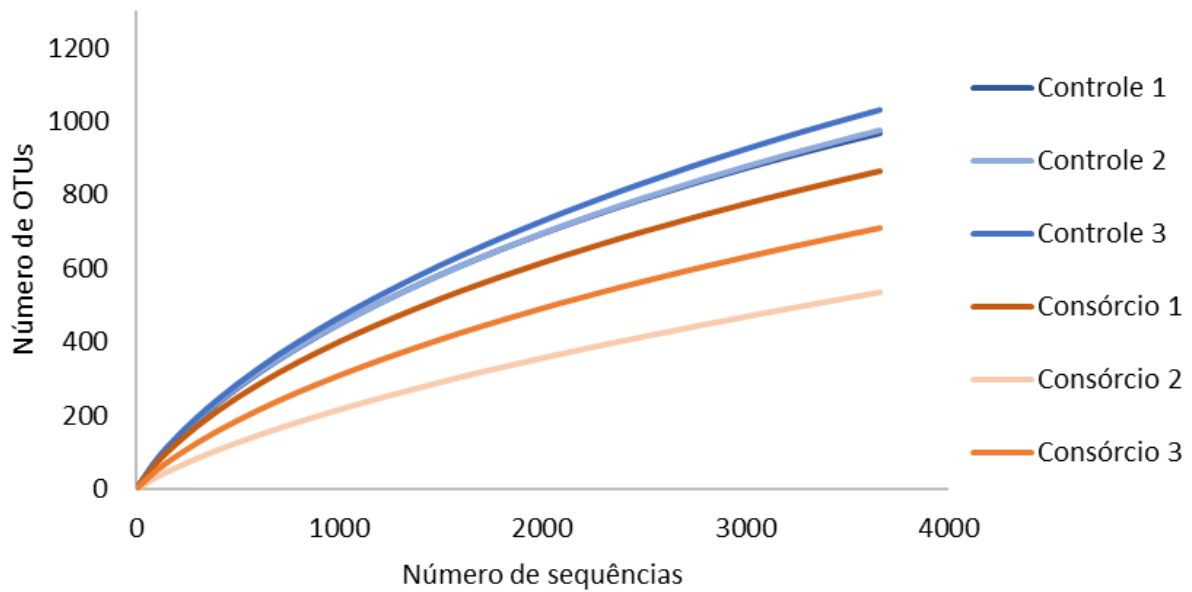
A  $\alpha$ -diversidade de uma amostra visa a entender os atributos de diversidade intrínsecos dela. Para o atual trabalho, foi utilizado o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) como indicador de número de espécies (riqueza) e o índice de Shannon como indicador da diversidade dentro das amostras controle e as que receberam o consórcio. A partir de um teste t, foi possível observar diferenças significativas na riqueza entre as amostras testadas ( $p < 0,05$ ), com maiores valores para os tratamentos controle. Houve tendência de redução da diversidade no tratamento Consórcio, porém sem diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ), conforme demonstrado na Figura 21.





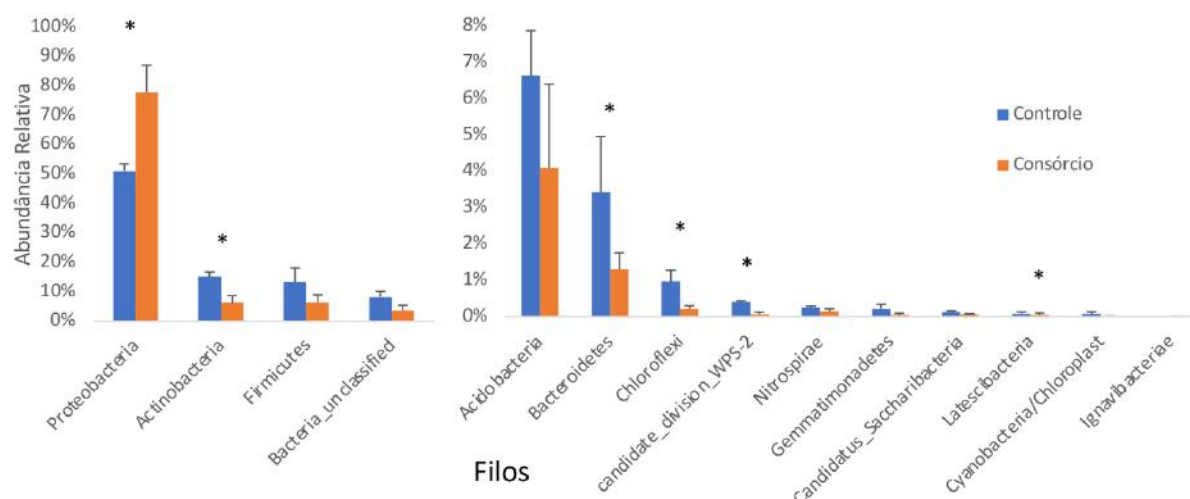
**Figura 21.** Riqueza de espécies ( $\alpha$ -diversidade) (A) e índice de *Shannon* (B) das amostras derivadas de raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras de desvio padrão representam as medidas de erro padrão (n=3). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos.

Uma curva de rarefação foi elaborada para entender as diferenças na diversidade individual das amostras. Todas as amostras do tratamento controle apresentaram maior diversidade comparada às amostras do tratamento que recebeu o consórcio, como pode ser observado pela posição superior das linhas no gráfico. Além disso é possível ver que todas as amostras apresentaram uma horizontalização à medida que foi havendo o aumento do número de sequências, o que demonstra uma boa cobertura, apesar do número relativamente baixo de sequências por amostra (Figura 22).



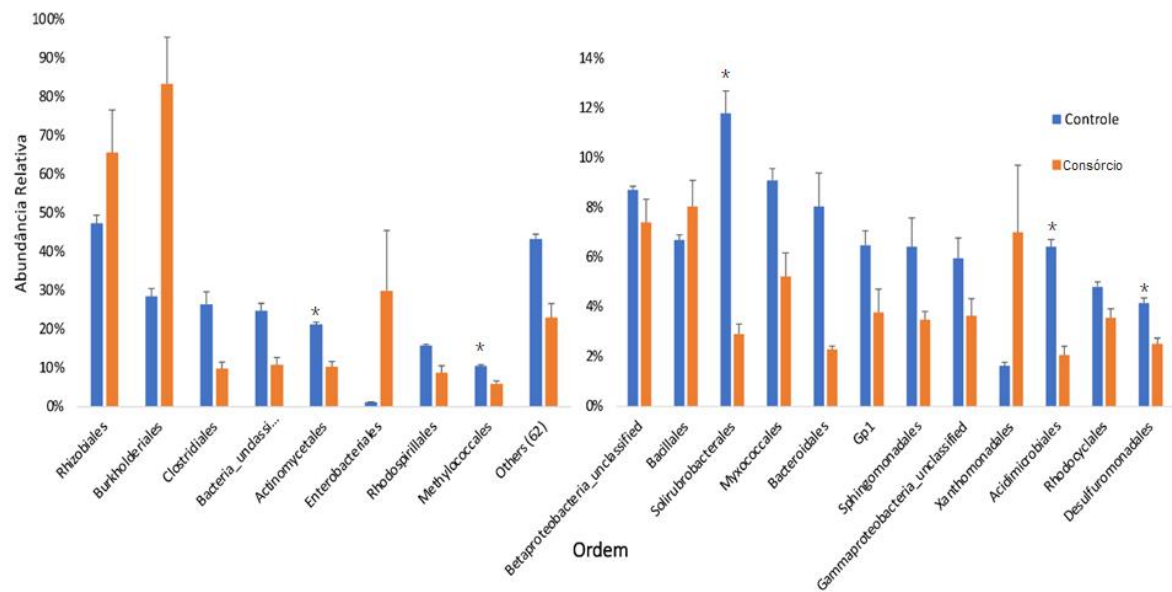
**Figura 22.** Curva de rarefação das OTUs presentes nas amostras do Controle e Consórcio (n=3).

Para entender a distribuição dos filos presentes nas raízes das mudas, foi realizada uma análise taxonômica que apontou uma maior abundância relativa à presença do filo Proteobacteria, seguido pelos filos Actinobacteria e Firmicutes tanto no tratamento controle quanto no tratamento que recebeu o consórcio. Foi possível observar diferença estatística nos seguintes filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Candidate\_division\_WPS-2 e Latescibacteria (Teste t,  $p < 0.05$ ). (Figura 23).



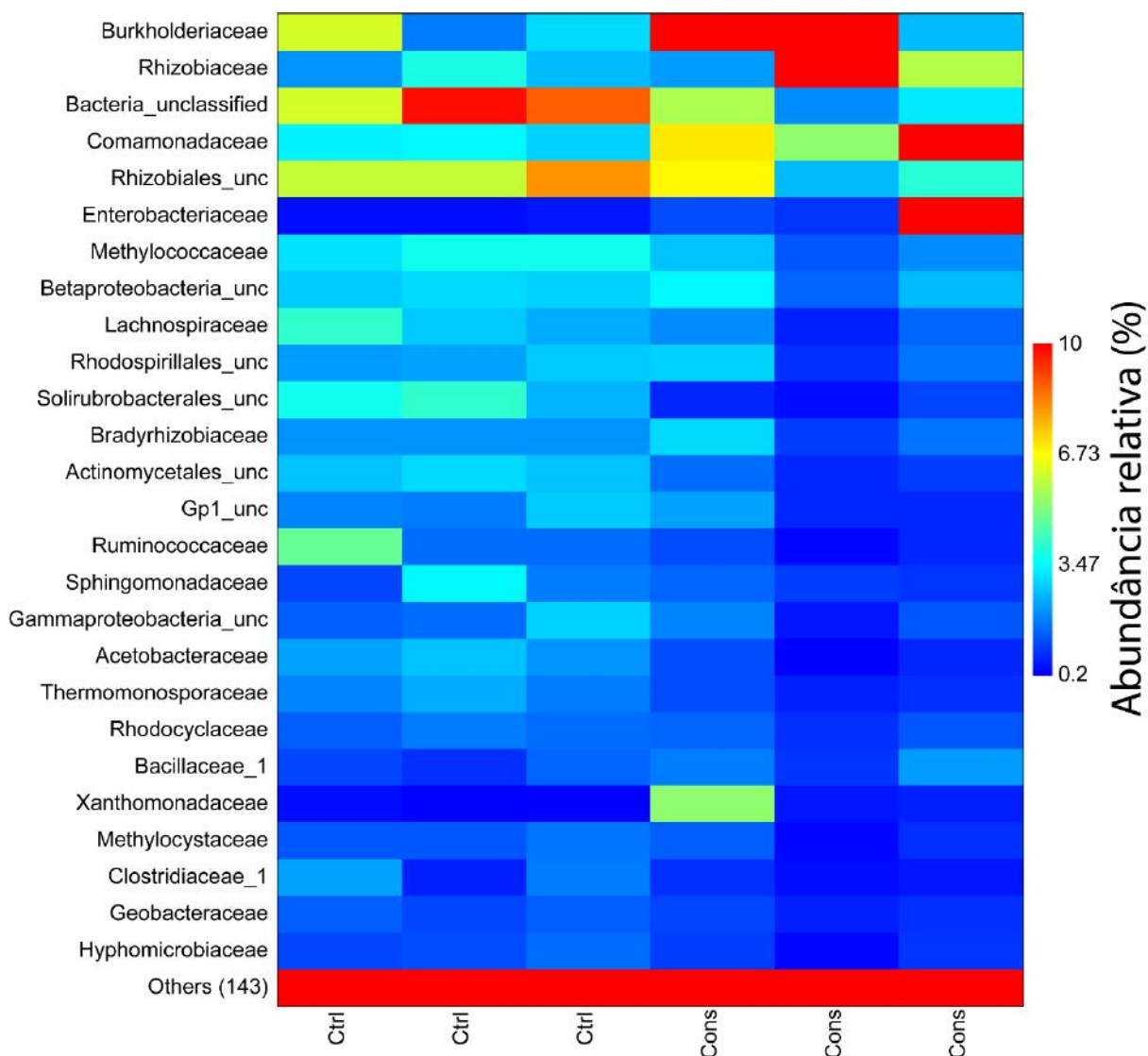
**Figura 23.** Abundância relativa dos principais filós do domínio Bacteria encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras representam as médias (n=3) e as barras de desvio são medidas de desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos, para o filo destacado (teste t,  $p < 0.05$ ).

