



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
CURSO DE AGRONOMIA

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL**

MARCOS FERREIRA TEIXEIRA

Garanhuns - Pernambuco
Junho ã 2018

MARCOS FERREIRA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL**

Relatório de Estágio Supervisionado
Obrigatório (ESO) apresentado à Universidade
Federal Rural de Pernambuco/Unidade
Acadêmica de Garanhuns, como parte das
exigências do Curso de Graduação em
Agronomia para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Júlia Kuklinsky Sobral

Prof.^a Dra. da Unidade
Acadêmica de Garanhuns /
UFRPE

Supervisor: Fernando Dini Andreote

Prof. Dr. Do Departamento de
Ciência do Solo ESALQ / USP

Garanhuns - Pernambuco
Junho - 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

T266a Teixeira, Marcos Ferreira

Avaliação fenotípica de bactérias promotoras de crescimento vegetal / Marcos Ferreira Teixeira. - 2018.

21 f. : il

Orientadora: Júlia Kuklinsky Sobral.

Coorientador: Fernando Dini Andreote

Trabalho de ESO (Estágio Supervisionado Obrigatório : Curso de Agronomia) ã Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Garanhuns, BR - PE, 2018.

Inclui referências e apêndices

1. Biofilme 2. Crescimento (Plantas) 3. Ecologia microbiana
4. Bacillus (Bacteria) I. Sobral, Júlia Kuklinsky, orient. II. Andreote, Fernando Dini, coorient. III. Título

CDD 631.4

MARCOS FERREIRA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL**

Relatório aprovado em 18 / 06 / 2018

Jesimiel Gomes Barbosa

Engenheiro Agrônomo, Mestre em Produção Agrícola, UFRPE/UAG

João Tiago Correia Oliveira

Doutor em Zootecnia ã UFRPE

Prof.^a Dr.^a Júlia Kuklinsky Sobral ã UFRPE/UAG

Orientadora

Garanhuns - Pernambuco

Junho – 2018

IDENTIFICAÇÃO

Nome do aluno: Marcos Ferreira Teixeira

Curso: Agronomia

Matricula: 200665176

Tipo de estágio: Curricular Supervisionado Obrigatório

Área de Conhecimento: Microbiologia do Solo

Empresa/Instituição: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP

Endereço: Av. Pádua Dias, 11 - Cx. Postal 9 - Piracicaba - SP, CEP 13418-900

Setor: Departamento de Ciência do solo da ESALQ - USP, Laboratório de Microbiologia do Solo

Supervisor: Fernando Dini Andreote

Função do Supervisor: Professor

Formação Profissional: Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas

Professora Orientadora: Júlia Kuklinsky Sobral

Período de realização: 23 / 04 / 2018 a 10 / 06 / 2018

Total de horas: 210 horas

À minha família, **Teixeira**, esta família que sempre está unida, família guerreira e batalhadora, que preza pela honestidade, muito simples e tradicional, mas com um amor fora do comum.

DEDICO!

Aos meus pais, **José Teixeira e Adelaide Teixeira**, aos meus irmãos, **Timóteo e Janete**, por todo o apoio antes e durante minha graduação, contribuindo assim para o meu crescimento profissional e pessoal.

OFEREÇO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, José Teixeira e Adelaide Teixeira e meus irmãos, por todo apoio, companheirismo e amor, por não medirem esforços em me ajudar todas as vezes que precisei.

A minha família Teixeira, que a todo momento permanece unida, aos exemplos que tenho dentro da família, o que me faz cada vez mais ter orgulho de ter uma família tão especial, todas as referências que tenho na família contribuiu e contribui muito para o meu crescimento pessoal.

A meu tio Josemil Peixoto, que teve uma atenção mais que especial na reta final, o que foi muito importante para minha conquista profissional, sempre me motivando e acreditando no meu potencial. Um exemplo de vida, está sempre à disposição para ajudar quem quer que seja, conquista a todos com seu carinho.

À minha orientadora e tutora, prof. Dr^a Júlia Kuklisnky Sobral, por sempre apoiar e acreditar no meu potencial, por todo conselho e aprendizado que me deu, por criar este vínculo não só profissional, mas de amizade e é por isso que à tenho como referência profissional.

