

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**Caracterização da comunidade bacteriana associada ao cultivo de
arroz (*Oryza sativa* L.) e estudo da interação bactéria-planta na
promoção do crescimento vegetal**

ROCHELI DE SOUZA

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre

Outubro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**Caracterização da comunidade bacteriana associada ao cultivo de
arroz (*Oryza sativa* L.) e estudo da interação bactéria-planta na
promoção do crescimento vegetal**

ROCHELI DE SOUZA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências (Genética e Biologia
Molecular).

Orientação: Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Porto Alegre

Outubro de 2013

Este trabalho foi realizado nas instalações do Núcleo de Microbiologia Agrícola do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e nas instalações e áreas experimentais do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA). O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo INCT da Fixação Biológica do Nitrogênio.

Àqueles que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, agradeço.

À minha família, dedico.

“As coisas que não vemos são muito mais poderosas do que as que vemos. O que está embaixo do solo gera o que está em cima dele. Como seres humanos, não estamos acima da natureza, somos parte dela. É inútil concentrarmos a atenção nos frutos que já estão maduros. Precisamos trabalhar a terra e reforçar as nossas raízes”.

AGRADECIMENTOS

À orientadora e professora Dr^a Luciane Passaglia pela confiança depositada, pelo apoio dedicado a meu crescimento profissional e valiosos ensinamentos durante essa trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, em especial ao Elmo, pela eficiência e profissionalismo.

Aos profissionais do Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA/RS) e Fundação Estadual de Pesquisa em Agropecuária (FEPAGRO/RS) pela colaboração em diversas etapas desse projeto, em especial ao Engenheiro Agrônomo Rodrigo Schoenfeld.

À Bioagro pela parceria no desenvolvimento de um produto inoculante, em especial à Francini Requia Parzianello pelo apoio e dedicação.

À UFRGS, aos seus professores e funcionários pela oportunidade de realizar o curso.

Aos órgãos financiadores CNPq, FAPERGS e INCT da Fixação Biológica do Nitrogênio pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, em especial aos amigos do Núcleo de Microbiologia Agrícola, pelas discussões, pela ajuda nos mais variados assuntos e pelo privilégio de poder conviver e aprender com vocês.

À minha família que, com todo apoio e compreensão nos momentos difíceis, tornou possível essa caminhada. Em especial à minha mãe.

Ao Diógenes pelo companheirismo, incentivo, paciência e amizade.

Aos meus amigos pela amizade incondicional.

Às demais pessoas e Instituições que, de uma forma ou outra, contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO.....	12
1. Importância econômica do arroz	12
1.1. Arroz irrigado e toxidez por ferro.....	13
2. Rizosfera e bactérias promotoras do crescimento de plantas	15
3. Mecanismos de promoção do crescimento vegetal	16
3.1. Fixação biológica do nitrogênio	16
3.2. Produção de sideróforo e disponibilidade de ferro	20
3.3. Solubilização de fosfato.....	23
3.4. Produção de auxina.....	25
3.5. Atividade ACC deaminase e etileno.....	28
OBJETIVOS	32
1. Objetivo geral	32
2. Objetivos específicos	32
CAPÍTULO 1	33
The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) cropped in southern Brazilian fields.....	33
CAPÍTULO 2	56
Relatório descritivo de patente de invenção: Composição de biofertilizante para a promoção de crescimento e aumento de produtividade de gramíneas	56
CAPÍTULO 3	75
Diversity and evaluation of plant growth promoting activities of bacterial communities associated with rice cropped in iron stressed soils.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato

AIA: ácido indol-3-acético

ARA: do inglês *acetylene reduction assay*, ensaio da redução de acetileno

ATP: do inglês *adenosine triphosphate*, trifosfato de adenosina

BLAST: do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

CAS: cromo azurol S, ferro III e CTAB

Da: Daltons

DNA: do inglês *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

dNTP: do inglês *deoxyribonucleotide*, desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FBN: fixação biológica do nitrogênio

H' : índice de diversidade de Shannon e Weaver

IAM: ácido indol-3-acetamida

AIB: ácido indole-3-butírico

IpyA: ácido indol-3-piruvato

kb: kilobases

KB: meio de cultura King B

LB: meio de cultura Luria Bertani

L: litro

ng: nanograma

Nif: do inglês *nitrogen fixation*, proteínas relacionadas à fixação biológica de nitrogênio

pb: pares de base

PCA: do inglês *Principal Component Analysis*, análise dos componentes principais

PCR: do inglês *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase

PGP: do inglês *Plant Growth Promoting*, promotor de crescimento vegetal

PGPB: do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*, bactérias promotoras de crescimento vegetal

pH: potencial de hidrogênio

rDNA: do inglês *ribosomal deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico ribossomal

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RNA: do inglês *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico

rRNA: do inglês *ribosomal ribonucleic acid*, ácido ribonucleico ribossomal

rpm: rotação por minuto

TAM: triptamina

TBE: Tris-borato EDTA

TSO: oxidase da cadeia lateral do triptofano

v/v: volume por volume

µg: micrograma

µl: microlitro

µM: micromolar

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo. O Brasil está entre os principais produtores mundiais de arroz e o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro. O nitrogênio é considerado um nutriente limitante para a produção de arroz, o que provoca o intenso uso de fertilizantes químicos nessa cultura, uma prática altamente prejudicial ao meio ambiente. Neste contexto, têm-se procurado novas tecnologias que visam o aumento de produtividade, a melhoria da qualidade e a rentabilidade no cultivo dessa gramínea. Uma das alternativas para o aumento da produção é a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal. Bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant growth-promoting bacteria*, PGPB) são bactérias que podem promover o crescimento de plantas e induzir a tolerância para diferentes estresses, através de uma grande variedade de mecanismos. Os objetivos deste estudo foram isolar e caracterizar putativas PGPBs associadas ao solo rizosférico e raízes de arroz, cultivado em diferentes regiões produtoras do sul do Brasil, bem como de cultivares de arroz que apresentam diferentes níveis de tolerância ao excesso de ferro, cultivadas em duas regiões: Camaquã (solo com excesso de ferro) e Cachoeirinha (controle para o excesso de ferro). Os isolados bacterianos foram avaliados para a produção de compostos indólicos, sideróforos, ACC deaminase e solubilização de fosfato. A fixação biológica do nitrogênio *in vitro* foi avaliada para os isolados bacterianos usados em experimentos de inoculação em câmara de crescimento e a campo em Cachoeira do Sul e/ou Camaquã. Seiscentos e sessenta e cinco estirpes bacterianas foram seletivamente isoladas com base no seu desenvolvimento em meio seletivo e foram identificadas por análise parcial do gene 16S rRNA e metodologia de sequenciamento. Estirpes pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Burkholderia* foram as mais abundantes entre os isolados Gram negativos, enquanto que aquelas pertencentes aos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* foram as mais abundantes entre os isolados Gram positivos. Um grande número de PGPBs de diferentes gêneros bacterianos apresentou diferentes características promotoras de crescimento vegetal. Produtores de compostos indólicos foram os mais abundantes entre os isolados. Plantas de arroz inoculadas com os isolados *Herbaspirillum* sp. (AC32), *Burkholderia* sp. (AG15), *Pseudacidovorax* sp. (CA21) e *Azospirillum* sp. (UR51) em conjunto com a metade da dose de fertilizante nitrogenado (60 kg de ureia ha⁻¹) atingiram resultados semelhantes àsquelas tratadas com a dose total de fertilizante, sem inoculação (120 kg de ureia ha⁻¹). Estirpes pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, e *Paenibacillus* apresentaram potencial para promover o crescimento da planta e a captação de nutrientes, em diferentes condições de ferro. Neste trabalho, a inoculação de arroz através da utilização de estirpes bacterianas confirmou o potencial dessas bactérias em interagir positivamente com o arroz.

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important crops for human nutrition been the food base for more than three billion of people in the world. Brazil is one of the top rice producers and Rio Grande do Sul state is the biggest producer in Brazil. Nitrogen is the most frequent limiting nutrient for rice production and the chemical fertilization usage is among agricultural practices that are most prejudicial to environment. New technologies are being search to increase productivity, to improve quality and profitability in the cultivation of this grass. One of the alternatives for the increase in rice production is the use of plant-growth-promoting bacteria. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are bacteria that can enhance plant growth and induce tolerance in plants under different stresses using a wide variety of mechanisms. The objectives of this study were to isolate and characterize putative PGPBs associated with rhizospheric soil and roots of rice plants cropped in different areas of southern Brazil, as well of rice cultivars that present distinct tolerance to iron toxicity grown in two areas: one with a well-established history of iron toxicity (Camaquã) and another without iron toxicity (Cachoeirinha). Bacterial isolates were evaluated for their ability to produce indolic compounds, siderophores, ACC deaminase, and solubilize phosphate. *In vitro* biological nitrogen fixation was evaluated for bacterial isolates used in the inoculation experiments in a growth chamber and under field conditions in Cachoeira do Sul and/or Camaquã. A total of 665 bacterial strains were selectively isolated based on their growth in selective media and were identified by analysis of the 16S rRNA gene and partial sequencing methodologies. Strains belonging to the *Burkholderia* and *Enterobacter* genera were the most abundant among all the Gram negative isolates whereas those belonging to *Paenibacillus* and *Bacillus* genera were the most abundant among the Gram positive isolates. A large number of PGPBs belonging to different bacterial genera presented several plant growth promotion traits. Indolic compounds producers were widely found among isolates. Plants inoculated with isolates *Herbaspirillum* sp. (AC32), *Burkholderia* sp. (AG15), *Pseudacidovorax* sp. (CA21), and *Azospirillum* sp. (UR51) together with half-fertilization level (60 kg of urea ha⁻¹) achieved growth similar to those that received the full-fertilization level without inoculation (120 kg of urea ha⁻¹). Strains belonging to *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, and *Paenibacillus* genera presented the potential to promote the plant growth and nutrient uptake in different iron conditions. In this work, the rice inoculation through the utilization of bacterial strains confirmed the bacterial potential to positively interact with rice.

INTRODUÇÃO

1. Importância econômica do arroz

O arroz é o principal componente da dieta básica da população mundial. Segundo a FAO, o arroz é o responsável por 20% da fonte da energia alimentar humana, enquanto o trigo fornece 19% e o milho 5%. Somente nos países asiáticos, mais de dois bilhões de habitantes têm o arroz e seus derivados como fontes de 60 a 70% das calorias ingeridas diariamente. Este cereal é, portanto, um alimento de extrema importância para a segurança alimentar da população mundial. Em função disso, aspectos relacionados à sua produção e consumo devem ser continuamente monitorados e avaliados, para que o seu suprimento seja garantido (FAO, 2009).

A produção de 662 milhões de toneladas de grãos em casca corresponde a cerca de 30% do total de grãos usados na alimentação humana (SOSBAI, 2010). O Brasil é o nono maior país produtor de arroz do mundo, cuja produção foi de 11,74 milhões de toneladas na safra 2012/2013 (IRGA, 2013). Entre 1975 e 2004 o país alcançou um salto de produtividade de 144,1% (FAO, 2009). Esse aumento da produtividade permitiu atender o aumento da demanda interna, em função do crescimento populacional brasileiro. O Estado do Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional de arroz, contribuindo com mais de 60% da produção nacional, sendo a fronteira oeste do RS a responsável por grande parte desta produção (IRGA, 2013). Cerca de 12% do arroz produzido no RS é consumido no próprio estado, sendo o restante exportado para os demais centros consumidores (SOSBAI, 2010). É importante ressaltar que entre os 20 maiores municípios produtores de arroz do Brasil, 19 são gaúchos. Os maiores municípios produtores do RS (Uruguaiana, Santa Vitória do Palmar, Itaqui, Alegrete e São Borja), concentraram 30% da produção gaúcha na safra 2011/2012 (IBGE, 2012).

A produção de arroz e, conseqüentemente, a segurança alimentar mundial, dependem da capacidade em atingir níveis ainda mais elevados de produtividade que não são possíveis sem o aporte adicional de nutrientes (Shenoy et al., 2001). A demanda de fertilizantes nitrogenados na agricultura mundial está diretamente relacionada com o crescimento da população mundial. Fertilizantes são caros e podem causar danos ao meio ambiente, tais como a contaminação da água com nitratos, a acidificação dos solos e as emissões de gases de efeito estufa, como o metano e o óxido nitroso (Shenoy et al., 2001).

Em razão da limitada disponibilidade de terras para a expansão da cultura do arroz, diversos trabalhos de pesquisa estão sendo desenvolvidos. A possibilidade de aumento da produção nacional depende da redução dos custos dessa produção e do desenvolvimento de novas tecnologias. Nesse contexto, a utilização de micro-organismos benéficos apresenta-se como uma alternativa natural evidenciada no aumento da produtividade das culturas, na possibilidade de redução dos custos de produção ao reduzir o volume de adubos nitrogenados que são aplicados e na melhor conservação dos recursos ambientais.

1.1. Arroz irrigado e toxidez por ferro

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma espécie anual pertencente à família Poaceae e ao gênero *Oryza*, adaptada ao meio aquático. Esta adaptação se deve à formação do aerênquima no colmo e nas raízes da planta, tecido este que possibilita a passagem de oxigênio do ar para a camada da rizosfera, permitindo o cultivo em ambientes alagados (anaeróbios) (Taiz e Zeiger, 2009). O gênero *Oryza* é de ampla utilização na alimentação humana na forma de grãos, apresentando como centros de origem o Japão, a Índia e a África (CONAB, 2009).

O cultivo de arroz requer temperaturas ótimas entre 20 e 35°C, dependendo da fase de desenvolvimento, não tolerando temperaturas muito baixas nem muito altas (Gomes et al., 2004). A descrição de eventos e marcadores morfológicos, relativos às fases e estádios de desenvolvimento da planta de arroz, segue uma escala fenológica, sendo a mais utilizada a desenvolvida por Counce et al. (2000). Os estádios compreendidos pela fase de desenvolvimento da plântula são identificados como S (do inglês *seedling*). Estádios de desenvolvimento vegetativo são identificados pela letra V (do inglês *vegetative*) e por um número que varia de 1 a n, de acordo com o número de folhas desenvolvidas no colmo principal da planta. A partir do início do desenvolvimento da panícula, a escala utiliza a letra R (do inglês *reproductive*). Esta fase está associada ao início da diferenciação da panícula até a maturação dos grãos (Counce et al., 2000). O cultivo de arroz pode ser limitado por uma série de fatores. Entre eles destacam-se os fatores bióticos, como doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides, e por fatores e/ou estresses ambientais, como a toxidez por ferro, os quais formam um complexo que, muitas vezes, impossibilita a produção agrícola em determinadas áreas orizícolas.

O ferro é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento de plantas, participando de importantes processos biológicos, como fotossíntese, respiração, síntese de clorofila (Kobayashi e Nishizawa, 2012) e fixação biológica do nitrogênio (Dixon e Kahn, 2004). É um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, presente em todos os solos em quantidades que variam de 0,7 a 55% (Lyndsay, 1979). Em solos aerados e com pH neutro a solubilidade do ferro é muito baixa (10^{-18} M) devido à rápida oxidação de Fe^{2+} (forma ferrosa) para Fe^{3+} (forma férrica) e a subsequente formação de hidróxidos e óxidos insolúveis (Andrews et al., 2003; Lemanceau et al., 2009). Entretanto, o alagamento do solo promove a solubilização do Fe^{3+} , podendo o acúmulo de Fe^{2+} na solução do solo atingir níveis tóxicos ao arroz (Gomes et al., 2004).

A toxidez por ferro é reconhecida como a principal desordem nutricional do arroz cultivado em várzea (Dobermann e Fairhurst, 2000), podendo gerar dano oxidativo em plantas (Stein et al., 2009). Em ambientes alagados, após a depleção do oxigênio, outros íons são utilizados como aceptores de elétrons (NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} e SO_4^{2-}) por micro-organismos anaeróbicos facultativos, sendo subsequentemente reduzidos (Ponnamperuma, 1972). A concentração de ferro solúvel, que anterior à subemergência do solo raramente excede $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, pode chegar, em solos ácidos, a aproximadamente 600 mg L^{-1} , dependendo das características de cada solo (Becker e Asch, 2005).

Existem dois tipos de toxidez por ferro, a direta e a indireta. A toxidez direta é caracterizada pelo acúmulo de grandes níveis de ferro em tecidos vegetais (acima de $300 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de matéria seca) (Fageria et al., 2003). Essa toxidez é manifestada visualmente através do bronzeamento das folhas, caracterizado como manchas marrons, que se propagam a partir das pontas para a base das folhas, desenvolvendo-se mais rapidamente nas folhas mais velhas (Tanaka et al., 1966). A toxidez indireta ocorre quando a planta, durante a respiração, elimina oxigênio através das raízes e há a reoxidação do Fe^{+2} (mais solúvel) em Fe^{+3} (pouco solúvel) (Yamauchi e Peng, 1995; Knoblauch e Reis, 2004). De acordo com Mehraban et al. (2008) esse ferro (Fe^{+3}) que precipita sobre as raízes bloqueia a absorção de outros elementos, como cálcio, magnésio, fósforo, potássio, nitrogênio e zinco. Os sintomas causados pela toxidez indireta são o atrofiamento da planta, a redução do perfilhamento e o alaranjamento das folhas e raízes.

Uma das alternativas que tem sido propostas para se contornar o problema de toxidez por ferro é o melhoramento genético, buscando genótipos de arroz que sejam tolerantes ao excesso de ferro. De acordo com Becker e Asch (2005), plantas de arroz desenvolveram mecanismos de tolerância para lidar com as diferentes condições do solo e sobreviver em solos com excesso de ferro. Entre tais mecanismos pode-se citar: a oxidação de ferro na superfície das raízes, a seletividade da membrana celular através da deposição de Fe^{3+} no apoplasto das células parenquimáticas das raízes, o remodelamento e a lignificação das paredes celulares, o acúmulo em tecidos da raiz e do caule através da formação de ferritinas e a compartimentalização em organelas, como vacúolos.

2. Rizosfera e bactérias promotoras do crescimento de plantas

A rizosfera pode ser definida como a região do solo onde os processos mediados por micro-organismos são influenciados especificamente pelo sistema radicular. Este espaço inclui o solo ligado às raízes vegetais e, frequentemente, se estende uns poucos milímetros da superfície da raiz. Os exsudatos de plantas na rizosfera, tais como aminoácidos e açúcares, provêm uma rica fonte de energia e nutrientes para as bactérias, resultando em uma maior população bacteriana nesta área do que fora da mesma (Gray e Smith, 2005). Estima-se que um grama de solo cultivado contenha 2×10^9 células procarióticas (Paul e Clark, 1989). De fato, a concentração de bactérias (por grama de solo) que é encontrada na rizosfera é geralmente muito maior do que a densidade bacteriana, ou concentração, que é encontrada em outras porções do solo (Glick, 1995). Além disso, a rizosfera é um importante ambiente para as interações planta e micro-organismo, sendo que a ocorrência de interações entre bactérias e raízes de plantas pode ser benéfica, nociva ou neutra para as plantas (Lynch, 1990).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (ou PGPB - *Plant Growth Promoting Bacteria*) pertencem a um grupo benéfico e heterogêneo de micro-organismos que podem ser encontrados na rizosfera, superfície das raízes ou em associação com as mesmas (Lynch, 1990). De acordo com o tipo de relação com as plantas, as PGPBs podem ser classificadas em bactérias simbióticas, associativas ou de vida livre (Shenoy et al., 2001; Khan, 2005). Gray e Smith (2005) também adotaram duas divisões de PGPBs, de acordo com o local onde habitam: PGPBs intracelulares – iPGPB (residem dentro das células vegetais ou encontram-se em estruturas

especializadas, os nódulos) e PGPBs extracelulares – ePGPB (podem estar associadas às raízes ou simplesmente viver próximas a elas).

Independentemente da localização das PGPBs, essas bactérias podem promover o crescimento das plantas através de vários mecanismos. PGPBs podem fazer o biocontrole de fungos patogênicos através da produção de antibióticos, competição por nutrientes, ou pela indução de resistência sistêmica (Glick, 1995; Glick et al., 1999). Tais bactérias podem melhorar o estado nutricional das plantas através da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos e produção de sideróforos (Dobbelaere et al., 2003; Vessey, 2003). Além disso, os efeitos hormonais ocorrem quando as PGPBs produzem compostos químicos, tais como auxinas, citocininas, giberelinas, que impactam diretamente no crescimento das plantas, estimulando a captação de nutrientes (Vessey 2003; Jha e Saraf, 2012). Dessa forma, muitas bactérias são capazes de utilizar diferentes habilidades para promover o crescimento da planta em vários estágios durante o seu ciclo de vida. As maneiras pelas quais as PGPBs podem influenciar o crescimento vegetal diferem de espécie para espécie, bem como de linhagem para linhagem. Assim, as PGPBs geralmente não têm um único mecanismo para a promoção do crescimento das plantas (Glick et al., 1999).

3. Mecanismos de promoção do crescimento vegetal

3.1. Fixação biológica do nitrogênio

Todos os organismos vivos requerem nitrogênio para sintetizar biomoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos. No entanto, a maior fonte de nitrogênio na natureza, o nitrogênio atmosférico, não é assimilável por grande parte dos seres vivos (Chubatsu et al., 2012). O processo biológico responsável pela redução do nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3) é denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Frache et al., 2009). Ele é realizado por micro-organismos denominados de diazotróficos, os quais são PGPBs extensivamente estudadas devido à importância do nitrogênio.