Na Figura 24, é possível observar as principais ordens (ou afiliações taxonômicas mais próximas) presentes nas raízes de mudas de *Eucalyptus*. As ordens Rhizobiales, Burkoderiales, Clostridiales tiveram uma maior abundância relativa nos dois tratamentos (Controle e tratamento que recebeu o consórcio), sendo seguidas por um grupo de bactérias não classificadas, um de Acidobacteria e outro de Bacteroidetes. O enriquecimento da ordem Burkholderiales é notável no tratamento consórcio, que variou entre 20% a 41% de toda a comunidade, enquanto no tratamento controle, variou de 8% a 12%. Porém, dado o alto grau de variabilidade e o pequeno n amostral (3), as diferenças na abundância apresentaram um valor de p limiar, de 0,06.



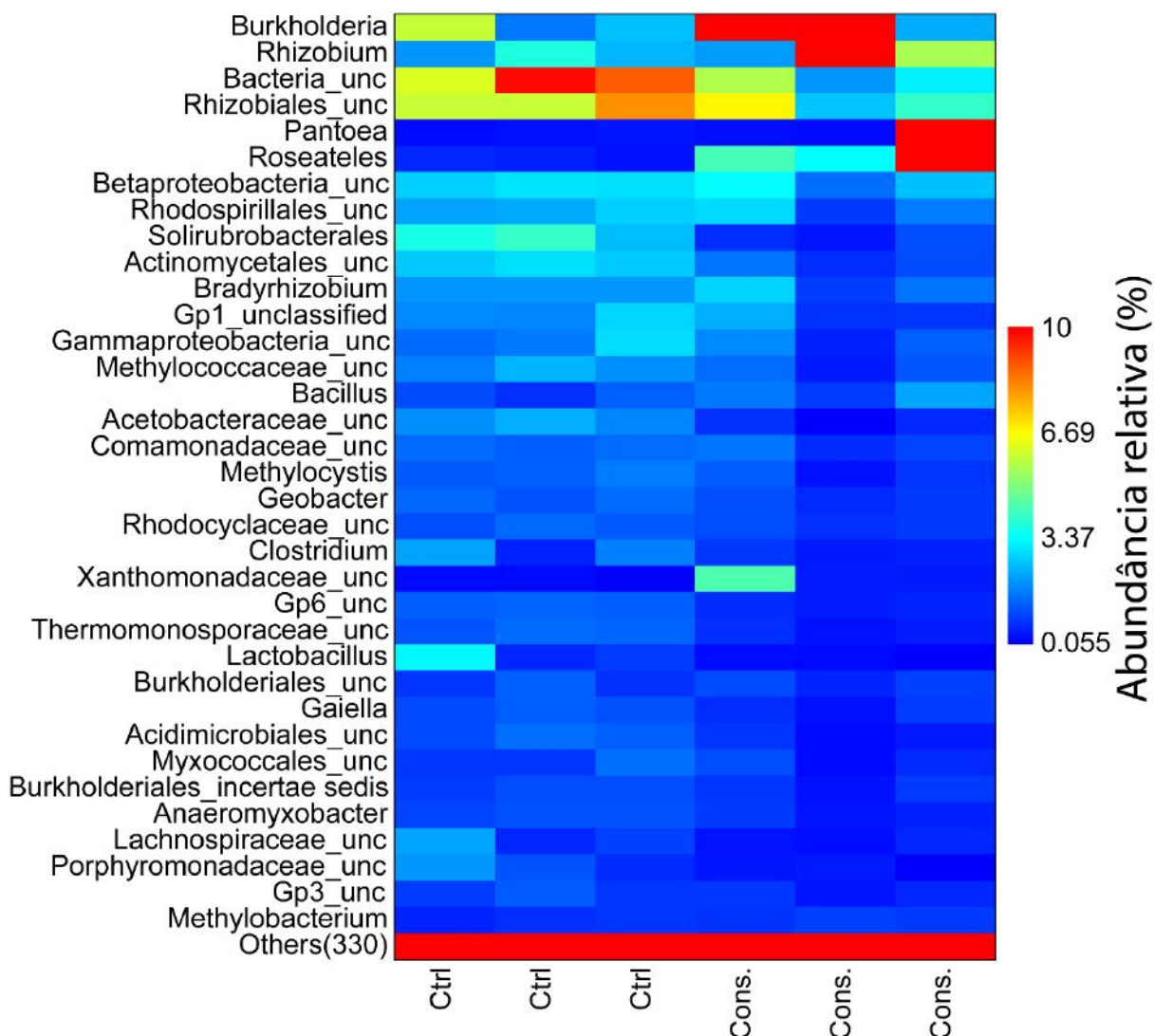
**Figura 24.** Abundância relativa das principais ordens do domínio Bacteria encontradas nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras representam as médias (n=3) e as barras de desvio são medidas de desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos, para os filos destacados (teste t,  $p < 0.05$ ).

Um grupo de Burkholderiaceae estava presente nos tratamentos controle e no tratamento que recebeu o consórcio. Também foi notável a presença de algumas famílias nos dois tratamentos, como Rhizobiaceae, Bacteria\_unclassified, Comamonadaceae e Rhizobiales\_unclassified (Figura 25).



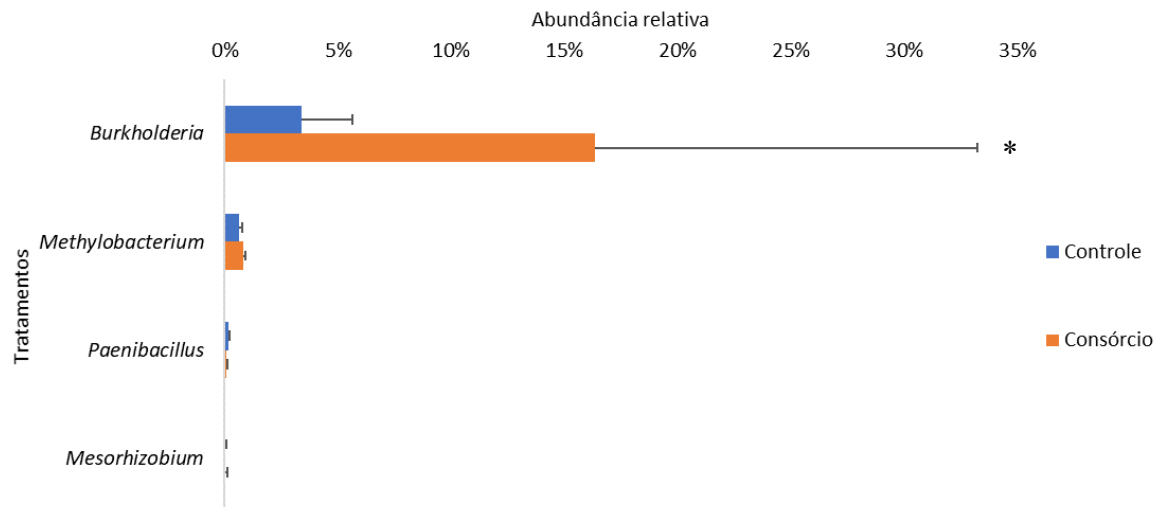
**Figura 25.** Mapa de calor representando a abundância relativa das principais famílias do domínio Bacteria encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal.

Por fim, foi analisado a abundância relativa dos gêneros presentes nas amostras. Os principais gêneros (ou afiliações taxonômicas mais próximas) presentes foram *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Bacteria\_unclassified*, *Rhizobiales\_unclassified*, *Pantoea* e *Roseateles*. Embora esses gêneros tenham apresentado uma maior abundância relativa, eles não foram diferentes significativamente entre os tratamentos. Dos gêneros apresentados na Figura 26, apenas o *Solirubrobacterales\_unclassified* apresentou diferença significativa no tratamento que recebeu o consórcio (Tukey,  $p < 0.05$ ).



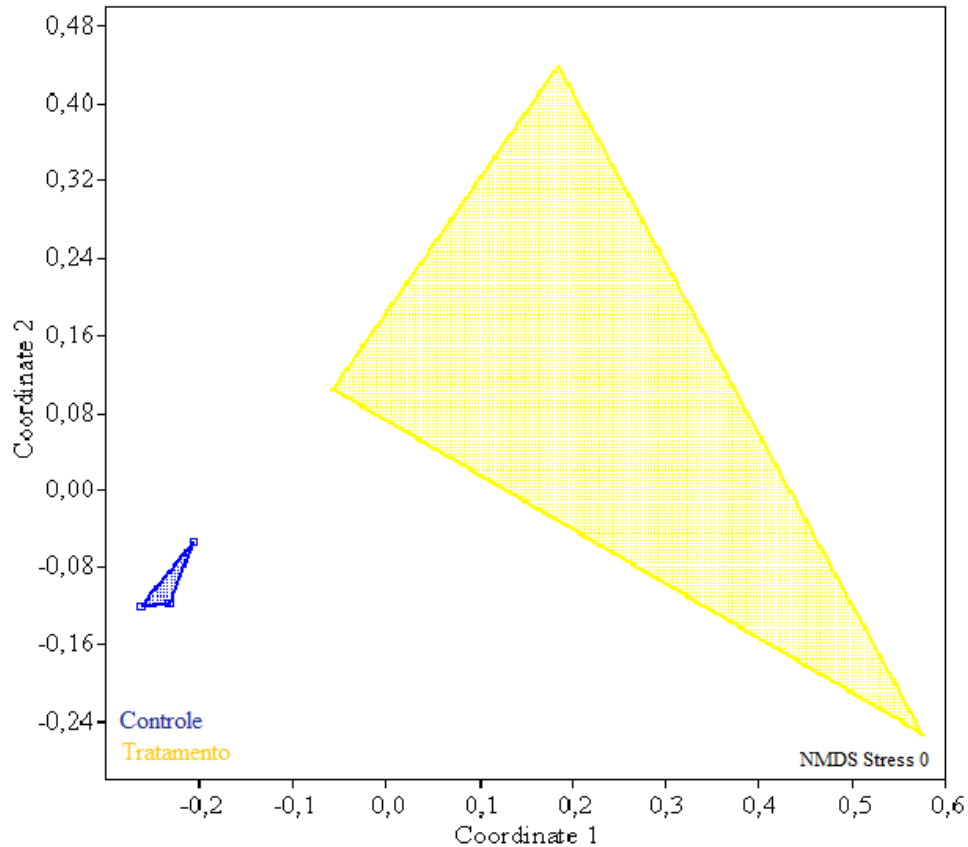
**Figura 26.** Mapa de calor representando a abundância relativa dos principais Gêneros do domínio Bacteria encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal.