Aos amigos do grupo PET e LGBM (Adijailton, Alyson, Anderson, Caio, Erlaine, Elvis, Erivaldo, Everlaine, Gessyka, Jacylene, Jesimiel, João, Júlio, Leandro, Lucianne, Maciel, Márcio, Marciano, Melquiades, Raquel, Ricardo, Ronaldo, Shilton, Tiago e Yasmin) pela convivência e amizade, por sempre ajudar e estar à disposição a todo momento onde quer que estejam.

A todos que fazem parte da turma de Agronomia 2013.2, pelo vínculo formado, por todos momentos divididos juntos, as alegrias e as aflições, pelas amizades formadas e estas levarei para o resto da vida.

A todos os professores da Unidade Acadêmica de Garanhuns, que contribuíram para minha formação profissional e aos demais funcionários que desempenham um papel de extrema importância dentro da instituição.

A agência de fomento MEC/SESu pela concessão da bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO	9
1. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA.....	10
2. INTRODUÇÃO	11
3. DESENVOLVIMENTO.....	12
3.1 Linhagens bacterianas	13
3.2 Teste de solubilização de fosfatos	13
3.2.1 Formulação meio PVK	13
3.3 Ensaio de formação de Biofilme	14
3.4 Teste de para identificação de microrganismos halotolerantes	15
3.5 Caracterização do perfil metabólico de isolados bacterianos através da metodologia	
BIOLOG	15
4. RESULTADOS.....	16
5. CONCLUSÃO	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
7. REFERÊNCIAS.....	21

RESUMO

O atual relatório refere-se ao Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), do curso de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns. Este relatório foi desenvolvido no Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura óLuiz de Queiroz - ESALQ/USP, especificamente no Laboratório de Microbiologia do Solo, sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, no período de abril à junho de 2018. Neste relatório será versado a avaliação fenotípica de bactérias promotoras de crescimento vegetal por meio de metodologias dependentes de cultivo como o BIOLOG . As bactérias utilizadas pertencem à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram realizados testes microbiológicos de solubilização de fontes de fosfatos, produção de biofilme, perfil metabólico e capacidade de crescimento em meio salino em duas bactérias do gênero *Bacillus*, (UAGAT 33 e UAGAT 71) isoladas de Atriplex, como por exemplo, halotolerante.

1. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) é um Campus da Universidade de São Paulo (USP) que tem suas atividades de ensino, pesquisa e extensão vinculadas às áreas das Ciências Agrárias, Sociais Aplicadas e Ambientais. Está localizada em Piracicaba no estado de São Paulo, a 160 km da capital, possui uma área territorial de 3.825,4 hectares, denominada Campus "Luiz de Queiroz" (Figura 1), correspondente a 48,85% da área total da USP e compreende 4 estações experimentais.

A ESALQ é reconhecida internacionalmente pela qualidade de suas pesquisas, estando entre as cinco melhores universidades do mundo na área das ciências agrárias, possui 7 cursos de graduação e 15 programas de pós-graduação (PPG), além de 2 interunidades e 1 interinstitucional, que se utilizam de seus 12 departamentos.

O Departamento de Ciência do Solo (LSO) atua nas áreas de solos, adubação, nutrição mineral de plantas e microbiologia do solo. O estágio foi realizado no laboratório de Microbiologia do Solo, o qual realiza pesquisa nas áreas de diversidade biológica do solo e interações solo-planta-microrganismos, microbiologia e bioquímica do solo.



Figura 1: Imagem aérea da ESALQ/USP, em destaque.
Fonte: Google maps (2018)

2. INTRODUÇÃO

As comunidades microbianas do solo desempenham importante papel em funções vitais do ecossistema, atuando na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, degradação de xenobióticos, solubilização de nutrientes e promoção de crescimento vegetal (COTTA, 2016). Como o grande desafio da agricultura moderna tem sido o aumento de produção, porém, reduzindo o uso de recursos finitos, a necessidade de promover estilos alternativos de agricultura ou implementação de práticas dentro dos sistemas já existentes que propicie a viabilidade agrícola sob seus diversos aspectos, tem-se tornado crucial.

