



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA- PGAGRO**

**DANYLLO AMARAL DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DE Pseudomonas ENDOFÍTICAS QUANTO À PRODUÇÃO  
DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE BIOESTIMULANTES DO  
DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

**Belém-PA**

**2019**

**DANYLLO AMARAL DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Pseudomonas* ENDOFÍTICAS QUANTO À PRODUÇÃO  
DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE BIOESTIMULANTES DO  
DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Agronomia.  
Linha de pesquisa: Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Batista de Souza

**Belém-PA**

**2019**

---

Oliveira, Danyllo Amaral de

Caracterização de *Pseudomonas* endofíticas quanto à produção de compostos potencialmente bioestimulantes do desenvolvimento vegetal / Danyllo Amaral de Oliveira. – Belém, 2019.

56 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Batista de Souza.

1. *Pseudomonas* 2. *Pseudomonas putida* 3. Bactérias gram-negativas I. Souza, Cláudia Regina Batista de (orient.) II. Título.

**CDD – 579.332**

---

Bibliotecária-Documentalista: Letícia Lima de Sousa – CRB2/1549

**DANYLLO AMARAL DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DE Pseudomonas ENDOFÍTICAS QUANTO À PRODUÇÃO  
DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE BIOESTIMULANTES DO  
DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Agronomia. Linha de pesquisa: Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas.

Data da aprovação: 25 de fevereiro de 2019

Banca Examinadora

Belém (PA), 25 de fevereiro de 2019.



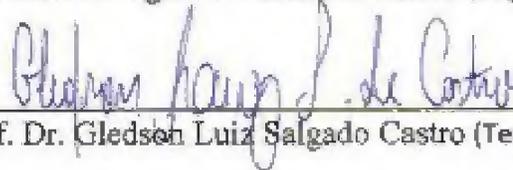
Prof.<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Regina Batista de Souza (Presidente/Orientadora)



Prof.<sup>a</sup>. Dra. Aline Medeiros Lima (Primeira Examinadora)



Prof. Dr. Agenor Valadares Santos (Segundo Examinador)



Prof. Dr. Gledson Luiz Salgado Castro (Terceiro Examinador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu bom Deus, que iluminou meus caminhos durante toda vida, aumentando a minha fé a cada dia e dando forças para que eu realize os meus sonhos.

À Universidade Federal Rural da Amazônia em especial ao Programa de Pós-graduação em Agronomia- PGAGRO pela oportunidade de fazer um mestrado acadêmico.

À Universidade Federal do Pará pela estrutura concedida para a pesquisa.

À Fapespa por conceder recursos para a execução do trabalho.

Ao Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ por conceder uma bolsa de estudos para melhor realização do estudo.

À minha orientadora Cláudia Batista pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa, conhecimentos repassados e auxílios durante a pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Biologia molecular, Angelo Pereira, Aline Medeiros, Cleyson Serrão, Daiany Carrera, Daihany Callegari, Francinilson Meirelles, Lígia Pontes, Nicolle Barros, Sávio Reis, Solange Ferreira, pela amizade, conhecimentos repassados e ajuda durante a execução do trabalho.

Aos meus pais Irenaldo Oliveira e Rejane Oliveira, e meus irmãos Daniel Oliveira e Jamilly Oliveira, que sempre com muito amor incentivaram meus estudos, com conselhos, tendo paciência, e confiança nas minhas decisões.

À minha namorada Lana Carvalho, que passou junto comigo os períodos mais difíceis da execução desta pesquisa e sempre se fez presente para me ajudar.

À todas as outras pessoas que de alguma forma ajudaram durante a execução desse trabalho.

A todos meus sinceros agradecimentos e reconhecimento.

## RESUMO

*Pseudomonas* é um gênero de bactérias gram-negativas frequentemente encontradas no solo ou em relação simbiótica com plantas. Quando presentes nos tecidos internos do vegetal são denominadas bactérias endofíticas, sendo algumas consideradas bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB), visto que são capazes de atuar na produção de fitoestimulantes, biofertilizantes e substâncias de biocontrole. Estudos prévios identificaram bactérias *Pseudomonas* (isolados Pt12 e Pt13) associadas a raízes de *Piper tuberculatum*, uma piperácea de ocorrência na região amazônica com conhecida resistência ao *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, agente causal da fusariose na pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). O presente estudo tem como objetivos a caracterização dos isolados Pt12 e Pt13 quanto à capacidade de produzir sideróforos, ácido indolacético (AIA) e solubilizar fosfatos. Os resultados obtidos evidenciaram a capacidade de ambos os isolados em produzir AIA, principalmente quando na presença de maior concentração de triptofano, indicando se tratar de bactérias produtoras de AIA por vias biossintéticas dependentes deste aminoácido. O isolado Pt12, previamente identificado como *Pseudomonas putida*, também foi capaz de produzir sideróforos quando cultivado nos meios LB líquido (Luria-Bertani) e TSB (Tryptona de soja) e avaliado através de ensaios com CAS (Cromo azulol S). Além disto, quando cultivado em meio NBRIP este isolado foi capaz de solubilizar fosfato tri-cálcico, o que foi evidenciado por meio da formação de halos transparentes ao redor das colônias bacterianas em meio sólido, e pela reação com o reagente molibdênio azul em meio líquido, não observadas essas características no isolado Pt13 nas condições do experimento. Concluindo que essas *Pseudomonas* possivelmente podem atuar no desenvolvimento vegetal caracterizando-as como bactérias promotoras do crescimento vegetal.

**Palavras-chave:** Promotoras de crescimento. Ácido indolacético. Sideróforos. Solubilização de fosfato

## ABSTRACT

*Pseudomonas* is a genus of gram-negative bacteria frequently found in soil or in symbiotic relationship with plants. When these bacteria occur into internal tissues of plants, they are denominated endophytic bacteria. Among them, some bacteria are known as Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB), since they are able to produce phytoestrogens, biofertilizers and biocontrol substances. Previous studies have identified *Pseudomonas* bacteria (isolates Pt12 and Pt13) associated with roots of *Piper tuberculatum*, a piperaceae occurring in the Amazon region with known resistance to infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causal agent of fusariosis of black pepper (*Piper nigrum* L.). The present study aims to characterize these two isolates regarding their abilities to produce siderophores and indoleacetic acid (IAA) and solubilize inorganic phosphates. Our results showed that isolates Pt12 and Pt13 were able to produce IAA, especially in the presence of high concentration of tryptophan, indicating that they are IAA-producing bacteria by tryptophan-dependent biosynthetic pathways. The isolate Pt12, identified previously as a *Pseudomonas putida*, was also able to produce siderophores when cultivated on LB broth (Luria-Bertani) and TSB (Tryptone Soybean) media, and analyzed through CAS (Chrome Azurol S) assay. In addition, when cultivated in NBRIP medium the isolate Pt12 was able to solubilize tri-calcium phosphate, which was showed by detection of transparent halos around the bacterial colonies and by the reaction with the molybdenum blue reagent in liquid medium, these characteristics were not observed in the isolated Pt13 under the conditions of the experiment. Concluding that these *Pseudomonas* possibly can act in the development vegetal characterizing them like plant growth-promoting bacteria.

**Keywords:** Growth-promoting . Indole acetic acid. Siderophores. Phosphate solubilization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Desenho esquemático dos possíveis compostos produzidos por bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> .....	12
<b>Figura 2-</b>	Esquema simplificado da ação do sideróforo bacteriano na captura do ferro quando liberado no meio extracelular.....	15
<b>Figura 3-</b>	Estrutura química hidroxamato (esquerda) e catecol (direita) dos dois principais sideróforos encontrados em bactérias pertencentes ao gênero <i>Pseudomonas</i> .....	16
<b>Figura 4-</b>	Produção de sideróforos pelos isolados Pt12 e Pt13 em meio CAS sólido após 24, 72 e 120 h de cultivo nos meios 2% LB e 0,6 % de TSB.....	37
<b>Figura 5-</b>	Detecção de sideróforos em solução CAS. ....	39
<b>Figura 6-</b>	Produção de sideróforos com solução CAS.....	40
<b>Figura 7-</b>	Produção de ácido indolacético ( $\mu\text{g/mL}$ ) na concentração de 0,2 g/L de L-triptofano..	44
<b>Figura 8-</b>	Produção de ácido indolacético ( $\mu\text{g/mL}$ ) na concentração de 3 g/L de L-triptofano.....	46
<b>Figura 9-</b>	Experimento em placas de NBRIP sólido.....	47
<b>Figura 10-</b>	Visualização da solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido.....	49
<b>Figura 11-</b>	Quantificação da solubilização de fosfato pelos isolados Pt12 e verificação da mudança de pH nos meios dos isolados Pt12 e Pt13 em NBRIP líquido.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Produção de sideróforos pelo isolado Pt12.....	38
<b>Tabela 2 -</b>	Produção de ácido indolacético ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação dos isolados Pt12 e Pt13 no meio TSB-Trp nas concentrações de 0,2 g/L e 3 g/L, com e sem extrato da <i>P. nigrum</i> . .....	43
<b>Tabela 3 –</b>	Índice de solubilização de fosfatos inorgânicos das três repetições do isolado Pt12. ....	48
<b>Tabela 4 –</b>	Características obtidas pelos isolados Pt12 e Pt13 após a realização dos experimentos nas condições definidas, mostrando os resultados que foram positivos (+) e negativos (-).....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
CAS	Crome Azurol S
ext	Extrato da pimenta-do-reino
HDTMA	Brometo de hexadeciltrimetilamio
IS	Índice de solubilização
LB	Meio Luria Bertani
NBRIP	Meio do National Botanical Research Institute Phosphate
PGPB	Plant Growth-Promoting Bacteria (Bacteria promotora de crescimento de plantas)
SU%	Unidade de sideróforos
TSA	Tryptone soya agar ou Triptona Soja sólido
TSB	Tryptone soya both ou Triptona Soja líquido
TSB-Trp	Meio TSB suplementado com L-triptofano

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	11
<b>1.1 Revisão de literatura</b> .....	13
1.1.1 O gênero <i>Pseudomonas</i> associado a plantas .....	13
1.1.2. Produção de sideróforos bacterianos .....	14
1.1.3. Produção de ácido indolacético .....	17
1.1.4. Solubilização de fosfato .....	19
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DE <i>Pseudomonas</i> QUANTO A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE BIOESTIMULANTES DO DESENVOLVIMENTO VEGETAL</b> .....	28
<b>2.1. Introdução</b> .....	28
<b>2.2. Material e métodos</b> .....	30
2.2.1 Isolados de <i>Pseudomonas</i> endofíticas.....	30
2.2.2. Produção de sideróforos pelos micro-organismos do gênero <i>Pseudomonas</i> .30	
2.2.2.1. Detecção em meio CAS sólido .....	30
2.2.2.2. Produção de sideróforos em solução CAS .....	31
2.2.3. Produção de ácido indolacético pelos micro-organismos do gênero <i>Pseudomonas</i> .....	32
2.2.3.1. Produção de AIA em membranas de nitrocelulose .....	32
2.2.3.2. Quantificação o AIA em meio líquido .....	33
2.2.4. Solubilização de fosfato .....	34
2.2.4.1. Solubilização em meio NBRIP sólido .....	34
2.2.4.2. Solubilização de fosfato NBRIP líquido .....	34
2.2.5. Análise dos dados .....	35
<b>2.3. Resultados e discussão</b> .....	35
2.3.1. Produção de sideróforos.....	35
2.3.2. Produção de AIA .....	41
2.3.3. Solubilização de fosfato .....	47
<b>2.4. Conclusão</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Compostos benéficos produzidos por micro-organismos podem ser utilizados como uma tática de promover uma agricultura com menor impacto ambiental e mais produtiva. Diversos estudos revelam o potencial de micro-organismos na melhoria da germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento e desenvolvimento vegetal, nutrição, controle de doenças e produtividade de diversas culturas (MENDES et al., 2013).

A possível produção de fitohormônios, bem como, enzimas e sideróforos capazes de solubilizar e/ou capturar nutrientes essenciais como o fósforo e o ferro, podem promover o crescimento de plantas e está relacionada ao biocontrole contra fitopatógenos (GLICK, 2012), como os fungos do gênero *Fusarium*, através do antagonismo competitivo, espessamento da parede celular ou por indução sistêmica de resistência (GLICK, 2012; AGISHA et al., 2017).