Como citado, os gêneros que compõem o consórcio são: *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Methylobacterium* e *Mesorhizobium*. Foi feita então uma busca na abundância relativa desses gêneros em questão para entender se houve um aumento do gênero devido à aplicação do consórcio. Foram então, encontrados os gêneros componentes do consórcio e apenas um gênero apresentou diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos controle e o tratamento que recebeu o consórcio (Teste t,  $p < 0.05$ ). Devido à nova classificação do gênero *Paraburkholderia* derivado do gênero *Burkholderia* e a não diferenciação entre esses gêneros no banco de dados, nesse trabalho a estirpe do gênero *Paraburkholderia* foi apresentada como *Burkholderia* (Figura 27).



**Figura 27.** Abundância relativa dos gêneros componentes do consórcio encontrados nas raízes das mudas de *Eucalyptus* do tratamento controle e tratamento que recebeu o consórcio analisado após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal. As barras representam as médias (n=3) e as barras de desvio são medidas de desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos.

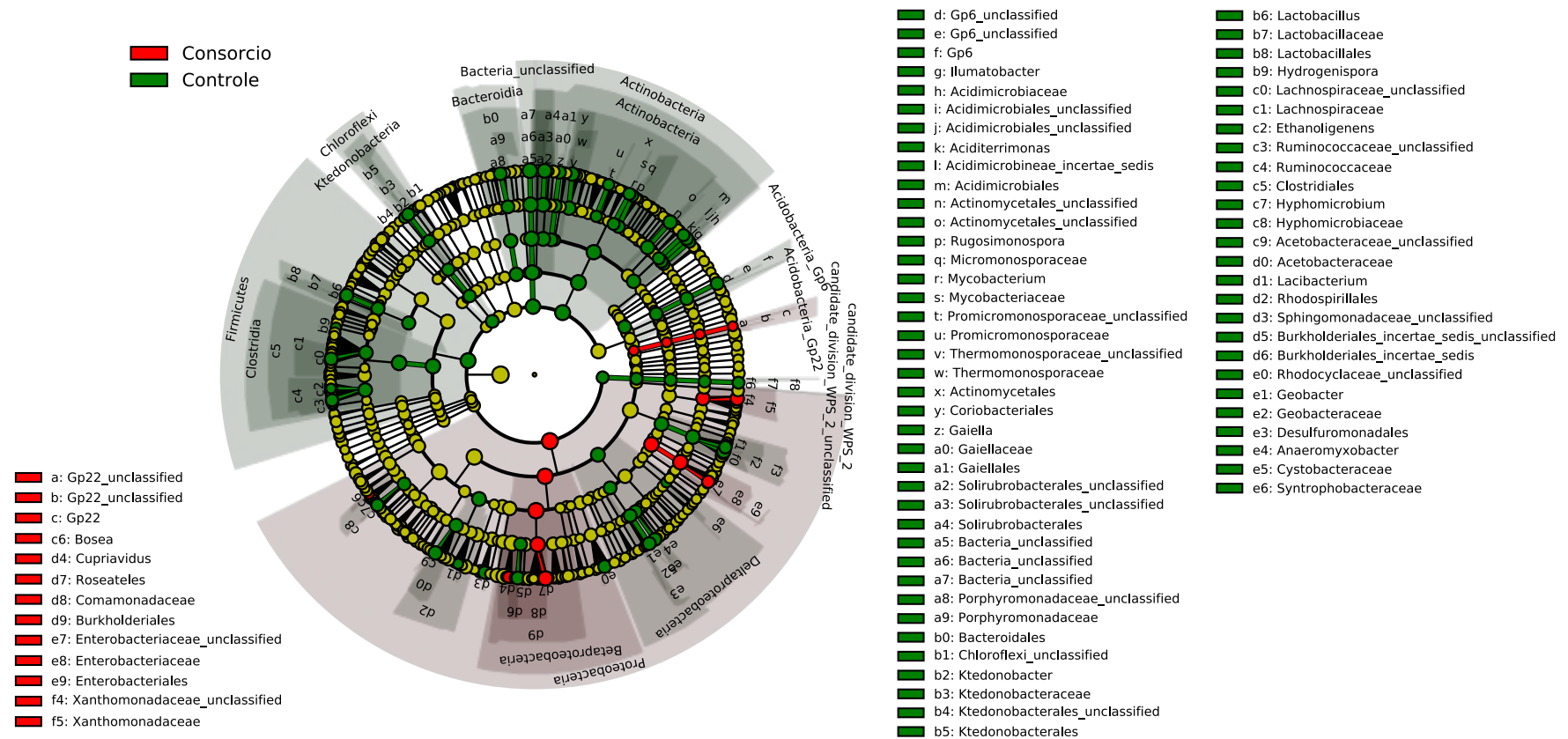
Para entender a  $\beta$ -diversidade da comunidade bacteriana presente nas raízes de mudas de *Eucalyptus*, foi realizada uma ordenação multidimensional não métrica (NMDS) de 3 dimensões. O gráfico se baseia na distância das amostras, sendo possível observar o nível de dissimilaridade entre elas. Na Figura 28 é possível inferir que os pontos amostrais se agrupam de acordo com o tratamento. A PERMANOVA foi utilizada para testar se as amostras diferem entre si e foi possível observar que há uma maior  $\beta$ -diversidade no tratamento que recebeu o consórcio do que no tratamento controle.



**Figura 28.** Ordenação multidimensional não métrica (NMDS) em 3 dimensões, baseada no índice de Bray-Curtis de similaridade, realizada após o sequenciamento da subunidade 16S ribossomal presente nas amostras do Controle (Azul) e do tratamento que recebeu o consórcio (Amarelo). Nessa figura são apresentados apenas os eixos 1 e 2.

Para realizar comparações entre as OTUs das amostras dos tratamentos controle (Vermelho) e o tratamento que recebeu o consórcio (Verde), foi realizado uma análise discriminante linear com o efeito do tamanho (LEfSe). Com ele é possível explicar a diferença entre os diferentes níveis taxonômicos e analisar qual táxon está mais expresso em um tratamento e qual a significância. Na Figura 29, é possível observar a influência da inoculação do consórcio nos filos Firmicutes, Actinobateria, Chloroflexi e as classes Clostridia e Bacteroidia. O filo Proteobacteria, juntamente com a classe Betaproteobacteria demonstraram não serem influenciados pelo consórcio.





**Figura 29.** Cladograma com a análise discriminante linear do tamanho do efeito (LEfSe). Cada anel representa um nível taxonômico (de dentro para fora, de reino a gênero) e cada círculo colorido representa um táxon. Taxons marcados de verde são significativamente mais associados ao controle e táxons marcados de vermelho são significativamente mais associados com o tratamento consórcio. Foram consideradas significativas, diferenças com valor de p inferior à 0.05 de acordo com os testes Kruskal-Wallis e Wilcoxon rank-sum, e com tamanho de efeito superiores a 3 na análise de discriminante linear.

## 6 – Discussão

As florestas plantadas são de suma importância para a produção de matéria-prima florestal, em especial para o plantio de *Eucalyptus* (Cuong *et al.*, 2020). Com o objetivo de aumentar a produção e o desempenho do plantio, diversas tecnologias mais sustentáveis são desenvolvidas (Kour *et al.*, 2019). Uma dessas abordagens é a utilização de microrganismos que apresentam um potencial biofertilizante, podendo assim ser utilizados em plantações em larga escala pelo rendimento igual e/ou superior a fertilizantes químicos utilizados atualmente (Owen *et al.*, 2015).

O uso de bioinóculo microbiano não é uma novidade em algumas monoculturas, principalmente no caso da soja. As bactérias, como as do gênero *Bradyrhizobium*, já são utilizadas como fixadoras de nitrogênio no plantio de soja, podendo apresentar uma economia de até 95% no custo com fertilizantes em comparação aos custos de uma fertilização nitrogenada (Embrapa, 2019). Para o plantio de *Eucalyptus*, essa é uma realidade muito diferente. Embora anteriormente tenha sido elaborado um bioinóculo, há ainda uma carência de estudos mais aprofundados sobre a ecologia microbiana da rizosfera e elaboração de protocolos para esse manejo, visando ao desenvolvimento de um produto com um grande potencial biotecnológico para o uso em mudas de *Eucalyptus*.

Para o sucesso de um bioinóculo, é essencial que além do entendimento dos processos fisiológicos, moleculares e estruturais da comunidade microbiana, sejam entendidos processos como: Qual o tipo de inóculo (microrganismos contidos nele), método de inoculação, tempo de prateleira, tempo que planta receberá o inóculo e meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos (Repáč, 2010). Outros parâmetros também podem ser utilizados para um maior entendimento da colonização dos microrganismos do bioinóculo em comparação com plantas que não receberam a inoculação, como a altura média atingida, a biomassa seca acumulada, tanto da parte aérea como da radicular, a taxa de sobrevivência e volume de raiz e outros (de Souza *et al.*, 2012).

Um ponto que pode ser destacado é a inoculação do consórcio na parte inicial do desenvolvimento de uma planta. Os primeiros 90 dias após o procedimento de mini-estaquia são fundamentais para determinar o sucesso ou não da muda, por isso, a aplicação deve ser nesse momento. Os microrganismos inoculados podem oferecer à planta os elementos necessários para esse crescimento e desenvolvimento inicial, no qual podem encontrar um ambiente estressante, mesmo controlado, como uma casa de vegetação. De Souza e colaboradores (2012) observaram a importância de um inóculo no momento da formação inicial

de mudas de *Eucalyptus*, mostrando que elas apresentaram melhora na absorção de água e nutrientes, resultando em uma maior massa seca aérea quando comparada a mudas que não receberam o inóculo. Outro trabalho também cita os efeitos conspícuos do uso do inóculo nas fases iniciais do feijão guandu, tendo uma maior importância do que a aplicação em fases posteriores pelo efeito acumulativo de nutrientes e a fitoestimulação de síntese de hormônios importantes nos momentos iniciais (Sharma *et al.*, 2017).