O fósforo (P) é um constituinte celular primordial, e desempenha funções como constituinte da membrana celular, composição de nucleotídeos, mobilização energética além da participação na respiração (TAIZ; ZEIGER, 2013). Apesar de ser encontrado em grandes quantidades no solo, sua disponibilidade é deficitária, devido alta afinidade deste elemento com metais como Fe e Al, sendo este considerado o elemento menos prontamente disponível na rizosfera (PAVINATO et al., 2017). Com isso se torna necessário grandes doses de adubos fosfatados, para que as culturas obtenham alta produtividade, o que eleva o custo de produção. Considerável número de trabalhos tem sido desenvolvido num esforço de encontrar alternativas para suprir as necessidades de P para as plantas a um custo menor, e nesse sentido, a aplicação de microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSP) é uma alternativa promissora, pois além de reduzir custos, os MSPs proporcionam melhor uso de insumos, conduzindo os sistemas agrícolas para uma agricultura limpa e sustentável (CHABOT et al., 1993).

Os microrganismos do solo também têm papel crucial na atividade enzimática do solo. Enzimas microbianas são os principais catalisadores das reações de decomposição de compostos orgânicos no solo, conseqüentemente, ciclagem de nutrientes e aumento de sua disponibilidade para as plantas (SILVA et al., 2012). Entre as enzimas do solo, as celulasas, as quitinases, as proteases e as amilases estão entre as mais importantes e mais caracterizadas na literatura, uma vez que estas enzimas estão diretamente relacionadas com a degradação da matéria orgânica do solo (LIMA et al., 2014).

Para que a interação microrganismo planta ocorra, uma série de fatores precisam ser levados em consideração, uma delas é a afinidade de grupos de microrganismos com

determinadas fontes de carbono, desde modo, o tipo de exsudado que uma determinada espécie vegetal secreta, pode estar favorecendo um grupo microbiano que lhe propicie mais benefícios, gerando assim uma interação simbiótica. Com isso, a identificação do perfil metabólico de comunidades microbianas do solo é uma ferramenta eficiente tanto para fornecer informações relevantes do funcionamento dos solos, como para o entendimento das relações afins de comunidades microbianas com determinadas espécies vegetais (ANTUNES, 2018).

A exposição de microrganismos a diferentes fontes de carbono é uma maneira de medir a diversidade funcional, gerando dados que possibilita identificar vias metabólicas que estes possuem (ZHANG et al., 2010). A metodologia BIOLOG utilizando microplacas apresenta vantagens de rapidez e eficiência da avaliação do perfil metabólico, o que facilita aquisição de características da identidade metabólica dos isolados microbianos.

Diante do exposto, objetivou-se com o estágio conhecer e realizar atividades a fim de aperfeiçoar os conhecimentos na área de microbiologia agrícola, relacionados às técnicas de estudos em microrganismos com características de promoção de crescimento vegetal.

3. DESENVOLVIMENTO

As atividades realizadas junto ao Laboratório de Microbiologia do Solo ã ESALQ teve como objetivo integrar o aluno a rotina de atividades a serem desenvolvidas no mesmo, acompanhando os pesquisadores em técnicas de estudo da comunidade microbiana que vivem no solo, mais precisamente na aplicação de testes de seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Foram realizados:

- Teste de Solubilização de Fosfatos.
- Ensaio de Formação de Biofilme.
- Teste de para identificação de microrganismos halotolerantes.

- Caracterização do Perfil Metabólico de isolados bacterianos através da metodologia Biolog.

3.1 Linhagens bacterianas

Foram avaliadas duas linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* spp., isoladas de plantas de *Atriplex nummularia* cultivadas no estado de Pernambuco, sendo elas, UAGAT 33, UAGAT 71, do nicho endofítico e rizosférico respectivamente (SILVA et al, 2016). As bactérias pertencem à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da Unidade Acadêmica de Garanhuns, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3.2 Teste de solubilização de fosfatos