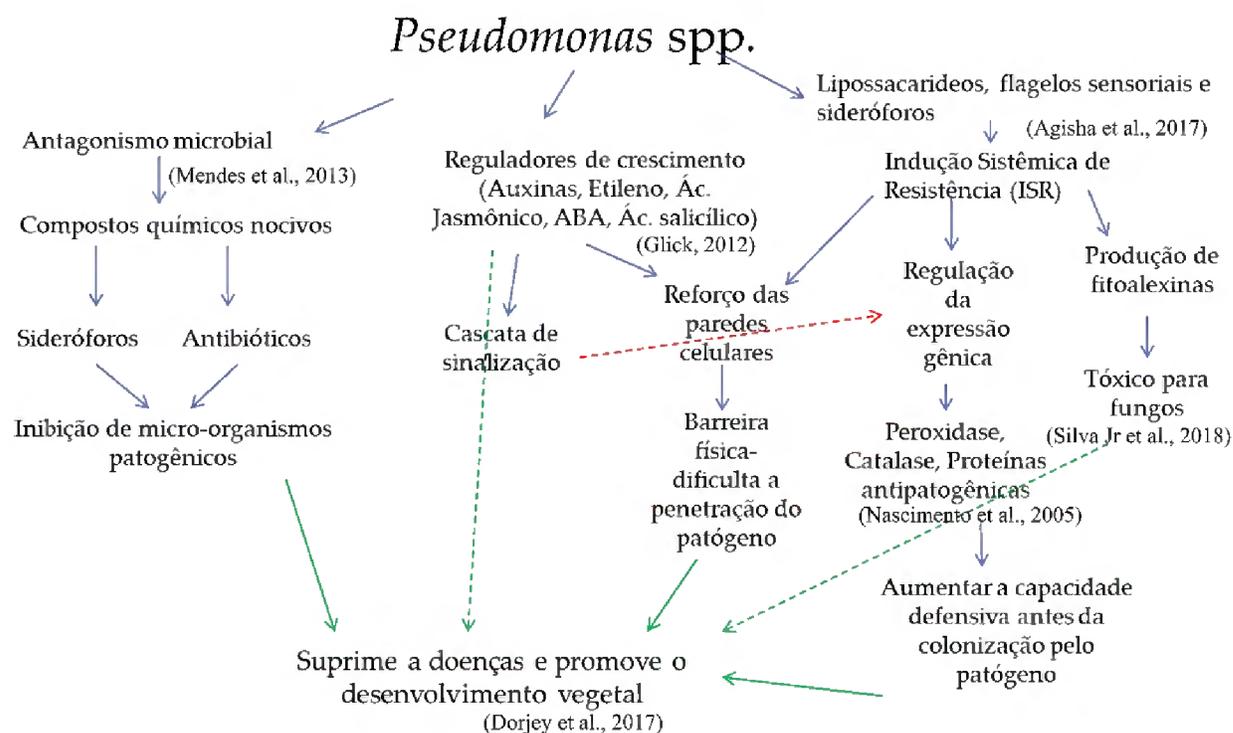
*Pseudomonas* spp. são muito conhecidas na literatura como bactérias denominadas de promotoras de crescimento de plantas (PGPB, do inglês Plant Growth-Promoting Bacteria), micro-organismos com características de produzir substâncias benéficas (FIGURA 1) que atuam em três vias para favorecer o desenvolvimento vegetal: na fitoestimulação, biofertilização e no biocontrole (DORJEY et al., 2017).

No intuito de descobrir uma medida mitigadora para a fusariose da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), doença que causa grande devastação nos plantios brasileiros, várias medidas já foram estudadas e aplicadas. Pesquisas de combate a doença por controle da irrigação, adubação, controle químico via fungicidas e identificação de indivíduos de *P. nigrum* resistentes entre os poucos genótipos brasileiros (centro de origem da espécie é na Índia), já foram efetuadas, no entanto, nenhuma delas eficiente (POLTRONIERI et al., 2000; BASTOS & SANTOS, 2016).

Albuquerque et al. (2001) identificaram piperáceas amazônicas resistentes à inoculação *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, fungo causador da fusariose na *P. nigrum*, e encontraram a *Piper tuberculatum* Jacq., uma espécie que foi assintomática após a inoculação do patógeno. Posteriormente, foi identificada por Nascimento et al. (2009) a expressão de genes de defesa por essa planta, relacionados a possível resistência na interação planta-fungo. No entanto, em estudos de enxertia utilizando espécies resistentes como porta-enxerto da *P. nigrum*, apresentaram

incompatibilidades tardias entre enxerto e porta-enxerto após o quarto ano de instalação do plantio (DUARTE, 2004; BASTOS & SANTOS, 2016).

**Figura 1 – Desenho esquemático dos possíveis compostos produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Mecanismos com potencial atuação em funções que favorecem ao desenvolvimento vegetal e a proteção das plantas contra patógenos.**



Fonte: AUTOR

Para determinar outros mecanismos de resistência da *Piper tuberculatum* ao fungo do solo, vários outros estudos foram feitos, entre eles, Nascimento et al. (2015) averiguaram a resistência da espécie relacionada a interações bacterianas. Isolaram bactérias endofíticas em meio não seletivo e através de estudos de antagonismo com o fungo, encontraram dois isolados do gênero *Pseudomonas* denominadas de Pt12 e Pt13, que *in vitro* foram capazes de inibir o *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Silva Jr, et al. (2018) estudaram genes envolvidos na produção de compostos de atividade antifúngica, e encontraram no DNA do isolado Pt12 sequências gênicas relacionadas a biossíntese de fenazina (PhzF), composto com potencial antibiótico contra fungos patogênicos. Outros resultados preliminares obtidos pelo grupo de pesquisa mostraram que plantas de *Piper nigrum* quando inoculadas com o isolado Pt13 apresentaram maiores incrementos na área foliar, na massa seca radicular e na massa seca total das plantas quando comparadas com uma planta controle sem inoculação da bactéria (Pereira et al., dados não publicados). Neste contexto, acredita-se que os isolados Pt12 e Pt13 são capazes de sintetizar compostos benéficos produzidos por PGPB's, como: sideróforos, AIA e enzimas capazes de solubilizar fosfatos inorgânicos.

## **1.1 Revisão de literatura**

### **1.1.1 O gênero *Pseudomonas* associado a plantas**

As espécies do gênero *Pseudomonas* possuem forma de bacilos, gram-negativos, aeróbios e móveis, que pertencem a classe das gammaproteobacteria. Estas bactérias possuem baixa necessidade nutricional e sobrevivem em uma variedade de ambientes distintos, a exemplo de solo, água e no interior de animais e vegetais (RAMOS, 2004; GOMILA et al., 2015).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são muito encontradas em relações benéficas com plantas, a exemplo de *Pseudomonas* spp. endofíticas, diversas literaturas associam esse gênero como bactérias que conseguem promover o crescimento e o desenvolvimento vegetal (PATTEN & GLICK, 2002b; SPAEPEN et al., 2007). A produção de compostos como o fitohormônios, antibióticos, sideróforos, enzimas e ácidos orgânicos, ajuda no desenvolvimento das plantas associadas, que em troca desses compostos, oferecem fotoassimilados para a nutrição bacteriana (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O crescimento de plantas pode ser favorecimento pela produção de auxinas (e.g. Ácido indolacético) que estimulam a divisão e diferenciação celular, mas também, a solubilização de fosfatos inorgânicos por ácidos orgânicos liberados próximos ao sistema radicular das plantas, e a

produção de sideróforos quelantes de ferro, podem ajudar a planta na nutrição de fósforo e ferro, nutrientes necessários para suprir as necessidades metabólicas dos vegetais e pouco móveis no solo (NOVAIS et al., 2007; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Outra característica é o biocontrole de fitopatógenos, *Pseudomonas* spp. endofíticas são bactérias que possuem um potencial de ação antimicrobiana, conseguem mitigar o crescimento de fungos ou bactérias que causam doenças nas plantas (TIAN et al., 2017). A produção de sideróforos por estas bactérias pode favorecer o potencial inibitório de patógenos pelo antagonismo por ferro, mas também, são conhecidas pelo desencadeamento da indução sistêmica de resistência a patógenos (IRS), seja pela liberação de lipossacarídeos, sideróforos ou por flagelos sensoriais (MEZIANE et al., 2005; AGISHA et al., 2017).

#### 1.1.2. Produção de sideróforos bacterianos

O ferro é um micronutriente essencial para sobrevivência das plantas, adquirido naturalmente pelo solo, faz parte de componentes de enzimas envolvidas em reações de transporte de elétrons (reações do tipo redox), constituição dos citocromos, e uma gama de ferro-proteínas (e.g. ferredoxinas e fitoferritinas) envolvidas na fixação biológica de nitrogênio, respiração, fotossíntese e que participam de alguns complexos clorofila-proteína (TAIZ & ZEIGER, 2013).

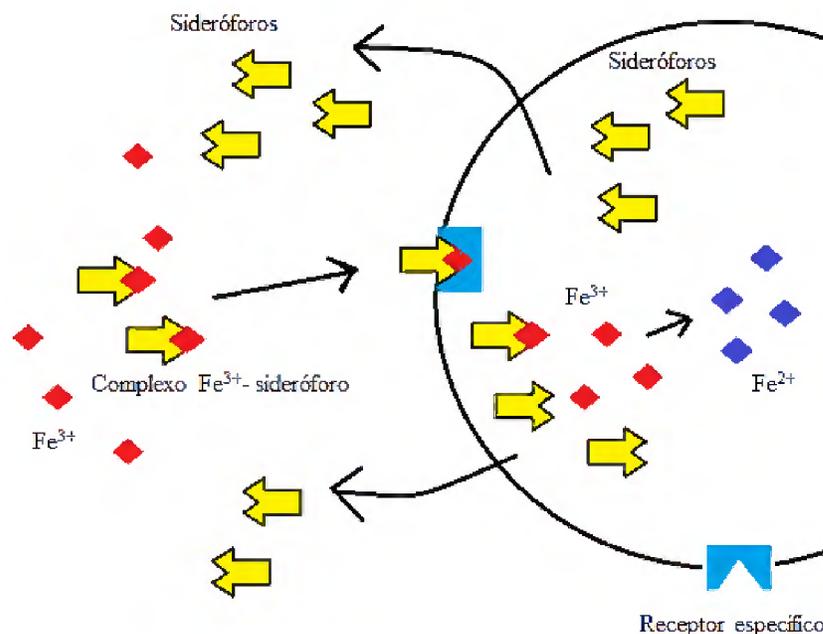
No estado preferencial de absorção pelas plantas, forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o nutriente encontra-se pouco disponível, pois quando em ambientes neutros, sofre rápida oxidação transformando-se para a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Em solos ácidos, o  $\text{Fe}^{3+}$  é facilmente adsorvido em ácidos húmicos ou colóides orgânicos, formas insolúveis e indisponíveis para as plantas (NOVAIS et al., 2007).

A liberação de substâncias quelantes como exsudatos radiculares, produtos da decomposição da matéria orgânica e compostos liberados por micro-organismos associados a plantas, ajudam os vegetais na nutrição de ferro (NOVAIS et al., 2007). Dentre os compostos liberados por micro-organismos que possuem alta afinidade pelos íons de ferro estão os

sideróforos bacterianos, palavra de origem grega que significa “agarrador ou portador de ferro”. São compostos químicos de baixo peso molecular (entre 400 a 1000 kDa) excretados por alguns seres vivos, incluindo micro-organismos, em condições de carência de ferro, os quais possuem grande afinidade com moléculas de  $\text{Fe}^{3+}$  e são capazes de realizar complexos com o íon férrico (SAHA et al., 2013).

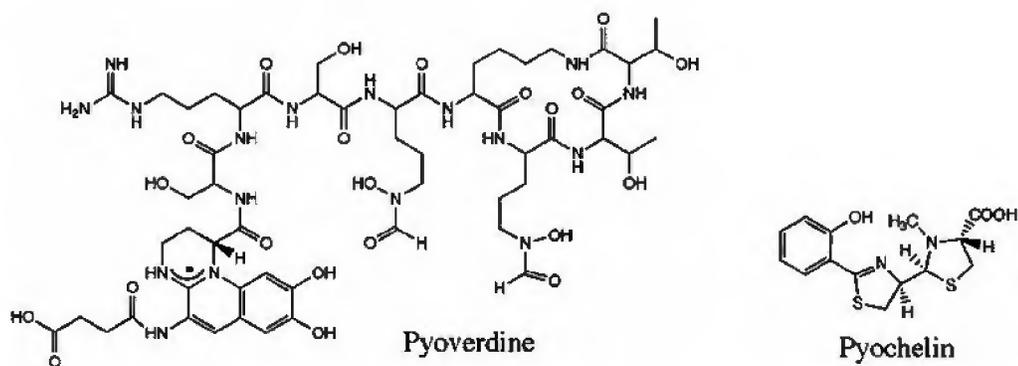
Esses compostos orgânicos são secretados nas proximidades radiculares das plantas, consistem em estruturas conservadas que juntam-se ao ferro (III) formando um complexo ferro-sideróforo (FIGURA 2). Este complexo é reconhecido com o auxílio de receptores de membrana, quando são absorvidos pelas plantas e no interior das células são separados, sendo o ferro convertido para ferro (II) ajudando no desenvolvimento do vegetal, assim como, na quantidade e qualidade na produção agrícola (KHAN et al., 2017).

**Figura 2 – Esquema simplificado da ação do sideróforo bacteriano na captura do ferro quando liberado no meio extracelular.** Forma um complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo reconhecido por receptores específicos presentes na membrana das células e incorporados para o interior da bactéria.



Os sideróforos podem ser divididos em três categorias de acordo com a sua estrutura química (FIGURA 3): catecol, hidroxamatos e carboxilatos, alguns organismos possuem formas mistas com duas destas estruturas químicas. Em *Pseudomonas* spp. já foram relatados dois tipos de sideróforos: um hidroxamato, pyoverdine (pioverdina, peptídeo específico em *Pseudomonas* spp. composto de 6 a 12 aminoácidos) e um catecol pyochelins (MARATHE et al., 2015; KHAN et al., 2017). A cadeia de biossíntese de pioverdinas, principal sideróforo excretado por *Pseudomonas* spp., está relacionada a expressão de diversos genes, já encontrados no genoma da *Pseudomonas aeruginosa* no mesmo locus, estes genes envolvidos na: Síntese transportadores específicos de membranas, transportador ABC constituído de uma Permease; Síntese de proteínas de ligação periplasmática, FpvE e FpvD; Síntese de proteínas envolvidas no transporte do ferro do periplasma para o citoplasma, FpvC e FpvF (YE et al., 2014; GANNE et al., 2017).