O nitrogênio é considerado um nutriente indispensável ao desenvolvimento vegetal e frequentemente limitante para a produção agrícola. De acordo com estatísticas da FAO (2001), cerca de 42 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados estão sendo aplicadas anualmente em escala global para a produção das três culturas de cereais mais importantes: trigo, arroz e milho. O aumento do uso de fertilizantes químicos, que constitui a maior interferência humana no ciclo do nitrogênio, levanta

preocupações sobre o acréscimo nas emissões de óxidos de nitrogênio, acidificação do solo e eutrofização da água (Dixon e Kahn, 2004). Anualmente $2,5 \times 10^{11}$ kg de NH_3 são fixados via FBN, enquanto que 8×10^{10} kg de NH_3 são produzidos por indústrias de fertilizantes nitrogenados (Cheng, 2008). O nitrogênio fixado fornecido pela FBN é menos propenso à lixiviação, volatilização e desnitrificação, uma vez que é utilizado *in situ* e, portanto, é um processo biológico importante que contribui para uma agricultura sustentável (Dixon e Kahn, 2004).

A FBN não é realizada por eucariotos. Entretanto, esse processo é amplamente realizado por bactérias e arqueas, mostrando grande biodiversidade entre os organismos diazotróficos, que são encontrados em uma ampla variedade de habitats (Dixon e Kahn, 2004). Diazotróficos associativos referem-se a uma grande variedade de espécies que fixam o nitrogênio e que colonizam a superfície ou o espaço intercelular (endófitos) das raízes das plantas, sem a formação de estruturas diferenciadas (Shenoy et al., 2001; Franche et al., 2009). As vantagens de uma associação endofítica, em plantas não leguminosas, é que esta associação protege as bactérias da competição, oferece troca metabólica mais íntima com a planta hospedeira, confere proteção contra altas concentrações de oxigênio, além do transporte de nitrogênio fixado para a planta hospedeira (Quispel, 1991). Bactérias que fixam nitrogênio independente de outros organismos são chamadas de diazotróficos de vida livre, contribuindo com pouco nitrogênio fixado para as culturas agrícolas, utilizando-o para seu próprio crescimento (Shenoy et al., 2001; Saikia e Jain, 2007). Por outro lado, a relação simbiótica entre rizóbios e leguminosas pode fornecer grandes quantidades de nitrogênio à planta e pode ter um impacto significativo na agricultura (Saikia e Jain, 2007).

Nos mais variados habitats, todos os micro-organismos diazotróficos são capazes de transformar o nitrogênio gasoso à amônia através do complexo enzimático da nitrogenase, uma enzima altamente conservada entre diazotróficos simbióticos e de vida livre (Franche et al., 2009). Em todos os organismos diazotróficos existe sempre pelo menos uma forma de nitrogenase, a nitrogenase molibdênio-ferro (Mo-nitrogenase), ou nitrogenase dependente do molibdênio, ou ainda nitrogenase 1. Porém, sob condições de depleção de molibdênio, duas outras formas foram inicialmente identificadas em *Azotobacter*: nitrogenase 2 ou dependente de vanádio (Va-nitrogenase) e nitrogenase 3 ou dependente de ferro (Fe-nitrogenase) (Bishop e Premakumar, 1992; Dixon e Kahn, 2004; Cheng, 2008). Todas as formas da nitrogenase são extremamente sensíveis ao oxigênio (Dixon e Kahn, 2004; Shridhar, 2012).

A enzima nitrogenase (Mo-nitrogenase) tem sido purificada a partir de diferentes bactérias, sendo composta de duas metaloproteínas (Franche et al., 2009). O componente I ou dinitrogenase (FeMo-proteína), que contém o sítio catalítico da enzima, é um tetrâmero formado por duas subunidades não idênticas. O componente II ou dinitrogenase redutase (Fe-proteína), é um dímero que transfere os elétrons para a dinitrogenase. Estas proteínas, juntamente com ATP, Mg^{+2} e uma fonte de elétrons são essenciais para a atividade de fixação de nitrogênio (Moat e Foster, 1995; Franche et al., 2009).

A sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio impõe restrições fisiológicas consideráveis à diazotrofia, pois existe uma obrigação de proteger a enzima dos danos por oxigênio. Na maioria dos diazotrofos, uma rede diversa de estratégias fisiológicas é utilizada para prover proteção contra oxigênio, incluindo evitar oxigênio através de crescimento anaeróbico, consumo do oxigênio pela respiração, barreiras contra difusão de oxigênio, ou a compartimentalização da enzima espacial ou temporalmente. O nódulo das raízes de leguminosas é um exemplo de tal estratégia, em que o córtex do nódulo é uma barreira contra a difusão de oxigênio (Dixon e Kahn, 2004). A fixação de nitrogênio é energeticamente muito dispendiosa e também é inibida pela presença de nitrogênio fixado, principalmente amônia.

A bactéria de vida livre *Klebsiella oxytoca* linhagem M5a1 (primeiramente identificada como *K. pneumoniae*) foi o primeiro diazotrófico a ter os genes envolvidos na FBN identificados e caracterizados. Nela, os genes de fixação biológica do nitrogênio (*nif*, do inglês, nitrogen fixation) para a síntese da nitrogenase funcional encontram-se agrupados em uma região cromossômica abrangendo 24 kb (Arnold et al., 1988; Franche et al., 2009) onde estão dispostos 20 genes organizados em 8 operons: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*, sendo a FeMo-proteína codificada pelos genes *nifD* e *nifK* e a Fe-proteína codificada pelo gene *nifH* (Franche et al., 2009). O gene da Fe-proteína, *nifH*, é um dos genes funcionais mais antigos da história da evolução e tem possibilitado o estudo da diversidade dos genes de fixação de nitrogênio em bactérias de interesse, bem como a caracterização de tais genes em comunidades microbianas do solo (Rosado et al., 1998).

Em leguminosas, as bactérias do solo da família Rhizobiaceae (rizóbio) estão confinadas dentro de um órgão simbiótico, o nódulo da raiz, onde são capazes de fixar nitrogênio, permitindo que o hospedeiro possa crescer sem a necessidade de fertilizantes nitrogenados (Hakoyama et al., 2009). Muitas espécies de rizóbios foram descritas por

apresentar uma relação simbiótica com plantas leguminosas, tais como *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, e muitas são utilizadas agronomicamente no cultivo de culturas de interesse econômico. A produção de soja no Brasil é um exemplo da eficiência da FBN, pois, desde que foram realizados programas para o incremento da fixação de N₂, que resultaram no desenvolvimento de inoculantes com linhagens de *Bradyrhizobium*, poucas aplicações de fertilizantes nitrogenados foram realizadas (Alves et al., 2004).

O isolamento de bactérias diazotróficas de raízes de gramíneas forrageiras e cereais tem sido amplamente realizado, conduzindo à identificação de dois grupos no que diz respeito ao grau de associação com o hospedeiro vegetal: colonizadores diazotróficos rizosféricos e endofíticos (Franche et al., 2009). Bactérias diazotróficas em associação com plantas não leguminosas e que contribuem para o crescimento vegetal são também referidas como PGPBs. Entre estas se destacam os gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, entre outros. Gyaneshwar et al. (2011) sugerem que espécies de *Burkholderia* fixadoras de nitrogênio devam ser classificadas em um novo gênero, separando-as de espécies patogênicas que se associam aos humanos.

Herbaspirillum é uma bactéria diazotrófica endofítica isolada da rizosfera e raízes de várias plantas incluindo arroz, milho, sorgo, trigo e cana de açúcar (Saikia e Jain, 2007), podendo colonizar os espaços intercelulares de raízes, caules e folhas sem causar sintomas de doença (Elbeltagy et al., 2001; Chubatsu et al., 2012). Outra bactéria bastante estudada é *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria endofítica isolada de cana-de-açúcar e de grande importância para o crescimento desta cultura pelos benefícios derivados da FBN (Sevilla et al., 2001).

Espécies de *Azospirillum*, outro gênero de bactérias diazotróficas endofíticas facultativas, exibem uma distribuição ecológica ampla e estão associadas com uma ampla diversidade de plantas, tais como trigo, arroz, sorgo e milho e várias espécies não gramíneas (Döbereiner e Pedrosa, 1987). No entanto, análises quantitativas da FBN em casa de vegetação indicam que a contribuição de N fixado por *A. brasilense* não desempenha um papel fundamental na promoção do crescimento de plantas (Spaepen et al., 2008). Okon (1985) determinou a quantidade de nitrogênio fixado em arroz e trigo utilizando o isótopo ¹⁵N confirmando que a maior parte do nitrogênio fixado por *Azospirillum* permanece dentro da sua própria célula e no ambiente rizosférico.

3.2. Produção de sideróforo e disponibilidade de ferro

Embora o ferro seja o segundo metal (após o alumínio) e o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre, apenas uma pequena fração está disponível para ser utilizada pelos seres vivos. O ferro tem a capacidade de aceitar e doar elétrons prontamente, interconvertendo-se entre a forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}) (Benite et al., 2002) podendo apresentar problemas de toxicidade e baixa solubilidade (Andrews et al., 2003). É um micronutriente essencial para praticamente todos os organismos, participando de vários processos fisiológicos tais como fotossíntese, respiração, transporte e consumo de H_2 , transporte de oxigênio, regulação gênica, biossíntese de DNA, fixação biológica de nitrogênio, entre outros (Krewulak e Vogel, 2008).

O ferro, enquanto nutriente essencial e de modo geral, não está prontamente disponibilizado em ambientes terrestres ou em hospedeiros animais, apresentando-se exclusivamente em sua forma oxidada (Fe^{3+}) (Benite et al., 2002). Por exemplo, em solos aerados e com pH neutro - bem como em condições fisiológicas - a solubilidade do ferro é muito baixa (10^{-18} M) devido à rápida oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} e a subsequente formação de hidróxidos e óxidos insolúveis (Chipperfiel e Ratledge, 2000; Andrews et al., 2003; Lemanceau et al., 2009). Entretanto, muitos micro-organismos podem vencer esta limitação nutricional obtendo ferro através da utilização de quelantes, chamados sideróforos (Neilands, 1995; Andrews et al., 2003; Lemanceau et al., 2009). Em geral, as concentrações mínimas de ferro requeridas para muitas bactérias são de 10^{-5} a 10^{-7} M para alcançar um ótimo crescimento (Andrews et al., 2003).

A biodisponibilidade do ferro microbiano é amplamente controlada pela presença de sideróforos, que são capazes de solubilizar hidróxidos de ferro do ambiente e manter a concentração de ferro solúvel em uma concentração ótima para o crescimento microbiano (Boukhalfa e Crumbliss, 2002). Tal estrutura também pode ser encontrada em algumas espécies de plantas como, por exemplo, em arroz (Ishimaru et al., 2006). Além disso, alguns micro-organismos são capazes de captar sideróforos exógenos, não produzidos por eles próprios, desde que possuam proteínas de membrana específicas (Lemanceau et al., 2009).

Sideróforos (do grego: “transportador de ferro”) são definidos como quelantes orgânicos de baixo peso molecular (<1000 Da) com alta afinidade por Fe^{3+} , cuja função é seletivamente adquirir e mediar o transporte de ferro e a deposição no interior das células (Neilands, 1995; Benite et al., 2002; Krewulak e Vogel, 2008). Existem aproximadamente 500 compostos, com diferentes estruturas, identificados como

sideróforos (Boukhalfa e Crumbliss, 2002). Sideróforos podem ser classificados de acordo com o grupo funcional utilizado como ferro-ligante (Andrews et al., 2003). Exemplos de sideróforos mais conhecidos são a enterobactina (um catecolato) e ferricromo (um hidroxamato).

O complexo ferro-sideróforo excede o tamanho das porinas, que constituem canais aquosos que permitem a difusão de pequenas moléculas hidrofílicas através da membrana externa das bactérias Gram negativas, e, desse modo, requerem transportadores específicos de membrana externa para entrar no espaço periplásmico. A via de captação de ferro via sideróforo depende de um receptor na membrana externa, uma proteína ligante periplasmática e de um transportador na membrana interna, transportador ABC (Krewulak e Vogel, 2008). Uma vez internalizado, o complexo Fe^{3+} -sideróforo deve ser dissociado para liberar o ferro complexado para posterior utilização no metabolismo celular (Braun e Hantke, 2011). Este processo envolve a redução do ferro associado ao sideróforo, resultando em dissociação devido à afinidade relativamente baixa de sideróforos pela forma Fe^{2+} (Andrews et al., 2003), podendo, então, o sideróforo ser degradado ou exportado para posterior reutilização (Braun e Hantke, 2011).

Diversos trabalhos mostram que a excreção de sideróforos por bactérias da rizosfera pode estimular o crescimento de plantas, melhorando a nutrição das mesmas ou por inibir o estabelecimento de patógenos de plantas, decorrente do sequestro de ferro do meio ambiente. A competição por ferro, mediada pela produção de sideróforos, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos (Weller, 1988; Beneduzi et al., 2012). Exemplos de PGPBs com esta atividade incluem *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa*, que inibem o crescimento dos patógenos de tomate *Fusarium oxysporum* e *Pythium*, respectivamente (Vandendergh e Gonzalez, 1984; Buysens et al., 1995). Ao contrário dos fitopatógenos microbianos, as plantas não são prejudicadas com a depleção de ferro pelas PGPBs. Algumas plantas podem até mesmo capturar o complexo ferro-sideróforo bacteriano, transportando-o e disponibilizando ferro para suas células (Crowley et al., 1988). Sideróforos também podem desencadear resistência sistêmica induzida (ISR, do inglês, *induced systemic resistance*). Diferentes linhagens de *Pseudomonas* sp. são conhecidas por desencadear ISR em plantas a diferentes micro-organismos, entre eles ao fungo *Botrytis cinerea* causador de doenças em feijão e tomate (Höfte e Pahn, 2007).

De acordo com Wei Jin et al. (2010) o estado nutricional das plantas, em especial a deficiência de ferro, pode alterar a comunidade de micro-organismos rizosféricos produtores de sideróforos. Estes autores submeteram plantas de *Trifolium pratense* (trevo-vermelho) a estresse por falta de ferro e verificaram um número muito maior de bactérias que secretavam sideróforos rapidamente (em até 24 h) quando comparado com a condição controle. Além da alta afinidade por ferro, sideróforos apresentam afinidade por outros metais. Em estudo realizado com *Azotobacter vinelandii*, Kraepiel et al. (2009), mostraram que esta bactéria excreta compostos catecolatos, previamente identificados como sideróforos, que se ligam a uma variedade de cofatores metais da nitrogenase (Mo, V e Fe). Este trabalho também sugere o papel de sideróforos na detoxificação de metais tóxicos (tungstênio, W), sendo que o processo ocorre pela formação do complexo W-sideróforo, impedindo a captação através da célula bacteriana. Dimkpa et al. (2009) mostraram que a presença de metais, tais como Al, Cd, Ni e Fe inibe a produção de auxina em *Streptomyces* sp. No entanto, a síntese de auxina é aumentada sob condições produtoras de sideróforos. Esses mesmos autores observaram que plantas de feijão-caupi cultivado em solo contaminado com metais pesados e inoculadas com filtrados de *Streptomyces acidiscabies* contendo sideróforos e auxinas apresentaram um bom crescimento vegetal quando comparado com plantas controle.

As bactérias geralmente regulam o metabolismo do ferro em resposta a biodisponibilidade deste nutriente. Em excesso, o ferro é tóxico para as células. Portanto, é necessária uma regulação bastante controlada para garantir a demanda e evitar a toxidez, sendo que mudanças na disponibilidade de ferro causam mudanças na expressão de genes relacionados ao metabolismo do ferro (Rudolph et al., 2006). Fur (*Ferric uptake regulator*) é uma metaloproteína dimérica caracterizada por apresentar atividade repressora, reprimindo a transcrição de seus genes-alvo quando interage com seu co-repressor, o Fe^{2+} (Neilands, 1995; Andrews et al., 2003; Rudolph et al., 2006). O aumento nos níveis de Fur também induz os sistemas de armazenamento de ferro, tais como as ferritinas (Andrews et al., 2003). A homeostase do ferro é essencial para a célula, uma vez que, em excesso, esse elemento pode ser deletério devido à associação com espécies reativas de oxigênio, através da reação de Fenton, gerando compostos capazes de danificar os componentes celulares (Touati, 2000). Proteínas Fur controlam a expressão de mais de 90 genes em *E. coli*, reprimindo mais de 35 genes envolvidos na aquisição de ferro em condições de suficiência de ferro (Andrews et al., 2003).

3.3. Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um nutriente essencial às plantas, participando como componente estrutural dos ácidos nucleicos, fosfolipídios, adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento-chave de vias metabólicas e bioquímicas e particularmente importante para a FBN (Richardson e Simpson, 2011). Em geral, grande proporção de P está presente em formas insolúveis e, conseqüentemente, não está disponível para a nutrição das plantas. Os baixos níveis de P são devido à alta reatividade de fosfato solúvel com outros elementos (Khan et al., 2007). Plantas só podem absorver P em duas formas solúveis: a forma monobásica (H_2PO_4^-) e a forma dibásica (HPO_4^{2-}) (Glass, 1989). Portanto, a disponibilidade de P depende da sua solubilidade, que pode ser influenciada pela atividade das raízes das plantas e micro-organismos do solo.

As fontes de P disponíveis no solo são provenientes de compostos fosfatados orgânicos - incorporado dentro da biomassa ou matéria orgânica do solo (Richardson e Simpson, 2011), - e de compostos fosfatados inorgânicos, principalmente na forma de complexos minerais insolúveis (Rodríguez et al., 2006). Como menos de 5% do fosfato total do solo encontra-se disponível para as plantas (Dobbelaere et al., 2003), a adição de fertilizantes fosfatados tornou-se uma prática comum na agricultura moderna. Cerca de 5 a 30% dos fertilizantes fosfatados aplicados aos solos são aproveitados pelas plantas e uma parte significativa é reduzida por reações físico-químicas no solo (Trove et al., 2003), sendo rapidamente imobilizado, logo após a aplicação, pelo ferro e pelo alumínio em solos ácidos (pH abaixo de 5), e por cálcio em solos alcalinos (pH acima de 7), tornando-se, assim, indisponível para as plantas (Holford, 1997; McLaughlin et al., 2011). Sob tais formas, o fosfato não é assimilado de forma eficiente pelas plantas, demandando aplicação excessiva de adubos fosfatados nas áreas de cultivo. No entanto, estas alterações do solo, além de apresentarem alto custo, são também consideradas uma potencial fonte de poluição ambiental (Shaharoon et al., 2008). A eutrofização é a principal preocupação ambiental relacionada com a aplicação de fertilizantes fosfatos em excesso e posterior escoamento para os recursos hídricos (Harris et al., 2005).

Os principais objetivos em gerenciamento de fósforo no solo são melhorar a produção de culturas, bem como minimizar a perda de P dos solos oriundos de fertilizantes (Chen et al., 2006). O fornecimento de P para as plantas por meio de inoculante biológico é uma alternativa sustentável e viável, já que o P solúvel é liberado a partir de reações de solubilização de fosfatos insolúveis no solo envolvendo diversos

micro-organismos, como bactérias e fungos (Richardson e Simpson, 2011). Estima-se que bactérias com potencial de solubilização de fosfato constituem 10-50%, enquanto fungos constituem 0,5-1% da população total de micro-organismos cultiváveis do solo (Chabot et al., 1993; Khan et al., 2007).

Bactérias solubilizadoras de fosfato são capazes de solubilizar compostos inorgânicos fosfatados pela produção de ácidos orgânicos (Jones, 1998; Chen et al., 2006; Rodríguez et al., 2006). A produção de ácidos orgânicos por bactérias tem sido bem documentada. Entre eles, o ácido glucônico e o ácido carboxílico são os mais conhecidos (Rodríguez e Fraga, 1999). Tais ácidos orgânicos através dos seus grupos carbonil e hidroxil quelam os cátions (principalmente Ca) ligados ao grupo fosfato, convertendo-os em formas solúveis captadas pelas plantas (Kpombrekou e Tabatabai, 1994), propiciando um melhor crescimento e maior rendimento das culturas (Khan et al., 2007). Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos desempenham um papel importante na disponibilização de diferentes formas inorgânicas de fosfatos, tais como fosfato de cálcio, fosfato de alumínio e fosfato de ferro (Chabot et al., 1993). Determinado micro-organismo pode solubilizar apenas fosfato de cálcio, enquanto outros ainda solubilizam outras formas, devendo-se levar em consideração que os micro-organismos podem solubilizar esses fosfatos em diferentes intensidades (Doyle et al., 1990).

Em relação à solubilização de fosfato, a maioria das plantas cultivadas tem sido positivamente afetada pela associação com a microbiota rizosférica. No estudo desenvolvido por Qin et al. (2011), os autores observaram que todas as estirpes de rizóbios apresentaram atividade solubilizadora, especialmente para fosfato de cálcio. Além disso, em comparação com plantas não noduladas, as plantas noduladas tiveram maior biomassa e conteúdo de fósforo. Do contrário, nem todas as bactérias com capacidade de solubilizar fosfato aumentam o crescimento da planta pelo aumento da disponibilidade P para as plantas hospedeiras. Por exemplo, De Freitas et al. (1997) encontraram estirpes solubilizadoras de fosfato pertencentes ao gênero *Bacillus* e à espécie *Xanthomonas maltophilia* isoladas de rizosfera de canola (*Brassica napus* L.) que apresentaram efeitos positivos sobre o crescimento vegetal, mas sem efeitos sobre o conteúdo de P, indicando que outro mecanismo foi o responsável pela promoção do crescimento vegetal.