Para o teste de solubilização de fosfato, o pré-inoculo foi obtido a partir da inoculação do mesmo em meio Tryptone Soya Agar (TSB) 10% líquido e mantido sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Após esta etapa 100⁻ L da solução bacteriana em meio Pikovskaya (PVK) líquido (PIKOVSKAYA, 1948). O meio PVK foi alterado para avaliação de solubilização de mais três diferentes fontes de fosforo, são elas, Fitato de Cálcio, Fosfato de Araxá e Fosfato de Alumínio, para isso, foi substituído o fosfato de cálcio da formulação base, por quantidades idênticas das outras fontes de fosforo citadas. Para quantificação de fosfato solubilizado, retirou-se uma alíquota de 1,5 mL da cultura em meio PVK de ambos tratamentos, esta foi centrifugada a 12.000g por 5 minutos, após este processo 260 µL do sobrenadante foi retirado e acrescentado 2,5 mL de água destilada e 1 mL de reagente molibdato e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.2.1 Formulação meio PVK

Glicose, 10g; Ca₃(PO₄)₂, 5g; (NH₄)₂SO₄, 0,5g; NaCl, 0,2g; MgSO₄.7H₂O, 0,1g; KCl, 0,2 g; extrato de levedura, 0,5g; MnSO₄.H₂O, 0,002g; FeSO₄.7H₂O,

0,002g; agar, 15g. Dissolver para 1 litro de água destilada. Esterilizar em autoclave a 120°C, por 20 minutos, sob 1 atm.

3.2.2 Reagente molibdato

Solução I:

400 mL de água destilada quente, acrescentar 25g de molibdato de amônia aos poucos e completar volume para 500 mL.

Solução II:

1,25g de metavanadato de amônia, 225 mL de água destilada aquecida, 175 mL de ácido nítrico e ajusta volume para 500 mL.

A solução esta completa ao misturar a solução I e II.

3.3 Ensaio de formação de Biofilme

O presente ensaio baseia-se na capacidade que os microrganismos possuem em se aderir as superfícies seja ela abiótica ou biótica, tal característica é atribuída as substâncias poliméricas extracelulares denominada de biofilme. Para quantificação da formação de biofilme, avaliou-se a capacidade das células de aderir às paredes de tubos Eppendorfs (polipropileno) usando um protocolo modificado previamente relatado (OÖTOOLE & KOLTER, 1998). A cultura dos isolados bacterianos foram obtidas *overnight*, a uma concentração verificada e ajustada para 10^9 UFC.mL⁻¹ com o auxílio de espectrofotometria (OD 595) e inoculadas (diluição de 1/20) em 1 mL de meio caldo nutriente, em tubos Eppendorf (polipropileno), em quintuplicata. Após 24 horas de incubação a 30° C, foram lavados com água deionizada, seguindo-se a adição de 1mL de solução de cristal violeta a 1% a cada tubo. Estes foram incubados por 45 minutos à temperatura ambiente e lavados gentilmente (3 vezes). O corante aderido ao biofilme foi solubilizado com a adição de 1mL de etanol absoluto em cada tubo. Após este passo foi realizada a leitura da absorbância a 600.

3.4 Teste de para identificação de microrganismos halotolerantes

Para testar a halotolerância, o pré-inóculo foi adquirido sob as mesmas condições anterior e em seguida, submetidos a concentrações de 0, 10, 15 e 20% de NaCl, em meio caldo nutritivo líquido, onde permaneceram sob agitação de 150 rpm por 5 dias para avaliação qualitativa.

3.5 Caracterização do perfil metabólico de isolados bacterianos através da metodologia BIOLOG

A análise do perfil metabólico foi obtido utilizando placas BIOLOG Ì EcoPlates (BIOLOG Inc., Hayward CA., EUA) e *BIOLOG GEN III MicroPlate™*, para a caracterização do perfil metabólico das linhagens UAGAT 33 e UAGAT 71.

As placas de BIOLOG Ì EcoPlates, consistem em 96 poços, com 31 diferentes fontes de carbono e um branco, em triplicata. São apropriadas para estudos de ecologia microbiana, pois contém fontes de carbono normalmente encontradas no solo. Já as placas *BIOLOG GEN III MicroPlate™* possuem 96 poços, no entanto consiste de 94 testes para identificação fenotípica, 71 fontes de carbono e 23 ensaios de sensibilidade química. Essa placa fornece uma óimpressão digital fenotípicaô do microrganismo, que pode ser utilizado até mesmo para identificação em nível de espécie.