Como citado, alguns microrganismos são responsáveis por moléculas análogas a fitohormônios e também pela disponibilização de nutrientes no ambiente. Alguns dos critérios utilizados para a seleção das estirpes foram: A produção de ácido indolacético, solubilização do fosfato e a fixação biológica de nitrogênio. Meneguzzi e colaboradores (2014) demonstraram os efeitos positivos da aplicação do ácido indolacético no processo de enraizamento inicial, favorecendo a porcentagem e o comprimento radicular nos primeiros 90 dias. Outros trabalhos também relataram efeitos benéficos na promoção de crescimento radicular em mudas de *Eucalyptus* após aplicação de isolados de *Streptomyces* sp., conhecidos como PGPB (Salla *et al.*, 2014).

Um estudo que visava a entender os efeitos da aplicação de um fungo do gênero *Pisolithus* em *Eucalyptus* relatou um aumento na concentração de fosfato no momento inicial de desenvolvimento e apresentou um aumento na biomassa aérea, diâmetro de colo e altura das mudas que receberam o inóculo comparados ao tratamento controle (Alves *et al.*, 2001). A aplicação de *Bradyrhizobium japonicum*, espécie conhecida por realizar fixação de nitrogênio biológica, foi aplicada em plantas no trabalho de Zuffo e colaboradores (2015) que observaram diferenças significantes na biomassa seca aérea, radicular, altura, número de folhas, volume de raiz e teor de nitrogênio foliar superiores ao tratamento controle nos primeiros 3 meses de plantio.

Uma das características desejáveis para um bioinóculo é que ele não necessite de um meio de cultura de custo elevado para o crescimento microbiano. Além disso, ele deve oferecer aos microrganismos um meio adequado de crescimento e que ofereça os elementos necessários para a sua multiplicação. O consórcio utilizado no atual trabalho é composto por 4 estirpes bacterianas e se fazia necessário encontrar meios de cultura que fornecessem para as quatro estirpes condições de crescimento adequado. Para testes iniciais, pequenas pesquisas e estudos, a manipulação de mais de um meio não é um processo dificultoso, porém em grandes quantidades para inoculação comercial em viveiros, esse processo pode ser tornar extremamente difícil (Repáč, 2010). Pensando em uma escala de produção, a escolha de um meio que fornecesse todos ou grande parte dos elementos necessários para todas as 4 estirpes

seria fundamental. Para isso, foi realizado o primeiro teste, com o objetivo de escolher o meio de cultura para a manutenção das estirpes do consórcio em laboratório.

O experimento, composto por 4 meios de culturas diferentes e testado com as 4 estirpes separadamente, apresentou o melhor crescimento no meio de cultura Trypticase Soy Broth. Embora as estirpes do consórcio tenham apresentado o melhor crescimento neste meio, o meio de cultura *Fitato low* foi escolhido para o crescimento e manutenção para os demais experimentos. A escolha de utilização do meio se deu pelo seu baixo custo e o bom crescimento das estirpes do consórcio no laboratório.

O meio de cultura TSB é amplamente utilizado para o cultivo de bactérias pelo seu alto teor nutritivo e sua versatilidade. Na sua composição, a triptona se faz presente sendo uma excelente fonte de nitrogênio, fundamental para o crescimento bacteriano. Em comparação com o *Fitato low*, o TSB tem uma menor concentração de glicose, sendo essa uma importante fonte de carbono. Uma menor concentração de carbono não foi um fator limitante para o crescimento das estirpes, embora Hempling e colaboradores (1975) tenham observado que meios de culturas com maiores concentrações de carbono apresentaram um crescimento bacteriano maior do que meios com concentrações menores e que essa mudança na concentração demonstrou uma íntima correlação na taxa de respiração, influenciando na replicação dos microrganismos em crescimento.

No processo de seleção dos isolados, as amostras foram crescidas no meio *Fitato low*, a fim de observar a capacidade de mineralização do fosfato (Fonseca, 2020). O mesmo protocolo foi realizado por Manzoor e colaboradores (2016), que analisou o desenvolvimento de mudas de milho com o inóculo de microrganismos isolados da rizosfera. Em ambos os trabalhos, as estirpes isoladas demonstraram a capacidade de solubilizar fosfato insolúvel em ágar, sendo essa capacidade uma boa característica para um componente de um bioinoculante. Além das 4 estirpes apresentarem um bom crescimento no meio fitato low em experimentos anteriores, a utilização do meio foi dada pelo seu baixo custo, comparado ao meio de cultura TSB, portanto a utilização deste meio foi mantida para a manutenção das estirpes.

No presente trabalho, em que foram testados quatro meios diferentes, foi possível verificar que o crescimento das estirpes foi bastante variável no período de 6 horas. Pelo baixo número de meios de cultura testados, se faz necessário uma busca maior de um meio que ofereça um bom crescimento para o inóculo. Assim, sugere-se que mais estudos nesse sentido sejam feitos, preferencialmente com formulações simples e baratas, que possam ser incorporadas na dinâmica industrial de produção do inoculante.

A determinação da concentração de um inóculo é indispensável para o sucesso da colonização da planta pelos microrganismos que compõem o consórcio na planta. Embora o plantio das mudas em viveiros seja em ambientes controlados, as mudas não encontrarão uma situação de esterilidade no substrato utilizado, na água de irrigação, nos tubetes utilizados para o plantio, das mini-estacas que receberão o inóculo e assim por diante. Os testes para garantir a melhor concentração do inóculo devem ser efetivos para garantir que os microrganismos introduzidos sejam capazes de colonizarem e se replicarem nas mudas, garantindo sua permanência durante o processo inicial de desenvolvimento.

Foram testadas as doses 1X, 10X e 100X para designar a concentração do consórcio. A dose 10X apresentou o melhor resultado comparado a outras mudas que também receberam o consórcio nas concentrações 1X e 100X e ao tratamento controle nos parâmetros de sobrevivência, altura e biomassa radicular. A concentração 1X, que foi utilizada no trabalho de Fonseca (2020), do qual o presente trabalho é uma vertente, também apresentou um bom desempenho comparado ao tratamento controle, sugerindo que a concentrações 1X e 10X do inóculo possam conter uma quantidade de estirpes que sejam capazes de colonizar as raízes mudas de *Eucalyptus*.

A alta concentração da densidade celular de um inóculo não necessariamente significa que haverá um efeito benéfico mais intenso, podendo até ter um efeito contrário do que o objetivo inicial que é a promoção do crescimento vegetal. Uma alta concentração de células pode favorecer um acúmulo de agregados celulares, dificultando a limitação da difusão dos elementos ali presentes e/ou até levar a escassez dos substratos, segundo o trabalho apresentado por Lazaro e colaboradores (2015).

No presente trabalho, foi observado que mudas que receberam doses 100X tiveram resultados inferiores nos parâmetros analisados, comparadas com as mudas que receberam as doses X e 10X. A concentração elevada de um inóculo pode levar a alterações estruturais da composição microbiana, modificando interações importantes para a proteção da planta, alterando o grau de proteção frente a patógenos (Berg e Koskella, 2018). A alta concentração de microrganismos introduzidos também pode induzir uma mudança transitória da comunidade microbiana, reduzindo o equilíbrio do ecossistema, podendo favorecer populações de microrganismos patogênicos (Sharma *et al.*, 2017).

Alguns trabalhos também abordam a fitopatogenicidade de microrganismos e a maior gravidade devido a sua maior concentração. Para confirmar essa afirmativa, pesquisadores que estudavam os efeitos da inoculação de diferentes concentrações de fungos conhecidos como fitopatógenos em sorgo observaram que raízes que receberam um inóculo com alta

concentração de fungos demonstraram um menor crescimento radicular do que plantas que receberam uma menor concentração (Raftoyannis e Dick, 2002).

Em 2011, o MAPA elaborou instruções e normas para a produção de um inoculante destinado à agricultura. No documento eram abordadas especificações e características que o produto deveria conter, além da garantia, tolerância, embalagem e da rotulagem que o futuro produto deveria apresentar. Grande parte dos bioinoculantes no mercado atualmente é utilizada para fixação biológica do nitrogênio, tendo um maior destaque para aplicação em leguminosas. Para o grupo de leguminosas, o bioinoculante deve apresentar uma concentração mínima de  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL. Para as demais PGPB e bactérias associativas, a concentração mínima de microrganismos deve ser informada para um órgão de pesquisa científica oficial ou credenciado pelo MAPA.

O consórcio utilizado neste trabalho é composto por estirpes de gêneros diferentes e foram selecionadas pelos seus efeitos biofertilizantes em plantas conhecidos na literatura e observados em laboratório. Há um trabalho na literatura que aborda o uso de estirpes que apresentam algum tipo de benefício para a planta, como a fixação biológica de nitrogênio, que não apresentaram resultados melhores do que quando as estirpes eram aplicadas separadamente (Zuffo *et al.*, 2015). Outro trabalho, como o de Basak e colaboradores (2010), evidenciou os efeitos positivos no ganho de biomassa vegetal quando inoculado estirpes que realizam fixação biológica de nitrogênio, que são solubilizadores de potássio em até 85,8% comparado ao tratamento controle.

Sabe-se, por experimentos anteriores realizados por Fonseca (2020), que as estirpes que compõem o consórcio não apresentaram inibição de crescimento entre si. No experimento realizado neste trabalho, a influência no desenvolvimento de mudas que era esperada pela inoculação do consórcio não foi observada na altura e na biomassa aérea das mudas que receberam o consórcio e também não foi observada nas mudas que receberam os inóculos com as estirpes de forma separada.

Porém, em relação à taxa de sobrevivência, a aplicação da estirpe 3.1, 87 ou do Consórcio, apresentaram taxas de sobrevivência próximas a 80%, enquanto o controle apresentou taxas próximas a 70%. Contudo, as mudas que receberam o inóculo da estirpe 21A apresentaram uma menor sobrevivência das mudas comparadas ao tratamento controle. As razões que levaram à redução da taxa de sobrevivência pela estirpe 21A precisam ser mais bem estudadas, e o experimento deve ser repetido. Contudo, é importante notar que neste estudo, o potencial efeito deletério da 21A sobre a taxa de sobrevivência foi suprimido na associação consorciada com outras bactérias. Dentro dessa temática, foram observados efeitos positivos no crescimento inicial de *Cajanus cajan* após a aplicação de cada componente de um bioinoculante, porém esse

efeito benéfico foi superior quando aplicados de forma conjunta, sugerindo um maior potencial biofertilizante gerado pelo consórcio (Sharma *et al.*, 2017), corroborando a hipótese inicial do atual trabalho, no qual era esperado resultados positivos quando aplicados as estirpes na forma de um consórcio.

Pesquisas com PGPB apontam as dificuldades de manter os efeitos observados em laboratório no campo. Por se tratar de organismos vivos, as bactérias se comportam de acordo com os fatores climáticos e ambientais, podendo causar assim disparidade no potencial da formulação com PGPB (Tabassum *et al.*, 2017). Uma revisão relatou os diversos problemas com as formulações de interesse para o bioinoculante, sendo a contaminação um dos problemas mais enfrentados nas formulações. Problemas como a vida útil curta, desempenho imprevisível em campo e perda da viabilidade por formação de aglomerado celulares também são relatados por Sahu e colaborador (2016).