Diferentes gêneros bacterianos têm a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, como, por exemplo, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*,

Achromobacter, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia*, sendo que as espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* são as solubilizadoras mais eficientes (Rodríguez e Fraga, 1999). Estudos com *Bacillus firmus* (Datta et al., 1982) e *Paenibacillus polymyxa* (Gaur e Ostwal, 1972) comprovaram o aumento na captação do fósforo em lavouras de arroz e trigo, respectivamente, e o ganho de produção após inoculação destas bactérias.

Adicionalmente, o solo contém uma ampla gama de substratos orgânicos, o que pode ser uma fonte de fósforo para o crescimento da planta. A solubilização de compostos fosfatados orgânicos ou mineralização é caracterizada pela hidrólise de substratos orgânicos para a liberação de íons ortofosfato (principalmente como H_2PO_4^-) (McLaughlin et al., 2011). A mineralização da maioria dos compostos fosfatados orgânicos é realizada pela liberação de enzimas, tais como fosfatases (Richardson e Simpson, 2011) e fitases (Rodríguez et al., 2006).

As bactérias do solo que expressam um nível significativo de fosfatases ácidas incluem estripes dos gêneros *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Rodríguez e Fraga, 1999). Plantas geneticamente modificadas de trevo (*Trifolium subterraneum* L.) expressando uma fitase fúngica extracelular (de *Aspergillus niger*) nas raízes mostraram uma capacidade eficiente em adquirir fósforo diretamente de fitato (Richardson e Simpson, 2011).

Além das bactérias solubilizadoras de fosfato citadas anteriormente, fungos micorrízicos arbusculares também desempenham papel importante nos processos de fornecimento de P para as plantas, atuando como extensões do sistema radicular, aumentando a área de absorção das raízes e a velocidade de absorção de P (Bolan, 1991). Plantas também possuem mecanismos capazes de influenciar a disponibilidade de P no solo, tais como mudanças de pH da rizosfera, liberação de ácidos orgânicos, de fosfatases e de agentes quelantes (Hinsinger, 2001).

3.4. Produção de auxina

Em plantas, os hormônios vegetais, também conhecidos como fito-hormônios ou substâncias de crescimento vegetal, são substâncias naturais que, em baixas concentrações, influenciam a fisiologia da planta (Teale et al., 2006). Os reguladores de crescimento vegetal podem ser classificados como auxinas, citocininas, giberilinas, ácido abscísico e etileno (Raven et al., 2001) e mais recentemente como jasmonatos e salicilatos (Taiz e Zeiger, 2009). Diversas espécies bacterianas produzem auxinas como

parte de seu metabolismo, incluindo o ácido indol-3-acético (AIA) e o ácido indole-3-butírico (AIB), ou os seus precursores. O AIA é a principal auxina de ocorrência natural e de maior relevância fisiológica (Spaepen et al., 2007; Jha e Saraf, 2012).

O fito-hormônio auxina (do grego *auxein*: “crescimento, aumento”) é amplamente distribuído entre bactérias associadas a plantas, sendo que cerca de 80% dos isolados bacterianos da rizosfera são capazes de produzir AIA (Patten e Glick, 2002; Spaepen et al., 2007). Muitas bactérias promotoras do crescimento sintetizam AIA e seu efeito na planta mimetiza o do AIA endógeno (Patten e Glick, 2002). Entretanto, o AIA aparentemente não funciona como um hormônio em células bacterianas e sua produção pelas bactérias pode ter surgido devido à sua importância na relação bactéria-plantas. O alongamento das raízes primárias ou a proliferação de raízes laterais, por exemplo, é vantajoso para plantas jovens devido ao aumento da habilidade de se ancorar ao solo e obter água e nutrientes do ambiente (Patten e Glick, 2002).

A síntese de fito-hormônios por bactérias da rizosfera depende da presença de precursores nos exsudatos radiculares de plantas. Entre os diferentes exsudatos, o aminoácido triptofano tem sido identificado como o principal precursor para a via de biossíntese de AIA em bactérias. A identificação de compostos intermediários conduziu à identificação de cinco vias diferentes usando triptofano como o precursor principal e as diferentes vias para a síntese de AIA em bactérias apresentam um elevado grau de semelhança entre as vias de biossíntese de AIA em plantas (Spaepen et al., 2007). Em bactérias, a produção de AIA pela via indol-3-piruvato (IpyA) tem sido descrita em uma vasta gama de bactérias patogênicas ou não, tais como *Pantoea agglomerans*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*, entretanto, a maioria das bactérias benéficas utilizam preferencialmente a rota IPyA. Em bactérias fitopatogênicas, AIA é geralmente produzido a partir da via indol-3-acetamida (IAM) com triptofano mono-oxigenase e indol-acetamida hidrolase como enzimas chaves. Além dessas vias de síntese de AIA dependente de triptofano, a via triptamina (TAM) foi identificada em *Bacillus cereus*, e a via oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) foi descrita em *Pseudomonas fluorescens* (Spaepen et al., 2007). Em *Azospirillum brasilense* pelo menos três vias biossintéticas foram descritas na produção de AIA: duas dependentes de triptofano (IAM e IpyA) e uma outra independente de triptofano (Prinsen et al., 1993), sendo IpyA a mais importante (Spaepen et al., 2008).

A potencialidade de rizóbios em estabelecer simbiose com leguminosas já é bem documentada, entretanto, estirpes bacterianas pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e

Bradyrhizobium podem promover o crescimento de plantas não leguminosas (Biswas et al., 2000). Os autores observaram que rizóbios diazotróficos podem promover o crescimento e o rendimento de grãos em arroz, possivelmente por mecanismos que envolvem modificações na fisiologia e arquitetura das raízes, permitindo uma melhor eficiência na obtenção de água e nutrientes do ambiente. Adicionalmente, estudos indicaram a importância de AIA em eventos de nodulação (Spaepen et al., 2007). Por exemplo, em ensaios de co-inoculação de feijão com *Azospirillum* e *Rhizobium* foram obtidos um maior número de nódulos, um aumento na quantidade de nitrogênio fixado, bem como um maior rendimento. Por outro lado, na utilização de uma estirpe mutante de *Azospirillum* para o gene *ipdC*, que produz apenas 10% do AIA, os resultados foram insatisfatórios, indicando a importância do AIA bacteriano no estabelecimento e eficiência da simbiose (Remans et al., 2008).

Sendo o aminoácido triptofano identificado como o principal precursor para a via de biossíntese de AIA, Kravchenko et al. (2004) estudaram o efeito do aminoácido triptofano presente em exsudatos radiculares de tomate e rabanete sobre a produção de AIA bacteriano e promoção do crescimento de plantas. Estes autores sugerem que as altas concentrações de triptofano na rizosfera de rabanete induziram a síntese de AIA bacteriano e assim, estimularam o desenvolvimento do sistema radicular. Por outro lado, resultados negativos foram encontrados em experimentos com tomate, decorrentes da baixa concentração de triptofano nos exsudatos radiculares.

Bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* sp. produtoras de AIA promoveram alterações no crescimento e desenvolvimento de plantas de trigo (Dobbelaere et al., 1999; Akbari et al., 2007; Spaepen et al., 2008) e de girassol (Ambrosini et al., 2012) mostrando o grande potencial deste gênero na promoção do crescimento vegetal. Baudoin et al. (2010) observaram que estirpes geneticamente modificadas de *A. brasilense* para a síntese de AIA inoculadas na rizosfera de trigo foram eficientes na colonização de raízes com densidades populacionais constantes ao longo do tempo e ecologicamente funcionais, exercendo um papel fundamental na promoção de crescimento vegetal.

Outra bactéria bastante estudada é *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria endofítica isolada de cana-de-açúcar de grande importância para o crescimento desta cultura pelos benefícios derivados da FBN. Em condições de deficiência de nitrogênio, plantas de cana-de-açúcar inoculadas com uma linhagem selvagem de *G. diazotrophicus* apresentaram um bom crescimento e conteúdo de N total maiores

quando comparados com plantas inoculadas com uma linhagem mutante defectiva na capacidade de fixar nitrogênio. Quando N não foi um fator limitante, a promoção do crescimento foi observada em plantas inoculadas com ambas as linhagens, sugerindo que um efeito adicional é fornecido por *G. diazotrophicus*, sendo a produção de AIA um forte candidato por influenciar o crescimento vegetal (Sevilla et al., 2001).

A resposta das plantas ao AIA liberado por micro-organismos pode variar de efeitos benéficos (anteriormente citado) até efeitos deletérios. Xie et al. (1996) testaram uma estirpe selvagem de *Pseudomonas putida*, que produzia cerca de 2 µg de AIA ml⁻¹ e o seu respectivo mutante, que produzia quatro vezes a mais a quantidade de AIA sintetizado pela estirpe de tipo selvagem. Enquanto a primeira foi capaz de promover o crescimento de raízes de canola, a segunda foi responsável pela diminuição do crescimento.

Adicionalmente à síntese de auxinas, micro-organismos do solo são também capazes de degradá-las. A capacidade por catabolizar o AIA está bem caracterizada em *Bradyrhizobium japonicum* (Jensen et al., 1995) e em *Pseudomonas putida* 1290 (Leveau e Lindow, 2005). *P. putida* 1290 utiliza AIA com fonte de carbono, nitrogênio e energia e em experimentos de inoculação em rabanete foi eficiente em minimizar os efeitos negativos de grandes concentrações de AIA produzidas por bactérias patogênicas como *Rahnella aquaticus* e *Pseudomonas syringae*. Neste contexto, micro-organismos rizosféricos degradadores de AIA também podem ter um efeito positivo no crescimento de plantas e impedir o ataque de patógenos (Leveau e Lindow, 2005).

3.5. Atividade ACC deaminase e etileno

O etileno é um hormônio vegetal gasoso produzido endogenamente que atua em concentrações muito baixas, participando da regulação de praticamente todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas (Shaharoon et al., 2006; Saleem et al., 2007). As funções do etileno no desenvolvimento vegetal estão relacionadas basicamente no amadurecimento dos frutos, na diferenciação do crescimento de parte aérea e raízes, quebra de dormência das sementes, indução de florescimento, promoção da abscisão de folhas, frutos e flores (Taiz e Zeiger, 2009). Além de ser um regulador de crescimento da planta, o etileno também tem sido identificado como um hormônio do estresse. Sob condições de estresses bióticos e abióticos, a produção endógena de etileno é substancialmente acelerada e adversamente interfere no crescimento das raízes e, conseqüentemente, no crescimento da planta como

um todo (Shaharoon et al., 2006; Saleem et al., 2007). Por outro lado, o aumento nos níveis de etileno em respostas a condições de estresse pode ser um indutor de respostas de defesa que ajudam a aumentar a sobrevivência da planta sob tais condições (Glick, 2005).

Uma série de enzimas tem sido investigada por ajudar na redução dos níveis de etileno nas plantas. Certas PGPBs contêm uma enzima vital, a 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, que regula a produção de etileno vegetal através da metabolização de ACC nas raízes (precursor imediato da síntese de etileno em plantas superiores) a ácido α -cetobutírico e amônia (Arshad et al., 2007; Saleem et al., 2007). Esta enzima tem sido amplamente encontrada em várias espécies microbianas de bactérias Gram negativas, bactérias Gram positivas e fungos (Saleem et al., 2007).

A descrição-modelo do modo de ação de bactérias contendo ACC deaminase foi precisamente e originalmente elaborada por Glick e colaboradores (*in* Glick, 2005). De acordo com esse autor, uma parte significativa de ACC vegetal pode ser excretada das raízes de plantas ou sementes, captada por micro-organismos do solo e hidrolisada pela enzima ACC deaminase, diminuindo a quantidade de ACC no ambiente. Assim, comunidades microbianas do solo com atividade de ACC deaminase podem apresentar melhor crescimento quando associadas a raízes de plantas por serem capazes de utilizar ACC como fonte de nitrogênio, em comparação com os outros micro-organismos do solo. Bactérias contendo atividade de ACC deaminase podem ser úteis na manutenção do crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições de estresse, através da redução da produção de etileno (Arshad et al., 2007).

De acordo com a atividade de ACC deaminase que é observada entre um micro-organismo e outro, as bactérias podem ser conceitualmente divididas em dois grupos: com alta ou baixa atividade da enzima. Organismos expressando alta atividade de ACC deaminase associam-se de maneira inespecífica com uma variedade de superfícies de plantas. Este grupo inclui organismos de rizosfera e endofíticos, os quais podem agir como um dissipador do ACC produzido em consequência do estresse. Por outro lado, organismos expressando baixa atividade ACC deaminase ligam-se apenas a plantas específicas e/ou são expressas apenas em certos tecidos, não diminuindo o nível global de etileno na planta, mas evitando um aumento localizado nos níveis de etileno. Este grupo inclui os rizóbios. Durante a infecção por rizóbios há uma pequena elevação nos níveis de etileno nas raízes das plantas sendo exigida uma baixa atividade da enzima (Glick, 2005; Saleem et al., 2007), e, assim, podendo facilitar a nodulação (Shaharoon

et al., 2006). Shaharoon et al. (2006) demonstraram que a inoculação de leguminosas com rizóbios e PGPB apresentando atividade de ACC deaminase pode ser uma abordagem eficaz e inovadora para alcançar a eficiência na nodulação em leguminosas.

Como citado anteriormente, a alta concentração de etileno em respostas a estresses bióticos e abióticos leva à inibição do crescimento radicular e da planta com um todo. Atualmente, a utilização de PGPB apresentando atividade de ACC deaminase na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições de estresse têm atraído muita atenção dos pesquisadores.

A seca é uma dos principais estresses ambientais que limitam o crescimento das plantas e a produção agrícola (Saleem et al., 2007). Em trabalho desenvolvido por Arshad et al. (2008) os autores observaram que a inoculação com estirpes de *Pseudomonas putida* e *P. fluorescens* apresentando atividade de ACC deaminase eliminaram parcialmente os efeitos do estresse hídrico em ervilha (*Pisum sativum* L.). A inoculação com PGPBs apresentando atividade de ACC deaminase teve impactos positivos no crescimento de plantas de arroz sob condições de estresse salino em diferentes parâmetros, incluindo a porcentagem de germinação, crescimento das raízes e parte aérea, teor de clorofila, bem como a redução da quantidade de etileno, quando comparado com o controle não inoculado (Bal et al., 2013). Saravanakumar e Samiyappan (2007) também observaram que *Pseudomonas fluorescens* com atividade de ACC deaminase promoveu o crescimento vegetal de plantas de amendoim em condições de estresse salino. Por outro lado, Jha et al. (2011) mostraram que a combinação de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (bactérias endofítica) com *Bacillus pumilus* (bactéria rizosférica) foi capaz de proteger plantas de arroz do estresse salino por indução de osmoprotetores e antioxidantes, os quais são considerados como marcadores bioquímicos e fisiológicos de tolerância a estresses. Além disso, as plantas de arroz do tratamento controle (sem NaCl) inoculadas com estas bactérias apresentaram resultados satisfatórios na promoção de crescimento.

Trabalhos recentes mostram que bactérias com atividade de ACC deaminase podem contribuir para a fitorremediação. A fitorremediação de solo e ambientes aquáticos é coordenada pelo sistema radicular da planta. No entanto, o crescimento radicular é frequentemente inibido por poluentes do solo, tais como metais pesados. A produção acelerada de etileno em resposta ao estresse induzido por contaminantes é conhecida por inibir o crescimento das raízes e é considerada como a principal limitação da eficiência da fitorremediação (Arshad et al., 2007). Neste enfoque, plantas

inoculadas com bactérias com atividade de ACC deaminase ou plantas transgênicas que expressam genes que codificam ACC deaminase podem regular os níveis de etileno e, conseqüentemente, contribuir para um melhor desenvolvimento do sistema radicular. Tal estratégia pode levar a uma maior captação de metais pesados ou rizodegradação de xenobióticos (Arshad et al., 2007).

Por fim, para um melhor entendimento e o conhecimento da microbiota e das funções que esta exerce quando em interação com as plantas, se faz necessário o uso de técnicas que permitam o acesso às comunidades bacterianas. A adoção de técnicas de microbiologia e biotecnologia permite o conhecimento das comunidades bacterianas associadas às plantas, bem como permite o estudo da interação entre micro-organismos com diversas culturas. Devido à grande demanda de “tecnologias limpas”, a seleção de uma ou mais estirpes, que possam ser usadas eficientemente no aperfeiçoamento da produção agrícola e em benefício da sustentabilidade ambiental, passa pelo isolamento de micro-organismos e a sua caracterização em busca de traços fenotípicos desejáveis.

O manejo das interações microbianas solo-planta tem emergido como uma ferramenta potente devido ao seu potencial biotecnológico, evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados que são aplicados e melhor conservação dos recursos ambientais (Shridhar, 2012). Uma das técnicas mais promissoras para reduzir os impactos ambientais, bem como reduzir custos de produção, é o uso de bioinoculantes - também chamados de biofertilizantes - compostos por bactérias benéficas como alternativa ao uso de fertilizantes. Devido ao sucesso das interações entre rizóbios e leguminosas e o uso dessas bactérias na agricultura, os estudos com PGPBs estão sendo cada vez mais intensificados na área de microbiologia agrícola, sendo o conhecimento da comunidade bacteriana que apresenta relação associativa com plantas de arroz o foco desse trabalho.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral a caracterização da comunidade bacteriana cultivável naturalmente associada ao cultivo de arroz no Estado do Rio Grande do Sul, bem como a compreensão da interação planta-bactéria na promoção do crescimento vegetal, a fim de que estirpes com potencial para a produção de inoculante possam contribuir para o aumento da produtividade e/ou a redução do uso de fertilizantes nitrogenados nessa gramínea.

2. Objetivos específicos

I. Acessar e caracterizar a diversidade de bactérias Gram negativas e Gram positivas de solo rizosférico e raízes de arroz em diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul, por métodos microbiológicos e moleculares;

II. Avaliar a capacidade das linhagens bacterianas isoladas quanto a diferentes habilidades de promoção de crescimento vegetal, tais como a fixação biológica de nitrogênio, produção de compostos indólicos, produção de sideróforos, solubilização de fosfato e atividade de ACC deaminase;

III. Eleger as linhagens bacterianas com potencial para estimular o crescimento vegetal e submetê-las a experimentos de inoculação, em câmara de crescimento e campo;

IV. Avaliar a eficiência dos isolados na promoção do crescimento das plantas e na capacidade de minimizar os efeitos da toxidez por ferro;

V. Submeter as linhagens bacterianas promissoras à produção de um produto inoculante, visando a posterior utilização deste no cultivo de arroz;

VI. Testar a eficiência do inoculante na promoção do crescimento de arroz, a fim de que esta tecnologia possa contribuir para o aumento da produtividade e a redução do uso de fertilizantes nitrogenados para esta cultura.

CAPÍTULO 1

The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields

Artigo publicado na revista *Plant Soil*, (2013) 366:585–603

The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields

Rocheli de Souza · Anelise Beneduzi · Adriana Ambrosini ·
Pedro Beschoren da Costa · Jacqueline Meyer ·
Luciano K. Vargas · Rodrigo Schoenfeld ·
Luciane M. P. Passaglia

Received: 2 June 2012 / Accepted: 16 August 2012 / Published online: 21 September 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract

Background and Aims Several strains of rhizobacteria may be found in the rhizospheric soil, on the root surface or in association with rice plants. These bacteria are able to colonize plant root systems and promote plant growth and crop yield through a variety of mechanisms. The objectives of this study were to isolate, identify, and characterize putative plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) associated

with rice cropped in different areas of southern Brazil.

Methods Bacterial strains were selectively isolated based on their growth on three selective semi-solid nitrogen-free media. Bacteria were identified at the genus level by PCR-RFLP 16S rRNA gene analysis and partial sequencing methodologies. Bacterial isolates were evaluated for their ability to produce indolic compounds and siderophores and to solubilize phosphate. In vitro biological nitrogen fixation and the ability to produce 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase were evaluated for each bacterial isolate used in the inoculation experiments.

Results In total, 336 bacterial strains were isolated representing 31 different bacterial genera. Strains belonging to the genera *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* were the most prominent isolates. Siderophore and indolic compounds producers were widely found among isolates, but 101 isolates were able to solubilize phosphate. Under gnotobiotic conditions, eight isolates were able to stimulate the growth of rice plants. Five of these eight isolates were also field tested in rice plants subjected to different nitrogen fertilization rates.

Conclusions The results showed that the condition of half-fertilization plus separate inoculation with the isolates AC32 (*Herbaspirillum* sp.), AG15 (*Burkholderia* sp.), CA21 (*Pseudacidovorax* sp.), and UR51 (*Azospirillum* sp.) achieved rice growth similar to those achieved by full-fertilization

Responsible Editor: Jorge Vivanco.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-012-1430-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. de Souza · A. Ambrosini · P. B. da Costa · J. Meyer ·
L. M. P. Passaglia (✉)
Departamento de Genética, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053,
Prédio 43312, sala 207b,
Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brasil
e-mail: lpassaglia@terra.com.br

A. Beneduzi · L. K. Vargas
Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO),
Rua Gonçalves Dias 570,
90130-060 Porto Alegre, RS, Brasil

R. Schoenfeld
Instituto Riograndense do Arroz (IRGA),
Avenida Bonifácio Carvalho Bernardes 1494,
94930-030 Cachoeirinha, RS, Brasil

without inoculation, thus highlighting the potential of these strains for formulating new bioinoculants for rice crops.