O pré-inóculo foi obtido em meio TSB 10%, cultivado por 48 horas a 28 °C e sob agitação de 150 rpm. Após este período, 25 mL da cultura pré-inoculo foi centrifugada a 15 °C por 20 minutos a 10.000g. As células precipitadas foram suspensas em TSB 10% fresco, dando origem a uma suspensão celular com absorbância a OD₍₅₆₀₎ de 0,1, a qual foi cultivada por 5 horas sob condições anteriores.

Após a incubação, 25 mL da suspensão foram centrifugadas e lavadas duas vezes em tampão PBS (com incubação de 1 hora cada lavagem) em temperatura ambiente e rotação de 150 rpm. Após lavagem, as células foram utilizadas para formar uma suspensão celular com OD₍₅₆₀₎ igual a 0,2. Em seguida, 150 ⁻L da suspensão bacteriana foi transferida para cada poço das microplacas *BIOLOG® EcoPLATE* (Hayward, CA) e *BIOLOG GEN III MicroPlate™*, que posteriormente foram incubadas por 48 horas a 28 °C. Após incubação a leitura foi realizada no equipamento *VarianCary 50 Bio UV/Vis Spectrophotometer* (McKinley Scientific) em OD₍₅₅₀₎.

4. RESULTADOS

Foi possível observar que as duas linhagens de *Bacillus*, UAGAT 33 e UAGAT 71, possuem potencial capacidade de solubilização de diferentes fontes de fosfato, formação de biofilme e são halotolerantes conseguindo se desenvolver em concentrações de 0%, 10% e 15% de NaCl.

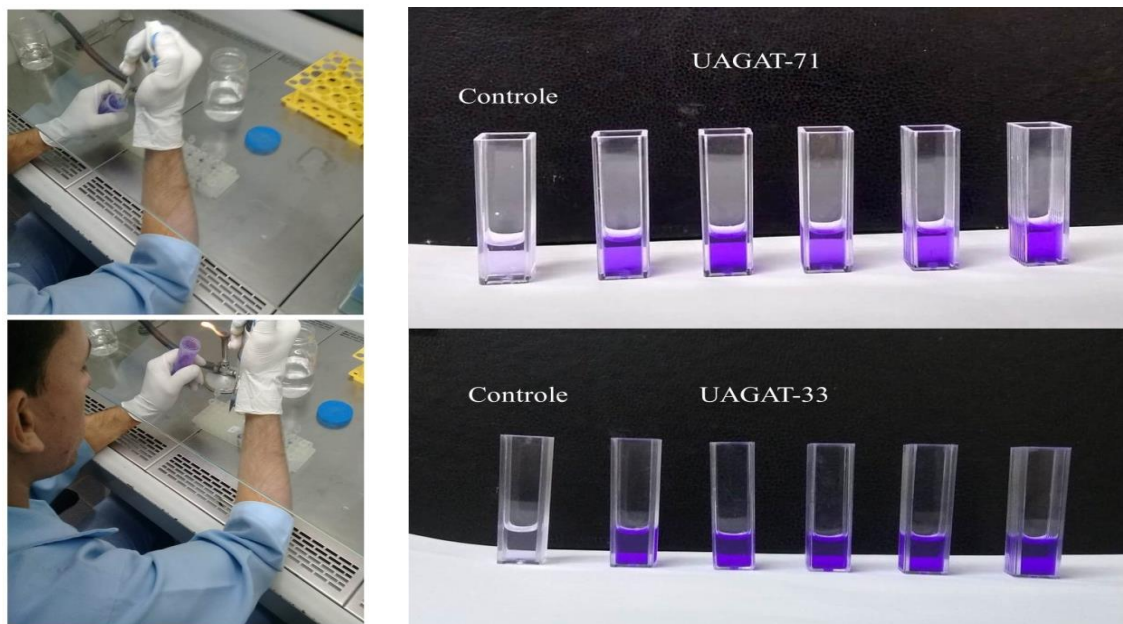


Figura 2: Ensaio de formação de biofilme.