**Figura 3 – Estrutura química hidroxamato (esquerda) e catecol (direita) dos dois principais sideróforos encontrados em bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. As pioverdinas (esquerda) e os pyochelins (direita).**



Fonte: SAHA et al. (2013)

Além do auxílio nutricional ocasionado pela liberação dos sideróforos bacterianos, muitas bactérias endofíticas possuem vantagens competitivas em relações a outros micro-organismos que ocupam o mesmo nicho ecológico (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Colonizam os tecidos das plantas antes que um possível patógeno possa se instalar na planta, excluindo por um potencial antagonista de ferro, a infestação de doenças ocasionadas por outros micro-

organismos, tais como *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* e *Gaeumannomyces graminis* inibidos pela produção de pioverdina pelo gênero *Pseudomonas* (SAHA et al., 2016; MAKSIMOV et al., 2018).

Micro-organismos produtores sideróforos também são estudados na biorremediação de áreas afetadas pela industrialização, áreas onde há acúmulo de substâncias de alta toxicidade e produtos cancerígenos como: metais pesados, pesticidas e solventes clorados, consistindo em uma técnica vantajosa por ser simples e barata, para promover a homeostase do ambiente (RAJKUMAR et al., 2010; MAKSIMOV et al., 2018).

Os sideróforos são responsáveis principalmente por quelar o Fe (III) em situações de estresse, porém, estudos revelam que estes possuem capacidade de complexar outros metais pesados como Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb e Zn, realizando a homeostase desses metais. Bactérias produtoras de sideróforos em simbiose com as raízes de plantas acumuladoras de metais pesados, são capazes de imobilizar e/ou reduzir a toxicidade destes elementos químicos, para ser tolerada a absorção de íons de metais traços pela plantas, mecanismo que incluem sequestro físico, exclusão, complexação e desintoxicação do ambiente (BRAUD et al., 2009; RAJKUMAR et al., 2010; SCHALK et al., 2011; ZLOCH et al., 2016).

### 1.1.3. Produção de ácido indolacético

Hormônios são compostos orgânicos que atuam em baixas concentrações como mensageiros químicos que interagem em sítios específicos com proteínas receptoras ligadas a rotas de transdução de sinais. Em plantas, os hormônios ajudam na obtenção de habilidades em resposta fatores como a luz ou estresses presentes no ambiente em que o vegetal se encontra. Geralmente, esses hormônios são sintetizados em um órgão específico do vegetal, e atuam em outros tecidos adjacentes regulando o desenvolvimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2013; SIVASAKTHI et al., 2014).

A auxina (do grego ‘auxein’, que significa crescer) foi o primeiro hormônio vegetal a ser descoberto, identificado primeiramente como ácido indol-3-acético (AIA), é o fitohormônio mais estudado e o mais produzido por bactérias. O AIA é mencionado na literatura como um hormônio

responsável principalmente pelo alongamento celular nos vegetais, mas também pode estar ligado ao desenvolvimento de frutos, diferenciação de tecidos e regulação gênica (NAVARRO et al., 2006).

Nas plantas as raízes são partes sensíveis a variações da quantidade de AIA, em condições de acúmulo de AIA exógeno nos tecidos radiculares, os vegetais respondem com o alongamento das raízes primárias, formação de raízes laterais e adventícias, estimuladas em baixas concentrações do hormônio, geralmente de  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  M, verificada a inibição do crescimento em concentrações mais elevadas, acima de  $10^{-6}$  M. (DAVIES ,1995; PATTEN & GLICK, 2002b).

Muitos gêneros como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Pantoea* e *Streptomyces* são relatados como produtores de hormônios (IMADA et al. 2017; MARAG & SUMAN, 2018). Em relações simbióticas com plantas, os exsudados radiculares ajudam a nutrição dos micro-organismos enquanto os vegetais se beneficiam capturando AIA produzido por estas bactérias (DUCA et al., 2014).

A produção de ácido indolacético por bactérias endofíticas pode ocasionar no melhor desenvolvimento dos vegetais, tanto em crescimento, quanto na defesa contra patógenos. A disponibilidade de AIA nas plantas pode favorecer o aumento da espessura da parede celular do vegetal, formando uma barreira física em combate a fitopatógenos, ou seja, é capaz de impedir a entrada de fitopatógenos através das células radiculares, além de participar da regulação de genes de defesa a patógenos (MOHITE, 2013). No caso da fusariose, doença que ataca os plantios de pimenteira-do-reino, ocasionada por um fungo presente nos solos brasileiros (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*), atinge primeiramente os tecidos radiculares das plantas (DUARTE, 2004), e seu acesso pode ser dificultado pelo incremento na parede celular dos vegetais.

Para a produção desse hormônio vegetal duas rotas biosintéticas podem ser utilizadas: as vias dependentes do triptofano como precursor [e.g. indol-3-acetamida (IAM), indol-3-pirúvico (AIP), triptamida (TAM), indol-3-acetonitrila (IAN)], e as vias não dependentes do aminoácido (e.g. indol-3-glicerol fosfato). Plantas e bactérias possuem um alto grau de similaridades em rotas biosintéticas do AIA, por exemplo, ambas plantas e bactérias produzem o AIA pela rota do ácido indol-3-pirúvico, no entanto, bactérias benéficas ao crescimento vegetal podem sintetizar auxina

através de rotas alternativas dependentes e não dependentes de triptofano, utilizando mais de uma rota biosintética do AIA (PATTEN & GLICK, 2002b; SPAEPEN et al., 2007).

A rota dependente de triptofano indol-3-acetamida (IAM), relatada em bactérias patogênicas de plantas, não é observada nos vegetais e pouco encontrada em promotoras do crescimento vegetal (PGPB), contudo, já foi característica em algumas bactérias benéficas importantes para plantas, inclusive bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (KOCHAR et al., 2011). Nesta rota o triptofano é convertido para AIA em duas etapas com o auxílio de duas enzimas a triptofano-2-monooxigenase e a IAM hidrolase, codificadas pelos genes *iaaM* e *iaaH*, respectivamente. Primeiramente o triptofano é convertido para IAM com o auxílio da triptofano-2-monooxigenase, depois transformado em AIA pela IAM hidrolase (DUCA et al., 2018).

Em contrapartida aos poucos relatos da rota IAM em bactérias benéficas, a rota indol-3-pirúvico (AIP) é a mais comum em plantas e em PGPB's, incluindo espécies como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici* (SPAEPEN et al., 2007; IMADA et al., 2017; MELIANI et al., 2017).

Esta rota acontece em três passos, começando pela conversão do aminoácido triptofano em ácido indol-3-pirúvico (AIP) pela enzima amino transferase, seguido de uma etapa de descarboxilação do AIP em indol-3-acetaldeído (IAAld) e posteriormente a oxidação do IAAld em AIA. O gene *ipdC* é responsável por codificar a enzima indolpiruvato descaboxilase responsável pela descarboxilação do AIP transformando-o em IAAld, considerada uma enzima chave para síntese de AIA via rota do AIP. Em *Pseudomonas putida* (GR 12-2) Patten & Glick (2002a) descobriram que a rota está relacionada a expressão do gene *ipdC* (indolpiruvato descaboxilase), ou seja, é uma bactéria produtora de AIA pela via do ácido indol-3-pirúvico.

#### 1.1.4. Solubilização de fosfato

O fósforo é um elemento que constitui biomoléculas importantes como o DNA e o ATP, essencial para a manutenção de todas as formas de vida. Em plantas é caracterizado como um macronutriente, ou seja, é necessário em quantidades relativamente altas para uma boa nutrição. Vegetais em um bom estado nutricional de fósforo apresentam aumento nas taxas fotossintéticas, melhoria na fixação do nitrogênio, estimulação da floração e frutificação (BRADY & RAY, 2013).

Na agricultura, o fósforo é um nutriente escasso, encontrado nos ambientes naturais em formas altamente insolúveis, indisponíveis para a nutrição de plantas. A tentativa de fertilização fosfatada é um problema para os agricultores, a rápida fixação por ferro e alumínio em solos ácidos, formando complexos como  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , ou por magnésio e cálcio em solos alcalinos e neutros, que formam o complexo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , acarreta em elevados custos em adubos fosfatados pouco rentáveis, devido maior parte da adubação fosfatada ser perdida por fixação ou lixiviação, o que deixa o nutriente indisponível para a planta (LIU et al., 2015, SATYAPRAKASH et al., 2017).

Além da pouca eficácia na fertilização fosfatada, as fontes de adubos fosfatados são monopólios de poucos países. A principal fonte para a produção de adubos fosfatados são rochas fosfatadas: apatitas, hidroxapatitas e oxapatitas, maior parte das jazidas concentradas no Marrocos e em outros três países (China, Estados Unidos e Rússia), ou seja, é um recurso natural finito, potencialmente esgotável (ZAPATA & ROY, 2004; ELSER & BENNET, 2011).

As rochas fosfatadas são a primeira etapa do ciclo biogeoquímico do fósforo, intemperizadas, liberam o nutriente para o solo (TIESSEN et al., 1984; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O intemperismo biológico realizado por bactérias solubilizadoras de fosfatos, pode contribuir na disponibilização de formas solúveis de fósforo ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), e ajudar no desenvolvimento de plantas por meio da biofertilização. A liberação de ácidos orgânicos e enzimas (e.g. fitases e fosfatases) por essas bactérias são capazes de solubilizar ou dissolver os fosfatos minerais pela diminuição do pH, quelar os cátions que se ligam ao fosfato, e hidrolisar o fósforo orgânico do solo liberando prótons e mineralizando os fosfatos orgânicos (TARAFDAR & CLAASEN, 1988)

Estudos revelam que a simbiose de plantas com bactérias solubilizadoras de fosfato estimula o desenvolvimento do vegetal pela disponibilização do nutriente próximo ao sistema radicular devido a baixa mobilidade do fósforo, mostrando que a produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido-2-ketoglucônico, são capazes de solubilizar fosfato de alumínio, fosfato de ferro e o fosfato tri cálcico (SARAPATKA & KRŠKOVA, 1997; OLIVEIRA et al., 2009). Estes micro-organismos são capazes de absorver o P em poros a distâncias inacessíveis às raízes e obtêm a capacidade de absorver o fósforo diretamente da liteira caída antes do dreno do solo, assim, recicla o fósforo novamente para o ciclo biogeoquímico (HERRERA et al., 1978).

Bactérias solubilizadoras de fosfatos inoculadas em mudas são muito utilizadas para a estimulação do desenvolvimento das plantas quando implantadas em condições ambientais adversas de estresses, além de favorecer a tolerância a doenças (SOUCHIE et al., 2005; BRITO et al., 2017). Muitos gêneros e espécies de bactérias, entre estas pode se destacar os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rizhobium* e *Enterobacter* considerados os maiores solubilizadores de fosfatos, porém outros gêneros como a *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Agrobacterium* e *Erwinia*, são frequentemente reportados como solubilizadores (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; SATYAPRAKASH et al., 2017).

A produção do principal ácido orgânico responsável na solubilização de fosfatos requer a expressão de genes, por exemplo, o *gabA* expresso pela *Pseudomonas cepacia* responsável pela síntese de ácido glucônico, porém o composto orgânico necessita de um cofator expressa pelos genes *pqq*, que codifica a proteína co-fatora pirroloquinoline quinona, necessária para a formação da holoenzima glicose desidrogenase (GDH-PQQ), que catalisa a produção de ácido glucônico o qual ajuda na solubilização de fosfatos insolúveis como o fosfato di-cálcio e hidroxiapatita (BABU-KHAN et al., 1995; MISRA et al., 2012).

Além da excreção de ácidos orgânicos capazes de dissolver diretamente o mineral fosfático quebrando as ligações e/ou quelando cátions que acompanham o ânion fosfato, a sintetize enzimas como as fosfatases, expressas pelo grupo gênico *Pho-box* em muitos micro-organismos, conseguem hidrolisar o fosfato orgânico do solo (ANTIBUS et al., 1981; CHEN et al., 2006). A produção de fosfatases alcalinas (ALP's, do inglês Alkaline phosphatases), glicoproteínas produzidas através da expressão dos genes *phoA* (fosfatase alcalina), *phoD* (fosfodiesterase), *phoX* (fosfatase alcalina monomérica) são responsáveis por catalisar a hidrólise de fosfomonoésteres e fosfodiésteres, algumas betaproteobactérias como as *Pseudomonas* spp. expressam esses genes que ajudam na disponibilização do fósforo inorgânico, pela reciclagem de glicerol fosfodiésteres (SHARMA et al., 2013; LIDBURY et al., 2017).

## REFERÊNCIAS

- AGISHA, V. N. et al. Plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 induces expression of defense genes in black pepper roots: Deciphering through suppression subtractive hybridization analysis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 106–116, 2017.
- ALBUQUERQUE, F. C. et al. Resistência de piperáceas nativas da amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 3, p. 341–348, 2001.
- ANTIBUS, R. K. et al. Ectomycorrhizal fungi of *Salix rotundifolia* III. Resynthesized mycorrhizal complexes and their surface phosphatase activities. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 12, p. 2458–2465, 1981.
- BABU-KHAN, S. et al. Cloning of a Mineral Phosphate-Solubilizing Gene from *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 972–978, 1995.
- BASTOS, C. N.; SANTOS, A. O. DA S. Porta-enxerto resistente a fusariose em pimenta-do-reino. **Agrotropica**, v. 28, n. 3, p. 331–334, 2016.
- BRADY, N.C.; WEIL, R.R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 704 p.
- BRAUD, A. et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. **Chemosphere**, v. 74, n. 2, p. 280–286, 2009.
- BRITO, V. N. et al. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada na produção de mudas de paricá. **Ciência florestal**, v. 27, n. 2, p. 485–497, 2017.
- CHEN, Y. P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, n. 1, p. 33–41, 2006.
- DAVIES P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1995.
- DORJEY, S.; DOLKAR, D.; SHARMA, R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 1335–1344, 2017.

DUARTE, M. DE L. R. Cultivo da pimenteira-do-reino na Região Norte. **Sistema de produção-Embrapa**, v. 1, n. 1, p. 185 p., 2004.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.