Keywords PGPR · Plant growth promoting rhizobacteria · Plant yield · Nutrient uptake · Rice

Introduction

Bacteria in the soil are important in biogeochemical cycles and have been used for crop production for decades (Hayat et al. 2010). Root-colonizing plant-beneficial bacteria, commonly referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), are capable of stimulating plant growth when cultivated in association with a host plant (Vessey 2003; Hayat et al. 2010). These bacteria are associated with the rhizosphere, the narrow zone of soil surrounding the root that is under the immediate influence of the root system (Dobbelaere et al. 2003) and that provides an important soil ecological environment allowing plant-microbe interactions (Hayat et al. 2010). The rhizosphere provides a rich source of energy and nutrients to the bacteria resulting in higher bacterial diversity and larger populations when compared with bulk soil (Gray and Smith 2005). Likewise, rhizobacteria also secrete a wide variety of metabolites into the rhizosphere that are utilized by plants (Van Loon 2007).

Plant-microbe interactions in the rhizosphere are the determinants of plant health and soil fertility (Hayat et al. 2010). The degree of intimacy between PGPR and the host plant can vary depending on where and how the bacteria colonize the host plant, and the relationships between PGPR and their hosts can be classified as either rhizospheric or endophytic (Vessey 2003). In root endophytic relationships, bacteria can colonize the internal tissues of the plant by residing within the apoplastic spaces between plant cells (Schulz and Boyle 2006). In rhizospheric relationships, PGPR may colonize the rhizosphere, the surface of the root, or even superficial intercellular spaces (Vessey 2003).

PGPR are able to increase plant growth, accelerate seed germination, improve seedling emergence responses to external stress factors, protect plants from disease, and promote root growth (Lugtenberg et al. 2002). PGPR can directly affect plant growth by (i) fixing atmospheric nitrogen (performed by diazotrophic organisms); (ii) solubilizing minerals such as

phosphorus; (iii) producing siderophores (iron chelators); (iv) producing plant growth regulators (hormones) such as indole acetic acid (IAA) (Selosse et al. 2004; Vega 2007); and (v) producing the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase to reduce ethylene levels in the roots of developing plants, thereby increasing root length and growth (Forchetti et al. 2007). Indirect stimulation occurs when PGPR prevent the deleterious effects of phytopathogenic microorganisms by producing siderophores, β -1,3-glucanase, chitinases and antibiotics (Glick 1995; Glick and Pasternak 2003) or by inducing systemic disease resistance (Tuzun and Kloepper 1994). Thus, PGPR are able to use different pathways to promote plant growth at various stages during the plant life cycle. The manner in which PGPR can influence plant growth differs from species to species as well as by strain (Glick et al. 1999). In the last few decades, a large array of bacteria have been found to possess plant growth-promoting properties, including species of *Pseudomonas* (Ahmad et al. 2006), *Azospirillum* (Okon and Labandrerá-Gonzalez 1994; Malik et al. 1997; Ambrosini et al. 2012), *Bacillus* (Ahmad et al. 2006; Beneduzi et al. 2008; Çakmakçı et al. 2007), *Klebsiella* (Govindarajan et al. 2007; Farina et al. 2012), *Herbaspirillum* (Elbeltagy et al. 2001), *Burkholderia* (Ambrosini et al. 2012; Farina et al. 2012), *Enterobacter* (Santi Ferrara et al. 2011; Ambrosini et al. 2012), and *Achromobacter* (Ambrosini et al. 2012).

Rice (*Oryza sativa* L.) is the most important cereal crop and staple food for two-thirds of the world's population (Khush 2003; Yanni and Dazzo 2010). Nitrogen is the most frequent limiting nutrient for rice production, which requires 1 kg of nitrogen to produce 15–20 kg of grain (Ladha and Reddy 2003). Consequently, rice production currently depends on the large-scale use of chemical fertilizers, which pose an environmental hazard for rice-producing areas (Wartiainen et al. 2008). However, agricultural systems have changed to improve environmental quality and avoid environmental degradation (Roesch et al. 2007). One popular approach of integrated plant nutrient management systems is the addition of biological agents to standard chemical fertilization methods to improve crop yields. In this regard, PGPR may have a potential role in the development of sustainable systems for crop production (Shoebitz et al. 2009), environmental

soundness and the enhanced production of rice in conjunction with the economical application of chemical fertilizers (Yanni and Dazzo 2010). Although PGPR have been extensively studied for inoculation efficacy and possible contributions to the growth and yield of rice, few studies support the hypothesis that the use of PGPR could allow feasible reductions in the use of chemical fertilizers.

Increases in productivity and yield per cultivated area are still needed in Brazil to meet essential food demands. Because rice is one of the most important nutritional crops for the Brazilian population and studies on the interactions between PGPR and non-leguminous plant species are of great agricultural importance, this study aimed to (i) isolate and identify putative PGPR strains associated with rhizospheric soil and the roots of rice plants cropped in different areas of southern Brazil, (ii) evaluate several plant growth promotion (PGP) activities of the bacterial isolates, (iii) select microbial strains with the potential to stimulate plant growth, and (iv) test their PGP abilities in a growth chamber and under field conditions using rice.

Materials and methods

Sampling and sample preparation

Samples were collected from six different rice-producing regions in the state of Rio Grande do Sul (RS), Brazil, South America: Aceguá [AC; 31°45'11" S, 54°3'22"W], Arroio Grande [AG; 32°14'19"S, 53°5'27"W], Cachoeirinha [CA; 29°56'51.9"S, 51°06'46.3"W], Santa Vitória do Palmar [SVP; 33°31'08"S, 53°22'04"W], Uruguaiana [U; 29°45'18"S, 57°05'16"W], and Viamão [VI; 30°04'51"S, 51°01'22"W]. The rice cultivar analyzed was Puitá INTA CL for all regions except Santa Vitória do Palmar, where the IRGA 425 cultivar was analyzed instead. Soil and rice samples were collected at the flowering stage between December 2010 and March 2011. Ten samples (0.5 kg each) of fresh weight soil were collected from each site down to a depth of 15 cm and bulked to obtain a representative composite sample. Three sub-samples (0.5 kg fresh weight) of soil from each region were analyzed for pH, clay, P, K, Fe, exchangeable Al, Ca, Mg, and organic matter (OM) content using standard methods (Tedesco et al. 1995; Table 1).

Isolation of plant growth promoting bacteria

Bacteria with PGP characteristics were isolated from rhizospheric soil and the roots of rice according to the method of Döbereiner et al. (1995). Rhizospheric and root endophytic bacteria were isolated from five independent plants with adhering (rhizospheric) soil that were spaced at least 2 m away from each other. Samples were randomly taken and bulked to obtain a representative composite sample.

To isolate root-associated bacteria, root samples were first sterilized by surface disinfection performed by washing the roots in running tap water, followed by a 70 % ethanol wash for 1 min, a sodium hypochlorite solution (4 %, v/v) wash for 2 min, and five serial rinses in sterilized distilled water. After disinfection, 10 g of roots from each sampling region was sliced with a sterile scalpel and placed into 250 ml Erlenmeyer flasks containing 90 ml of sterile saline solution (0.85 % NaCl). Rhizospheric bacteria isolated from 10 g of rhizospheric soil from each sampling region were also placed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 90 ml of sterile saline solution. Both rhizospheric soil and sliced roots samples were incubated at 4°C with agitation (125 rpm) for 4–6 h. Aliquots of 0.1 ml of three-fold serial dilutions were inoculated, in triplicate, into vials containing 4 ml of semi-solid N-free medium (NFb, LGI or LGI-P) according to the procedures recommended by Döbereiner et al. (1995). After 7 days of incubation at 28°C, those vials showing a veil-like pellicle near the surface of the medium were considered positive and were used to inoculate fresh vials containing the same semi-solid N-free medium previously utilized. The cultures from the positive vials were subjected to further purification steps by streaking them onto specific agar plates containing 20 mg l⁻¹ of yeast extract and incubating them at 28°C for 3 days. Immediately after incubation, one colony from each plate was randomly selected and grown in liquid LB medium (Sambrook and Russel 2001) at 28°C with agitation (125 rpm). From each sampled region, 30 colonies of root-associated bacteria and 30 colonies of rhizospheric soil bacteria (totaling 60 colonies from each region) were isolated. These bacterial isolates were individually analyzed by Gram-staining and immediately stored in sterile glycerol solution (50 %) at -20°C.

Table 1 Abiotic soil characteristics of the sampling sites

Sampling sites	Clay (%)	OMC (%)	pH (H ₂ O)	P (mg dm ⁻³)	K (mg dm ⁻³)	Fe (%)	Ca _{exc} (cmol _c dm ⁻³)	Al _{exc} (cmol _c dm ⁻³)
1. Aceguá	20	3.2	6.1	12.6	113	0.14	10.5	0.0
2. Arroio Grande	22	1.8	5.0	0.1	46	0.23	2.7	2.1
3. Cachoeirinha	29	1.9	5.2	10.8	41	0.22	2.7	0.5
4. Santa Vitória do Palmar	19	2.6	5.8	10.8	77	0.03	5.6	0.0
5. Uruguaiana	29	3.5	5.5	0.9	70	0.78	11.5	0.1
6. Viamão	8	1.1	5.2	3.2	15	0.09	0.4	0.6

OMC organic matter content

exc exchangeable

Extraction of bacterial DNA

To extract DNA, 2 ml of each bacterial culture was grown in LB medium, after which the cultures were centrifuged for 5 min at 12,000 × *g*. The bacterial pellet was rinsed with 700 µl of TES buffer (10 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA, 150 mM NaCl), re-centrifuged and suspended in 500 µl of TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA). Cells were lysed at 37°C with 20 mg ml⁻¹ lysozyme, 4 % sodium dodecyl sulfate and 20 mg ml⁻¹ proteinase K. The samples were homogenized for 30 s and incubated at 56°C for 15 min. To precipitate cellular waste, 600 µl of ammonium acetate (8 M pH 8.0) was added, and the samples were kept on ice for 30 min and subsequently centrifuged for 20 min at 12,000 × *g*. Phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation were performed as described by Sambrook and Russel (2001). The quality and integrity of the DNA were determined by electrophoresis in 0.8 % agarose gels containing ethidium bromide and visualized by UV light.

PCR amplification, RFLP analysis and partial sequencing of the bacterial 16S rRNA gene

Partial sequences of the 16S rRNA gene (roughly 450 bp) from each isolate were amplified using the primers U968 (AACGCGAAGAACCCTTAC) and L1401 (CGGTGTGTACAAGACCC) (Felske et al. 1997), which cover the region between nucleotides 968 and 1401 of the *Escherichia coli* 16S rRNA gene. This fragment includes the variable regions V6 to V8 (Brosius et al. 1978). Extracted DNA (50 ng) was used as a template in 25 µl reactions containing 20 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.3 µM of each

primer, 2 mM MgCl₂ and 2 U of Taq polymerase (Invitrogen®) in 1X Taq buffer. The reactions were performed using the PCR Express Temperature Cycling System (Thermo Hybrid) under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by 30 cycles at 94°C for 45 s, 52°C for 45 s, 72°C for 45 s and one cycle at 72°C for 10 min for final elongation. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gels containing ethidium bromide and visualized under UV light.

Aliquots (5 µl) of each PCR product were directly used for restriction enzyme cleavage (HaeIII and MspI) and incubated at 37°C for 16 h to ensure the complete digestion of the PCR product. RFLP analysis was performed by electrophoresis in a 10 % polyacrylamide gel stained with silver nitrate (Sambrook and Russel 2001). The gels were run for 3 h at 200 V in 1 X Tris-borate-EDTA buffer and stained for 30 min in silver nitrate. This procedure was repeated at least twice for each sample to verify the consistency of the patterns. The complete restriction profiles obtained were used to distinguish each isolate. The RFLP banding profile was transformed into a two-dimensional binary matrix, where 1 was assigned for the presence and 0 for the absence of a band. Data were subjected to diversity analysis using the PAST software (Hammer et al. 2001; available at <http://folk.uio.no/ohammer/past/>) and by the UPGMA algorithm and Jaccard coefficient. One dendrogram showing the genetic relationships among the isolates was constructed for each geographical region studied.

One representative bacterial isolate from each cluster obtained from the 16S rDNA PCR-RFLP was chosen for partial sequencing of the 16S rRNA gene. Sequencing was performed using an ABI PRISM

3100 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems) at the ACT Gene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, Brazil) using forward and reverse primers as described by the manufacturer. Sequence analysis was performed using the BioEdit version 7.0.9.0 software (Hall 1999) to verify sequence quality and to check for possible chimeric origins. DNA sequences (approximately 450 bp) were compared with sequences from EzTaxon Server version 2.1 (Chun et al. 2007; available at <http://www.eztaxon.org/>) and GenBank using the BLASTN software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The nucleotide sequences of the 95 partial 16S rRNA gene segments determined in this study have been deposited in GenBank (accession numbers JQ965549 to JQ965644).

To generate a phylogenetic tree, the sequences obtained in this study were combined into a database with other 16S rRNA gene sequences retrieved from GenBank. Multiple sequence alignments were performed using the ClustalX 1.83 software (Thompson et al. 1997). The evolutionary tree for the data set was inferred using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) and the Molecular Evolutionary Genetic Analysis software version 4 (MEGA 4.0; Tamura et al. 2007) based on 1,000 reassemblings.

Diversity

The diversity index (H' ; Shannon and Weaver 1949) was estimated based on dendrograms for each sampled site by counting the number of clusters at the 70 % similarity level and the number of taxa within each cluster (Borges et al. 2003; Kaschuk et al. 2006). Principal component analysis (PCA) was used to verify correlation between soil properties and rhizospheric bacterial diversity (Rico et al. 2004). All variables were normalized using division by their standard deviations and the eigenvalues and eigenvectors of the correlation matrix were calculated, as well as the percentages of variance accounted for each component. The H' and PCA were computed using the PAST software (Hammer et al. 2001).

Evaluation of the characteristics that promote plant growth

The PGP capacity of the bacterial isolates was evaluated by in vitro tests. The production of indolic compounds (IC) and siderophores and the ability to

solubilize phosphate were determined for all bacterial isolates. Assays for in vitro biological nitrogen fixation and the metabolism of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) were then performed for the eight bacterial isolates selected for in vivo experiments. Bacterial suspensions ($10 \mu\text{l}$ of 10^8 CFUml^{-1}) of each isolate grown in LB medium at 28°C with agitation (125 rpm) for 48 h were used as inocula for the PGP experiments. The production of IC and siderophores and the phosphate solubilization capacity were determined as described by Ambrosini et al. (2012). The nitrogen-fixing ability of the isolates was tested using the acetylene reduction assay (ARA) as described by Boddey (1987) and Ambrosini et al. (2012).

The ACC deaminase activity was evaluated by the ability of the isolates to use ACC as a nitrogen source and was determined according to Penrose and Glick (2003). Bacterial suspensions were washed three times in sterile saline solution. The bacteria were then inoculated onto plates containing 25 ml of DF salts medium with ACC (0.5 M). Inoculated plates without ACC were used as a negative control. All plates were incubated at 28°C for 5 days and examined every day.

In vivo experiments on plant growth promotion by native PGPR isolates

Bacterial isolates demonstrating different PGP characteristics were tested in experiments with rice (*Oryza sativa* L.) in a growth chamber and under field conditions.

Growth chamber assay

The growth chamber experiment was conducted with a photoperiod cycle of 14 h light at 28°C and 10 h dark at 20°C . The experimental units consisted of pots ($15 \times 20 \text{ cm}$) sterilized with 0.7 % sodium hypochlorite solution and filled with sterile vermiculite before seeding. Rice seeds (cultivar Puitá INTA CL) were surface-disinfected by washing them in 70 % ethanol for 1 min, followed by a 5 min wash with sodium hypochlorite solution (4 %, v/v) containing three drops of Tween 80 and five serial rinses in sterilized distilled water. The sterilized seeds (two seeds per pot) were planted 2 cm below the soil surface and immediately inoculated with different isolates. Eight bacterial isolates were grown in LB medium with agitation (125 rpm) for 48 h at 28°C , and pure bacterial cultures

were centrifuged and diluted to a final concentration of 10^8 CFU ml⁻¹ in sterile saline solution. Seeds were inoculated with 2 ml aliquots of the cell suspensions by direct irrigation of the substrate. The treatments were as follows: (a) AC32, (b) AC60, (c) AG15 (d) CA1, (e) CA6, (f) CA21, (g) CA56, (h) UR51 and (j) non-inoculated control. The experiment consisted of sixteen replicates per treatment and a completely randomized design; all treatments were treated once with Hoagland's nutrient solution according to Ambrosini et al. (2012). Plants were irrigated every 2 days with distilled water lacking micro or macronutrients. The experiment was maintained for 30 days, after which several parameters were evaluated. Plants were harvested and length data were recorded. Shoots and roots were dried at 65°C to constant weight to evaluate dry matter. All shoot dry matter from each treatment was combined for elemental analysis. Shoot nutrient content was determined by the Kjeldahl method (detection limit 0.01 %) for N and nitric-perchloric wet digestion/ICP-OES (Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry; detection limit 0.01 %) for P and K. The nutrient content of the plants was estimated for each treatment through uptake per gram of plant tissue multiplied by total yield per treatment [(yield) X (percent nutrient per gram of plant tissue)] (Adesemoye et al. 2009).

Field assay

The field experiment was conducted in Cachoeira do Sul [CS; 30°02'20"S, 52°53'38"W, RS, Brazil] concurrently with the growth chamber experiment. Five isolates (AC32, AG15, CA21, CA56, and UR51) were tested under field conditions. Each isolate was grown in LB medium with agitation (125 rpm) for 48 h at 28°C to a final concentration of 10^8 CFU ml⁻¹. Rice seeds were then inoculated with each bacterial suspension for 30 min at room temperature. Control seeds were treated in the same manner with uninoculated LB medium. The experiment was conducted in a completely randomized design with four plots per treatment. The experimental units were 1.5×5 m. Soil preparation, fertilizer base, sowing and other treatments were conducted as recommended for the cultivar (Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado 2010). The experiment consisted of the following treatments: (1) absence of nitrogen fertilizer with and without inoculation; (2) mineral nitrogen supplied at the recommended dose for the culture (120 kg

urea ha⁻¹) with and without inoculation; and (3) half the recommended dose of mineral nitrogen (60 kg urea ha⁻¹) with and without inoculation. The soil used in the experiment contained 9.5 mg dm⁻³ of phosphorous (P), 101 mg dm⁻³ of potassium (K), 2.8 mg dm⁻³ of iron (Fe), 0.6 cmol_c dm⁻³ of aluminum (Al), 3.0 cmol_c dm⁻³ of calcium (Ca), 24 % clay, and 1.7 % organic matter (OM), and presented a pH of 5.0. The parameters evaluated were plant height, shoot dry matter, shoot nutrient content, number of panicles per square meter, and grain yield.

Statistical analysis

Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and means were compared using Tukey's test ($P=0.05$ %).

Results

Isolation and identification of putative PGP bacteria

Bacteria possessing PGP characteristics were isolated from the rhizospheric soil and roots of rice plants collected from six different rice-producing regions of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. In total, 336 bacterial strains were selectively isolated based on their growth in three selective semi-solid nitrogen-free media, NFb, LGI, and LGI-P. These selective media were used as a discriminating strategy to select putative nitrogen-fixing and plant growth-promoting rhizobacteria.

Bacteria were identified at the genus level by analyzing the PCR-RFLP patterns of the 16S rRNA gene using two restriction enzymes, HaeIII and MspI, which allowed the construction of a dendrogram for each sampling site (data not shown). Overall, 31 different bacterial genera with a relationship to rice were identified from partial sequencing of the 16S rRNA genes of representative isolates (Table 2).

Among the 31 genera described in Table 2, the most prominent bacterial isolates were species of *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* genera. In the rhizospheric soil of rice, the most abundant genera recovered were *Burkholderia* (59 isolates), *Enterobacter* (42), *Pseudomonas* (18), and *Agrobacterium* (10). These same genera were also the most prevalent among root-associated

Table 2 Distribution of bacterial genera and the Shannon diversity index (H') at each sampling site

Bacterial genus	Percentage of bacterial genera from the sampling sites ^a											
	AC ^b		AG ^b		CA ^b		SV ^b		UR ^b		VI ^b	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Achromobacter</i>	–	15.4	–	–	–	–	–	–	–	3.4	–	–
<i>Acinetobacter</i>	–	3.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Agrobacterium</i>	15.4	3.8	3.4	13.3	3.7	–	7.7	3.7	6.6	6.9	–	–
<i>Azospirillum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6.9	–	–
<i>Bordetella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3.3
<i>Brevundimonas</i>	–	3.8	–	–	3.7	–	–	–	–	–	–	–
<i>Burkholderia</i>	19.2	26.9	44.9	–	44.4	62.9	19.2	3.7	20	10.3	62.1	53.3
<i>Caulobacter</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	3.3	–	–	–
<i>Cedecea</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6.9	–	–
<i>Chryseobacterium</i>	–	3.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cronobacter</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	10
<i>Devosia</i>	3.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Duganella</i>	–	–	–	–	–	–	7.7	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter</i>	30.8	23	37.4	66.6	–	–	30.7	81.5	46.7	37.9	–	20
<i>Herbaspirillum</i>	–	3.8	3.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Ideonella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	3.3	–	–	–
<i>Klebsiella</i>	3.8	–	–	–	–	–	–	–	3.3	–	6.9	6.6
<i>Massilia</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3.4	–	–
<i>Paenibacillus</i>	–	–	–	–	3.7	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pandoraea</i>	–	–	–	–	11.1	–	3.8	–	–	–	3.4	–
<i>Pantoea</i>	–	–	–	–	14.8	14.8	3.8	–	–	3.4	17.2	–
<i>Pigmentiphaga</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	3.3	–	–	–
<i>Pseudacidovorax</i>	–	–	–	–	3.7	3.7	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i>	23.1	3.8	–	3.3	7.4	11.1	26.9	7.4	6.6	3.4	3.4	6.6
<i>Rhizobium</i>	3.8	7.7	–	–	–	3.7	–	3.7	–	16.6	–	–
<i>Rhodococcus</i>	–	–	–	–	3.7	–	–	–	–	–	–	–
<i>Roseateles</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	3.3	–	–	–
<i>Salmonella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3.4	–
<i>Sphingobacterium</i>	–	3.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Sphingomonas</i>	–	–	–	16.6	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Stenotrophomonas</i>	–	–	10.3	–	3.7	3.7	–	–	3.3	–	3.4	–
H'	2.14		1.72		1.55		1.75		2.49		1.46	

(–) = not identified

^a Sampling sites: AC Aceguá; AG Arroio Grande; CA Cachoeirinha; SV Santa Vitória do Palmar; UR Uruguaiana, and VI Viamão

^b Bacterial genera isolated from: 1: rhizospheric soil, and 2: roots

bacteria, although in roots, *Enterobacter* strains were more abundant (65) than *Burkholderia* strains (44). *Agrobacterium* and *Enterobacter* strains were not found in samples collected from Viamão and

Cachoeirinha, respectively. In these same regions, the results indicated that *Burkholderia* strains represented more than 50 % of all bacterial isolates that were found in both rhizospheric soil and the roots of rice.