Problemas com contaminação e mudanças de estirpe das estirpes são documentados em estudos que desenvolvem bioinoculantes. Após observar os efeitos desejados em um isolado, é de extrema importância que o mesmo seja mantido em condições que não favoreçam qualquer alteração fenotípica da estirpe, permanecendo confiáveis para utilizações futuras. Embora as manutenções de cultura sejam controladas em laboratório, é observada uma queda de qualidade dos efeitos observados anteriormente no isolado e até contaminações, havendo uma grande dificuldade de distinção entre o isolado e o contaminante (Lupwayi *et al.*, 2000). Para uma maior percepção da queda de rendimento esperado pela inoculação das estirpes nas mudas, as estirpes deverão ser avaliadas por um novo sequenciamento para confirmar uma possível contaminação e se não for o caso, deverão ser realizadas investigações para entender quais fatores levaram essa diminuição de rendimento.

As mudanças epigenéticas também são pontos abordados por alguns trabalhos. A manipulação em meio de cultura em um laboratório pode oferecer condições nutricionais, de temperatura e concentração diferentes, podendo gerar mudanças epigenéticas resultando em até 8 subpopulações fenotípicas diferentes (Morovic e Budinoff, 2020). Para que seja desenvolvido um bioinoculante e que ele seja produzido em alta escala, é importante que haja um processo rigoroso de controle no processo de produção a fim de evitar uma variação de lote.

Um dos pontos importantes para um futuro produto é a ‘*Shelf life*’ (tempo de prateleira) que ele apresenta. O termo ‘*Shelf life*’ é vulgarmente conhecido como o período no qual um produto se mantém viável até o seu uso, sendo um termo conhecido na produção de alimentos. Se tratando de um produto vivo, e visando a uma futura comercialização, é fundamental que haja um maior entendimento do tempo de viabilidade desses microrganismos.

O experimento que tinha o objetivo de determinar o período de viabilidade do consórcio perdurou por 32 dias. As concentrações observadas nos dias 7 e 14 apresentaram uma pequena diferença entre elas, tendo uma maior diminuição entre os dias 14 e 32, considerando a concentração de UFC/mL inoculadas inicialmente. O resultado deste experimento coincide com os experimentos de Dave e colaboradores (1997) que buscavam observar a concentração dos microrganismos inoculados em produtos lácteos ao longo de 35 dias, observando uma maior perda de viabilidade entre 15 a 35 dias.

Conforme previamente colocado, 3 das 4 estirpes que compõem o consórcio são fenotipicamente semelhantes, dificultando a distinção de cada espécie apenas por análise visual. Assim, o presente experimento não logrou sucesso em uma avaliação de longo prazo devido a sua dificuldade de identificar a presença das 4 estirpes após 32 dias de experimento. Quando se trabalha com apenas uma bactéria em um bioinóculo, a diferenciação rápida pode ser feita através de uma coloração de Gram e dependendo da retenção do cristal violeta, é possível fazer uma identificação precoce de contaminação ou não de contaminação (Lupwayi *et al.*, 2000). Por esse trabalho ser composto por 4 bactérias, sendo elas Gram positivas e Gram negativas, essa identificação não poderia ser utilizada neste experimento. Uma possível alternativa é refazer o experimento de viabilidade com cada estirpe isoladamente. Alternativamente, pode-se avaliar o emprego de técnicas alternativas.

Experimentos com o uso de sondas pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) já são utilizados para detectar a distribuição de bactérias em folhas, raízes, flores, semente e outros, sendo uma alternativa para distinção de estirpes, principalmente quando se trata de produtos com mais de uma espécie (Sabir, 2013). Técnica de microscopia eletrônica de transmissão também pode ser aplicada para observar a migração dos microrganismos na planta, sendo possível indicar a presença na parte radicular ou em outras partes do vegetal (Ruppel *et al.*, 1992).

Além disso, com o cultivo em laboratório, foram observados diferentes tempos de crescimento entre as estirpes. A diferença de tempo de multiplicação entre as estirpes do consórcio pode apresentar uma competição de nutrientes que o meio de cultura oferece, favorecendo a multiplicação das estirpes que apresentam uma multiplicação mais rápida. Alguns gêneros como *Azospirillum* e *Pseudomonas*, que se apresentam como potenciais PGPB, também apresentam problemas devido à pequena vida útil em laboratório nos experimentos realizados, pois são facilmente inviabilizados após a escassez de nutrientes da formulação (Tubassum *et al.*, 2017).



Desta forma, uma solução para a diferença de tempo de crescimento das espécies seria a montagem do consórcio (união das estirpes) momentos antes do processo de inoculação nas mudas, evitando uma competição por nutrientes e garantindo o crescimento das estirpes. A elaboração de futuros bioinoculantes compostos por microrganismos que esporulam também é uma alternativa de aumentar a vida útil de um produto. *Bacillus subtilis*, conhecido pela produção de esporos, é uma das espécies encontradas no bioinoculante Rizolyptus®, produto pioneiro no mercado de bioinoculantes em *Eucalyptus*. Outro trabalho também aborda a tecnologia de encapsulação (processo físico-químico para aprisionar uma substância em cápsulas de até alguns milímetros), promovendo uma maior sobrevivência e/ou uma liberação mais lenta do bioinóculo (Chavarri, Maranon e Carmen, 2012).

O quinto experimento tinha o propósito de entender a influência da refrigeração em um bioinóculo. Na altura e biomassa aérea, os tratamentos controle e inóculo não refrigerado apresentaram um valor médio superior ao tratamento que recebeu o inóculo refrigerado. Contudo, apesar de uma pequena diferença na altura e na biomassa aérea, essa diferença não é determinante para afirmar que a refrigeração influenciou nesse processo. Já os tratamentos que receberam o bioinoculante, o controle apresentou uma maior taxa de sobrevivência, sendo significativa estatisticamente. O resultado mostra que a inoculação pode ter interferido na microbiota rizosférica e na taxa de sobrevivência, levando mudas que receberam inóculo refrigerado e não refrigerado a apresentarem uma maior taxa de mortalidade.

Na indústria alimentícia, são realizados diversos estudos para entender como a refrigeração pode afetar na viabilidade de alimentos com microrganismos, como os probióticos. Por se tratar de um produto que é recomendado a refrigeração, é importante que se mantenha o número de células viáveis até o consumo. Estudos mostraram que, além da refrigeração, os produtos gerados pela multiplicação, e a alteração do meio conseqüentemente, são fatores que levam a diminuição de células viáveis (Damin et al., 2008).

O experimento sobre o efeito da refrigeração foi elaborado após a realização de um experimento em alta escala de inoculação do consórcio em mudas de *Eucalyptus* de diferentes estirpes. Nesse experimento, as estirpes foram padronizadas na concentração 10X e refrigeradas por 24 horas. Momentos antes da inoculação, foi realizada a união das estirpes. Após 3 meses do inóculo, não foi possível observar os efeitos esperados nas mudas que receberam o inóculo comparado a mudas que não receberam, não apresentando alterações na taxa de sobrevivência, na altura e na biomassa vegetal.

A competição por nutrientes do meio de cultura neste experimento foi descartada, tendo em vista que a união das estirpes foi realizada momentos antes da inoculação. Os parâmetros

avaliados no experimento não apresentaram resultados muito diferentes do controle, o que sugere que pode não ter acontecido alguma interferência da inoculação. A hipótese inicial elaborada para a possível perda de efetividade observada nas mudas foi uma mudança de estirpe ou contaminação durante o processo de repicagem em laboratório. Para que seja confirmada essa hipótese, outros experimentos devem ser realizados a fim de observar alteração em uma ou mais estirpes comparadas aos isolados iniciais.

Para que haja sucesso, os bioinoculantes dependem do tipo de estirpe que está sendo utilizada e também dependem de como esse produto vai chegar até a planta alvo. As formulações e inoculações podem diferir de acordo com a planta alvo, o tipo de solo, os nutrientes por eles fornecidos e os manuseios são importantes para garantir a proteção das células no armazenamento e transporte até o uso. Atualmente, essas formulações são conhecidas como de base líquida, de base sólida, com osmoprotetores, com agentes aderentes e agentes aprisionadores, como relatado na literatura (Sahu e BrahmaPrakash, 2016).

Segundo Sahu e colaborador (2016), inoculantes químicos não são necessariamente os meios de cultura utilizados para crescimento dos microrganismos e sim uma substância que ofereça uma fonte de carbono, nitrogênio e vitaminas além de conter um protetor e/ou aditivo para garantir a viabilidade e qualidade do inóculo. Para inóculos composto por bactérias, o meio de cultura utilizado para crescimento da estirpe pode ser utilizado como uma fórmula de levar as bactérias até a mudas, desde que esta forneça bons elementos para a sua multiplicação (Herrmann *et al.*, 2013).

Além disso, a forma na qual esse bioinoculante será introduzido na planta é fundamental para a colonização das estirpes nas mudas. A retirada das miniestacas é causada por cortes na planta-matriz, o que pode propiciar a colonização de microrganismos. O inóculo atual tem sua formulação líquida, o que facilitaria essa entrada para a planta, principalmente no processo de pulverização. A pulverização é uma forma de aplicação já realizada por algumas empresas que se utilizam de microrganismos que apresentam algum benefício para a planta (promoção de crescimento, indução de defesa, antagonismo) pela sua multifuncionalidade (Preininger *et al.*, 2018). O processo de pulverização independe de uma aplicação feita de forma unitária, o que demandaria mais tempo e necessitaria de mão de obra, além de poder ser realizada por maquinaria já presente na indústria, utilizadas para aplicação de fungicidas, herbicidas e a própria irrigação das plantas. Desta forma, foi testada mais de uma maneira de inoculação para tentar entender a possível diferença entre os tipos de inoculações.

No atual trabalho, nos experimentos 2, 3 e 5, a forma de inoculação do bioinoculante foi realizada por imersão da muda em um recipiente contendo o consórcio + meio de cultura. No

trabalho realizado por Fonseca (2020), além da imersão, 100 microlitros do consórcio foi aplicado diretamente no substrato para garantir a colonização das estirpes do consórcio nas mudas.

A hipótese inicial do experimento era observar resultados similares dos apresentados por Fonseca (2020), tendo em vista a não observação dos efeitos positivos nas mudas pelos resultados anteriores a este experimento, supondo que a forma de inoculação poderia ser um dos fatores pelos quais os efeitos não foram observados.

Nos parâmetros sobrevivência e altura, os valores médios foram muito próximos, não apresentando uma diferença esperada, presumindo que a inoculação não seja o problema para a não observação dos efeitos nas mudas de *Eucalyptus*. Na média obtida da biomassa aérea, foi apresentada uma diferença de mais de 18% encontrada entre as mudas que receberam o inóculo de mudas que não receberam, porém essa diferença não foi significativa, embora esse valor poderia se mostrar uma vantagem real quando colocada em campo. Pela maioria das plantas crescerem no modelo sigmóide (crescimento inicial lento com aumento gradativo), é importante que haja esse aumento de área foliar, tendo um maior aproveitamento da radiação fotossintética, podendo ter um crescimento inicial mais rápido (Stewart e Dwyer, 1994).