DUCA, D. R.; ROSE, D. R.; GLICK, B. R. Indole acetic acid overproduction transformants of the rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 111, n. 9, p. 1645–1660, 2018.

ELSER, J.; BENNETT, E. Phosphorus cycle: A broken biogeochemical cycle. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 29–31, 2011.

GANNE, G. et al. Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 1056–1065, 2017.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 15, 2012.

GOMILA, M. et al. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. March, p. 1–13, 2015.

HERRERA, R. et al. Directe phosphorus transfer from leaf litter to roots. **Naturwissenschaften**, v. 65, n. 4, p. 208–209, 1978.

IMADA, E. L. et al. Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 3, p. 283–292, 2017.

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. **Microbiological Research**, n. October, p. 0–1, 2017.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 426–435, 2011.

LIDBURY, I. D. E. A. et al. Identification of extracellular glycerophosphodiesterases in *Pseudomonas* and their role in soil organic phosphorus remineralisation. **Scientific Reports**, v. 7,

n. 1, p. 1–11, 2017.

LIU, Z. et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 217–224, 2015.

MAKSIMOV, I. V. et al. Endophytic Bacteria as Effective Agents of New-Generation Biopesticides (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 128–140, 2018.

MARAG, P. S.; SUMAN, A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize ( *Zea mays* L .). **Microbiological Research**, v. 214, n. May, p. 101–113, 2018.

MARATHE, R.; PHATAKE, Y.; SONAWANE, A. Bio prospecting of *Pseudomonas aeruginosa* for their potential to produce siderophore, process optimization and its bioactivity. **International journal of bioassays**, v. 4, n. 2, p. 3667–3675, 2015.

MELIANI, A. et al. Plant Growth-Promotion and IAA Secretion With *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* Laboratory of Food and Industrial Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, University Laboratory of Biology and Biotechnology of Microorganisms. **Journal of Botanical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 16–24, 2017.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MEZIANE, H. et al. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 2, p. 177–185, 2005.

MISRA, H. S.; RAJPUROHIT, Y. S.; KHAIRNAR, N. P. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. **Journal of Biosciences**, v. 37, n. 2, p. 313–325, 2012.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, n. ahead, p. 0–0, 2013.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Biotecnologia do Solo. **Editora UFPA**,

v. ed. 2, p. 729, 2006.

NASCIMENTO, S. B. et al. Identifying Sequences Potentially Related to Resistance Response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by Suppression Subtractive Hybridization. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 12, p. 1429–1434, 2009.

NASCIMENTO, S. B.; LIMA, A. M.; BORGES, B. N. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7567–7577, 2015.

NAVARRO, L. et al. A Plant miRNA Contributes to. **Science**, v. 312, p. 436–439, 2006.

NOVAIS, R.F. et al. **Fertilidade do Solo**. Viçosa: SBCS, 2007. 1050 p.

OLIVEIRA, C. A. et al. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782–1787, 2009.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795–801, 2002b.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142–149, 2010.

RAMOS, J.-L. **Pseudomonas- Genomics, Life Style and Molecular Architecture**. [s.l.: s.n.]. v. 1

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4–5, p. 319–339, 1999.

SARAPATKA, B.; KRŠKOVÁ, M. Interactions between phosphatase activity and soil characteristics from some locations in the Czech Republic. **Rostlinna Vyroba**, Praha, v. 43, n. 9, p. 415–419, 1997.

SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.

- SAHA, R. et al. Microbial siderophores: A mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013.
- SATYAPRAKASH, M. et al. Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 2133–2144, 2017.
- SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 2844–2854, 2011.
- SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.
- SILVA JR, O. S. et al. Detection of sequences related to biosynthesis of antifungal metabolites and identification of a PhzF- like gene in a Pseudomonas rhizobacterium of Piper tuberculatum. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, p. 1–14, 2018.
- SIVASAKTHI, S.; USHARANI, G.; SARANRAJ, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 16, p. 1265–1277, 2014.
- SOUCHIE, E. L. et al. Bactérias Solubilizadoras De Fosfato E Fungos. **Population (English Edition)**, p. 329–334, 2005.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- TARAFDAR, J. C.; CLAASSEN, N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 5, n. 4, p. 308–312, 1988.
- TIAN, B. et al. Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 247, n. 2, p. 149–156, 2017.

TIESSEN, H.; STEWART, J. W. B.; COLE, C. V. Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis. **Soil Science Society of America Journal**, v. 48, n. 4, p. 853–858, 1984.

YE, L. et al. Draft Genome Sequence Analysis of a *Pseudomonas putida* W15Oct28 Strain with Antagonistic Activity to Gram-Positive and *Pseudomonas* sp. Pathogens. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

ZAPATA, F.; ROY, R. N. Use of phosphate rocks for sustainable agriculture. **FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin**, p. 20, 2004.

ZŁOCH, M. et al. Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to Cd<sup>2+</sup>. **Chemosphere**, v. 156, p. 312–325, 2016.

## **2. CARACTERIZAÇÃO DE *Pseudomonas* QUANTO A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS POTENCIALMENTE BIOESTIMULANTES DO DESENVOLVIMENTO VEGETAL**

### **2.1. Introdução**

Estudos com micro-organismos são frequentes e atraem atenção, principalmente devido ao fato de que muitos são patógenos que causam doenças e prejuízos aos seres vivos, contudo, vários desses seres microscópicos são estudados devido vantagens na produção de substâncias benéficas em âmbitos farmacológicos, na indústria alimentícia e na agricultura (CANO, 2011; GOBETTI et al., 2010; PARSHIKOV et al., 2014).

Dentre estes micro-organismos benéficos destacamos a gênero *Pseudomonas* constituídos por bactérias gram negativas muito encontradas no solo ou em simbiose com plantas, conhecidas em diversas literaturas como promotoras de crescimento vegetal, atua em funções de desenvolvimento vegetal e no biocontrole de fitopatógenos, a exemplo dos fungos: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Pestalotiopsis theae*, *Nigrospora sphaerica* (RAAIJMAKERS & WELLER 2001; DE SOUZA & RAAIJMAKERS, 2003; MAZURIER et al., 2009; SARHAN & SHEHATA, 2014; DUTTA & THAKUR, 2017).

São características de alguns indivíduos do gênero *Pseudomonas* a produção de sideróforos, capazes de promover o controle de patógenos pelo antagonismo por ferro, fitohormônios como o ácido indolacético (AIA) e enzimas que solubilizam fosfatos do solo (PATTEN & GLICK, 2002b; MARATHE et al., 2015).

Estes compostos podem ajudar a combater doenças de diversas formas, seja pelo enrijecimento das paredes celulares ocasionados por fitohormônios como o AIA, ou em consequência ao antagonismo da nutrição por ferro no caso de sideróforos bacterianos, que levam ao melhor desenvolvimento das plantas associadas com essas bactérias, além de auxiliar em uma maior produção agrícola por possuírem a capacidade de solubilizar e disponibilizar fosfatos para a planta (MOHITE, 2013; SAHA et al., 2016; MAKSIMOV et al., 2018).

Metodologias de percepção e quantificação desses compostos já foram relatadas e consideradas confiáveis para as avaliações bacterianas. Estas envolvem o crescimento de isolados *in vitro* em meio específicos, que pela inativação do AIA, pela percepção da formação do complexo ferro-sideróforo ou pela dissolução dos fosfatos inorgânicos, análises colorimétricas são capazes de quantificar a produção dessas substâncias produzidas por bactérias promotoras do crescimento vegetal (TANG & BONNER, 1947; GODON & WEBER, 1951; KANTZNELSON et al., 1962; SCHWYN & NEILANDS, 1987; NAUTIYAL, 1998).

No solo, indivíduos da microbiota encontram-se em um ambiente extremamente competitivo, e buscam alternativas para sobrevivência, uma das habilidades encontradas por alguns micro-organismos é invadir o tecido das plantas e realizar uma relação benéfica longe da interferência de fatores químicos, físicos e biológicos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). As bactérias endofíticas são definidas como aquelas com capacidade de colonizar os tecidos e órgãos internos de plantas, sem assumir um comportamento patogênico ou causar danos ao vegetal, algumas reportadas como promotoras de crescimento vegetal capazes de produzir fitoestimuladores, biofertilizantes e substâncias de biocontrole (HALLMANN et al., 1997; PATTEN et al., 2012).

Nascimento et al. (2015) na tentativa de combater a fusariose da *Piper nigrum* L., isolaram bactérias endofíticas de raízes da *Piper tuberculatum* Jacq., afim de averiguar se a resistência ao *Fusarium solani* f. spp. *piperis* nessa piperácea amazônica identificada por Albuquerque et al. (2001), está ligada a interações bacterianas. Encontraram a partir de estudos de antagonismo com o fungo, dois isolados previamente identificados como pertencentes do gênero *Pseudomonas* denominados de Pt12 e Pt13, que *in vitro* foram capazes de inibir o *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Tendo em vista compostos produzidos pelas PGPB's como possíveis substâncias inibidoras do crescimento do *Fusarium solani* f. sp. *piperis* produzidas pelos isolados identificados por Nascimento et al. (2015). O presente estudo tem como objetivos a caracterização dos isolados Pt12 e Pt13 quanto à capacidade de produzir sideróforos, ácido indolacético (AIA) e solubilizar fosfatos.

## 2.2. Material e métodos

### 2.2.1 Isolados de *Pseudomonas* endofíticas

O estudo foi realizado no Laboratório Francisco Mauro Salzano (Laboratório de Biologia Molecular), localizado na Universidade Federal do Pará - UFPA, o qual utilizou os isolados endofíticos provenientes das raízes da *Piper tuberculatum* Jacq, previamente identificados por Nascimento et al. (2015) por meio do sequenciamento do gene 16S, pertencem ao gênero *Pseudomonas*, e foram denominados de Pt12 (*Pseudomonas putida*) e Pt13 (*Pseudomonas* sp.), estes se encontram preservados no laboratório em solução de glicerol. Para o estudo, os isolados foram inoculados e cultivados em meio TSA para verificação da qualidade e renovação das colônias.

### 2.2.2. Produção de sideróforos pelos micro-organismos do gênero *Pseudomonas*

#### 2.2.2.1. Detecção em meio CAS sólido

A produção de sideróforos em meio Cromo azul S sólido foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Schwyn & Neilands (1987). Para isso se utilizou três soluções misturadas: a solução mãe; a parte sólida e o meio MM9, na proporção de 8:1:1, respectivamente.

Para o preparo da solução mãe, foram utilizadas três soluções: Solução I - 60,5 mg de Cromo azul S dissolvidos em 50 mL de H<sub>2</sub>O; Solução II - 10 mL de solução de Ferro III (FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O 100 mM, HCl 10 mM); Solução III - 40 mL da solução 10 mM de HDTMA (brometo de hexadeciltrimetilamio), misturadas na ordem numérica das soluções. A parte sólida consiste em 3,01 g de tampão de Pipes e 1,5 g de ágar aferidos para 80 mL em pH 6,8. Já o meio MM9 foi feito com: 1,28 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05 g de NaCl; 0,1 g de NH<sub>4</sub>Cl, 20% de glicose filtrada em filtro de 0,22 µm.

Para a detecção de sideróforos em meio sólido, os dois isolados foram inoculados em meio TSB 3% e incubados sob agitação (150 rpm, 28 °C) durante 12 h, a fim de favorecer o crescimento bacteriano e utilizar células renovadas no experimento. Crescidos, os inóculos foram diluídos em três repetições na proporção de 1: 100 em dois meios diferentes: LB 2% (Luria Bertani) e TSB a 0,6%, meios com concentração pequena de ferro para favorecer a produção de sideróforos pelas bactérias.

As bactérias foram cultivadas durante cinco dias, alíquotas foram coletadas em intervalos determinados (24, 72 e 120 h), primeiramente, para a leitura da absorbância das culturas a 600 nm referente ao crescimento bacteriano, e depois para a retirada de 100 µm dos sobrenadantes, inoculados em poços de 10 mm de diâmetro furados meio CAS sólido e incubados por 48h na ausência de luz, após centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos).

Como controle negativo da produção de sideróforos foi utilizado os meios (LB e TSB) de cultura sem bactéria inoculada. A formação de um halo amarelado ao redor dos poços é o sinal positivo para a produção de sideróforos, os quais os diâmetros foram mensurados.

#### 2.2.2.2. Produção de sideróforos em solução CAS

Para a quantificação de sideróforos dos dois isolados por espectrofotometria Vis/UV, foi utilizada a solução CAS, preparada de acordo com o protocolo de detecção de sideróforos de Schwyn & Neilands (1987).

Seis mililitros de HDTMA 10 mM diluídos em água foram adicionada em um frasco de 100 mL, gentilmente misturados com 1,5 mL de uma solução de ferro III ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  100 mM, HCl 10 mM) e 7,5 mL de solução CAS (2mM). Foi dissolvida em água 4,307g de piperazina anidra e ajustada com HCl para o pH 5,6, esta solução tampão foi adicionada ao frasco até o volume final de 100 mL.

Os isolados foram cultivados durante cinco dias em meio LB 2%, coletadas alíquotas das culturas para a mensuração do crescimento em espectrofotometria Vis/UV (600 nm) e para a coleta dos sobrenadantes.

Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante de cada cultura foi misturada com 0,5 mL da solução CAS, após 30 minutos da reação, foram lidas as absorbâncias dos tratamentos em um comprimento de onda 630 nm. A quantidade de sideróforos foi determinada pela redução percentual na cor azul da solução, em unidades de sideróforos (SU%) comparado ao controle negativo, calculada pela fórmula:  $SU\% = [(Ar-A)/Ar] \times 100$ , onde AR é a absorbância referência a 630 nm (solução CAS + meio sem inoculação de bactéria) e A é a absorbância da amostra (solução CAS + sobrenadante).