It was observed that *Burkholderia* and *Pseudomonas* were present in all six sampling regions, whereas *Enterobacter* was identified in only five sampling regions. Thus, these three genera could be considered dominant in their association with rice plants. Other genera that were found in association with the roots and rhizospheric soil of rice plants include *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rhizobium*, and *Stenotrophomonas*. It should be noted that some genera were found in only one environmental site: isolates of *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Cedecea*, *Cronobacter*, and *Sphingomonas* were found in the roots of rice whereas isolates of *Devosia*, *Duganella*, *Ideonella*, *Paenibacillus*, *Pigmentiphaga*, *Rhodococcus*, *Roseateles*, and *Salmonella* were found only in rhizospheric soil samples.

Of the identified bacteria, eight strains were further selected for the growth chamber experiment, and five strains were selected for the field experiment. The selection was based on their PGP characteristics and their taxonomic identification. According to the partial sequences of the 16S rRNA gene, the phylogenetic tree showed that the bacterial strains identified as CA1, CA6, and AG15 belonged to *Burkholderia*, AC32 to *Herbaspirillum*, CA21 to *Pseudacidovorax*, AC60 to *Acinetobacter*, CA56 to *Rhizobium*, and UR51 to *Azospirillum* genera (Fig. 1).

Principal coordinate analysis (PCA) was used to investigate the relationships between rhizospheric bacterial diversity (H') and abiotic soil parameters (Fig. 2). The first two dimensions of the PCA explained 84.61 % of the total variation. Component 1 accounting for 57.18 % of total variation and separated Al, on the left side, from all other variables. Component 2 represented 27.43 % of total variation and separated P, pH and K on the lower side of the plot. PC1 was positively loaded with Fe, clay, H' , Ca, OMC, K, P, and pH and negatively loaded with Al. PC2 was positively loaded with Al, Fe, clay, H' , Ca, and OMC and negatively loaded with K, pH, and P. High genetic diversity was found in Aceguá ($H'=2.14$) and Uruguaiana ($H'=2.49$). Arroio Grande ($H'=1.72$), Cachoeirinha ($H'=1.55$), Santa Vitória do Palmar ($H'=1.75$), and Viamão ($H'=1.46$) presented lower diversity indices (Table 2). This analysis showed that the soil factors Fe, clay, Ca, and OMC were more related to rhizospheric bacterial diversity in general. Moreover, no differences were found between the genera identified when compared the IRGA 425 cultivar (Santa Vitória do Palmar) and Puitá INTA CL cultivar (other regions).

PGP attributes of the bacterial isolates

The production of IC and siderophores and the ability to solubilize phosphate were analyzed for the 336 strains isolated from the roots and rhizospheric soil of rice in each sampled region (Table 3). One of the most evident characteristics among all of the isolates was the production of plant hormones; 329 of the isolates were able to synthesize IC, which can act as a phytohormone for plant growth. The production of IC ranged from 0.38 to 307.73 $\mu\text{g IC ml}^{-1}$, and of the 329 IC producers, 13 produced more than 100 $\mu\text{g IC ml}^{-1}$ in vitro after 72 h of incubation. The majority of the isolates (284) were also able to produce siderophores, which most likely aid the plant in acquiring iron. Notably, isolates belonging to *Enterobacter* and *Burkholderia* produced the highest levels of indolic compounds and siderophores. Additionally, 101 isolates were able to solubilize phosphate; these isolates belonged to *Burkholderia*, *Cedecea*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, and *Pseudomonas* and were all identified as good phosphate-solubilizing strains. *Burkholderia* had the highest number of phosphate-solubilizing strains. Moreover, the rhizospheric soil and rice roots obtained from Cachoeirinha, Uruguaiana, and Viamão showed the highest number of phosphate-solubilizing strains when compared to the other regions.

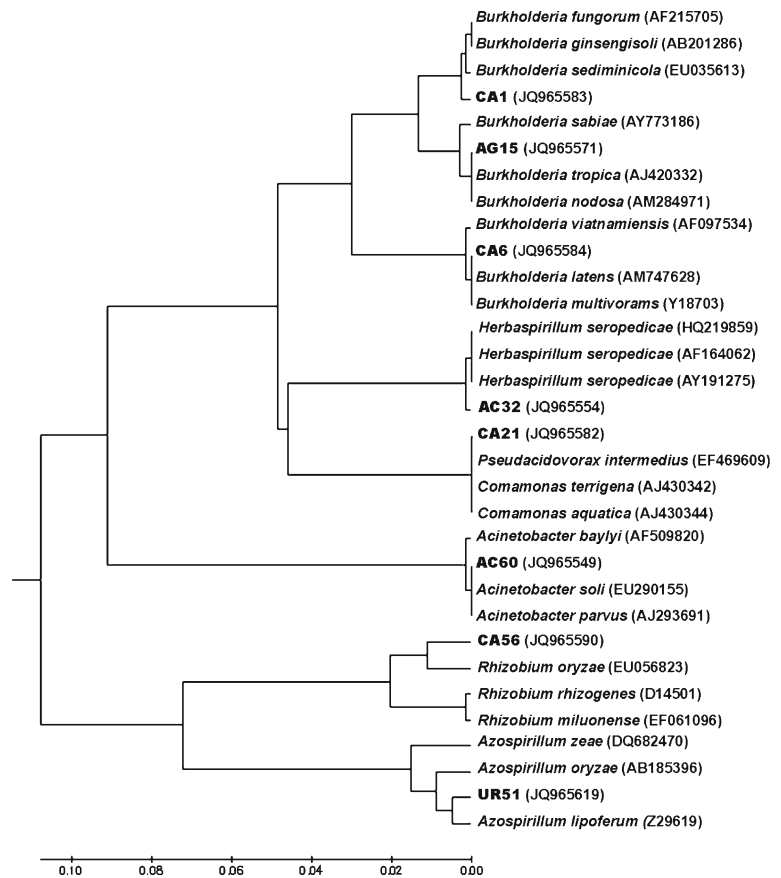
Many of the 336 bacterial strains isolated in this study possessed more than one PGP attribute: 284 isolates were able to produce IC and siderophores, 101 were able to produce IC and solubilize phosphates, 96 were able to produce siderophores and solubilize phosphates, and 96 were able to produce IC and siderophores and solubilize phosphates at the same time. Again, *Burkholderia* isolates were more likely to simultaneously present more than one PGP attribute.

The in vitro assays for biological nitrogen fixation and the ability to metabolize ACC were performed for eight of the bacterial isolates. These isolates were selected based on their taxonomic identification and PGP attributes for use in inoculating rice seeds for the growth experiment (Table 4).

The growth-promoting effect of the bacterial treatment of rice in the growth chamber assay

To test the interaction between PGPR and rice, an in vivo experiment was conducted with eight selected isolates and a growth chamber (Table 4). Under

Fig. 1 Phylogenetic tree for the partial sequences of the 16S rRNA gene showing the relationships among PGPR isolated from rice (AC32: *Herbaspirillum* sp., AG15, CA1 and CA6: *Burkholderia* sp., CA21: *Pseudacidovorax* sp., CA56: *Rhizobium* sp., and UR51: *Azospirillum* sp.) and related genera. The database accession numbers are indicated after the bacterial names. The sequences obtained in this study are shown in *bold*



growth chamber conditions, most of the selected isolates used for the inoculation of rice resulted in satisfactory effects on plant growth (Table 5). The rice inoculated with AC32, CA1, CA6, CA21, and CA56 presented significantly higher results than the

uninoculated control plants in terms of shoot length and dry shoot biomass. These same bacterial isolates also promoted a significant increase in the dry root weight of rice when compared with the uninoculated control plants.

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of the diversity indexes (H') of the six sampling sites (Aceguá, Arroio Grande, Cachoeirinha, Uruguaiiana, Santa Vitória do Palmar, and Viamão) in relation to different soil properties (clay, organic matter content (OMC), pH, P, K, Fe, Ca, and Al). Principal component 1 and component 2 accounted for 57.18 % and for 27.43 % of the total variation, respectively

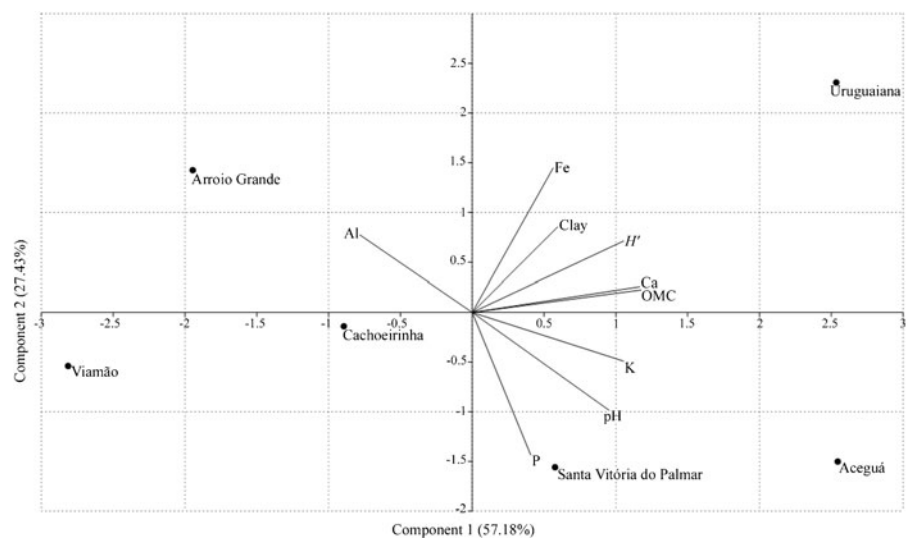


Table 3 Number of isolates, siderophore production, phosphate solubilization, and indolic compound (IC) production by bacterial isolates at each sampling site

Source ^a	Number of isolates	Siderophore production ^b		Phosphate solubilization ^c		IC production ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
		+	++	+	++	0.1–50	51–100	>100
AC-1	26	1	22	1	0	22	3	1
AC-2	26	5	13	5	2	23	3	0
AG-1	29	3	22	6	6	19	9	1
AG-2	30	20	2	0	0	28	2	0
CA-1	27	2	22	4	1	18	3	4
CA-2	27	5	21	13	1	26	1	0
SV-1	26	0	21	0	0	16	2	5
SV-2	27	2	25	4	0	24	1	2
UR-1	30	3	19	9	5	26	3	0
UR-2	29	9	12	10	0	25	4	0
VI-1	29	6	20	8	7	29	0	0
VI-2	30	4	25	17	2	29	0	0
Total	336	284		101		285	31	13

^a Sampling sites: *AC* Aceguá; *AG* Arroio Grande; *CA* Cachoeirinha; *SV* Santa Vitória do Palmar; *UR* Uruguaiana, and *VI* Viamão. Bacterial strain isolated from: 1–rhizospheric soil, and 2–roots

^b Development of a yellow, orange or violet halo around the bacterial colony was considered to be positive for siderophore production. The size of halo was evaluated to obtain a estimative of degree of siderophore production: halos from 0.1 cm to 0.6 cm (+) and halos higher than 0.6 cm (++)

^c Development of a halo around the bacterial colony was considered to be positive for phosphate solubilization. The size of halo was evaluated to obtain a estimative of degree of phosphate solubilization: halos from 0.1 cm to 0.6 cm (+) and halos higher than 0.6 cm (++)

With respect to plant nitrogen content, the inoculation of rice with AC32, CA1, CA6, CA21, and CA56 resulted in enhanced N uptake by the rice plants (values ranged from 70 % to 100 %) when compared with the uninoculated control plants. Moreover, similar results were observed for the uptake of P and K using the same isolates (Fig. 3).

Field plant assay

To corroborate the results obtained in the growth chamber, a field experiment was conducted with five of the isolates (AC32, AG15, CA21, CA56, and UR51) and different nitrogen fertilization conditions (0, 50, and 100 % N). The results of inoculation of rhizobacteria on shoot growth are shown in Table 6 and Supplementary Material, Table SM-1. With respect to shoot length, rice plants treated with CA21 plus 50 % N fertilizer were statistically equivalent to plants that received 100 % N without inoculation (Table 6). Furthermore, the results showed no differences between the five isolates and the

non-inoculated control in terms of shoot length for plants that received 50 % N fertilizer (Table SM-1). Plants inoculated with strains AC32, AG15, and CA21 plus 50 % N fertilizer presented the same results as those that received 100 % N fertilizer without inoculation, in terms of dry shoot biomass (Table 6). No differences in shoot dry matter were seen for inoculated plants receiving 50 % N fertilizer and non-inoculated plants receiving the same N dose (Table SM-1). It should be highlighted that the dry shoot matter of UR51-inoculated plants receiving 50 % N fertilizer was significantly higher than plants receiving 100 % N fertilizer and this PGPR (Table SM-1).

Bacterial inoculation and N fertilization rates significantly influenced the number of panicles and the yield of the rice plants in the field assay (Table 6; Table SM-2). Treatments with all five strains plus 50 % N fertilizer resulted in the same number of panicles when compared with 50 % and 100 % non-inoculated controls (Table 6), and strains AC32, AG15, and UR51 plus 50 % N fertilizer presented results statistically similar to those

Table 4 Identification and PGP attributes of selected isolates

Isolates ^a	16S rDNA sequence ^b	Phosphate solubilization	Siderophore production	IC production (μgml^{-1}) ^c	ARA (nmol C ₂ H ₄ mg protein h ⁻¹) ^c	ACC deaminase activity
AC32	<i>Herbaspirillum</i> sp. (99 %)	–	+	64.22	9.6	–
AC60	<i>Acinetobacter</i> sp. (99 %)	+	–	59.62	19.2	–
AG15	<i>Burkholderia</i> sp. (99 %)	+	+	4.11	207	–
CA1	<i>Burkholderia</i> sp. (99 %)	–	+	8.27	21	+
CA6	<i>Burkholderia</i> sp. (99 %)	–	+	47.19	18.6	–
CA21	<i>Pseudacidovorax</i> sp. (99 %)	–	+	5.84	9.0	–
CA56	<i>Rhizobium</i> sp. (97 %)	–	+	33.68	Nd	–
UR51	<i>Azospirillum</i> sp. (99 %)	+	+	27.76	32.4	–
Control	<i>A. brasilense</i> Sp7	nd	nd	nd	10081.8	nd

nd (not determined); IC (indolic compounds); ARA (acetylene reduction assay)

^a Bacteria isolated from: AC32 (roots/Aceguá); AC60 (roots/Aceguá); AG15 (rhizospheric soil/Arroio Grande); CA1 (rhizospheric soil/Cachoeirinha); CA6 (rhizospheric soil/Cachoeirinha); CA21 (rhizospheric soil/Cachoeirinha); CA56 (roots/Cachoeirinha); UR51 (roots/Uruguaiana)

^b Identities (in parentheses) are based on comparison with the GenBank database using the BLASTN program

^c Results represent the means of three experiments conducted separately under identical conditions

obtained with 100 % N with inoculation (Table SM-2). Comparison of the results obtained for rice yield with strains UR51 plus 50 % N fertilizer were statistically similar to those obtained with 100 % N fertilizer without PGPR (Table 6).

The potential role of PGPR in the promotion of rice growth was also evaluated using the concentration of N, P and K accumulated per gram of rice shoot tissue

(Table 7; Table SM-3). The uptake of all three elements increased significantly when rice plants were inoculated with PGPR under different amounts of nitrogen fertilizer. The amount of N found in rice plants receiving 50 % N fertilizer plus inoculation with the isolates AC32, AG15, CA21, and CA56 was statistically similar to the results obtained with 100 % N without inoculation (Table 7). Similar results were found for the uptake of P and K in

Table 5 The effect of the inoculation of native PGPR on the promotion of rice growth under growth chamber conditions

Isolates*	Shoot growth		Root growth	
	Length (cm)	Dry matter (mg)	Length (cm)	Dry matter (mg)
AC32	26.23 (± 1.75) ab	54.5 (± 6.44) bcd	23.22 (± 3.67) abc	35.3 (± 5.54) bc
AC60	25.33 (± 1.35) bc	50.9 (± 5.15) cd	21.86 (± 3.49) abc	35.7 (± 5.03) bc
AG15	23.06 (± 2.05) d	46.5 (± 7.46) d	24.25 (± 3.08) ab	32.9 (± 7.06) c
CA1	27.31 (± 1.85) a	65.9 (± 13.00) a	20.83 (± 3.23) bc	43.0 (± 5.80) a
CA6	26.91 (± 1.60) ab	64.2 (± 8.55) a	22.25 (± 3.54) abc	40.5 (± 5.76) ab
CA21	25.73 (± 1.97) ab	61.1 (± 9.02) ab	23.59 (± 3.29) abc	38.6 (± 7.39) abc
CA56	25.77 (± 1.37) ab	58.6 (± 7.96) abc	20.20 (± 2.62) c	35.6 (± 4.96) bc
UR51	23.53 (± 2.40) cd	51.3 (± 8.46) cd	24.83 (± 2.19) a	35.6 (± 4.30) bc
Non-inoculated	20.38 (± 0.99) e	33.7 (± 4.84) e	20.76 (± 3.60) bc	23.2 (± 3.52) d

Data represent the means of 16 replicates of plants grown in vermiculite in a photoperiod chamber

Values in the same column followed by the same letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test)

* AC32 (*Herbaspirillum* sp.); AC60 (*Acinetobacter* sp.); AG15 (*Burkholderia* sp.); CA1 (*Burkholderia* sp.); CA6 (*Burkholderia* sp.); CA21 (*Pseudacidovorax* sp.); CA56 (*Rhizobium* sp.); UR51 (*Azospirillum* sp.)

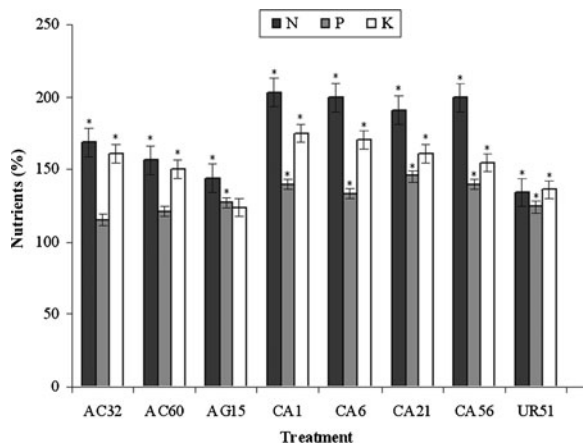


Fig. 3 Influence of the isolates AC32 (*Herbaspirillum* sp.), AC60 (*Acinetobacter* sp.), AG15 (*Burkholderia* sp.), CA1 (*Burkholderia* sp.), CA6 (*Burkholderia* sp.), CA21 (*Pseudacidovorax* sp.), CA56 (*Rhizobium* sp.), and UR51 (*Azospirillum* sp.) on the uptake of N, P and K by rice in vermiculite (30 days after sowing in pots). The nutrient content of the plants from the non-inoculated control was (mg g^{-1} of shoots): 0.32 mg of N, 0.033 mg of P and 0.64 mg of K. The values of the non-inoculated control treatment were considered equal to 100 % and used as reference for the estimative of the effect obtained with inoculation. The * above the error bar indicates a mean value significantly different from the non-inoculated control at $P > 0.05$ (Tukey's test)

plants inoculated with the isolates AC32, AG15, CA21, and CA56. For K uptake, the results obtained for all isolates plus 50 % N fertilizer were statistically significant when compared with the control (0 % N) without or with PGPR (Table 7; Table SM-3).