Foi observado que houve uma diminuição no número de OTUs no tratamento que recebeu o inóculo, indicando que a introdução das estirpes pode ter influenciado na colonização radicular comparado ao tratamento que não recebeu o consórcio, alterando assim a riqueza da comunidade bacteriana. Esse processo é um indicativo de colonização efetiva do inóculo, pois espera-se que o microbioma da planta inoculada apresente maior dominância dos microrganismos inoculados em comparação com aquelas que não receberam nenhum tratamento específico, e foi colonizada de forma natural. O mesmo resultado foi observado no plantio de mudas que receberam o inóculo de *Lactobacillus plantarum*, havendo uma diminuição na riqueza e diversidade das amostras (Keshri *et al.*, 2018). No índice de diversidade, que indica a variação dessas OTUs foi apresentada uma diferença significativa entre os tratamentos. Em estudos com sistema de cultivo, uma redução da diversidade foi observada no experimento indicando que plantios que recebem algum tipo de manejo podem favorecer alguns grupos de microrganismos (Costa *et al.*, 2021).

A fim de entender a distribuição taxonômica e observar a possível promoção ou a supressão de bactérias, os táxons avaliados foram: Filo, ordem, família e gênero. Os filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes foram os principais filos encontrados nas duas amostras. Os mesmos filos também foram encontrados no trabalho de Fonseca e colaboradores (2017) que também estudavam o microbioma endofítico de *Eucalyptus*. Esses filos são bastante

presentes no solo. A abundância encontrada neste trabalho também é encontrada no trabalho de Delgado-Baquerizo e colaboradores (2018), no qual apresentou uma grande presença dos filos Proteobacteria e Actinobacteria, porém apresentou uma menor porcentagem de Firmicutes do que o atual trabalho. Outros níveis taxonômicos, como ordem e família também foram avaliados e não apresentaram diferenças estatísticas de abundância entre o tratamento controle e o que recebeu o consórcio.

Os gêneros encontrados em maior abundância foram *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Pantoea* e *Roseateles* nos dois tratamentos do experimento. Shen e colaboradores (2015) também encontraram a presença expressiva do gênero *Rhizobium* na região rizosférica de raízes de bananeiras tanto no tratamento controle, quanto no tratamento que recebeu o biofertilizante, indicando uma presença desse gênero no solo.

Entre os gêneros presentes no consórcio, *Paraburkholderia* apresentou um claro aumento na sua abundância relativa, demonstrada pelo aumento da ordem *Burkholderiales* em mudas inoculadas. É importante ressaltar que a denominação *Paraburkholderia* é derivada de *Burkholderia* (Sawana *et al.*, 2014), e é relativamente recente, de modo que essa classificação taxonômica não está presente no banco de dados do *Ribosomal Database Project*, utilizado no presente trabalho.

Também houve um incremento médio na abundância da ordem Rhizobiales, a qual pertencem os gêneros *Methylobacterium* e *Mesorhizobium*. Ainda que a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, ela pode ser considerada, haja vista a alta variabilidade em modelos biológicos e o baixo número amostral utilizado para o sequenciamento. Não foi observada uma diferença significativa especificamente para os gêneros *Methylobacterium* e *Mesorhizobium*. Isso pode representar que, de fato não houve uma colonização por parte desses microrganismos, ou então que a definição taxonômica até o nível de gênero não foi efetiva para os microrganismos utilizados.

Os dados de sequenciamento sugerem que a estirpe relacionada a *Paenibacillus* não foi favorecida pelo uso do consórcio, pois tanto o gênero, quanto seus níveis taxonômicos mais altos não foram impactados pelo tratamento. No trabalho de Keshri e colaboradores (2018), no qual foi observado o aumento ou diminuição dos gêneros inoculados no milho, foi notado que o gênero *Lactobacillus* inoculado aumentou até 24% comparado ao tratamento que não recebeu, contrastando com dados obtidos neste experimento.

A  $\beta$ -diversidade foi avaliada para entender como ela poderia variar entre as amostras dos dois tratamentos. Pela ordenação multidimensional não métrica (NMDS) foi possível notar uma maior distância entre as amostras do tratamento que recebeu o consórcio, mesmo com a

aplicação das 4 estirpes diretamente no substrato e nas miniestacas. A hipótese inicial do trabalho era pautada em uma menor variação da relação de abundância entre as amostras, porém os resultados apresentaram uma maior variação, contrariando a hipótese inicial do experimento. Isso pode ser explicado pela alta colonização de *Roseateles* e *Pantoea* em uma das amostras do tratamento inoculado. As razões desse alto nível de colonização ainda precisam ser mais bem entendidas, haja vista que ocorreu em apenas uma amostra, e que esses gêneros não faziam parte do consórcio.

Também foi possível observar a influência do consórcio no microbioma bacteriano das raízes pela análise linear discriminante do efeito do tamanho (LEfSe). Os filos que foram influenciados pela aplicação do consórcio foram os filos Firmicutes e Actinobacteria. O filo Proteobacteria não pareceu ser influenciado pela aplicação do consórcio, mesmo as 3 das 4 estirpes componentes do inoculante sendo do filo Proteobacteria, o que também foi encontrado nos resultados obtidos pelo Fonseca (2020), que observou uma redução de espécies do filo Proteobacteria com a aplicação do consórcio+fertilizante.

O presente trabalho foi realizado visando a otimizar um bioinoculante com um potencial biofertilizante em mudas de *Eucalyptus*. Para isso foi realizada uma busca de um meio de cultura que oferecesse nutrientes necessários para o crescimento das estirpes, teste de concentração de inóculo, observação dos efeitos de cada componente do consórcio nas mudas, teste do tempo de prateleira, a influência da refrigeração no bioinoculante e testado uma outra alternativa de inoculação e também entender como esse bioinoculante poderia influenciar no microbioma bacteriano radicular a partir do sequenciamento massivo do gene que codifica a subunidade 16S ribossomal. Com isso, espera-se que o atual trabalho possa contribuir com um maior entendimento sobre a otimização e as mudanças na região endofíticas das raízes após a aplicação de um consórcio bacteriano na literatura científica e na melhoria da eficácia de futuros produtos voltados para a produção de *Eucalyptus*.

## 7 – Conclusões

- O meio de cultura TSB se mostrou o mais adequado para o crescimento do consórcio, entre os meios testados.
- A concentração  $10^7$  (10X) do inóculo se mostrou a mais eficiente para aplicação em mudas de *Eucalyptus*.
- Não houveram diferenças significativas na aplicação das estirpes que compõe o consórcio separadamente nas mudas de *Eucalyptus*.
- Embora tenha acontecido uma diminuição da concentração bacteriana no final do experimento comparado a concentração plaqueada inicialmente, não houve perda de viabilidade do número total de células associadas ao consórcio, até o trigésimo segundo dia do experimento.
- A refrigeração aparentemente não afetou significativamente os efeitos do consórcio nas mudas de *Eucalyptus*.
- As formas de inoculação testadas não alteraram significativamente os efeitos causados nas mudas de *Eucalyptus*.
- Os efeitos benéficos observados nos primeiros experimentos com o consórcio não foram reprodutíveis nos últimos experimentos realizados.
- A inoculação promoveu uma redução da diversidade associada à planta e promoveu maior variabilidade composicional nas mesmas. Apenas o gênero *Paraburkholderia* apresentou fortes indícios de colonização. Não houve aumento do gênero *Paenibacillus* em mudas que receberam o consórcio em comparação com mudas do tratamento controle.

## 8 - Referências Bibliográficas

- Ahemad, M. e Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science* 26, 1–20.
- Ali, S., Charles, T. C. e Glick, B. R. (2017). Endophytic Phytohormones and Their Role in Plant Growth Promotion. *Functional Importance of the Plant Microbiome*, 89–105.
- Alori, E. T., Dare, M. O. e Babalola, O. O. (2017). Microbial Inoculants for Soil Quality and Plant Health. *Sustainable Agriculture Reviews* 22, 281–307.
- Alves, J. R., Souza, O. de, P., Sanchez, P. A., Giachini, A. J. e Oliveira, V. L. (2001). Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36, 307-313.
- Andrade (1911). Manual do plantador de eucaliptos. In: *Typographia Brazil de Rothschild* (São Paulo: Edição do autor), pp 3-349.
- Araújo, W. L., Maccheroni Jr., W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O. e Azevedo, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 229–236.
- Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32, 1559–1570.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Badalamenti, E., Sferlazza, S., Veca, S. L. M., Maetzke, F., Sala, G. e Mantia, L. T. (2020). The evolution in time of the concept of fast growing tree species: is it possible to use a definition applicable to all environmental conditions? *Annals of Silvicultural Research* 45, 53-61.
- Basak, B. B., e Biswas, D. R. (2010). Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop. *Biology and Fertility of Soils*, 46(6), 641–648.
- Benite, A. M. C., Machado, S. de P. e Machado, B. da C. (2002). Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. *Química Nova* 25, 1155-1164.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 11–18.
- Berg, M. e Koskella, B. (2018). Nutrient- and Dose-Dependent Microbiome-Mediated Protection against a Plant Pathogen. *Current Biology* 28, 2487–2492.
- Bhattacharyya, P. N. e Jha, D. K. (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1327–1350.
- Bona, E., Lingua, G. e Todeschini, V. (2016). Effect of Bioinoculants on the Quality of Crops. *Bioformulations: For Sustainable Agriculture*, 93–124.
- Brevik, E. C., Cerdà, A., Mataix-Solera, J., Pereg, L., Quinton, J. N., Six, J. e Van Oost, K. (2015). The interdisciplinary nature of soil. *Soil* 1, 117–129.
- Brookes, P. (2001). The Soil Microbial Biomass: Concept, Measurement and Applications in Soil Ecosystem Research. *Microbes and Environments* 16, 131–140.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2010). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4516–4522.
- Cardoso, E. J. B. N. e Andreote, F. D. (2016). *Microbiologia de solo*. 2 eds. (Piracicaba, ESALQ), pp 55-225.

- Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*.
- Chen, S., Shahi, C., Chen, H. Y. H. e McLaren, B. (2017). Economic analysis of forest management alternatives: Compositional objectives, rotation ages, and harvest methods in boreal forests. *Forest Policy and Economics* 85, 124–134.
- Chen, Y., Kim, J. K., Hirning, A. J., Josi, K. e Bennett, M. R. (2015). Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium. *Science* 349, 986–989.
- Cochrane, S. A. e Vederas, J. C. (2014). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews* 36, 4–31.
- Colombo, F., Macdonald, C.A., Jeffries, T.C., Powell, J.R. e Singh, B.K. (2016). Impact of forest management practices on soil bacterial diversity and consequences for soil processes. *Soil Biology and Biochemistry* 94, 200–210.
- Costa, A. D.; Araújo, R. da C.; Diniz, B. L. M. T.; Sousa, S. de; Coaracy, T. do N.; Silva, W. A. O. da .; Saraiva, M. M. T. e Silva, H. M. F. das N. (2021). Epiedaphic macrofauna in noni cultivation area under agricultural practices demand. *Research, Society and Development* 10. e20610111664.
- Cuong, T., Chinh, T. T. Q., Zhang, Y. e Xie, Y. (2020). Economic Performance of Forest Plantations in Vietnam: *Eucalyptus*, *Acacia mangium*, and *Manglietia conifera*. *Forests* 11, 284.
- Damin, M. R., Minowa, E., Alcântara, M. R. e Oliveira, M. N. (2008). Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal of Texture Studies* 39, 40–55.
- Dave, R. I., e Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7, 31–41.
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-gonzález, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., Singh, B. K. e Fierer, N. (2018). Bacteria Found in Soil. *Science* 325, 320–325.
- Dixon, R.K., Winjum, J.K. e Schroeder, P.E. (1993). Conservation and sequestration of carbon. The potential of forest and agroforest management practices. *Global Environmental Change* 3, 159–173.
- Duchene, O., Vian, J.-F. e Celette, F. (2017). Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 240, 148–161.
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196, 3–14.
- Eggers, J., Rätty, M., Öhman, K. e Snäll, T. (2020). How Well Do Stakeholder-Defined Forest Management Scenarios Balance Economic and Ecological Forest Values? *Forests*, 11, 86.
- Elli, E. F., Sentelhas, P. C., de Freitas, C. H., Carneiro, R. L. e Alvares, C. A. (2019). Assessing the growth gaps of *Eucalyptus* plantations in Brazil – Magnitudes, causes and possible mitigation strategies. *Forest Ecology and Management* 451, 117464.
- Embrapa (2000). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Plantio de eucalipto na pequena propriedade rural. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/290994/plantio-de-eucalipto-na-pequena-propriedade-rural>. Acesso em: 03/04/2020.
- Embrapa (2011). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2011). Nova legislação, recomendação de doses de inoculantes e pré-inoculação: riscos ao sucesso da contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41902/1/ferreirap.325-327.pdf>. Acesso em: 15/02/2021.
- Embrapa (2018). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em 29/03/2020.
- Embrapa (2018). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Plano de Desenvolvimento de Florestas plantadas. Disponível em:



<https://www.embrapa.br/documents/10180/0/Plano+Nacional+de+Desenvolvimento+de+Florestas+Plantadas/90e38846-d556-da1d-0213-dda16a75088e>. Acesso em: 03/04/2020.

Embrapa (2019). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Inoculação reduz custos com fertilizantes na soja. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46716731/inoculacao-reduz-custos-com-fertilizantes-na-soja>. Acesso em: 15/02/2021.

EUCLID (2006). Centre for Plant Biodiversity Research: Eucalypts of Australia. Fourth Edition. Disponível em: <http://keyserver.lucidcentral.org:8080/euclid/data/02050e02-0108-490e-89000e0601070d00/media/Html/index.htm>. Acesso em: 06/04/2020.

FAO (2003). Food and Agriculture Organization. Organização das Nações Unidas para a alimentação e agricultura. Disponível em: <http://www.fao.org/3/x3996p/x3996p00.htm#Contents>. Acesso em 17/07/2020.

FAO (2020). Food and Agriculture Organization. Disponível em: <http://www.fao.org/forest-resources-assessment>. Acesso em 23/05/2020.

Ferez, A. P. C., Campoe, O. C., Mendes, J. C. T. e Stape, J. L. (2015). Silvicultural opportunities for increasing carbon stock in restoration of Atlantic forests in Brazil. *Forest Ecology and Management* 350, 40–45.

Fonseca, E. da S., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Balieiro, F. de C., Tiedje, J. M. e Rachid, C. T. C. da C. (2017). The Microbiome of *Eucalyptus* Roots under Different Management Conditions and Its Potential for Biological Nitrogen Fixation. *Microbial Ecology* 75, 183–191.

Fonseca, E. S. (2020). Desenvolvimento de consórcio microbiano bioestimulante e avaliação das suas influências sobre a ecologia da rizosfera de *Eucalyptus*. Tese. (Doutorado em Ciências). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 103f.

Fox, T.R. (2000). Sustained productivity in intensively managed forest plantations. *Forest Ecology and Management* 138, 187–202.

FSC (2020). Forest Stewardship Council. Disponível em: <https://br.fsc.org/pt-br>. Acesso em 29/04/2020.

Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S. e Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100, 1738–1750.

Gonzalez, R., Treasure, T., Wright, J., Saloni, D., Phillips, R., Abt, R. e Jameel, H. (2011). Exploring the potential of *Eucalyptus* for energy production in the Southern United States: Financial analysis of delivered biomass. Part I. Biomass and Bioenergy 35, 755–766.

Good, A. (2018). Toward nitrogen-fixing plants. *Science* 359, 869–870.

Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L. e Krishnamurthy, L. (2014). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotech* 5, 355–377.

Gosal, S. K. e Kaur, J. (2017). Microbial Inoculants: A Novel Approach for Better Plant Microbiome Interactions. *Probiotics in Agroecosystem*, 269–289.

Goswami, D., Thakker, J. N. e Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 2, 1-19.

Govind, G., Shailendra, S. P., Narendra, K. A., Sunil, K. S. e Vinod, S. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial & Biochemical Technology* 7, 96-102.

Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S. e Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research* 206, 131–140.

Haichar, F. el Z., Santaella, C., Heulin, T. e Achouak, W. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* 77, 69–80.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T. e Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia electronica* 4, 1-9.

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. e Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60, 579–598.
- Hayat, R., Ahmed, I. e Sheirdil, R. A. (2012). An Overview of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. *Crop Production for Agricultural Improvement*, 557–579.
- Hempfling, W. P. e Stanley E. M. (1975). Effects of Varying the Carbon Source Limiting Growth on Yield and Maintenance Characteristics of *Escherichia coli* in Continuous Culture. *Journal of bacteriology* 123, 1076-1087.
- Herrmann, L. e Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 8859–8873.
- IBÁ (2015). Indústria Brasileira de Árvores. Relatório Anual 2015. Disponível em: <https://www.iba.org/publicacoes>. Acesso em 31/07/2020.
- IBÁ (2017). Indústria Brasileira de Árvores. Relatório Anual 2017. Disponível em: <https://www.iba.org/publicacoes>. Acesso em 31/07/2020.
- IBÁ (2019). Indústria Brasileira de Árvores. Relatório Anual 2019. Disponível em: <https://www.iba.org/publicacoes>. Acesso em 25/03/2020.
- IBÁ (2020). Indústria Brasileira de Árvores. Relatório Anual 2020. Disponível em: <https://www.iba.org/publicacoes>. Acesso em 16/02/2021.
- Saha, R., Ginwal, H.S., Chandra, G. et al. (2019). Integrated assessment of adventitious rhizogenesis in *Eucalyptus*: root quality index and rooting dynamics. *Journal of Forestry Research*, 1-17.
- IDESAM (2018) Instituto de Conservação e Desenvolvimento Sustentável da Amazônia. Cartilha. Disponível em: <https://idesam.org>. Acesso em 26/04/2020.
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A. e Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science* 8, Artigo 1617.
- Jung, B. K., Khan, A. R., Hong, S.-J., Park, G.-S., Park, Y.-J., Kim, H.-J., ... Shin, J.-H. (2017). Quorum sensing activity of the plant growth-promoting rhizobacterium *Serratia glossinae* GS2 isolated from the sesame (*Sesamum indicum* L.) rhizosphere. *Annals of Microbiology* 67, 623–632.
- Kaminsky, L. M., Trexler, R. V., Malik, R. J., Hockett, K. L. e Bell, T. H. (2018). The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants. *Trends in Biotechnology* 22, 1-12.
- Keshri, J., Chen, Y., Pinto, R., Kroupitski, Y., Weinberg, Z. G., & Sela, S. (2018). Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without *Lactobacillus plantarum* inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 4025–4037.
- Kloepper, J. W. e Schroth, M. N. (1978). Plant growth probioting rhizobacteria on radishes. In IV Conferência internacional sobre bactérias fitopatogênicas. Disponível em: <http://www.bashanfoundation.org/contributions/Kloepper-J/kloeperradish.pdf>. Acesso em: 10 agosto 2020.
- Kloepper J. W e Beauchamp. C. J. (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 1219-1232.
- Koebel, B. M., Levet, A.-L., Nguyen-Van, P., Purohoo, I. e Guinard, L. (2016). Productivity, resource endowment and trade performance of the wood product sector. *Journal of Forest Economics*, 22, 24–35.
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., ... Saxena, A. K. (2019). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23, 101487.
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, A., Meena, V. S., ... Saxena, A. K. (2019). Rhizospheric Microbiomes: Biodiversity, Mechanisms of Plant Growth Promotion, and Biotechnological Applications for Sustainable Agriculture. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*, 19–65.
- Kudoyarova, G., Arkhipova, T., Korshunova, T., Bakaeva, M., Loginov, O. e Dodd, I. C. (2019). Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses. *Frontiers in Plant Science* 10, Artigo 1368.

- Kumar, A., Bahadurl, I., Maurya, B. R., Raghuwanshi, R., Meenal, V. S., Singh, D. K. e Dixit, J. (2015). Does a Plant Growth Promoting Rhizobacteria Enhance Agricultural Sustainability? *Journal of pure and applied microbiology* 9, 715-724.
- Kumar, V. V. (2016). Plant Growth-Promoting Microorganisms: Interaction with Plants and Soil. *Plant, Soil and Microbes*, 1–16.
- Lawrence, D. e Vandecar, K. (2015). Effects of tropical deforestation on climate and agriculture. *Nature Clim Change* 5, 27–36.
- Lazaro, C. Z., Varesche, M.B.A., e Silva e E.L. (2015). Efeito da concentração de inóculo, pH, intensidade de luz e regime de iluminação na produção de hidrogênio por consórcio microbiano fototrófico. *Energia renovável* 75, 1-7.
- Lopes, L. D., Pereira e Silva, M. de C. e Andreote, F. D. (2016). Bacterial Abilities and Adaptation Toward the Rhizosphere Colonization. *Frontiers in Microbiology* 7, 1341.
- Lupwayi, N., Olsen, P., Sande, E., Keyser, H., Collins, M., Singleton, P., e Rice, W. (2000). Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research* 65, 259–270.
- Malusà, E., Pinzari, F. e Canfora, L. (2016). Efficacy of Biofertilizers: Challenges to Improve Crop Production. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* 17–40.
- MAPA (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA/MAPA 13/2011. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>. Acesso em: 15/02/2021.
- Marron, N. e Epron, D. (2019). Are mixed-tree plantations including a nitrogen-fixing species more productive than monocultures? *Forest Ecology and Management* 441, 242–252.
- Martínez-Viveros, O, Jorquera, M.A, Crowley, D. E, Gajardo, G, e Mora, M.L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* 10, 293-319.
- Matilla, M. A. e Krell, T. (2018). Plant Growth Promotion and Biocontrol Mediated by Plant-Associated Bacteria. *Microorganisms for Sustainability*, 45–80.
- Matos, P. S., Barreto-Garcia, P. A. B., Scoriza, R. N. (2019). Effect of different forest management practices on the soil macrofauna in the arboreal caatinga. *SciELO*, v. 32, n. 3, 741-750.
- Mawarda, P. C., Le Roux, X., Dirk van Elsas, J. e Salles, J. F. (2020). Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 148, 1-29.
- Mendes, R., Garbeva, P. e Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 634–663.
- Meneguzzi, A., Navroski, M. C., Lovatel, Q. C., Marco, F. T., Pereira, M. O. e Tonett, E. L. (2015). Indole acetic acid influences on rooting of *Pittosporum tobira* cuttings. *Ciências Agroveterinárias* 14, 24-28.
- Mishra, B., Gyawali, B. R., Paudel, K. P., Poudyal, N. C., Simon, M. F., Dasgupta, S. e Antonious, G. (2018). Adoption of Sustainable Agriculture Practices among Farmers in Kentucky, USA. *Environmental Management* 62, 1060–1072.
- Misra, R. K. (1998). *Plant and Soil* 206, 37–46.
- Mitter, B., Brader, G., Pfaffenbichler, N. e Sessitsch, A. (2019). Next generation microbiome applications for crop production — limitations and the need of knowledge-based solutions. *Current Opinion in Microbiology* 49, 59– 65.
- Montebello, A. E. S. (2010). Configuração, reestruturação e mercado de trabalho do setor de celulose e papel no Brasil. Tese (Doutorado em Economia Aplicada). – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 173 f.