### 2.2.3. Produção de ácido indolacético pelos micro-organismos do gênero *Pseudomonas*

Para a avaliação da produção de AIA pelos isolados Pt12 e Pt13 foi realizado os testes segundo a metodologia de Bric et al. (1991) e Godon & Weber (1951), o quais utilizaram meio de cultura suplementado com L-Triptofano juntamente com o reagente de Salkowski, em cultivos em TSA e por métodos colorimétricos em TSB.

#### 2.2.3.1. Produção de AIA em membranas de nitrocelulose

Foram inoculados os isolados em meio TSB 3% e incubados 12 horas sob agitação (150 rpm, 28 °C) para o crescimento de células metabolicamente ativas. Utilizou-se a metodologia de Bric et al. (1991), foram inoculadas as bactérias em meio TSA suplementado com L-Triptofano 1 g/L e 3 g/L (modificação) e cobertas com membrana de nitrocelulose.

Após 48 h de crescimento em temperatura ambiente, as membranas de nitrocelulose foram removidas e tratadas com o 2,5 mL de reagente de Salkowski (1,2% de  $FeCl_3$  e 37% de

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e incubadas no escuro, posteriormente avaliadas. O resultado positivo é demonstrado pela formação de uma coloração rósea ao redor das colônias.

#### 2.2.3.2. Quantificação o AIA em meio líquido

A quantificação do AIA foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). Os isolados foram cultivados durante 12 horas em meio TSB 3%, em seguida as culturas foram diluídas na proporção 1:100 em duas concentrações do meio TSB suplementado com L-triptofano [(TSB-Trp); (0,2 g/L e 3 g/L)], com três repetições. Alíquotas da cultura foram coletadas periodicamente (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) para a avaliação do crescimento bacteriano a 600nm, e para a centrifugação (10.000 rpm durante 10 minutos). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi acrescentado o reagente Salkowski na proporção 2:1 e incubado por 20 minutos na ausência de luz. A concentração de AIA produzida por cada bactéria foi determinada em pelo espectrofotômetro Vis-UV a 530 nm de comprimento de onda.

Um extrato aquoso da *Piper nigrum* L. foi preparado segundo Jasim et al. (2014), com a intenção de estimular a produção de AIA pelas bactérias, em um meio TSB-Trp com compostos da pimenteira. Foram macerados em solução aquosa tecidos do caule, raízes e folhas, filtrados em filtros de papel e esterilizados com filtro de membrana de 0,45 µm. Este extrato foi usado na concentração de 0,5% (v/v) nas diferentes concentrações do meio TSB-Trp, feito os mesmos procedimentos da quantificação do método de Gordon e Werber (1951).

Para a determinação da produção de AIA pelos isolados, foi realizada uma curva padrão a partir de concentrações conhecidas do autêntico ácido-3-indolacético diluído em meio TSB. Após tratamento com o reagente de Salkowski foram mensurados os graus de absorbância de cada concentração (530nm), e a partir da análise de regressão linear dos dados de absorbância x concentração de AIA, foi obtida a fórmula mais adequada as dados, com o cálculo do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o p-valor.

## 2.2.4. Solubilização de fosfato

### 2.2.4.1. Solubilização em meio NBRIP sólido

Para a avaliação da solubilização de fosfato pelas bactérias estudadas, foi preparado o meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL, 1998), para 1000 mL: 10 g de glicose filtrada; 5 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,25 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,2 g de KCl; 0,1 g de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 15g de ágar; suplementado com 5 g de  $Ca_3(PO_4)_2$  e ajustado pH 7,0.

As bactérias foram submetidas ao crescimento de 12 horas em meio TSB a 3% sob agitação (150 rpm, 28 °C), estas foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada em centrifugações a 10.000 rpm por 5 minutos, ressuspensos os pellets em 1 mL de água.

Para a avaliação da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido, foram feitos poços de 10 mm de diâmetro, para a inoculação de 100 µl das culturas lavadas em triplicatas. O tamanho dos halos formados foi medido sete dias após a inoculação no meio NBRIP sólido e feito o cálculo do índice de solubilização:  $IS = (\text{Diâmetro do halo} + \text{Diâmetro da cultura}) / \text{Diâmetro da cultura}$  (NGUYEN et al., 1992).

### 2.2.4.2. Solubilização de fosfato NBRIP líquido

Para quantificar a solubilização de fosfatos em meio líquido foi utilizado meio NBRIP sem adição de ágar. Os experimentos foram realizados com três repetições, 10 mL do meio NBRIP foram inoculadas com 200 µl dos isolados após três lavagens em água destilada e autoclavada (centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos). Os tubos foram submetidos a agitação no shaker (150 rpm, 28 °C) e avaliados periodicamente durante os intervalos 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de crescimento.

Alíquotas das culturas crescidas nos intervalos propostos e um controle negativo (meio NBRIP sem inóculo), tiveram o pH mensurado, e após duas centrifugações a 12.000 rpm por 15

minutos foi determinada a quantidade de fósforo solúvel analisada pela reação do sobrenadante bacteriano na proporção de 1:5 com a solução do método molibdênio azul (MURPHY & RILEY, 1962). Após 10 minutos da reação foi lida a absorvância da solubilização de fosfato a 882 nm.

A quantidade de fósforo solúvel deu-se pela diferença entre os valores de absorvância do controle pela absorvância dos tratamentos, comparados com a curva padrão, feita a partir de concentrações conhecidas de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (70%  $\text{PO}_4^-$ ) reagidas com a solução de detecção de fósforo e lidas em 882 nm após 10 minutos de reação. A partir da análise de regressão linear dos dados de absorvância x concentração de  $\text{PO}_4^-$ , foi obtida a fórmula mais adequada aos dados, com o cálculo do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o p-valor.

#### 2.2.5. Análise dos dados

As análises estatísticas foram efetuadas com o auxílio do software estatístico R-Studio v. 1.1.456, utilizando o pacote “Agricolae”. Todos os experimentos foram efetuados em delineamento inteiramente ao acaso, utilizando os dois isolados para cada composto analisado em três repetições. Análises de variância (ANOVA) foram realizadas e após a significância dos dados, o teste de Fisher (LSD) foi realizado para análise de comparação múltipla e o teste SNK para dados independentes, ao nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 2.3. Resultados e discussão

#### 2.3.1. Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi determinada pela formação de halos distintos da cor azul do meio, que levam a considerar uma bactéria produtora desta substância. Dos dois isolados em estudo, a formação do halo foi visualizada apenas no Pt12, o isolado Pt13 não apresentou indícios de produção de sideróforos pela reação de seus sobrenadantes com placas de CAS sólido, quando cultivado em meio TSB 0,6% ou LB 2% (FIGURA 4).

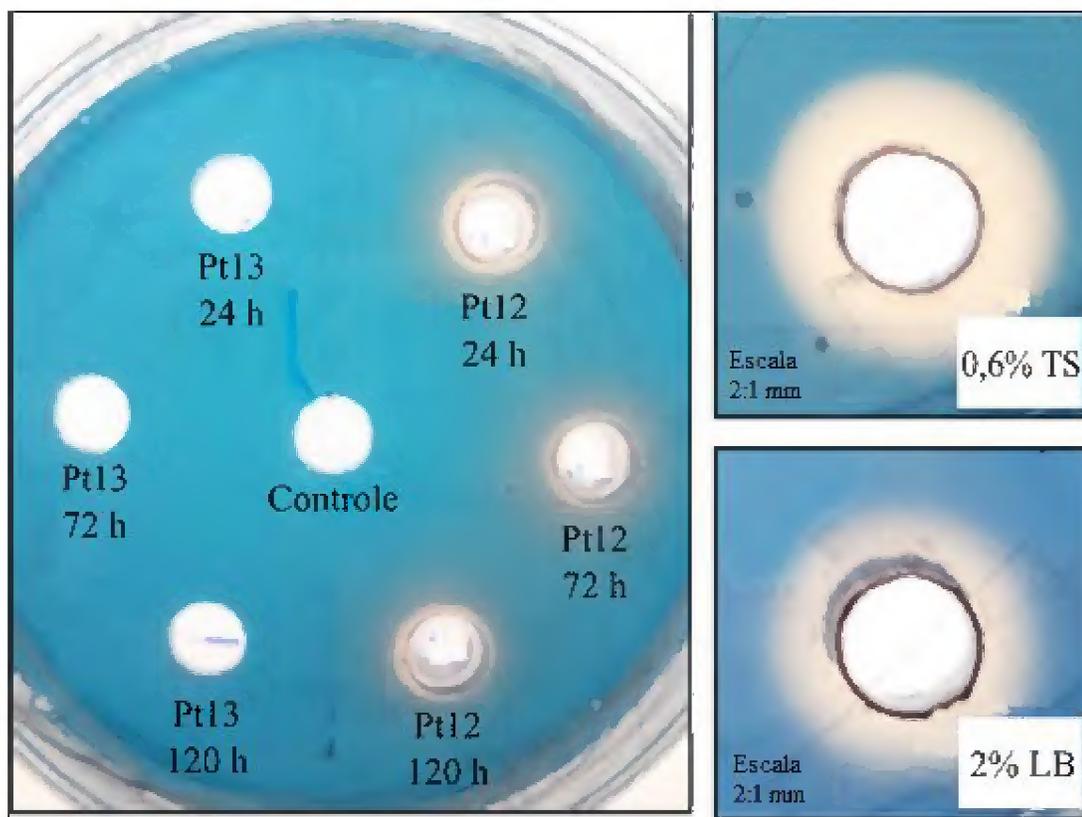
Sideróforos são compostos químicos de baixo peso molecular, frequentemente produzidos na ausência de ferro para suprir a necessidade nutricional de determinado ser vivo (SAHA et al., 2013). A detecção desse composto orgânico em meio CAS sólido é percebida pela mudança da coloração do meio de azul para amarelo-alaranjado ao redor das colônias (SCHWYN & NEILANDS, 1987).

Ma et al. (2016) estudaram uma *Pseudomonas* sp. p21, produtora de pioverdina que apresentou a formação de halos ao redor das colônias bacterianas, ao contrário de outras bactérias do mesmo gênero não produtoras de sideróforos, e de genoma muito próximo a *Pseudomonas putida* KT2440 (NELSON et al., 2002).

Os sideróforos bacterianos liberados possuem a habilidade de promover a biofertilização das plantas associadas com bactérias produtoras da substância quelante de ferro, e também característica de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos pela competição por ferro (NOVAIS et al., 2007; KHAN et al., 2017). Relatos de bactérias do gênero *Pseudomonas* podem ratificar que a produção de sideróforos por isolados bacterianos pode estar ligada a inibição fúngica (EL-SAYED, 2014; DUTTA & THAKUR, 2017; KAUR et al., 2017; UZAIR et al., 2018).

Nos isolados Pt12 e Pt13 a inibição do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* já foi relatada por Nascimento et al. (2015), podendo a produção de sideróforos pelo isolado Pt12, ser uma das substâncias que ajudaram na inibição *in vitro* do patógeno causador da fusariose. Visto que não só apenas os sideróforos são capazes de inibir o desenvolvimento de patógenos, no caso do isolado Pt13, outras substâncias podem estar correlacionadas a sua capacidade de inibir o *Fusarium*.

**Figura 4 - Produção de sideróforos pelos isolados Pt12 e Pt13 em meio CAS sólido após 24, 72 e 120 h de cultivo nos meios 2% LB e 0,6 % de TSB.** A presença da coloração amarelada em trono dos poços feitos nas placas de CAS sólido significa a produção dos sideróforos. À direita é apresentada esquematização da placa que reagiu com o sobrenadante, à esquerda verificam-se os halos formados do isolado Pt12 cultivados nos dois meios e colocados em poços de 10 mm de diâmetro.



Fonte: AUTOR

Quando analisada a produção de sideróforos, levando em consideração a mudança no tempo de cultivo do isolado Pt12 nos meios estudados (TSB e LB), o tamanho dos halos não obtiveram diferenças significativas quando deixadas crescer por um tempo maior (TABELA 1).

**Tabela 1 - Produção de sideróforos pelo isolado Pt12.** A partir da mensuração do halo formado ao redor dos poços e densidade óptica de crescimento bacteriano a 600 nm, após cultivo nos meios 2% LB e 0,6% TSB durante 24, 72 e 120 h. Os valores são dados como média±desvio padrão de três repetições. Letras minúsculas se referem a diferença em relação ao tempo de cultivo, e letras maiúsculas se referem a diferença em relação entre os meios de cultivo.

Tempo	Crescimento Pt12 2% LB (600nm)	Tamanho do halo Pt12 2% LB (mm)	Crescimento Pt12 0.6% TSB (600 nm)	Tamanho do halo Pt12 0.6% TSB (mm)
24h	1,510	15,16 ± 0.02 a A	1,284	16,04 ± 0.12 a A
72h	1,767	15,17 ± 0.08 a A	1,352	16,49 ± 0.08 a A
120h	1,945	14,78 ± 0.07 a B	1,235	16,71 ± 0.03 a A

Médias seguidas de mesma letra minúscula e maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Fisher (LSD) e SNK, respectivamente.