Discussion

Isolation and identification of putative PGP bacteria

PGPR constitute a heterogeneous and beneficial group of microorganisms that may be found in the rhizosphere, on the root surface or in association with the host plant (Lynch 1990; Bhromsiri and Bhromsiri 2010). In the present study, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* strains were the most abundant isolates recovered from roots and rhizospheric soil samples of rice. Ambrosini et al. (2012) also showed that *Enterobacter* and *Burkholderia* strains were predominant in the roots and rhizospheric soil of sunflower (*Helianthus annuus* L.), respectively. *Enterobacteria* have been found in association with a large number of plant species, such as citrus (*Citrus aurantium*, Araujo et al. 2001), maize (*Zea mays*, Hinton and Bacon 1995), wheat (*Triticum aestivum*, Joshi and Bhatt 2011), sugarcane (*Saccharum officinarum*, Magnani et al. 2010; Santi Ferrara et al. 2011), and soybean (*Glycine max*, Kuklinsky-Sobral et al. 2004). According to Coenye and Vandamme (2003), *Burkholderia* is exploited for biocontrol, bioremediation, plant growth promotion, and has been detected in tomato (*Solanum lycopersicum*, Caballero-Mellado et al. 2007), maize (Di Cello et al. 1997; Estrada et al. 2002; Reis et al. 2004), sugarcane (Brämer et al. 2001; Reis et al. 2004), freshwater sediments (Lim et al. 2008), and rice (Gillis et al. 1995). Strains belonging to the genus *Agrobacterium* were also

Table 6 The effect of the inoculation of native PGPR on the promotion of rice growth in the field assay

Treatment*	Shoot growth		Production	
	Length (cm)	Dry matter (mg)	Number of panicles (m^2)	Yield (Mg ha^{-1})
AC32 + 50 %N	71.15 (± 1.66) b	2144 (± 333) a	550.17 (± 16.24) a	9.41 (± 0.78) ab
AG15 + 50 %N	70.10 (± 4.67) b	2179 (± 365) a	542.80 (± 19.86) a	10.61 (± 1.14) ab
CA21 + 50 %N	73.00 (± 2.97) a	2177 (± 473) a	502.97 (± 69.37) a	9.66 (± 1.00) ab
CA56 + 50 %N	70.25 (± 4.16) b	2028 (± 235) ab	531.00 (± 56.38) a	9.15 (± 0.74) b
UR51 + 50 %N	71.00 (± 2.67) b	1985 (± 431) ab	595.90 (± 41.71) a	11.04 (± 0.42) a
Control 0 %N	53.00 (± 3.01) c	1699 (± 307) b	330.40 (± 54.71) b	6.28 (± 0.64) c
Control 50 %N	70.05 (± 3.62) b	1888 (± 438) ab	547.22 (± 103.10) a	9.75 (± 0.11) ab
Control 100 %N	75.25 (± 1.41) a	2133 (± 519) a	572.30 (± 55.97) a	10.93 (± 0.44) a

Data represent the means of four plots per treatment in the field assay

Values in the same column followed by the same letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test)

* AC32 (*Herbaspirillum* sp.); AG15 (*Burkholderia* sp.); CA21 (*Pseudacidovorax* sp.); CA56 (*Rhizobium* sp.); UR51 (*Azospirillum* sp.). 0, 50 %, 100 % N (percent of nitrogen fertilizer)

Table 7 The effect of the inoculation of native PGPR on the uptake of N, P and K by rice in the field assay

Treatment*	Nutrient uptake		
	Nitrogen (N) (mg g ⁻¹)	Phosphorus (P) (mg g ⁻¹)	Potassium (K) (mg g ⁻¹)
AC32 + 50 %N	23.59 (±3.65) a	6.01 (±0.93) a	38.60 (±5.98) ab
AG15 + 50 %N	21.75 (±3.69) ab	5.87 (±0.99) a	37.05 (±6.20) a
CA21 + 50 %N	21.55 (±4.67) ab	6.09 (±1.32) ab	41.37 (±8.98) ab
CA56 + 50 %N	20.28 (±2.34) ab	5.27 (±0.61) ab	36.50 (±4.22) ab
UR51 + 50 %N	19.45 (±4.22) bc	5.36 (±1.16) ab	33.75 (±7.33) bc
Control 0 %N	12.74 (±2.30) d	4.92 (±0.89) b	27.18 (±4.91) c
Control 50 %N	16.42 (±3.81) cd	4.90 (±1.13) b	32.09 (±7.44) bc
Control 100 %N	23.46 (±5.70) a	5.54 (±1.34) ab	36.27 (±8.81) ab

Data represent the means of four plots per treatment in the field assay

Values in the same column followed by the same letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test)

* AC32 (*Herbaspirillum* sp.); AG15 (*Burkholderia* sp.); CA21 (*Pseudacidovorax* sp.); CA56 (*Rhizobium* sp.); UR51 (*Azospirillum* sp.). 0, 50 %, 100 % N (percent of nitrogen fertilizer)

identified in association with rice plants in the present study. The potential benefit of *Agrobacterium* species as PGPR has been indicated (Hameed et al. 2004), and isolated from rice roots by Bhromsiri and Bhromsiri (2010).

As shown in Table 2, several other bacterial genera found in association with the roots and rhizospheric soil of rice should be noted, including *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, and *Azospirillum*. Roesch et al. (2008) analyzed the biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize, noting that *Herbaspirillum* and *Klebsiella* appeared to dominate the interior of the plant but were much rarer in soil. Many reports have also indicated that *Rhizobium* strains have the potential to be used as PGPR with non-legume plants (Vessey 2003), as, for example, with rice (Yanni and Dazzo 2010; James 2000). *Rhizobium* has been described in radishes (*Raphanus sativus*, Antoun et al. 1998), sweet potato (*Ipomoea batatas*, Reiter et al. 2003), lettuce (*Lactuca sativa*, Chabot et al. 1996), bean (*Phaseolus vulgaris*, Amarger et al. 1997), maize (Chabot et al. 1996), and the sawdust from *Populus alba* (García-Fraile et al. 2007).

Zhang et al. (2006) showed that different environmental parameters such as the content of soil organic carbon, total nitrogen and altitude could affect the diversity of soil bacteria. Soil organic matter (SOM) is the greatest storehouse and supplier of N for plant roots and microorganisms. Almost 95 % of total soil N is closely associated with SOM (Schulten and

Schnitzer 1998). The correlation between the diversity of putatively diazotrophic rhizobacteria isolates from plants and OMC can be influenced by the presence of nitrogen scavengers or oligotrophs, which can benefit of the nitrogen fixed and released by diazotrophs during culture in the N-free semi solid medium. In order to evaluate the relationships between rhizospheric bacterial diversity (H') and abiotic soil parameters was used Principal component analysis (PCA) (Fig. 2). No correlation between abiotic soil parameters and rhizospheric bacterial diversity was found at any of the sampling sites. Nogueira et al. (2006) reported that soil with higher microbial activity also exhibited higher water content. In the current study, it should be noted that other, unmeasured soil variables could also be correlated with microbial diversity, such as humidity levels and temperature.

Several studies have shown that plant genotype, root zone, plant age and plant community composition are major factors that influence the diversity of microbial communities as compared to soil (Smalla et al. 2001; Kowalchuk et al. 2002; Mitchell et al. 2010). In this work two cultivars were evaluated and no difference was found regarding rhizospheric bacterial diversity. However, the analysis of microbial diversities and communities has been well explored by diverse culture-independent methods (CIMs) (Su et al. 2012). CIMs can provide information about impact of plant species on structure and function of rhizobacteria communities (Berg and Smalla 2009). Different cultivars of

the same plant species can affect the rhizosphere microbial communities as showed by Briones et al. (2002), who found cultivar-specific differences for ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in the rhizosphere of rice by a multiphasic approach.

The PGP attributes of the bacterial isolates

In this study, the ability to produce IC and siderophores and solubilize phosphate was determined for all bacterial isolates (Table 3). PGPR may indirectly or directly influence plant growth by the production of siderophores, which are produced by aerobic bacteria and fungi growing under low iron conditions (Neilands 1995). Data indicate that the excretion of siderophores by rhizospheric bacteria may stimulate plant growth either by improving Fe nutrition to the plants (Masalha et al. 2000) or by making Fe unavailable to phytopathogens, thus protecting plant health (Ahmad et al. 2006). In the present study, 284 isolates (84 %) were able to produce siderophores, and similar numbers of siderophore-producing bacteria have been documented by other studies. Tian et al. (2009), for example, evaluated the diversity of cultivable siderophore-producing bacteria in the tobacco (*Nicotiana tabacum*) rhizosphere and found that 85 % of the 354 isolates examined produced siderophores in Fe-limited liquid medium.

Phosphate solubilizing bacteria are common in the rhizosphere, and the secretion of organic acids and phosphatases are a common method of facilitating the conversion of insoluble forms of P to plant-available forms (Kim et al. 1998). The solubilization of P in the rhizosphere is the most common mode of action implicated in PGPR to increase nutrient availability to host plants (Richardson 2001). Of our 336 isolates, only 101 (30 %) were identified as being capable of phosphate solubilization. Similarly low numbers of phosphate-solubilizing bacteria have been documented by Ambrosini et al. (2012) and Beneduzi et al. (2008).

Another important trait of PGPR that can influence plant growth is the production of IC (phytohormones). Most commonly, IC-producing PGPR are believed to increase root growth and length, resulting in greater root surface area that enables the plant to access more nutrients from the soil. IC production was the most common trait found among the isolates in the present work, as roughly 97 % of isolates displayed this ability in the presence of the precursor L-tryptophan. Our

results with regard to IC production agreed with those of Ahmad et al. (2006), who also reported that IC production was the most prevalent plant growth-promoting characteristic in the majority of their isolates.

In the present study, *Burkholderia* and *Enterobacter* strains were the most prominent among all of the isolates in displaying plant growth-promoting characteristics. Moreover, of the 336 isolates, 96 isolates were able to produce IC and siderophores and solubilize phosphates at the same time. Ahmad et al. (2006) reported that bacterial isolates could exhibit more than two or three PGP traits, which may promote plant growth directly, indirectly or even synergistically.

The growth-promoting effect of bacterial treatment on rice in a growth chamber

Rice inoculated with the bacterial isolates AC32, CA1, CA6, CA21, and CA56 (identified as *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Burkholderia* sp., *Pseudacidovorax* sp., and *Rhizobium* sp., respectively) presented significantly higher results for shoot length, dry shoot biomass, and dry root weight when compared with the uninoculated control plants (Table 5) under gnotobiotic conditions. These isolates also significantly enhanced the nutrient uptake of the rice plants (Fig. 3).

Nitrogen fixing and phosphorus-solubilizing bacteria may be important for plant nutrition by increasing N and P uptake by the plants and may play a significant role as PGPR in the biofertilization of crops (Çakmakçi et al. 2006). Rice plants inoculated with AC32, CA1, CA6, CA21, and CA56 showed high levels of N, P and K in their shoots (Fig. 3); however, these isolates were not able to solubilize phosphate in our in vitro assay and showed low capacity to reduce acetylene. These observations could indicate that growth promotion mechanisms other than nitrogen fixation, such as phytohormone production, improved nutrient uptake balance. The hormone auxin is an important regulator that directly influences plant development and growth (Jaillais and Chory 2010). The root system plays an important role in plant productivity because roots explore the soil to allow the uptake of essential nutrients (Shaharoon et al. 2008). Our results indicate that the ability to produce IC was the most likely PGP trait to contribute to the increase in plant dry mass and nutrient uptake in rice shoots, as the production of IC by the selected isolates ranged from 5.84 to 64.22 $\mu\text{g IC ml}^{-1}$ (Table 4). However, it

is not possible to explain the intrinsic network of bacterial-plant interactions based upon the above-mentioned characteristics because the effects caused by certain strains could result from either the single or the joint action of bacterial metabolites and regulators on the roots (Glick 2005; Ambrosini et al. 2012).

Although several species of PGPR have been extensively studied, little is known about the role of *Pseudacidovorax* species, a novel nitrogen-fixing beta-proteobacterium isolated from soil that was described by Kämpfer et al. (2008), in the promotion of plant growth. One of the tested strains, CA21 was identified as belonging to the genus *Pseudacidovorax*; it was found to promote significant increases in shoot length, dry shoot matter and the roots of rice under both growth chamber and field conditions (Tables 5 and 6).

Field experiment

To determine whether the growth chamber results could be achieved under field conditions, five of the selected bacterial strains were simultaneously used to promote the growth of rice plants in a field experiment. The same variety of rice was used in both experiments. The field results confirmed that PGPR treatments did indeed promote the growth of rice, increase plant height, dry shoot matter, N, P and K uptake and grain production even when the recommended amount of nitrogen fertilizer was reduced in half (Tables 6 and 7). Similar results were obtained by Biswas et al. (2000) and Yanni and Dazzo (2010) using rice inoculated with rhizobial strains; by Sasaki et al. (2010) who compared the effects of the inoculation of an *Azospirillum* strain (B510) on the growth of rice under standard and low nitrogen fertilization in paddy field conditions; and, more recently, by Duarah et al. (2011) with rice and bean inoculated with phosphate-solubilizing bacteria and by Khorshidi et al. (2011), who studied the effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum lipoferum* isolates on the yield and yield components of rice under different nitrogen levels. Altogether, these results agree with those obtained by Adesemoye et al. (2009) and support the hypothesis that single PGPR or combinations of PGPR can improve the efficient use of fertilizers, thus allowing increases in plant growth and yield.

Nitrogen, phosphorus, and potassium uptake increased significantly in PGPR-inoculated rice plants receiving half of nitrogen fertilizer (Table 7).

According to Shaharoona et al. (2008), nutrient acquisition by plants is primarily dependent on root growth and the bioavailability of nutrients in the rooting medium. The results of pot and field trials revealed that the efficacy of pseudomonad strains for improving the growth and yield of wheat decreased when increasing amounts of NPK were added to the soil; the colonization of the root of the wheat plant by PGPR might have been suppressed by the increasing levels of nutrients (NPK) in the growth medium (Shaharoona et al. 2008). In general, it is believed that PGPR are more effective in promoting plant growth under limiting nutrient conditions (De Freitas and Germida 1990; Egamberdiyeva 2007). Other studies have reported the beneficial effects of PGPR in increasing nutrient uptake by rice, including NPK uptake (Biswas et al. 2000; Vessey 2003; Adesemoye and Kloepper 2009; Adesemoye et al. 2009; Duarah et al. 2011).

Conclusions

Fertilizers are essential components of modern agriculture because they provide essential plant nutrients. However, the overuse of fertilizers can cause unanticipated environmental impacts (Adesemoye et al. 2009). Inoculation of rice with PGPR significantly enhances rice production, thus allowing for the reduced use of nitrogen fertilizers that can significantly help sustainable rice production and reduce environmental problems. The favorable effects of PGPR inoculation on plant growth, NPK uptake, and yield may be due to growth-promoting substances produced by PGPR. It can be concluded that PGPR technology should be utilized along with appropriate levels of fertilization to achieve maximum benefits in terms of fertilizer savings and better growth. The present work clearly indicates that some PGPR may be candidates for formulation as bioinoculants, including AC32 (*Herbaspirillum* sp.), AG15 (*Burkholderia* sp.), CA21 (*Pseudacidovorax* sp.), and UR51 (*Azospirillum* sp.). Furthermore, the results suggest that PGPR could be used without compromising crop yields.

Acknowledgments This work was financed by a grant and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil) and INCT da Fixação Biológica do Nitrogênio (Brasil).

References

- Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1–12. doi:10.1007/s00253-009-2196
- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58:921–929. doi:10.1007/s00248-009-9531-y
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2006) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–181. doi:10.1016/j.micres.2006.04.001
- Amarger N, Macheret V, Laguerre G (1997) *Rhizobium gallium* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol* 47:996–1006. doi:10.1099/00207713-47-4-996
- Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro FG, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356:245–264. doi:10.1007/s11104-011-1079-1
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalonde R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* 204:57–67. doi:10.1023/A:1004326910584
- Araujo WL, Maccheroni W Jr, Aguilar-Vildoso CI, Barroso PAV, Saridakis HO, Azevedo JL (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can J Microbiol* 47:229–236. doi:10.1139/cjm-47-3-229
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP (2008) Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl Soil Ecol* 39:311–320. doi:10.1016/j.apsoil.2008.01.006
- Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1–13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x
- Bhromsiri C, Bhromsiri A (2010) Isolation, screening of growth-promoting activities and diversity of Rhizobacteria from Vetiver Grass and Rice plants. *Thail J Agric Sci* 43:217–230
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB, Irbg R, Irbg B (2000) Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci Soc Am J* 64:1644–1650
- Boddey RM (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Crit Rev Plant Sci* 6:209–266
- Borges LGA, Dalla Vechia V, Corção G (2003) Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiol Ecol* 45:173–180. doi:10.1016/S0168-6496(03)00147-8
- Brämer CO, Vandamme P, Silva LF, Gomez JGC, Steinbüchel A (2001) *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1709–1713
- Briones AM, Okabe S, Umehiya Y, Ramsing N, Reichardt W, Okuyama H (2002) Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. *Appl Environ Microbiol* 68:3067–3075. doi:10.1128/AEM.68.6.3067-3075.2002
- Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(10):4801–4805. doi:10.1073/pnas.75.10.4801
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada SP, Martínez-Aguilar L (2007) The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 73:5308–5319. doi:10.1128/AEM.00324-07
- Çakmakçı R, Dönmez F, Aydın A, Şahin F (2006) Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem* 38(6):1482–1487. doi:10.1016/j.soilbio.2005.09.019
- Çakmakçı R, Erat M, Erdogan U, Donmez MF (2007) The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plant. *J Plant Nutr Soil Sci* 170:288–295. doi:10.1002/jpln.200625105
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil* 184:311–321
- Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2259–2261. doi:10.1099/ij.s.0.64915-0
- Coenye T, Vandamme P (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5:719–729. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x
- De Freitas JR, Germida JJ (1990) Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Can J Microbiol* 36:265–272
- Di Cello F, Bevivino L, Chiarini R, Fani R, Paffetti D, Tabacchioni S, Dalmastrì C (1997) Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize. *Appl Environ Microbiol* 63:4485–4493
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22:107–149
- Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília
- Duarah I, Deka M, Saikia N, Deka Boruah HP (2011) Phosphate solubilizers enhance NPK fertilizer use efficiency in rice and legume cultivation. *Biotechnol* 1:227–238. doi:10.1007/s13205-011-0028-2
- Egamberdiyeva D (2007) The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl Soil Ecol* 36:184–189. doi:10.1016/j.apsoil.2007.02.005
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* 67:5285–5293. doi:10.1128/AEM.67.11.5285-5293.2001

- Estrada P, Mavingui P, Cournoyer B, Fontaine F, Balandreau J, Caballero-Mellado J (2002) A N_2 -fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Can J Microbiol* 48:285–294. doi:10.1139/W02-023
- Farina R, Beneduzi A, Ambrosini A, Campos SB, Lisboa BB, Wendisch V, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Appl Soil Ecol* 55:44–52. doi:10.1016/j.apsoil.2011.12.011
- Felske A, Rheims H, Wokerink A, Stackebrandt E, Akkermans DL (1997) Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grasslands soils. *Microbiol* 143:2983–2989. doi:10.1099/00221287-143-9-2983
- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:1145–1152. doi:10.1007/s00253-007-1077-7
- García-Fraile P, Rivas R, Willems A, Peix A, Martens M, Martínez-Molina E, Mateos PF, Velazquez E (2007) *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:844–848. doi:10.1099/ijs.0.64680-0
- Gillis M, Van Van T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernande MP (1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N_2 -fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol* 45:274–289. doi:10.1099/00207713-45-2-274
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (1999) Biochemical and genetics mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London
- Glick BR, Pasternak JJ (2003) Plant growth promoting bacteria. In: Glick BR, Pasternak JJ (eds) Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA, 3rd. ASM Press, Washington, pp 436–454
- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251:1–7. doi:10.1016/j.femsle.2005.07.030
- Govindarajan M, Kwon SW, Weon HY (2007) Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World J Microbiol Biotechnol* 23:997–1006. doi:10.1007/s11274-006-9326-y
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37:395–412. doi:10.1016/j.soilbio.2004.08.030
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hameed S, Yasmin S, Malik KA, Zafar Y, Hafeez FY (2004) *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biol Fertil Soils* 39:179–185. doi:10.1007/s00374-003-0697-z
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis version 2.09. *Palaeontol Electron* 4(1):9
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579–598. doi:10.1007/s00248-007-9247-9
- Hinton DM, Bacon CW (1995) *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia* 129:117–125. doi:10.1007/BF01103471
- Jaillais Y, Chory J (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol* 17:642–645. doi:10.1038/nsmb0610-642
- James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res* 65:197–209. doi:10.1016/S0378-4290(99)00087-8
- Joshi P, Bhatt AB (2011) Diversity and function of plant growth promoting Rhizobacteria associated with wheat Rhizosphere in North Himalayan Region. *Int J Environ Sci* 1:1135–1143
- Kämpfer P, Thummes K, Chu HI, Tan CC, Arun AB, Chen WM, Lai WA, Shen FT, Rekha PD, Young CC (2008) *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:491–495. doi:10.1099/ijs.0.65175-0
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS, Campo RJ (2006) Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol* 32:210–220. doi:10.1016/j.apsoil.2005.06.008
- Khorshidi YR, Ardakani MR, Ramezanpour MR, Khavazi K, Zargari K (2011) Response of yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L.) to *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum lipoferum* under different nitrogen levels. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 10:387–395
- Khush G (2003) Productivity improvements in rice. *Nutr Rev* 61:114–116. doi:10.1301/nr.2003.jun.S114-S116
- Kim KY, Jordan D, McDonald GA (1998) Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol Fertil Soils* 26:79–87. doi:10.1007/s003740050347
- Kowalchuk GA, Buma DS, De Boer W, Klinkhamer PGL, Van Veen JA (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:509–520. doi:10.1023/A:1020565523615
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 6:1244–1251
- Ladha JK, Reddy PM (2003) Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospect. *Plant Soil* 252:151–167. doi:10.1023/A:1024175307238
- Lim JH, Baek SH, Lee ST (2008) *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:565–569. doi:10.1099/ijs.0.65502-0
- Lugtenberg B, Chin-A-Woeng T, Bloemberg GV (2002) Microbe plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:373–383. doi:10.1023/A:1020596903142
- Lynch JM (1990) The rhizosphere. Wiley-Interscience, Chichester, p 458