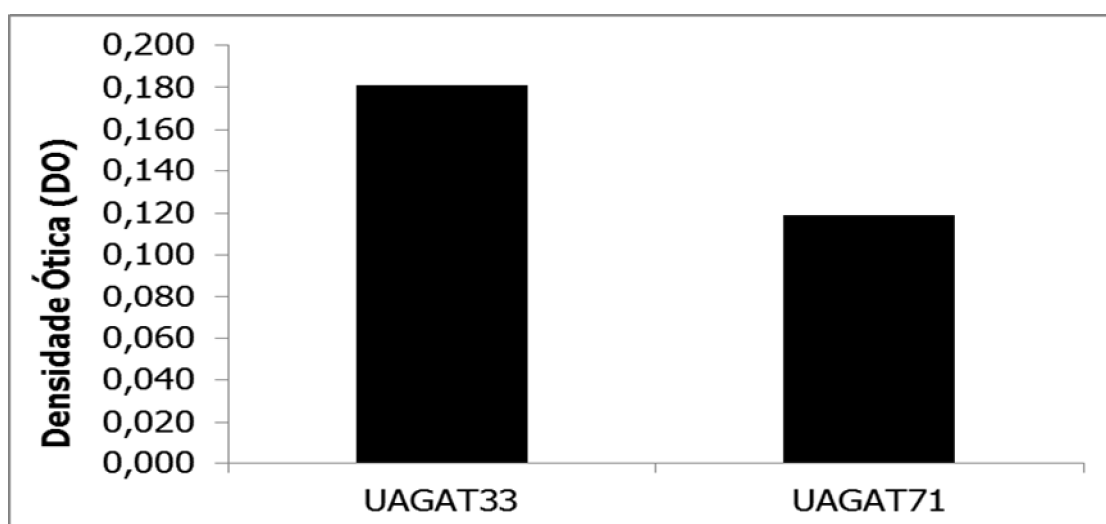


Figura 3: Densidade Ótica do biofilme aderido ao corante cristal violeta.

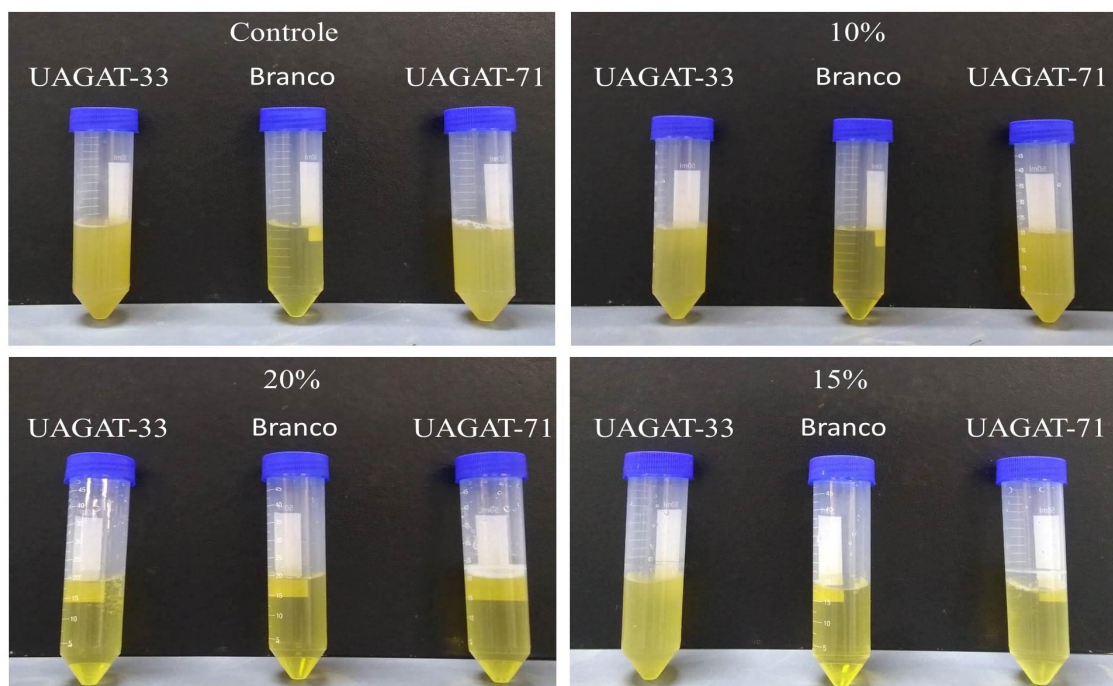


Figura 4: Teste para identificação de microrganismos halotolerantes.