Fonte: AUTOR

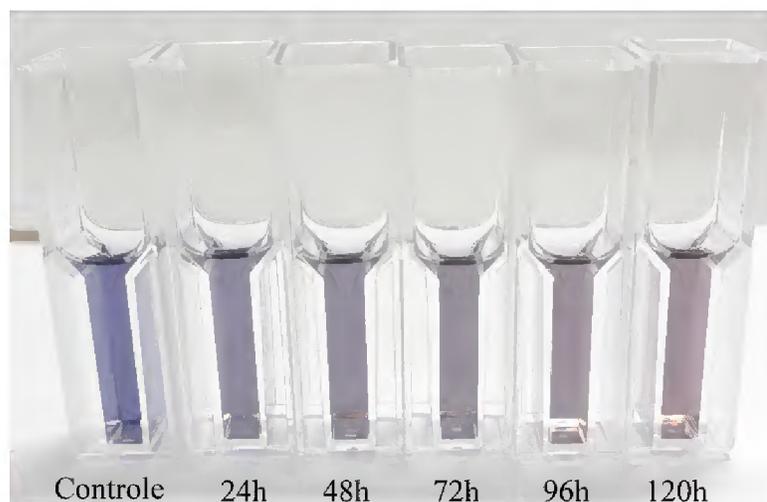
O diferencial do meio de cultivo bacteriano para favorecer a produção de sideróforos, também não foi significativo para os cultivos de até as 72 h. Ambos os meios utilizados para o cultivo mostram-se eficazes para induzir os isolados na liberação dos sideróforos quelantes de ferro, no entanto, após 120 h de cultivo o meio 0,6% TSB apresentou maior tamanho médio do halo em comparação ao 2% LB (TABELA 1). Triptona soja (TS) é um meio muito utilizado para a seleção e identificação de bactérias endofíticas de diversas partes da planta, é um meio que consegue promover o crescimento e adaptação de um maior número de endófitos de diversas partes da planta quando comparado com outros meio de cultura utilizados para o mesmo propósito (MARAG & SUMAN, 2018).

O meio CAS sólido é muito utilizado para detectar bactérias produtoras de sideróforos, porém utilizado sozinho, é capaz de ocultar alguns estipes produtores da substância, visto que são encontradas bactérias que produzem grandes quantidades de sideróforos em solução líquida, mas nem sempre produzem halos no meio sólido (ALEXANDER & ZUBERER, 1990).

Contudo, mesmo nas análises de detecção em solução CAS, o isolado Pt13 não foi capaz de produzir sideróforos. Apenas no isolado Pt12 foi observada a alteração na coloração da solução composta pelo sobrenadante bacteriano e a solução de detecção de sideróforos, enfraquecendo o azul da solução de acordo com o tempo de cultivo do isolado em meio LB

(FIGURA 5). Segundo Schwyn & Neilands (1987) a produção de sideróforos por isolados bacterianos leva a alteração da cor da solução para uma cor alaranjada a rósea, confirmando a produção pelo isolado Pt12.

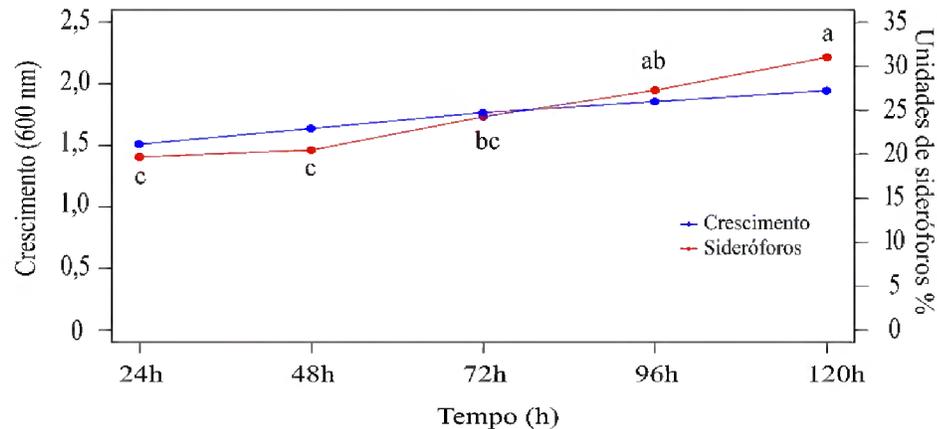
**Figura 5 - Detecção de sideróforos em solução CAS.** A partir do crescimento bacteriano no meio 2% LB nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, notou-se a mudança na coloração em relação ao controle (sem bactéria) com o passar do tempo, quando reagido o sobrenadante do isolado Pt12 com a solução CAS.



Fonte: AUTOR

Feita a mensuração das absorbâncias das reações, foi possível a quantificação dos sideróforos do isolado Pt12 cultivado em meio 2% LB, pelo cálculo das unidades de sideróforos (SU%) em relação ao controle, nos diferentes intervalos de tempo. A produção de sideróforos pelo isolado teve uma tendência crescente com o passar do tempo, ou seja, após 120 h de cultivo o isolado conseguiu produzir a maior quantidade de sideróforos (FIGURA 6).

**Figura 6 - Produção de sideróforos com solução CAS.** Quantificação a partir do cultivo bacteriano no meio 2% LB nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, em três repetições. Valores de médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Fisher (LSD).



Fonte: AUTOR

Soni et al.(2016) estudaram a produção de sideróforos e potencial antagônico a fungos patogênicos de 26 isolados de *Pseudomonas* da rizosfera de maçã e pera, e conseguiram mostrar que todos os isolados são capazes de produzir sideróforos em meio CAS sólido e em solução CAS. Além disso, a maior parte desses isolados foi capaz de inibir o crescimento de patógenos como: *Fusarium oxysporum*, *Dematophora* sp., *Alternaria* sp. e *Pythium* sp., não eliminando a possibilidade da inibição do *Fusarium solani* f. sp. *piperis* pelo isolado Pt12 ser devido a produção de compostos de potencial antagônico como os sideróforos quelantes de ferro.

Verma et al. (2016) identificaram uma bactéria da espécie *Pseudomonas putida* isolado DE-18 capaz de inibir em experimentos laboratoriais os fungo patogênicos da maçã *Dematophora nectarix* e *Phytopathora cactoram*, esta foi capaz de produzir sideróforos (42,18 %SU), além da produção de AIA e solubilização de fosfatos. Valor próximo aos isolados estudados por Sharma et al. (2017) que encontraram *Pseudomonas* sp. capazes de produzir o máximo de 43,32 SU% e mínimo de 25,92 %SU, produções de sideróforos próximas ao isolado Pt12, que em 120 h de cultivo conseguiu a máxima produção de 31 %SU.

Outra relação obtida foi a do crescimento bacteriano com a produção de sideróforos, com o crescimento no número de células, houve um crescimento na produção de sideróforos (FIGURA 6). Em *Pseudomonas* spp. há maior produção de sideróforos na fase logarítmica de crescimento bacteriano, decrescendo a quantidade na medida em que chega a fase estacionária (YU et al, 2017, SINHA et al, 2019).

### 2.3.2. Produção de AIA

A produção de ácido indolacético exógeno por bactérias associadas com plantas é uma característica importante relacionada a bactérias promotoras do crescimento vegetal. A utilização do reagente de Salkowski para a inativação do AIA liberado no meio é realizada para a quantificação da produção do hormônio (TANG & BONNER, 1947). Feita a análise das duas *Pseudomonas* pelas metodologias utilizadas, resultados satisfatórios foram obtidos para a produção do hormônio.

No cultivo dos isolados em meio TSA suplementado com triptofano, seguindo a metodologia de Bric et al. (1991) cujo o meio de cultura foi suplementado com 1 g/L de L-triptofano e coberto com nitrocelulose, não foi observado nitidamente a formação da coloração rósea ao redor das culturas bacterianas. Porém, com a modificação metodológica na concentração de L-triptofano para 3 g/L, melhor foi observada a presença de uma coloração em torno das culturas.

Em contrapartida aos resultados pouco visíveis em membranas de nitrocelulose, a metodologia colorimétrica em meio TSB-Trp foi bem visualizada quando comparadas as bactérias crescidas nas duas concentrações de L-triptofano (0,2 g/L e 3 g/L), afirmando que os isolados Pt12 e Pt13 possuem a capacidade de produzir AIA.

Foi realizada a quantificação do ácido indolacético dos isolados a partir de uma curva padrão, modelo matemático feito por meio das tendências dos dados, obteve-se o ajuste de uma fórmula de tendência linear com parâmetros de erros confiáveis para estimar as concentrações de AIA dos isolados em estudo ( $y = 0,0093x + 0,0347$ ;  $R^2 = 0,9856$ ;  $R_a^2 = 0,9838$ ; p-valor < 0,05).

Foi possível observar entre as bactérias estudadas que a maior produção de AIA está na maior concentração de triptofano, levando a concluir que as bactérias produzem maior parte do hormônio por vias dependentes do triptofano, sendo estas diretamente proporcional a quantidade do aminoácido (TABELA 2). Bactérias são capazes de produzir AIA na ausência de triptofano, porém quando presente o aminoácido no meio de cultura, há maior atividade bacteriana para a produção de compostos indólicos, utilizando este na rota como precursor, crescendo a produção do hormônio (JAYAPRAKASHVEL et al., 2014). Sasirekha et al. (2012) verificaram em trabalhos com o gênero *Pseudomonas* que a produção de AIA cresceu de 80 µg/mL para 132 µg/mL, quando a suplementação de L-Triptofano foi alterada de 0,1 g/L para 0,5 g/L.

Em relação ao crescimento bacteriano, este manteve-se próximo independente da concentração de triptofano no meio, contudo, é de se considerar que é diretamente proporcional a produção de AIA em ambos os experimentos, ou seja, enquanto as bactérias não alcançaram um crescimento elevado, próximo a fase estacionária, pouco foi o AIA produzido (FIGURAS 9 e 10). Este resultado afirma o AIA como um metabólito secundário que a bactéria produz em maior quantidade quando já terminada a fase crescimento logarítmica (trofofase), e esteja na fase estacionária (idiofase) (TORTORA et al., 2012). Metabólitos secundários são produtos específicos produzidos por uma ou poucas espécies de bactérias, não possuem função óbvia no crescimento bacteriano, por conta disso, são sintetizados após os metabólitos primários, produzidos durante a multiplicação celular para suprir as necessidades imediatas (WEINBERG, 1970).

**Tabela 2 - Produção de ácido indolacético ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação dos isolados Pt12 e Pt13 no meio TSB-Trp nas concentrações de 0,2 g/L e 3 g/L, com e sem extrato da *P. nigrum*. Os valores são dados como média  $\pm$  desvio de três repetições, se seguidos de mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.**

Tempo de cultivo em meio TS-Triptofano 0,2 g/L					
Isolados	24h	48h	72h	96h	120h
Pt12	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,75 $\pm$ 1,28 b	6,84 $\pm$ 1,96 c
Pt12ext	0,00 b	0,00 b	0,21 $\pm$ 3,57 b	3,08 $\pm$ 5,56 b	9,89 $\pm$ 5,37 bc
Pt13	16,16 $\pm$ 2,22 a	21,54 $\pm$ 2,36 a	18,35 $\pm$ 1,84 a	15,23 $\pm$ 1,61 a	14,30 $\pm$ 0,90 ab
Pt13ext	16,30 $\pm$ 3,36 a	24,48 $\pm$ 3,97 a	20,50 $\pm$ 2,19 a	16,84 $\pm$ 1,67 a	16,05 $\pm$ 1,41 a

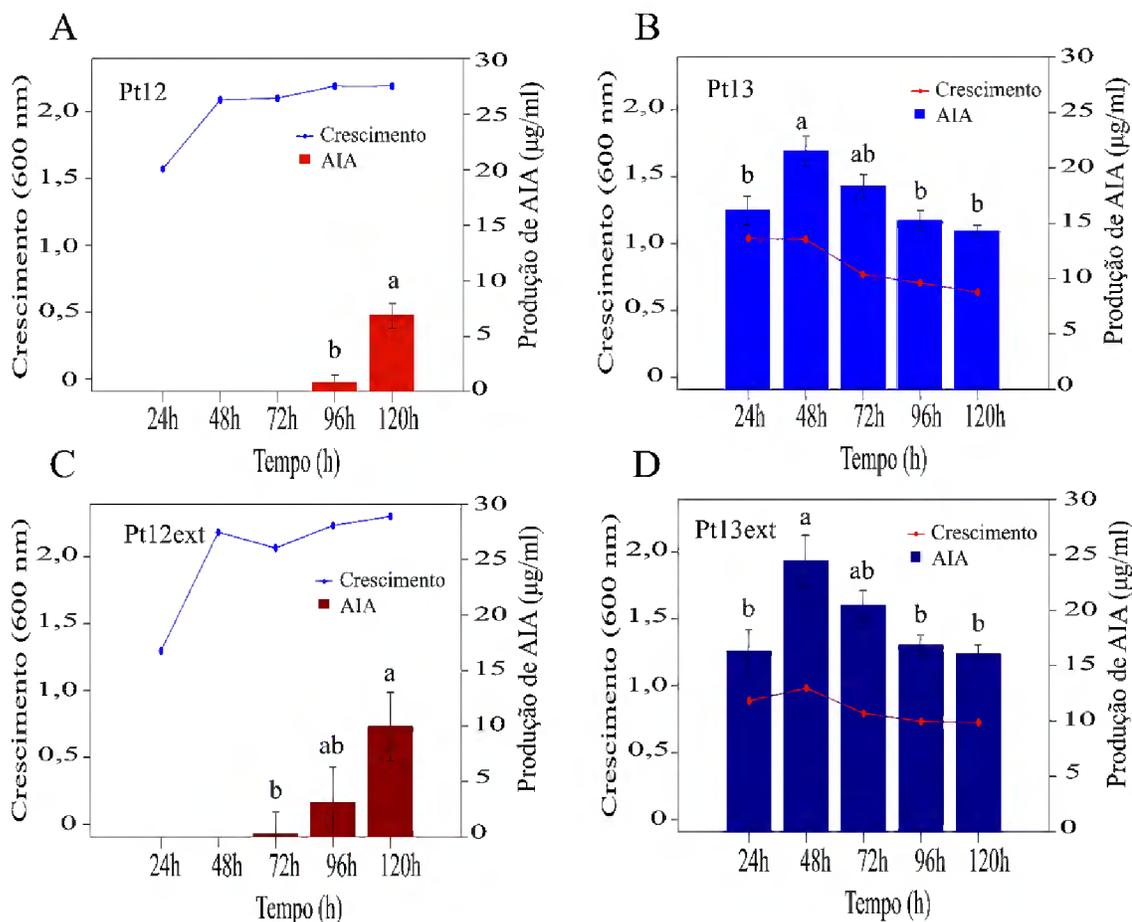
Tempo de cultivo em meio TS-Triptofano 3 g/L					
Isolados	24h	48h	72h	96h	120h
Pt12	62,18 $\pm$ 12,11 a	67,06 $\pm$ 9,92 a	71,32 $\pm$ 9,57 b	111,32 $\pm$ 1,77 a	75,77 $\pm$ 0,76 a
Pt12ext	104,91 $\pm$ 3,24 a	107,06 $\pm$ 4,55 a	127,16 $\pm$ 1,43 a	112,29 $\pm$ 3,28 a	77,60 $\pm$ 2,34 a
Pt13	61,29 $\pm$ 3,94 a	76,13 $\pm$ 4,26 a	61,65 $\pm$ 4,68 b	58,71 $\pm$ 2,77 b	55,77 $\pm$ 10,03 b
Pt13ext	93,22 $\pm$ 13,99 a	60,82 $\pm$ 1,25 a	45,23 $\pm$ 0,62 b	48,35 $\pm$ 4,85 b	40,86 $\pm$ 2,95 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

Fonte: AUTOR

No experimento com menor suplementação L-triptofano, a Pt13 produziu mais hormônio quando comparada a Pt12 cultivada com e sem extrato (TABELA 2), em 48 h o isolado Pt13 apresentou o pico de produção, enquanto a Pt12 demorou até as 120 h para alcançar a máxima produção com o extrato da pimenteira (FIGURA 7).