- Magnani GS, Didonet CM, Cruz LM, Picheth CF, Pedrosa FO, Souza EM (2010) Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genet Mol Res* 9:250–258. doi:10.4238/vol9-1gmr703
- Malik KA, Bilal R, Mezhnez S, Rasul G, Mirza MS, Ali S (1997) Association of nitrogen fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil* 194:37–44
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci O, Mengel K (2000) The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soils* 30:433–439. doi:10.1007/s003740050021
- Mitchell RJ, Hester AJ, Campbell CD, Chapman SJ, Cameron CM, Hewison RL, Potts JM (2010) Is vegetation composition or soil chemistry the best predictor of the soil microbial community? *Plant Soil* 333:417–430. doi:10.1007/s11104-010-0357-7
- Neilands JK (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270:26723–26726. doi:10.1074/jbc.270.45.26723
- Nogueira MA, Albino UB, Brandão-Junior O, Braun G, Cruz MF, Dias BA, Duarte RTD, Gioppo NMR, Menna P, Orlandi JM, Raimam MP, Rampazzo LGL, Santos MA, Silva MEZ, Vieira FP, Torezan JMD, Hungria M, Andrade G (2006) Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agric Ecosyst Environ* 115:237–247. doi:10.1016/j.agee.2006.01.008
- Okon Y, Labandrerá-González CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26:1591–1601. doi:10.1016/0038-0717(94)90311-5
- Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* 118:10–15. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x
- Reis VM, Estrada PS, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VLD, Schmid M, Baldani JJ, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J (2004) *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2155–2162. doi:10.1099/ijs.0.02879-0
- Reiter B, Bürgmann H, Burg K, Sessitsch A (2003) Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato. *Can J Microbiol* 49:549–555. doi:10.1139/w03-070
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust J Plant Physiol* 28:897–906. doi:10.1071/PP01093
- Rico A, Ortiz-Barredo A, Ritter E, Murillo J (2004) Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol* 96:302–310. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02156.x
- Roesch LFW, Quadros PD, Camargo FAO, Triplett EW (2007) Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1377–1383. doi:10.1007/s11274-007-9376-9
- Roesch LFW, Camargo FAO, Bento FM, Triplett EW (2008) Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil* 302:91–104. doi:10.1007/s11104-007-9458-3
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Santi Ferrara FI, Oliveira ZM, Gonzales HHS, Floh EIS, Barbosa HR (2011) Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil* 353:409–417. doi:10.1007/s11104-011-1042-1
- Sasaki K, Ikeda S, Eda S, Mitsui H, Hanzawa E, Kisara C, Kazama Y, Kushida A, Shinano T, Minamisawa K, Sat T (2010) Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *Soil Sci Plant Nutr* 56:636–644. doi:10.1111/j.1747-0765.2010.00499.x
- Schulten HR, Schnitzer M (1998) The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol Fertil Soils* 26:1–15
- Schulz B, Boyle C (2006) What are endophytes? In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds) *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin, pp 1–13
- Selosse MA, Baudoin E, Vandenkoornhuysen P (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C R Biol* 327:639–648. doi:10.1016/j.crv.2003.12.008
- Shaharoona B, Naveed M, Arshad M, Zahir ZA (2008) Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 79:147–155. doi:10.1007/s00253-008-1419-0
- Shannon CE, Weaver W (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana
- Shoebitz M, Ribaldo CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Curá JA (2009) Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 41:1768–1774. doi:10.1016/j.soilbio.2007.12.031
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot R, Heuer H, Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* 67:4742–4751. doi:10.1128/AEM.67.10.4742-4751.2001
- Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (2010) *Arroz irrigado: Recomendações técnicas para o Sul do Brasil*. Bento Gonçalves, RS: Sosbai, p 188
- Su C, Lei L, Duan Y, Zhang KQ, Yang J (2012) Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:993–1003. doi:10.1007/s00253-011-3800-7
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolution genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
- Tedesco JM, Gianelo C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ (1995) *Análises de solo, plantas e outros materiais*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882

- Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L, Du B (2009) Genetic diversity of siderophore producing bacteria of tobacco Rhizosphere. *Braz J Microbiol* 40:276–284
- Tuzun S, Kloepper JW (1994) In: Ryder MH (ed) Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. CSIRO, Adelaide, pp 104–109
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243–254. doi:10.1007/s10658-007-9165-1
- Vega NWO (2007) A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 60:3621–3643
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586. doi:10.1023/A:1026037216893
- Wartiainen I, Eriksson T, Zheng W, Rasmussen U (2008) Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Appl Soil Ecol* 39:65–75. doi:10.1016/j.apsoil.2007.11.008
- Yanni YG, Dazzo FB (2010) Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. *Plant Soil* 336:129–142. doi:10.1007/s11104-010-0454-7
- Zhang Y, Li D, Wang H, Xiao Q, Liu X (2006) Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan plateau, China. *FEMS Microbiol Lett* 260:134–142. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00317.x

Electronic supplementary material

Table SM-1. The effect of native PGPR on the growth of rice under different nitrogen fertilizer treatments with or without inoculation in the field assay.

Isolates*	Length of shoot (cm)			Dry matter of shoot (mg)		
	Percent of nitrogen fertilizer					
	0%	50%	100%	0%	50%	100%
AC32	54.85 (± 3.40) aC	71.15 (± 1.66) aB	77.75 (± 3.90) aA	1520 (± 265) aB	2144 (± 333) aA	2133 (± 420) aA
AG15	54.25 (± 4.93) abC	70.10 (± 4.67) aB	74.60 (± 6.08) aA	1468 (± 229) aB	2179 (± 365) aA	2243 (± 435) aA
CA21	53.60 (± 2.78) abB	73.00 (± 2.97) aA	74.40 (± 4.16) aA	1503 (± 314) aB	2177 (± 473) aA	2049 (± 470) aA
CA56	53.50 (± 3.18) abC	70.25 (± 4.16) aB	75.85 (± 5.00) aA	1493 (± 281) aC	2028 (± 235) aB	2370 (± 497) aA
UR51	50.80 (± 3.03) bC	71.10 (± 2.67) aA	70.05 (± 4.79) bA	1487 (± 320) aB	1985 (± 431) aA	1668 (± 523) bB
Non-inoculated	53.00 (± 3.01) abC	70.05 (± 3.62) aB	75.25 (± 1.41) aA	1699 (± 307) aB	1888 (± 438) aAB	2133 (± 519) aA

Data represent the means of four plots per treatment in the field assay.

Values in the same column followed by the same lower case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test).

Values in the same line followed by the same upper case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test).

* AC32 (*Herbaspirillum* sp.); AG15 (*Burkholderia* sp.); CA21 (*Pseudacidovorax* sp.); CA56 (*Rhizobium* sp.); UR51 (*Azospirillum* sp.).

Table SM-2. Number of panicles and rice yield under different nitrogen fertilizer treatments with or without inoculation of native PGPR in the field assay.

Isolates*	Number of panicles (m ²)			Yield (Mg ha ⁻¹)		
	Percent of nitrogen fertilizer					
	0%	50%	100%	0%	50%	100%
AC32	371.70 (± 28.50) aB	550.17 (± 16.24) aA	514.77 (± 22.78) bA	6.52 (± 0.59) aB	9.41(± 0.78) bA	10.60 (± 0.96) cA
AG15	351.05 (± 23.84) aB	542.80 (± 19.86) aA	606.22 (± 18.88) abA	5.95 (± 0.68) aB	10.61 (± 1.14) abA	10.17 (± 0.33) cA
CA21	337.77 (± 63.06) aC	502.97 (± 69.37) aB	609.17 (± 57.48) abA	6.60 (± 1.06) aC	9.66 (± 1.00) abB	12.57 (± 0.50) aA
CA56	324.50 (± 18.65) aC	531.00 (± 56.38) aB	660.80 (± 39.43) aA	6.51 (± 1.13) aC	9.15 (± 0.74) bB	12.54 (± 0.34) abA
UR51	328.92 (± 36.17) aB	595.90 (± 41.71) aA	597.37 (± 54.36) abA	6.44 (± 0.98) aB	11.04 (± 0.42) aA	11.19 (± 0.98) abcA
Non-inoculated	330.40 (± 54.71) aB	547.22 (± 103.10) aA	572.30 (± 55.97) abA	6.28 (± 0.64) aB	9.75 (± 0.11) abA	10.93 (± 0.44) bcA

Data represent the means of four plots per treatment in the field assay.

Values in the same column followed by the same lower case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test).

Values in the same line followed by the same upper case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test).

* AC32 (*Herbaspirillum* sp.); AG15 (*Burkholderia* sp.); CA21 (*Pseudacidovorax* sp.); CA56 (*Rhizobium* sp.); UR51 (*Azospirillum* sp.).

Table SM-3. Effect on N, P and K uptake per gram of rice shoot under different nitrogen fertilizer treatments with or without inoculation of native PGPR in the field assay.

Isolates*	Nitrogen (N) (mg g ⁻¹)			Phosphorus (P) (mg g ⁻¹)			Potassium (K) (mg g ⁻¹)		
	Percent of nitrogen fertilizer								
	0%	50%	100%	0%	50%	100%	0%	50%	100%
AC32	16.72 (± 2.91) aB	23.59 (± 3.65) aA	21.33 (± 4.28) bcA	4.56 (± 0.79) aB	6.01 (± 0.93) aA	5.54 (± 1.11) abA	25.84 (± 4.50) aB	38.60 (± 5.98) abA	34.12 (± 6.85) abA
AG15	16.14 (± 2.51) abB	21.75 (± 3.69) abA	21.08 (± 4.09) bcA	4.25 (± 0.66) aB	5.87 (± 0.99) abA	5.83 (± 1.13) aA	24.95 (± 3.88) aB	37.05 (± 6.20) abcA	38.13 (± 7.39) aA
CA21	13.52 (± 2.82) abcC	21.55 (± 4.67) abB	24.59 (± 5.63) abA	4.20 (± 0.88) aB	6.09 (± 1.32) aA	5.73 (± 1.31) aA	24.04 (± 5.02) aB	41.37 (± 8.98) aA	36.89 (± 8.45) abA
CA56	12.24 (± 2.30) cC	20.28 (± 2.34) abB	26.14 (± 5.46) aA	4.03 (± 0.75) aC	5.27 (± 0.61) abB	6.41 (± 1.34) aA	23.88 (± 4.48) aB	36.50 (± 4.22) abcA	38.03 (± 7.95) aA
UR51	14.87 (± 3.20) abcB	19.45 (± 4.22) bcA	18.35 (± 5.75) cA	4.01 (± 0.86) aB	5.36 (± 1.16) abA	4.67 (± 1.46) bAB	25.27 (± 5.44) aB	33.75 (± 7.33) bcA	31.70 (± 9.93) bA
Non-inoculated	12.74 (± 2.30) bcC	16.42 (± 3.81) cB	23.46 (± 5.70) abA	4.92 (± 0.89) aA	4.90 (± 1.13) bA	5.54 (± 1.34) abA	27.18 (± 4.91) aB	32.09 (± 7.44) cAB	36.26 (± 8.81) abA

Data represent the means of four plots per treatment in the field assay.

Values in the same column followed by the same lower case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test).

Values in the same line followed by the same upper case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test).

* AC32 (*Herbaspirillum* sp.); AG15 (*Burkholderia* sp.); CA21 (*Pseudacidovorax* sp.); CA56 (*Rhizobium* sp.); UR51 (*Azospirillum* sp.).

CAPÍTULO 2

Relatório descritivo de patente de invenção: Composição de biofertilizante para a promoção de crescimento e aumento de produtividade de gramíneas

RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENCÃO

COMPOSIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DE GRAMÍNEAS

Campo da Invenção

A presente invenção se situa no campo da agricultura com ênfase no manejo das interações microbianas solo-cultura. Mais especificamente, a presente invenção proporciona composição de biofertilizantes que favoreçam a promoção de crescimento e aumento de produtividade de gramíneas. Os biofertilizantes da invenção compreendem as linhagens de *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32.

Antecedentes da Invenção

Biofertilização e promoção de crescimento de plantas

A indisponibilidade de nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P), limita o crescimento da planta e seu rendimento. Dentre as várias formas de aumentar a produção vegetal, destaca-se a importância de fontes capazes de fornecer grandes quantidades de nitrogênio às plantas, entre elas a utilização de fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio. A adição de fertilizantes nitrogenados tornou-se uma prática comum na agricultura moderna, entretanto, uma grande porção do fertilizante é rapidamente perdida através da lixiviação, volatilização e desnitrificação, contribuindo para diversos desequilíbrios ambientais. Além disso, a aplicação excessiva de fertilizantes nitrogenados no cultivo de plantas leva à exaustão acelerada de outros nutrientes principais ou minoritários, levando ao desbalanço de nutrientes e a baixa fertilidade do solo. A possibilidade de aumento da produção agrícola brasileira depende da redução dos custos dessa produção e do desenvolvimento de novas tecnologias, que possibilitem um maior potencial produtivo. Biofertilizantes, incluindo micro-organismos benéficos, podem contribuir para a fertilização do solo e de plantas cultivadas através de diferentes mecanismos.

Em geral, bactérias benéficas do solo são comumente conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas, ou PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*). PGPBs podem afetar o crescimento de plantas direta ou indiretamente. A promoção indireta do crescimento de plantas ocorre quando a bactéria impede os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos. A promoção direta do crescimento de plantas, em sua maioria, proporciona à planta o contato com um composto que é

sintetizado pela bactéria ou facilita a absorção de determinados nutrientes, como N, P e ferro (Fe).

A distribuição ecológica de *Azospirillum* spp. é extremamente ampla, podendo ser considerada uma bactéria universal, encontrada colonizando plantas cultivadas em diferentes habitats. Estirpes pertencentes a este gênero têm sido encontradas em associação com gramíneas, pois combinam a capacidade de fixar nitrogênio com a grande produção de metabólitos, os quais têm a função de promover o crescimento de plantas e, conseqüentemente, aumentar a produtividade de culturas.

Herbaspirillum é uma bactéria diazotrófica isolada da rizosfera e raízes de várias plantas, incluindo arroz, milho, sorgo, trigo e cana-de-açúcar, podendo colonizar os espaços intercelulares de raízes, caules e folhas sem causar sintomas de doença. Vários estudos têm mostrado que esta bactéria pode contribuir para o crescimento vegetal, sugerindo um potencial para o uso como biofertilizante.

Enquanto múltiplas espécies de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* podem ser detectadas no solo e rizosfera, o isolamento de uma linhagem específica é fundamental. A interação de tais bactérias com plantas cultivadas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao seu potencial biotecnológico, evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilitando a redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados que são aplicados e, conseqüentemente, melhorando a conservação dos recursos ambientais.

No âmbito patentário, alguns documentos descrevem métodos de fixação de nitrogênio e de crescimento de plantas.

O documento WO 2008/097501 descreve um método para aperfeiçoar o crescimento de plantas aplicando um fertilizante para plantas, especialmente livre de hormônios e sarcosina, a fim de aumentar a biomassa da planta durante o crescimento e retardando o crescimento de fungos e bactérias. Além desse método, também é descrita uma composição para o crescimento de plantas. A presente invenção não difere desse documento por utilizar somente organismos vivos, comumente encontrados no solo.

O documento WO 2006/098225 descreve um método de construção de plantas com nódulos de elevada atividade de fixação de nitrogênio. Esse método compreende a superexpressão do gene da globina não-simbiótica. A presente invenção difere da desse documento por não utilizar superexpressão de genes, mas, sim, organismos capazes de melhorarem as condições do solo e da planta para que a mesma tenha seu crescimento aumentado.

O documento WO 2005/062899 descreve métodos e composições que fornecem efeitos agronomicamente benéficos em leguminosas e não leguminosas. Em especial, esse método compreende o uso de um fungicida e/ou um inseticida. A presente invenção difere desse documento por não necessitar de fungicida e/ou um inseticida sendo, portanto, ecologicamente correta.

O documento WO 05/110068 descreve composições e métodos para controlar a infestação de pestes compreendendo a aplicação de determinadas sequências de RNA e, adicionalmente, proteínas de *Bacillus* como agentes pesticidas. A presente invenção difere desse documento por não compreender as referidas sequências.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona um processo de promoção de crescimento e aumento de produtividade de gramíneas compreendendo a inoculação das mesmas com linhagens de *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32.

São dadas, portanto, com ênfase na promoção de crescimento e aumento de produtividade de gramíneas, as referidas etapas:

a) Isolar linhagens bacterianas associadas a lavouras de arroz de distintas localidades do Estado do Rio Grande do Sul.

b) Caracterizar diferentes habilidades promotoras de crescimento vegetal entre as bactérias isoladas a fim de que possam ser selecionadas com potencial para a produção de biofertilizante.

c) Selecionar isolados com potencial de promoção de crescimento de plantas de forma quantitativa (nº de características) e qualitativa (diferentes graus de atividade).

d) Contatar o referido isolado bacteriano selecionado com a planta de interesse, através da inoculação das sementes.

e) Determinar a capacidade de promoção de crescimento e o aumento da produtividade de plantas, através de experimentos em câmara de crescimento e em experimento a campo.

Em uma realização preferencial, o melhoramento da presente invenção compreende a modulação da fixação de nitrogênio e/ou de fatores promotores de crescimento.

É outro objeto da presente invenção, composições para biofertilizante agrícola compreendendo:

- a) O material biológico de linhagens selecionadas.
- b) Veículo aceitável e adequado para a prática agrícola.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar o escopo da mesma.

Composição de biofertilizante para a promoção de crescimento de plantas e aumento de produtividade

O método envolvendo biofertilizante que favorece a promoção de crescimento e o aumento de produtividade de gramíneas em acordo com a redução de fertilizantes nitrogenados compreende as seguintes etapas:

Linhagens de Azospirillum e Herbaspirillum

As linhagens de *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32 da presente invenção foram isoladas durante análise do solo rizosférico de cultivares de arroz de diferentes regiões, através do emprego de metodologias que favorecem o isolamento de bactérias diazotróficas.

Material Biológico

O material biológico útil na presente invenção inclui, mas não se limita aos elementos como DNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais, isolados de *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32.

Em especial, o material biológico da presente invenção compreende células portadoras das sequências da região do gene 16S ribossomal, depositadas no Genbank como as sequências de número de acesso JQ965619 para *Azospirillum* sp. UR51 e JQ965554 para *Herbaspirillum frisingense* AC32.

Material Biológico Vegetal

O material biológico útil na presente invenção inclui, mas não se limita aos elementos como DNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais, células, órgãos, tecidos vegetais, incluindo plantas e/ou sementes em formação ou completamente formadas.

Células trabalhadas

As células trabalhadas da presente invenção compreendem pelo menos um material biológico de linhagens escolhidas que compreende *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32.

Composições

As composições da presente invenção compreendem:

- a) O material biológico de linhagens selecionadas.
- b) Veículo aceitável e adequado para a prática agrícola.

Veículo aceitável e adequado para a prática agrícola

O veículo aceitável da presente invenção pode ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores aceitáveis para a prática agrícola, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimes.

Exemplo 1. Obtenção e caracterização das bactérias promotoras de crescimento vegetal

Amostragem, preparação de amostra e isolamento

Amostras do solo de rizosfera e de raízes de arroz foram coletadas a partir do mesmo cultivar de arroz (cultivar Puitá INTÁ CL) em cinco regiões de produção de arroz distintas do Estado do Rio grande do Sul, Brasil: Aceguá [AC; 31°45'11"S,

54°3'22"W], Arroio Grande [AG; 32°14'19"S, 53°5'27"W], Cachoeirinha [CA; 29°56'51.9"S, 51°06'46.3"W], Uruguaiana [U; 29°45'18"S, 57°05'16"W] e Viamão [VI; 30°04'51"S, 51°01'22"W]. Dez subamostras do solo (0-15 cm de camada) de cada área foram obtidas e misturadas para obter uma amostra representativa do solo.

O isolamento das bactérias foi feito a partir de amostras de solo rizosférico, bem como de raízes de arroz. As amostras de raiz, previamente esterilizadas, foram trituradas e foram suspensas em solução salina 0,85% a 4°C overnight, do mesmo modo, com as amostras de solo. Essas suspensões foram inoculadas em meios de cultura semisseletivos sem adição de fonte de nitrogênio, de acordo com o procedimento recomendado por Döbereiner e colaboradores (1995) para obtenção e preservação de bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento vegetal. As colônias das bactérias obtidas foram reinoculadas em meio LB e incubadas a 28°C por três dias sob agitação. A coloração de Gram foi realizada para verificar a morfologia celular e a pureza da cultura. Culturas bacterianas puras foram estocadas a 18°C em glicerol 50%.

Extração de DNA

Cada isolado bacteriano foi inoculado em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio LB, sendo posteriormente incubados por 48 h sob agitação. Um precipitado de células provenientes das culturas líquidas foi utilizado para extração de DNA total conforme protocolo de Sambrook e Russel (2001). A quantidade e a integridade do DNA foram checadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Amplificação de PCR e caracterização do gene do 16S RNAr pela técnica de RFLP

Cerca de 50 nanogramas de DNA foram usadas como molde em procedimentos de PCR. *Primers* selecionados U968 e L1401 foram usados para amplificar uma região de 450 pares de bases do gene 16S rRNA. Amplificações por PCR foram feitas conforme descrito por Souza et al. (2013).