Através das microplacas de BIOLOG, foi possível observar que mesmo as bactérias sendo do mesmo gênero bacteriano, provavelmente são de diferentes espécies, além disso, essas bactérias são de ambientes distintos a UAGAT71 foi isolada da rizosfera e a UAGAT33 é endofítica da Atriplex, essa diferença tanto de ambiente quanto possivelmente de espécie gera diferentes perfis metabólicos destas bactérias, consumindo de forma diferenciada as fontes presentes nas microplacas.

Na microplaca *BIOLOG® EcoPLATE* (Hayward, CA) que possui 31 fontes de carbono, estas foram consumidas de forma variável entre as bactérias avaliadas (UAGAT 33 e UAGAT 71). A bactéria UAGAT 33 se sobressaiu consumindo um maior número de fontes de carbono quando comparada a UAGAT 71, destacando por exemplo, o consumo de acetilglucosamida, ácido pirúvico, metilglucose e serina (Figura 5). Foi observado que a bactéria UAGAT 71 exibiu um maior consumo das fontes fenilalanina e asparagina, quando comparada com a bactéria UAGAT 33. Ressalta-se que estes (fenilalanina e asparagina) são importantes aminoácidos essenciais ao metabolismo microbiano e que o maior consumo por parte da bactéria UAGAT 71

poderia estar relacionado a uma compensação no menor consumo de outros aminoácidos essenciais (MADIGAN, 2016).

A microplaca *BIOLOG GEN III MicroPlate™* permite uma avaliação minuciosa a identificação fenotípica destes isolados, que se mostraram novamente distintos quanto ao consumo das fontes de carbono e sensibilidade química (Figura 6). No entanto foi possível observar que os isolados se comportaram de forma diferenciada no consumo de fontes que estão presentes na *BIOLOG® EcoPLATE* e na *BIOLOG GEN III MicroPlate™*. Mesmo não havendo grandes diferenças quanto ao consumo das fontes, observa-se que algumas fontes são exclusivamente mais consumidas ora pela bactéria UAGAT 33 ora pela bactéria UAGAT 71. Assim, evidenciam-se diferenças nos perfis fisiológicos das espécies estudadas, podendo estas promover diferentes efeitos quando submetidas a interações ecológicas com outros microrganismos ou vegetais.