- Manzoor, M., Abbasi, M. K. e Sultan, T. (2016). Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Maize Rhizosphere and Their Potential for Rock Phosphate Solubilization–Mineralization and Plant Growth Promotion. *Geomicrobiology Journal* 34, 81–95.
- Moreira, J. M. M. Á. P., Simioni, F. J. e Oliveira, E. B. de. (2017). Importância e desempenho das florestas plantadas no contexto do agronegócio brasileiro. *Floresta* 47, 85-94.
- Morovic, W. e Budinoff, C. R. (2020). Epigenetics: A New Frontier in Probiotic Research. *Trends in Microbiology* 29, 117-126.
- Mukherjee, S. e Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology* 17, 371–382.
- Mustafa, S., Kabir, S., Shabbir, U. e Batool, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach. *Symbiosis* 78, 115–123.
- Muyzer G, de Waal E. C. e Uitterlinden A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59, 695–700.
- Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanohoun, A. e Baba-Moussa, L. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* 15, 1452–1463.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. e Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-33.
- Oliveira, A. L. M. de, Costa, K. D. R., Ferreira, D. C., Milani, K. M. L., Dos Santos, O. J. A. P., Silva, M. B. e Zuluaga, M. Y. A. (2014). Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. *Biochemistry and Biotechnology Reports* 3, 56-77.
- Ontl, T. A., Janowiak, M. K., Swanston, C. W., Daley, J., Handler, S., Cornett, M., ... Patch, N. (2019). Forest Management for Carbon Sequestration and Climate Adaptation. *Journal of Forestry* 118, 86–101.
- Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., Shelat, H. N. e Vyas, R. V. (2016). *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, 257–270.
- Parrotta, J., Yeo-Chang, Y. e Camacho, L. D. (2016). Traditional knowledge for sustainable forest management and provision of ecosystem services. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management* 12, 1–4.
- Pinheiro, R. C., de Deus, J. C., Nouvellon, Y., Campoe, O. C., Stape, J. L., Aló, L. L., ... Laclau, J.-P. (2016). A fast exploration of very deep soil layers by Eucalyptus seedlings and clones in Brazil. *Forest Ecology and Management* 366, 143–152.
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M. e Jat, L. K. (2019). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, 129–157.
- Preininger, C., Sauer, U., Bejarano, A. e Berninger, T. (2018). Conceitos e aplicações de pulverização foliar para inoculantes microbianos. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 7265-7282.
- Qiu, Z., Egidi, E., Liu, H., Kaur, S. e Singh, B. K. (2019). New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnology Advances* 37, 1-11.
- Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W. e Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology* 86, 41–54.
- Raftoyannis, Y. e Dick, M. W. (2002). Effects of inoculum density, plant age and temperature on disease severity caused by pythiaceus fungi on several plants. *Phytoparasitica* 30, 67–76.
- Ramakrishna, W., Yadav, R. e Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology* 138, 10-18.
- Ritz, K. (2007). The Plate Debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 358–362.

- Repáč, I. (2010). Ectomycorrhizal Inoculum and Inoculation Techniques. *Soil Biology*, 43–63.
- Ruppel, S., Hecht-Buchholz, C., Remus, R., Ortmann, U. e Schmelzer, R. (1992). Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil* 145, 261–273.
- Sabir, A. (2013). Improvement of grafting efficiency in hard grafting grape *Berlandieri* hybrid rootstocks by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Scientia Horticulturae* 164, 24–29.
- Sahu, P. K. e Brahma Prakash, G. P. (2016). Formulations of Biofertilizers – Approaches and Advances. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, 179–198.
- Salla, T. D., Ramos da Silva, T., Astarita, L. V., e Santarém, E. R. (2014). *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of *Eucalyptus* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 85, 14–20.
- Sammauria, R., Kumawat, S., Kumawat, P., Singh, J. e Jatwa, T. K. (2020). Microbial inoculants: potential tool for sustainability of agricultural production systems. *Archives of Microbiology* 202, 677–693.
- Santos, M. L. dos, Berlitz, D. L., Wiest, S. L. F., Schünemann, R., Knaak, N. e Fiuza, L. M. (2018). Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 61, e18160431.
- Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., Kumar, K. V., Yellareddygar, S. K. R., Deshmukh, A. M., Patel, P. R. e Gangurde, N. S. (2012). Potential of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agriculture. *Bacteria in Agrobiology: Plant Probiotics*, 287–313.
- Sawana, A., Adeolu, M. e Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics* 5, 429.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. e Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537–7541.
- Siddiqui, Z. A. (2005). PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* 32, 111–142.
- Sharma, R., Paliwal, J. S., Chopra, P., Dogra, D., Pooniya, V., Bisaria, V. S., ... Sharma, S. (2017). Survival, efficacy and rhizospheric effects of bacterial inoculants on *Cajanus cajan*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 240, 244–252.
- Shen, Z., Ruan, Y., Chao, X., Zhang, J., Li, R., & Shen, Q. (2015). Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression. *Biology and Fertility of Soils* 51, 553–562.
- Shi, S., Nuccio, E. E., Shi, Z. J., He, Z., Zhou, J. e Firestone, M. K. (2016). The interconnected rhizosphere: High network complexity dominates rhizosphere assemblages. *Ecology Letters* 19, 926–936.
- Silva-Junior, O.B., Faria, D.A. e Grattapaglia, D. (2015). A flexible multi-species genome-wide 60K SNP chip developed from pooled resequencing of 240 *Eucalyptus* tree genomes across 12 species. *New Phytologist* 206, 1527–1540.
- Singh, J. S. (2013). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Resonance* 18, 275–281.
- Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *Biotech* 7, 255.
- Souza, E. L., Antonioli, Z. I., Goulart, M. R., Pazzini, E. D., Barbosa, D. S. de F., Karsten S. e Guilherme (2012). Efeito da inoculação com isolados de fungos ectomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de *eucalyptus grandis* hill ex maiden. *Ciência Florestal* 22, 251–261.
- Souza, R. de, A., A. e Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology* 38, 401–419.

- Spohn, M. (2016). Element cycling as driven by stoichiometric homeostasis of soil microorganisms. *Basic and Applied Ecology* 17, 471–478.
- Stewart, D.W. e Dwyer, L.M. (1994). Appearance time, expansion rate and expansion duration for leaves of field grown maize (*Zea mays* L.). *Canadian Journal of Plant Science* 74, 31-36.
- Supaphol, S., Panichsakpatana, S., Trakulnaleamsai, S., Tungkananuruk, N., Roughjanajirapa, P. e O'Donnell, A. G. (2006). The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils. *Journal of Microbiological Methods* 65, 432–441.
- Suyal, D. C., Soni, R., Sai, S. e Goel, R. (2016). Microbial Inoculants as Biofertilizer. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, 311–318.
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, MS, Shahid, N., e Aaliya, K. (2017). Gargalos na comercialização e perspectivas futuras do PGPR. *Applied Soil Ecology*, 121, 102-117.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A. e Aronsson, A.-C. (2017). Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science* 8, 49.
- Tiwari, S., Prasad, V. e Lata, C. (2019). *Bacillus*: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 43–55.
- Vandana, U. K., Chopra, A., Bhattacharjee, S. e Mazumder, P. B. (2017). Microbial Biofertilizer: A Potential Tool for Sustainable Agriculture. *Microorganisms for Green Revolution* 6, 25–52.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. e Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* 21, 573.
- Venturi, V. e Keel, C. (2016). Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science* 21, 187–198.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A. e Brown, P. H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-32.
- Zarpelon, T. G., Guimarães, L. M. da S., Alfenas-Zerbini, P., Lopes, E. S., Mafia, R. G. e Alfenas, A. C. (2016). Rhizobacterial characterization for quality control of eucalyptus biogrowth promoter products. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 973-979.
- Zuffo, A. M., Rezende, P. M., Bruzi, A. T., Oliveira, N. T., Soares, I. O., Neto, G. F.G., Cardillo, Bruno, E. S., e Silva, L. O. (2015). Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. *Ciências Agrárias* 38, 87-93.

## 9 –Anexos

Meios de Cultura e Soluções utilizadas.

Meio *Fitato low*

Reagentes:

Glicose.....	10 g
Sulfato de Amônio.....	0,5 g
Cloreto de Potássio.....	0,2 g
Sulfato de Magnésio heptahidratado.....	0,1 g
Fitato de Cálcio* .....	2 g
Extrato de Levedura.....	0,5 g
Sulfato de Manganês.....	0,005 g
Sulfato de Ferro.....	0,005 g
Água Destilada.....	1000 mL

pH 7

\*Reagente insolúvel

## Solução de PBS (Phosphate buffered saline) 1x

## Reagentes:

Cloreto de Sódio.....	0,82 g
Fosfato Sódio.....	1,05 g
Fosfato Sódio Monobásico.....	0,355 g
Água Destilada.....	1000 mL

pH 7



## Meio YEPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose)

Dextrose.....	20,0 g
Extrato de Levedura.....	10,0 g
Peptona.....	20,0 g
Água Destilada.....	1000 mL

pH 7

## Desinfecção das Raízes

Com finalidade de eliminar os organismos associados à superfície das raízes para o estudo dos microrganismos endofíticos, os fragmentos de raiz amostrados foram submetidos ao processo de desinfecção superficial.

O procedimento foi executado seguindo as seguintes etapas:

- 1- Lavagem em água corrente;
- 2- Exposição a luz ultravioleta por 5 minutos;
- 3- Lavagem com álcool 70% por 1 minuto;
- 4- Lavagem com hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos;
- 5- Lavagem com álcool 70% por 1 minuto;
- 6- Novamente seguida de mais 5 lavagem com água destilada esterilizada.

O processo foi adaptado de Araújo e colaboradores (2001).

## Meio YEPG (Yeast Extract-Peptide-Glucose)

Glicose.....	1,0 g
Extrato de Levedura.....	0,2 g
Peptona.....	2,0 g
Nitrato de Amônio.....	0,2 g
Água Destilada.....	1000 mL

pH 7