**Figura 7 - Produção de ácido indolacético ( $\mu\text{g/mL}$ ) na concentração de 0,2 g/L de L-triptofano.** O crescimento bacteriano foi mensurado na densidade óptica a 600 nm e relacionado ao AIA produzido. (A) Pt12 sem extrato; (B) Pt13 sem extrato; (C) Pt12 com extrato; (D) Pt13 com extrato. Os valores são dados como média de três repetições, se seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Fisher (LSD).



Fonte: AUTOR

Diversos trabalhos com o meio suplementado com 0,2 g/L de L-triptofano já demonstraram que as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir ácido indolacético em experimentos laboratoriais. Etmnani & Harighi (2018) trabalhando com bactérias endofíticas isoladas de *Pistacia atlantica* L., identificaram *Pseudomonas protegens* capazes de produzir AIA em uma quantidade variável aproximadamente de 8  $\mu\text{g/mL}$  a 50  $\mu\text{g/mL}$  de AIA. Quando comparadas com as bactérias em estudo, demonstra que a Pt13 como uma

espécie desconhecida do gênero *Pseudomonas* se aproximou na produção de AIA de bactérias pertencentes a este gênero.

Experimento com *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* realizado por Meliani et al. (2017) com a concentração de 0,2 g/L de triptofano, resultou na produção de 116 µg/mL e 89 µg/mL de AIA, respectivamente. Isso demonstra que a espécie *Pseudomonas putida* consegue produzir boa quantidade do hormônio, sendo uma característica do próprio isolado Pt12 a pouca produção em baixas concentrações do aminoácido precursor (PATTEN & GLICK, 2002b).

Ao contrário do experimento com menor concentração de triptofano no meio, quando suplementado com 3 g/L, a produção de AIA da Pt12 nas duas condições de cultivo (Pt12 e Pt12 ext) foi maior em comparação com a Pt13 a partir de 96 h de cultivo, antes disso, apenas em 72 h o tratamento Pt12ext foi maior que os outros (TABELA 2). A necessidade de triptofano para a produção de AIA é diferente nas bactérias estudadas, fazendo com que houvesse uma diferença na produção do hormônio quando analisadas as concentrações de 0,2 g/L e 3 g/L do aminoácido, sendo o isolado Pt12 o qual possuiu maior necessidade do triptofano para produzir AIA.

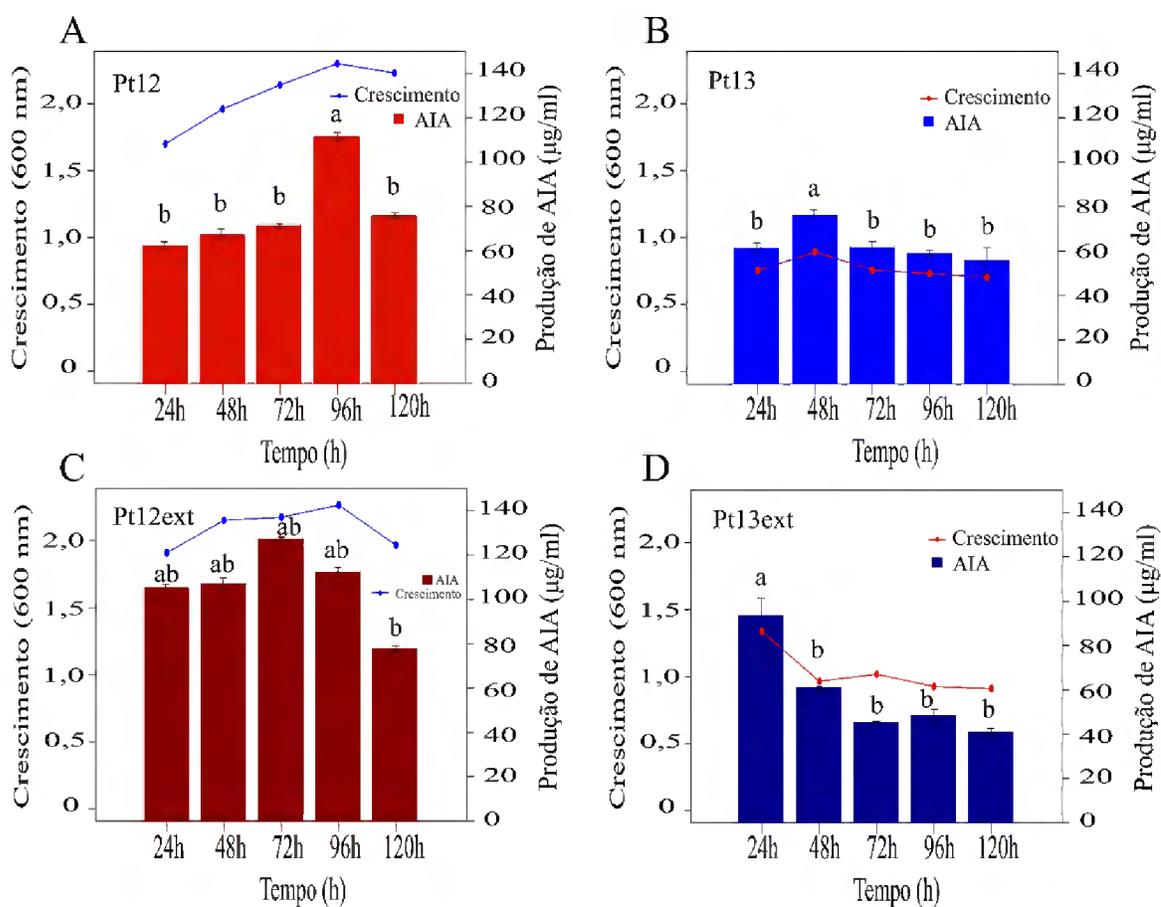
Os resultados mostraram que as quantidades de AIA presentes no meio variaram de acordo com o intervalo de tempo de cultivo. Em 96 h, o isolado Pt12 produziu a maior quantidade de AIA, porém quanto tratado com extrato, não se obteve diferenças entre a produção de AIA e os períodos de cultivo. O isolado Pt13 teve o pico de produção após 48 h de cultivo, enquanto Pt13ext teve o pico de produção após 24 h (FIGURA 8).

Na comparação da quantidade de AIA produzido pelos isolados na presença e ausência do extrato da *Piper nigrum* em ambas as concentrações de triptofano estudadas, a adição do extrato da pimenteira no TSB-Trp a 0,2 g/L não teve efeito na produção de AIA das duas bactérias. Porém, no experimento TSB-Trp 3 g/L obteve-se diferença positiva na quantidade de AIA apenas do isolado Pt12 após 72h de cultivo, sendo assim, verificada que a adição do extrato na maior parte dos intervalos de cultivo foi capaz apenas de antecipar os picos de produção do hormônio, mas não de aumentar as taxas de produção (TABELA 2 e FIGURA 8).

A característica da antecipação da produção de AIA pela suplementação do meio com extrato, pode estar relacionada com a indução da produção AIA na presença de metabólitos das

plantas (JASIM et al., 2014). Plantas hospedeiras fornecem as bactérias associadas açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, esse favorecimento pode afetar na quantidade e na antecipação da produção de auxina (KAMILOVA et al., 2006).

**Figura 8 - Produção de ácido indolacético ( $\mu\text{g/mL}$ ) na concentração de 3 g/L de L-triptofano. O crescimento bacteriano foi mensurado na densidade óptica a 600 nm e relacionado ao AIA produzido. (A) Pt12 sem extrato; (B) Pt13 sem extrato; (C) Pt12 com extrato; (D) Pt13 com extrato. Os valores são dados como média de três repetições, se seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Fisher (LSD).**



Fonte: AUTOR

### 2.3.3. Solubilização de fosfato

A necessidade de alternativas para disponibilizar fósforo no solo, ou pelo menos evitar perdas nas práticas de fertilização de fósforo no solo, leva aos estudos das bactérias que possuem capacidade de disponibilizar fosfatos solúveis às plantas. A presença de halos transparentes ao redor da colônia bacteriana crescida no meio NBRIP sólido é um indício da capacidade de ser uma bactéria solubilizadora de fosfato (KATZNELSON et al., 1962). No estudo, a avaliação das *Pseudomonas* crescidas no meio NBRIP sólido apresentou halos formados ao redor do isolado Pt12, porém a Pt13 não apresentou halos (FIGURA 9).

**Figura 9 – Experimento em placas de NBRIP sólido.** O experimento foi realizado em triplicatas dos isolados Pt12 (esquerda) e Pt13 (direita). A presença do halo transparente ao redor dos poços significa a solubilização do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .



Fonte: AUTOR

Os halos formados em torno das triplicatas da Pt12 tiveram o índice de solubilização médio de 2,67 (TABELA 3). Bello-Akinosho et al. (2016) encontraram duas bactérias do gênero

*Pseudomonas* (KM578846\_10\_1C KR185712\_10\_8A5) capazes de formar halos em placas com NBRIP em elevados índices de solubilização de fosfato (IS máximo= 7,28), em relações a outros gêneros de bactérias como *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* (IS= 2,17 a 3,44). Entretanto, em trabalhos cujos realizaram metodologias próximas ao estudo em questão, mostram que essas bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* quando crescidas em meio NBRIP sólido, os índices de solubilização variam em média de 1,08 a 2,74 (RFAKI et al., 2014; LIU et al., 2015; BELLO-AKINOSHO et al., 2016; KAUR et al., 2017).

**Tabela 3 – Índice de solubilização de fosfatos inorgânicos das três repetições do isolado Pt12.** IS foi calculado a partir do tamanho do halo transparente formado ao redor dos poços no meio NBRIP sólido.

Pt12		
Repetições	Índice de solubilização	Média
1	2,60	2,67
2	2,77	
3	2,66	

Fonte: AUTOR

Georgieva et al. (2018) avaliou duas *Pseudomonas putida*, isolado BTCC1046 e isolado Or5, capazes de solubilizar fosfato tricálcico quando inoculadas em NBRIP, as quais apresentaram índices de solubilização de fosfato 2,01 e 1,4, respectivamente. Resultados próximos ao isolado Pt12, o que leva a ser considerada uma bactéria que possui índice de solubilização médio próximo a bactérias da mesma espécie, *Pseudomonas putida*.

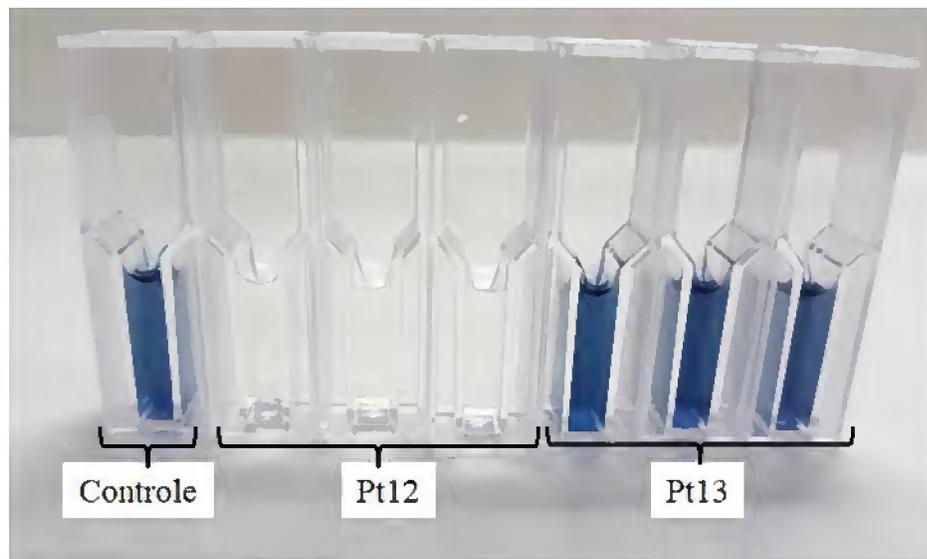
A seleção de bactérias que são possíveis solubilizadoras de fosfato geralmente é realizada em meio sólido, porém, não é o método mais indicado e mais eficiente para a avaliação da atividade solubilizadoras, nem para indicar o potencial solubilizador de bactérias, visto que existem bactérias que não conseguem solubilizar fosfatos em placas, mas conseguem em meio líquido (NAUTIYAL, 1999; ZENG et al., 2016).