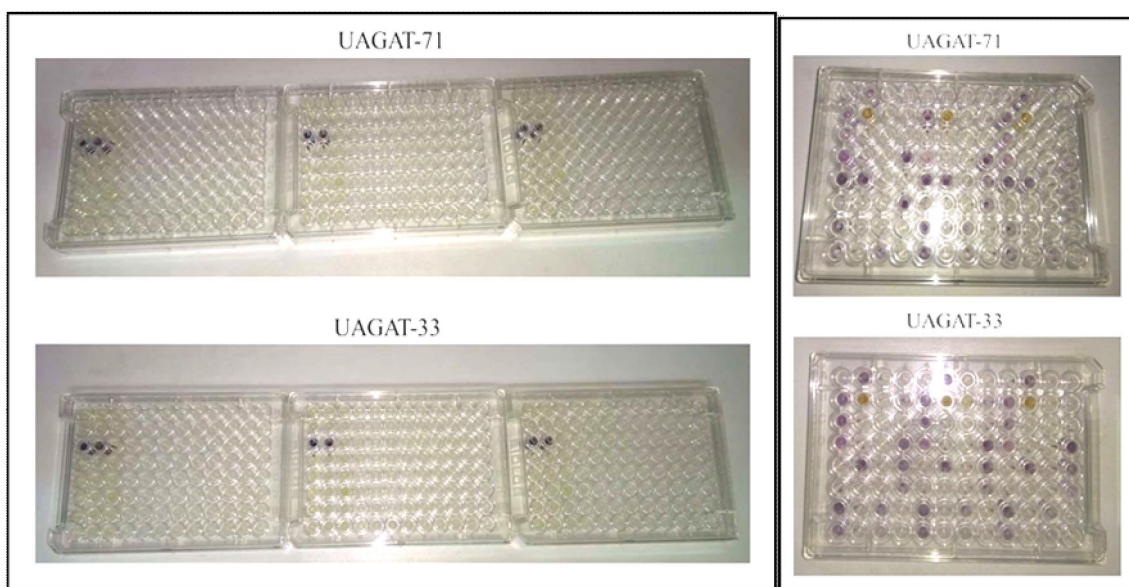


Figura 5: Placas de BIOLOG. A - *BIOLOG GEN III MicroPlate™*. B - *BIOLOG® EcoPLATE*
Fonte: Arquivo pessoal (2018).

5. CONCLUSÃO

As linhagens bacterianas, provenientes da Atriplex, apresentaram distintas frequências quanto a solubilização de fosfato, capacidade de formação de biofilme e tolerância a NaCl, mostrando potencial de serem exploradas. Os resultados visuais sobre solubilização de fosfato permitem inferir que as linhagens apresentam características de promoção de crescimento.

Tais bactérias apresentaram diferentes perfis metabólicos, potencial para serem ainda mais exploradas, possivelmente promovendo o crescimento vegetal de forma rentável e com mínimos de impactos ambientais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. As práticas favorecidas ao discente, durante o estágio, possibilitaram o conhecimento de áreas de pesquisas durante o período de graduação, motivando-o a seguir na área profissional voltada à pesquisa;

2. Proporcionou um enriquecimento pessoal e profissional de uma maneira inestimável, quanto ao desenvolvimento de experimentos e descobertas na área de microbiologia.

7. REFERÊNCIAS

ANTUNES, C. H. et al. Avaliação da Comunidade Microbiana do Solo em um Sistema de Plantio Direto sob Diferentes Condições de Calagem e Aplicação de Nitrogênio. 2018.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Stimulation de la croissance du maïs et de la culture romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* V. 39, p. 941 à 947, 1993.

COTTA, S. R. O solo como ambiente para a vida microbiana. 2016. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. Microbiologia do solo. 2 ed. Piracicaba, SP: ESALQ, 2016. 221 p.

LIMA, J. V. L., PINHEIRO, M. S., FIÚZA, L. M. C. G., MARTINS, S. C. S., MARTINS, C. M. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. *Enciclopédia Biosfera*, v.10, p. 2300-2316, 2014.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock-14ª Edição. Artmed Editora, 2016.

OTOOLE, G. A., & KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.

PAVINATO, P.S.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; SARTOR, L.R.; WITHERS, P.J.A. Effects of cover crops and phosphorus sources on maize yield, phosphorus uptake, and phosphorus use efficiency. *Agronomy Journal*, v. 109, p. 1039-1047, 2017.

PIKOVSKAYA, R. I. 1948. Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection With the Vital Activity of Some Microbial Species, *Mikrobiologiya* 17: 362-370.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.

SILVA, F. G. et al. Bioprospecting and plant growth-promoting bacteria tolerant to salinity associated with *Atriplex nummularia* L. in saline soils. *African Journal of Microbiology Research*, v. 10, n. 31, p. 1203-1214, 2016.

SILVA, K.; CASSETARI, A. S.; LIMA, A. S.; BRANDT, E.; PINNOCK, E.; VANDAMMEC, P.; MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic Burkholderia species isolated from the Amazon region exhibit phenotypic, functional and genetic diversity. *Systematic and Applied Microbiology*, v.35, p.253-262, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan. Porto Alegre. p. 454-460. 2013.

ZHANG, B., DENG, H., WANG, H.L., YIN, R., HALLETT, P.D., GRIFFITHS, B.S., DANIELL, T.J. Does microbial habitat or community structure drive the functional resilience of microbes to stress in severely degraded soils restored with different plant species? *Soil Biol. and Biochem.* v. 42, p. 850-859, 2010.