Nos experimentos em meio líquido, novamente o isolado Pt13 não foi capaz de solubilizar os fosfatos insolúveis, sendo assim, apenas o isolado Pt12 foi capaz de solubilizar os fosfatos nessa metodologia. Para a quantificação em meio líquido utilizou-se uma curva padrão

com concentrações conhecidas de  $\text{PO}_4^-$ , que a partir de análise regressão linear, obteve-se uma fórmula de tendência linear com alto coeficiente de determinação, e eficaz para a estimação dos valores de absorvância lidos nos intervalos da solubilização de fosfato ( $y = 0,0323x + 0,5581$ ;  $R^2 = 0,9893$ ;  $R^2_a = 0,9872$ , p-valor < 0,05).

A mudança de pH foi uma característica observada no meio de cultivo do isolado Pt12, a liberação de possíveis substâncias como enzimas ou ácidos orgânicos, acidificam o meio e podem realizar a solubilização de fosfatos insolúveis, sendo assim, a liberação do fósforo solúvel em água é diretamente proporcional a acidificação do meio (LIU et al., 2015; SATYAPRAKASH et al., 2017). As bactérias ao solubilizarem o fosfato insolúvel do meio promovem mudanças de coloração da reação entre o reagente do método molibdênio azul e o sobrenadante bacteriano, sendo mais incolor a medida que o fosfato vai sendo solubilizado (FIGURA 10).

**Figura 10 – Visualização da solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido.** O experimento evidencia a alteração na coloração no produto da reação entre o sobrenadante dos isolados Pt12, Pt13 e um controle negativo (sem bactéria) com o reagente molibdênio azul, após 96 h de cultivo dos isolados.



Fonte: AUTOR

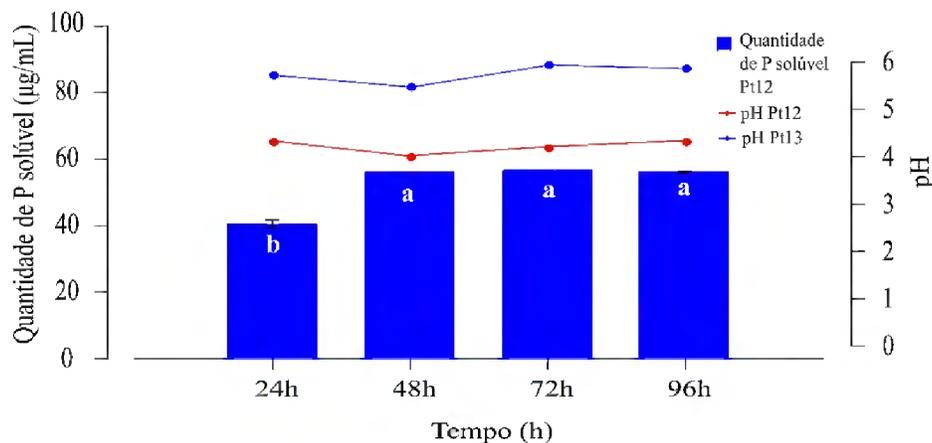
O isolado Pt12 foi capaz de solubilizar fosfatos em todos os intervalos de tempo, principalmente, quando o meio de cultivo decresceu para pH 4,0 após 48 h de incubação, tempo

em que a solubilização tornou-se estável até as 120 h. Ao contrário desse resultado, o isolado Pt13 com o máximo de acidez em pH 5,8, não conseguiu solubilizar o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  do meio NBRIP (FIGURA 11).

Ordoñez et al. (2016) caracterizaram 10 isolados de *Pseudomonas* capazes de solubilizar  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , em valores que variaram de 27,16 a 110,28  $\mu\text{g/ml}$  de fósforo. Zeng et al. (2016) obtiveram resultados similarmente ao isolado Pt12 de um isolado de *Pseudomonas frederiksbergensis* (JW-SD2), cujo quando cultivado em meio NBRIP suplementado com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , foi capaz de solubilizar o fosfato insolúvel e tornar o pH do meio para pH 4,23 após 24 h de crescimento, além disso, analisaram que após 120 h de cultivo 11 tipos de ácidos orgânicos foram liberados no meio.

Oteino et al. (2015) estudaram sete isolados e encontraram cinco bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* com potencial solubilizador de fosfato tricálcico, todas alteraram o pH do meio para próximo de pH 4, duas destas eram uma bactéria do gênero *Bacillus* e um controle negativo (*E. coli*) não solubilizadoras de fosfatos, ambas similarmente ao isolado Pt13 tiveram acidez máxima em acima do pH 5.

**Figura 11 – Quantificação da solubilização de fosfato pelos isolados Pt12 e verificação da mudança de pH nos meios dos isolados Pt12 e Pt13 em NBRIP líquido.** Nas barras estão presentes os valores da quantificação de P solúvel dados como média de três repetições, se seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Fisher (LSD).



Fonte: AUTOR

Schlemper et al. (2018) estudaram uma *Pseudomonas fluorescens* (IAC/BECa 141), que similarmente a Pt13, não conseguiu solubilizar fosfato inorgânico no meio NBRIP, e também não produziu sideróforos em CAS sólido, apenas capaz de produzir AIA, fato que pode estar ligado a características específicas de espécies do gênero estudado (TABELA 4). Vários estudos mostram que dentro do gênero *Pseudomonas* há uma grande variedade de bactérias com características diferentes (Scagliola et al., 2016; Soni et al., 2016; Rai et al., 2017).

**Tabela 4 – Características obtidas pelos isolados Pt12 e Pt13 após a realização dos experimentos nas condições definidas, mostrando os resultados que foram positivos (+) e negativos (-).**

Análises	Isolados	
	Pt12	Pt13
Produção de AIA	+	+
Solubilização de Fosfato	+	-
Produção de Sideróforos	+	-

Fonte: AUTOR

## 2.4. Conclusão

A bactéria *P. putida* (Pt12) foi capaz de produzir sideróforos, AIA e solubilizar fosfato inorgânico, caracterizando-a como uma possível PGPB. Desta forma, a bactéria Pt12 apresenta potencial para promover o crescimento radicular em plantas de pimenteira-do-reino, devido a produção de AIA in vitro e sua capacidade de solubilizar fosfatos insolúveis. Além disto, a capacidade da Pt12 em produzir sideróforos pode contribuir no antagonismo do crescimento do *F. solani* f. sp. *piperis* em plantas de pimenteira inoculadas com esse patógeno, contudo estudos futuros elucidarão o papel dessas moléculas nesta interação planta-patógeno.

Em contra partida, a *Pseudomonas* sp. (Pt13) foi capaz de produzir somente o AIA nas condições testadas, sendo um possível responsável pelo crescimento radicular observado em plantas de *P. nigrum* inoculadas com este isolado.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C. et al. Resistência de piperáceas nativas da amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 3, p. 341–348, 2001.
- ALEXANDER, D. B.; ZUBERER, D. A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, n. 1, p. 39–45, 1991.
- BELLO-AKINOSHO, M. et al. Potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterial Isolates to Contribute to Soil Fertility. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONET, S. E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 535–538, 1991.
- CANO, M. A. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. UNA REVISIÓN. **Rev.U.D.C.A Act. e Div. Cient.**, v. 14, n. 2, p. 15–31, 2011.
- DE SOUZA, J. T.; RAAIJMAKERS, J. M. Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 1, p. 21–34, 2003.
- DUTTA, J.; THAKUR, D. Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–24, 2017.
- EL-SAYED, W. S. et al. In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. DEC, p. 1–11, 2014.
- ETMINANI, F.; HARIGHI, B. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. **Plant Pathology Journal**, v. 34, n. 3, p. 208–217, 2018.
- GEORGIEVA, T. et al. Assessment of plant growth promoting activities of five rhizospheric *Pseudomonas* strains. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. April, p. 285–292, 2018.
- GOBETTI, M.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M. Functional microorganisms for functional food quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 8, p. 716–727, 2010.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indole acetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192–195, 1951.
- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.

JASIM, B. et al. Studies on the factors modulating indole-3-acetic acid production in endophytic bacterial isolates from *Piper nigrum* and molecular analysis of ipdc gene. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 786–799, 2014.

JAYAPRAKASHVEL, M. et al. Isolation and characterization of Indole Acetic Acid (IAA) produced by a halo tolerant marine bacterium isolated from coastal sand dune plants. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 11, n. SepcialEdition, p. 263–269, 2014.

KAMILOVA, F. et al. Organic Acids , sugars , and L -tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 3, p. 250–256, 2006.

KATZNELSON, H.; PETERSON, E. A.; ROUATT, J. W. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, n. 9, p. 1181–1186, 1962.

KAUR, G. et al. Exploitation of endophytic *Pseudomonas* sp . for plant growth promotion and colonization in rice. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 9, n. 3, p. 1310–1316, 2017.

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. **Microbiological Research**, n. October, p. 0–1, 2017.

LIU, Z. et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 217–224, 2015.

MAKSIMOV, I. V. et al. Endophytic Bacteria as Effective Agents of New-Generation Biopesticides (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 128–140, 2018.

MARAG, P. S.; SUMAN, A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). **Microbiological Research**, v. 214, n. May, p. 101–113, 2018.

MARATHE, R.; PHATAKE, Y.; SONAWANE, A. Bio prospecting of *Pseudomonas aeruginosa* for their potential to produce siderophore, process optimization and its bioactivity. **International journal of bioassays**, v. 4, n. 2, p. 3667–3675, 2015.

MAZURIER, S. et al. Phenazine antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. **ISME Journal**, v. 3, n. 8, p. 977–991, 2009.

MELIANI, A. et al. Plant Growth-Promotion and IAA secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. **Journal of Botanical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 16–24, 2017.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, n. ahead, p. 0–0, 2013.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Biotecnologia do Solo. **Editora UFLA**, v. ed. 2, p. 729, 2006.

- NASCIMENTO, S. B.; LIMA, A. M.; BORGES, B. N. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq. : isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7567–7577, 2015.
- NAUTIYAL, C. S. An eficiente microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiologic Letters**, v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.
- NELSON, K. E. et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 799–808, 2002.
- NOVAIS, R.F. et al. **Fertilidade do Solo**. Viçosa: SBCS, 2007. 1050 p.
- OLIVEIRA, C. A. et al. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782–1787, 2009.
- ORDOÑEZ, Y. M. et al. Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2016.
- OTEINO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUL, p. 1–9, 2015.
- PATTEN, C. L.; BLAKNEY, A. J. C.; COULSON, T. J. D. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 395–415, 2013.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 635–642, 2002a.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795–801, 2002b.
- RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M. Exploiting Genotypic Diversity of 2, 4-Diacetylphloroglucinol- Producing *Pseudomonas* spp. : Characterization of Superior Root-Colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2545–2554, 2001.
- RAI, A.; RAI, P. K.; SINGH, S. Characterization of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of *Aloe vera* (L.) pseudomonads from the rhizosphere of *Aloe vera* (L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2017.
- RFAKI, A.; NASSIRI, L.; IBIJBIJEN, J. Genetic diversity and phosphate solubilizing ability of *Triticum aestivum* rhizobacteria isolated from Meknes region, Morocco. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 19, p. 1931–1938, 2014.

SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.

SAHA, R. et al. Microbial siderophores: A mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013.

SASIREKHA, B.; SHIVAKUMAR, S.; SULLIA, S. B. Statistical optimization for improved indole-3-acetic acid (iaa) production by *Pseudomonas aeruginosa* and demonstration of enhanced plant growth promotion. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 2012.

SATYAPRAKASH, M. et al. Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 2133–2144, 2017.

SCAGLIOLA, M. et al. Characterization of plant growth promoting traits of bacterial isolates from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) and tomato (*Solanum lycopersicon* L.) grown under Fe sufficiency and deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 187–196, 2016.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47–56, 1987.

SHARMA, P.; VERMA, P. P.; KAUR, M. Phytohormones Production and Phosphate Solubilization Capacities of Fluorescent *Pseudomonas* sp . Isolated from Shimla Dist . of Himachal Pradesh. v. 6, n. 9, p. 2447–2454, 2017.

SINHA, A. K. et al. Effects of growth conditions on siderophore producing bacteria and siderophore production from Indian Ocean sector of Southern Ocean. **Journal of Basic Microbiology**, p. 1–13, 2019.

TANG, Y. W.; BONNER, J. The enzymatic inactivation of indole-acetic, acid. **Arch Biochem.** v. 13, p. 11-25, 1947.

TORTORA, G.R. **Microbiologia**. 10<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

UZAIR, B. et al. Isolation and Molecular Characterization of a Model Antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* divulging in vitro plant growth promoting characteristics. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

VERMA, P.; THAKUR, S.; KAUR, M. Antagonism of *Pseudomonas putida* Against *Dematophora nectarix* A Major Apple Plant Pathogen and Its Potential Use as a Biostimulent. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 2717–2726, 2016.

WEINBERG, E. D. Biosynthesis os a secondary metabolite: role of a trace metals. **Advanced microbial physiology**. v. 4, p. 1-44, 1970.

YU, S. et al. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF . 1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. v. 55, n. 11, p. 877–884, 2017.

ZENG, Q.; WU, X.; WEN, X. Erratum to: Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2, and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings (*Annals of Microbiology*, (2016), 66, 4, (1343-1354), 10.1. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 287, 2017.