Os produtos PCR obtidos foram diretamente usados para clivagem com enzimas de restrição (HaeIII e MspI, Promega). Digestões foram realizadas durante a noite para permitir a fragmentação completa. DNAs digeridos foram analisados em gel de poliacrilamida 10% corados com prata. As condições de eletroforese foram 8 h a 90 V em tampão 1x Tris-borato-EDTA, seguido por 30 min de coloração com nitrato de prata (Sambrook e Russel 2001). A informação total do perfil de restrição obtido foi usada

para distinguir cada isolado. A análise estatística e a construção de dendogramas foram executados usando o pacote NTSYS-PC, com 1 marcando a presença e 0 marcando a ausência da banda, usando o coeficiente de Jaccard. O algoritmo UPGMA (média matemática de grupos de pares sem peso) foi usado para realizar a análise de cluster hierárquico.

Os fragmentos obtidos foram sequenciados no laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, no sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados de sequencia EzTaxon-e (eztaxon-e.ezbiocloud.net). A sequência foi depositada no GenBank sob o número de acesso JQ965619 para *Azospirillum* sp. UR51 e JQ965554 para *Herbaspirillum frisingense* AC32.

Produção de compostos indólicos in vitro

Cada isolado foi crescido em meio LB a 28°C sob agitação por 48 h. Densidade óptica foi usada para controlar o tamanho do inóculo (10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹). Inóculos foram transferidos (100 µl) para meio KB o qual, de acordo com Glickmann e Dessaux (1995), é o meio usado para quantificar a produção de compostos indólicos. Esse método faz uso do reagente Salkowski (12 g L⁻¹ FeCL₃ + 7,9 M H₂SO₄), e foi usado para quantificar a produção de ácido indol-acético (AIA), ácido indol-pirúvico (IPyA) e indol-acetamida (IAM), os quais serão aqui referidos neste texto coletivamente como compostos indólicos.

Produção de Sideróforo in vitro

Amostras bacterianas simples foram analisadas pela sua capacidade de produção de sideróforo em placas de Petri contendo meio KB suplementado com um complexo cromo-azurol S (CAS/ferro(III)/brometo de amônio hexadeciltrimetil), como descrito por Schwyn e Neilands (1987). Bactérias que foram capazes de produzir sideróforos cresceram e formaram um halo amarelo ao redor da bactéria.

Solubilização do fosfato tricálcio in vitro

O método descrito por Sylvester-Bradley et al. (1982) foi usado para identificar os isolados com habilidade para solubilizar fosfato tricálcio. O meio contém fosfato de cálcio insolúvel que faz o meio opaco. Os isolados que formaram halos claramente

visíveis ao redor de suas colônias foram considerados como solubilizadores de fosfato tricálcio.

Atividade de ACC deaminase in vitro

A atividade de ACC deaminase foi avaliada através da capacidade dos isolados em utilizar o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como fonte de nitrogênio. Para tanto foi utilizado o procedimento descrito por Penrose e Glick (2003). As suspensões bacterianas foram lavadas três vezes em solução salina estéril. As bactérias foram inoculadas em placas contendo 25 mL de meio DF salt com ACC (0,5 M). As placas inoculadas sem ACC foram utilizados como controle negativo. Todas as placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias e examinadas diariamente. Bactérias que foram capazes de crescer em meio com ACC são consideradas positivas para a atividade ACC deaminase.

Ensaio biológico de fixação de nitrogênio in vitro

Os isolados foram crescidos em meio LB. Densidade óptica foi utilizada para controlar o tamanho do inóculo (10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹). Inóculos foram transferidos (100 µl) para meio livre de N e a quantidade de fixação biológica *in vitro* foi medida pela técnica de redução de acetileno, como descrito por Boddey (1987).

Experimentos de promoção de crescimento de arroz em câmara de crescimento

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com um foto-período de 14 horas de luz a 28°C e 10 h de escuro a 20°C. Sementes de arroz (cultivar Puitá INTÁ CL) foram desinfetadas lavando-as em 70% de etanol por 1 min, seguido de uma lavagem de 5 min com hipoclorito de sódio (4% v/v) contendo três gotas de Tween 80 e, finalmente, cinco lavagens em água destilada esterilizada. Sementes foram plantadas 2 cm abaixo da superfície de vermiculita esterilizada em copos (15 x 20 cm) e imediatamente inoculada com diferentes isolados. Os isolados bacterianos foram cultivados em meio LB, com agitação (125 rpm) durante 48 h a 28°C, e as culturas bacterianas puras foram centrifugadas e diluídas até uma concentração final de 10^8 UFC mL⁻¹ em solução salina estéril.

As sementes foram inoculadas com 2 mL de alíquotas de suspensão de células diretamente no substrato. Os tratamentos foram como se segue: (a) AC32, (b) UR51 e (c) controle não inoculado. Todos os tratamentos foram tratados uma vez com solução

nutritiva de Hoagland de acordo com Ambrosini et al. (2012). O experimento consistiu de dezesseis repetições por tratamento e inteiramente casualizado. As plantas foram irrigadas a cada 2 dias com água destilada. O experimento foi mantido por 30 dias após a emergência, os quais vários parâmetros foram avaliados: comprimento, matéria seca de parte aérea e raiz e conteúdo de N, P, K a partir de matéria seca das folhas (Tedesco et al., 1995). Os dados foram analisados usando análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P = 0,05\%$).

Ensaio de promoção de crescimento de arroz em experimento a campo

O experimento de campo foi realizado em Cachoeira do Sul [CS, 30°02'20 "S, 52°53'38" W, RS, Brasil]. Cada isolado (AC32, UR51) foi crescido em meio LB com agitação (125 rpm) durante 48 h a 28°C a uma concentração final de 10^8 UFC mL⁻¹. Sementes de arroz (cultivar Puitá INTA CL) foram inoculadas com cada suspensão bacteriana por 30 min à temperatura ambiente. Sementes do tratamento controle foram tratadas da mesma maneira, com meio LB não inoculado. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro parcelas por tratamento. As unidades experimentais foram de 1,5 x 5 m, com 1 m de distanciamento entre as parcelas. O experimento consistiu nos seguintes tratamentos: (1) ausência de fertilizante nitrogenado com e sem inoculação, (2) de nitrogênio mineral fornecido na dose recomendada para a cultura (120 kg de ureia ha⁻¹), com e sem inoculação, e (3) a metade da dose recomendada de nitrogênio mineral (60 kg de ureia ha⁻¹), com e sem inoculação. As aplicações de ureia foram feitas em duas aplicações, sendo 50% no plantio e 50% na floração. Os parâmetros avaliados foram altura da planta, matéria seca da parte aérea na fase de enchimento de grãos, conteúdo de nutrientes (N, P, K), número de panículas m⁻², e rendimento de grãos. Os dados foram analisados usando análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P = 0,05\%$).

Produção de biofertilizante

A produção dos biofertilizantes contendo a linhagem de *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32 foi realizada na sede da empresa Bioagro Indústria e Comércio Agropecuário Ltda, localizada em Santa Maria, através da tecnologia de fermentação.

Os meios de cultura utilizados para reativar as ampolas foram os indicados para cada bactéria pelo protocolo conforme Relare (2007). As ampolas foram reativadas em

câmara de fluxo laminar e repicadas com auxílio de alça de platina, por estriamento, para placas de Petri contendo os meios de cultura agarizados, e também para tubos de ensaio contendo os meios de cultura líquidos. O material foi levado à estufa de crescimento a 28°C durante três dias.

O caldo formulado utilizado para o crescimento das bactérias foi composto por K_2HPO_4 0,80 g L⁻¹, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,50 g L⁻¹, NaCl 0,10 g L⁻¹, extrato de levedura 2,0 g L⁻¹, PVP-K30 20,0 g L⁻¹, CaCl 0,14 g L⁻¹, $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ 8,4 mL L⁻¹, NH_4Cl 0,60 mL L⁻¹, NaOH 0,16 mL L⁻¹ e glicerol 12,0 mL L⁻¹, em pH 6,8. O caldo foi armazenado em garrafão de vidro com bocal fechado com bucha de algodão e esterilizado em autoclave a 121°C e 45 minutos. Após 24 horas, o caldo foi inoculado e colocado no ar estéril através de bico injetor conectado, por uma mangueira de silicone, ao garrafão, durante três dias.

Após três dias de crescimento, o caldo foi injetado, assepticamente em câmara de fluxo laminar, através de seringa hipodérmica de vidro estéril em embalagem de polipropileno contendo 110 g de turfa estéril. O orifício feito pela injeção foi fechado com fita adesiva. O volume de caldo injetado foi de 140 mL, totalizando 250 g de produto final, à concentração celular na casa de 10⁸ células/g, com validade de seis meses.

Ensaio de promoção de crescimento de arroz em experimento a campo

O experimento a campo foi realizado nas dependências do Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA), nos municípios de Cachoeira do Sul e Camaquã, RS. A análise do solo foi realizada para caracterização química e física do solo e parâmetros como pH, quantidade de argila, matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes minerais foram analisados. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com quatro repetições, com 1 m de distanciamento entre as parcelas. As unidades experimentais foram de 6,5 x 5 m, com espaçamento entre linhas de 17 cm. O experimento consistiu nos seguintes tratamentos: (1) ausência de fertilizante nitrogenado com e sem inoculação, (2) de nitrogênio mineral fornecido na dose recomendada para a cultura (120 kg de ureia ha⁻¹), com e sem inoculação, e (3) a metade da dose recomendada de nitrogênio mineral (60 kg de ureia ha⁻¹), com e sem inoculação. As aplicações de ureia foram feitas em duas aplicações, sendo 50% no plantio e 50% na floração. O biofertilizante obtido foi utilizado para biofertilização de sementes de arroz

e da adição de 400 g de biofertilizante (10^8 células g^{-1}) para 50 kg de sementes, cultivar Puitá INTA CL.

Amostras de parte aérea foram colhidas de cinco plantas de cada parcela para a determinação de nutrientes (N, P, K) (Tedesco et al., 1995). Outros parâmetros avaliados como altura da planta, matéria seca da parte aérea na fase de enchimento de grãos, número de panículas m^{-2} , e rendimento de grãos foram determinados. Os dados foram analisados usando análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P = 0,05\%$).

Promoção de crescimento de arroz por Azospirillum sp. UR51 e Herbaspirillum sp. AC32

Na presente invenção, as linhagens UR51 e AC32 foram identificadas como pertencentes à espécie e/ou gênero de *Azospirillum* e *Herbaspirillum frisingense*, respectivamente. Os isolados mostraram habilidades promotoras de crescimento vegetal. Dentro das características promotoras de crescimento vegetal, avaliadas em Souza et al. (2013), o isolado AC32 apresentou produção de compostos indólicos e sideróforos, bem como habilidade de fixação de nitrogênio. O isolado UR51 apresentou produção de compostos indólicos e sideróforos, bem como habilidade de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato.

No experimento em câmara de crescimento estes isolados utilizados para a inoculação de arroz resultaram em satisfatórios efeitos sobre o crescimento (Tabela 1). Estas bactérias também estimularam a captação de nutrientes (N, P, K), variando entre 110% e 170% de aumento em relação ao controle não inoculado.

Para confirmar os resultados obtidos na câmara de crescimento, um experimento de campo foi realizado com as linhagens de *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32 sob diferentes quantidades de fertilizante nitrogenado (0%, 50%, e 100% da dose de ureia) (Tabelas 2 e 3). Sementes inoculadas com a linhagem AC32 + 50% N apresentaram os mesmos resultados que o controle 100% N, em termos de biomassa seca da parte aérea e conteúdos de N, P, K.

Em relação à produção de grãos e conteúdo de P nas folhas, a linhagem UR51 + 50% N foi estatisticamente semelhante ao resultado obtido com o controle 100% N. Em síntese, os dados mostraram que as plantas de arroz atingiram bom crescimento e maior produtividade quando inoculadas com 50% da dose de ureia e as linhagens de *Herbaspirillum frisingense* AC32 e *Azospirillum* sp. UR51, respectivamente, indicando

o potencial destas linhagens em promover o crescimento de plantas de arroz, juntamente com a redução no uso de fertilizantes nitrogenados.

Logo, estas linhagens foram encaminhadas para a tecnologia de produção de biofertilizante.

Tabela 1: Efeito da inoculação das linhagens de bactérias AC32 e UR51 na promoção do crescimento do arroz em câmara de crescimento.

Tratamento*	Crescimento de parte aérea		Crescimento de raiz	
	Comprimento (cm)	Matéria Seca (mg)	Comprimento (cm)	Matéria Seca (mg)
AC32	26,23 (\pm 1,75) a	54,50 (\pm 6,44) a	23,22 (\pm 3,67) ab	35,3 (\pm 5,54) a
UR51	23,53 (\pm 2,40) b	51,3 3 (\pm 8,46) ab	24,83 (\pm 2,19) a	35,6 (\pm 4,30) a
Controle	20,38 (\pm 0,99) c	33,70 (\pm 4,84) c	20,76 (\pm 3,60) b	23,2 (\pm 3,52) b

Os dados representam as médias (\pm DP) de dezesseis repetições de plantas cultivadas em vermiculita estéril em uma câmara de crescimento.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em $P > 0,05$ (teste de Tukey).

* AC32 (*Herbaspirillum frisingense*); UR51 (*Azospirillum* sp.).

Tabela 2: Efeito da inoculação das linhagens de bactérias AC32 e UR51 na promoção do crescimento do arroz em experimento a campo (Cachoeira do Sul, RS).

Tratamento*	Crescimento de parte aérea		Produção	
	Comprimento (cm)	Matéria Seca (mg)	Número de panículas (m^{-2})	Rendimento (Mg ha^{-1})
AC32 + 50% N	71,15 (\pm 1,66) b	2144 (\pm 333) a	550,17 (\pm 16,24) a	9,41 (\pm 0,78) ab
UR51 + 50% N	71,00 (\pm 2,67) b	1985 (\pm 431) ab	595,90 (\pm 41,71) a	11,04 (\pm 0,42) a
Controle 0% N	53,00 (\pm 3,01) c	1699 (\pm 307) b	330,40 (\pm 54,71) b	6,28 (\pm 0,64) c
Controle 50% N	70,05 (\pm 3,62) b	1888 (\pm 438) ab	547,22 (\pm 103,1) a	9,75 (\pm 0,11) ab
Controle 100% N	75,25 (\pm 1,41) a	2133 (\pm 519) a	572,30 (\pm 55,97) a	10,93 (\pm 0,44) a

Os dados representam as médias (\pm DP) de quatro parcelas por tratamento em experimento a campo.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em $P > 0,05$ (teste de Tukey).

* AC32 (*Herbaspirillum frisingense*); UR51 (*Azospirillum* sp.). 0%, 50%, 100% N (% de fertilizante nitrogenado).

Tabela 3: Efeito da inoculação das linhagens AC32 e UR51 no conteúdo de N, P, K nas folhas de arroz em experimento a campo (Cachoeira do Sul, RS).

Tratamento	Teor de nutrientes		
	Nitrogênio ($mg\ g^{-1}$)	Fósforo ($mg\ g^{-1}$)	Potássio ($mg\ g^{-1}$)
AC32 + 50% N	23,59 (\pm 3,65) a	6,01 (\pm 0,93) a	38,60 (\pm 5,98) a
UR51 + 50% N	19,45 (\pm 4,22) bc	5,36 (\pm 1,16) ab	33,75 (\pm 7,33) bc
Controle 0% N	12,74 (\pm 2,30) d	4,92 (\pm 0,89) b	27,18 (\pm 4,91) c
Controle 50% N	16,42 (\pm 3,81) cd	4,90 (\pm 1,13) b	32,09 (\pm 7,44) bc
Controle 100% N	23,46 (\pm 5,70) a	5,54 (\pm 1,34) ab	36,27 (\pm 8,81) ab

Os dados representam as médias (\pm DP) de quatro parcelas por tratamento em experimento a campo.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em $P > 0,05$ (teste de Tukey).

* AC32 (*Herbaspirillum frisingense*); UR51 (*Azospirillum* sp.). 0%, 50%, 100% N (% de fertilizante nitrogenado).

Biofertilização de Azospirillum sp. UR51 e Herbaspirillum frisingense AC32 na promoção de crescimento de arroz

Na presente invenção, a biofertilização a campo com as linhagens de *Azospirillum sp. UR51* e *Herbaspirillum frisingense AC32* e 50% da dose de N apresentaram resultados tão positivos quanto o controle que recebeu o total da dose recomendada de N para o cultivo de arroz.

Em Cachoeira do Sul (Tabela 4), a massa seca das plantas biofertilizadas com UR51 + 50% N significativamente superou aos tratamentos que receberam apenas adubação nitrogenada. O número de panículas foi significativamente maior nos tratamentos que receberam maior dose de adubação nitrogenada. Quanto ao rendimento de grãos, foram observados valores significativamente mais altos nos tratamentos que receberam adubação nitrogenada, mas não houve diferença estatística entre as doses, embora a produção tenha sido mais alta para AC32 + 50% N.

Quando comparado com o tratamento que recebeu a metade da dose de ureia (controle 50% N), o teor de N nas folhas foi significativamente mais alto na presença das bactérias. Além disso, a presença *Azospirillum sp. UR51* com a metade da dose de fertilizante nitrogenado (50% N) também estimulou a captação de K (Tabela 5).

Para o tratamento sem N (controle 0% N) todos os parâmetros analisados apresentam resultados inferiores quanto ao crescimento de plantas de arroz (Tabela 5).

Tabela 4: Efeito dos biofertilizantes a base de AC32 e UR51 na promoção do crescimento do arroz em experimento a campo (Cachoeira do Sul, RS).

Tratamento	Crescimento de parte aérea		Produção	
	Estatura (cm)	Matéria Seca (mg)	Número de panículas (m ²)	Rendimento (Mg ha ⁻¹)
AC32 + 50% N	99,95 (± 5,28) b	2380 (± 330) ab	544,27 (± 73,43) ab	9,54 (± 0,74) a
UR51 + 50% N	97,65 (± 4,17) b	2530 (± 400) a	544,25 (± 85,69) ab	9,02 (± 0,65) a
Controle 0% N	81,90 (± 2,69) c	2060 (± 490) b	402,65 (± 65,06) b	6,41 (± 1,27) b
Controle 50% N	99,60 (± 4,11) b	2240 (± 310) ab	525,10 (± 70,14) ab	9,10 (± 1,20) a
Controle 100% N	105,0 (± 3,48) a	2400 (± 470) ab	578,20 (± 46,21) a	9,22 (± 0,51) a

Os dados representam as médias (± DP) de quatro parcelas por tratamento em experimento a campo.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em $P > 0,05$ (teste de Tukey).

* AC32 (*Herbaspirillum frisingense*); UR51 (*Azospirillum sp.*). 0%, 50%, 100% N (% de fertilizante nitrogenado).

Tabela 5: Efeito dos biofertilizantes a base de AC32 e UR51 no conteúdo de N, P, K nas folhas de arroz em experimento a campo (Cachoeira do Sul, RS).

Tratamento	Nitrogênio (mg g ⁻¹)	Fósforo (mg g ⁻¹)	Potássio (mg g ⁻¹)
AC32 + 50% N	10,67 (± 3,29) a	3,93 (± 0,60) a	49,23 (± 6,99) ab
UR51 + 50% N	11,41 (± 2,45) a	3,53 (± 1,22) ab	56,88 (± 14,50) a
Controle 0% N	7,77 (± 2,07) b	3,01 (± 1,05) b	47,41 (± 13,01) b
Controle 50% N	8,06 (± 1,00) b	3,82 (± 0,58) a	49,99 (± 8,16) ab
Controle 100% N	9,64 (± 2,22) ab	3,80 (± 0,84) a	58,62,41 (± 16,04) a

Os dados representam as médias (± DP) de quatro parcelas por tratamento em experimento a campo.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em $P > 0,05$ (teste de Tukey).

* AC32 (*Herbaspirillum frisingense*); UR51 (*Azospirillum* sp.). 0%, 50%, 100% N (% de fertilizante nitrogenado).

No experimento a campo realizado em Camaquã foi observado que a maioria dos parâmetros analisados foi significativamente melhor no tratamento que recebeu a totalidade da dose de adubação nitrogenada (100% N) (Tabela 6).

Sementes inoculadas com a linhagem UR51 + 50% N apresentaram os mesmos resultados que o controle 100% N, em termos de número de panículas. Em relação ao rendimento de grãos, os resultados são de difícil interpretação, embora os valores com a presença das bactérias tenham sido estatisticamente maiores do que o controle 50% N, com valores próximos ao controle 100%N.

Adicionalmente, o teor de N nas folhas foi significativamente mais alto na presença da bactéria AC32 com a metade da dose de fertilizante, em relação ao controle 50% N. Quando comparado com o controle 100% N, os valores foram estatisticamente iguais (Tabela 7).

Tabela 6: Efeito dos biofertilizantes a base de AC32 e UR51 na promoção do crescimento do arroz em experimento a campo (Camaquã, RS).

Tratamento	Crescimento de parte aérea		Produção	
	Estatura (cm)	Matéria Seca (mg)	Número de panículas (m ⁻²)	Rendimento (Mg ha ⁻¹)
AC32 + 50% N	76,15 (± 3,87) b	9580 (± 3720) ab	554,60 (± 52,1) bc	7,06 (± 1,10) ab
UR51 + 50% N	77,10 (± 2,65) b	8250 (± 2225) b	597,75 (± 40,0) ab	7,54 (± 0,50) ab
Controle 0% N	71,55 (± 3,92) c	6800 (± 3640) b	436,72 (± 33,1) c	5,91 (± 0,50) b
Controle 50% N	78,45 (± 3,48) b	7860 (± 1260) b	550,17 (± 74,8) bc	6,88 (± 0,90) b
Controle 100% N	83,30 (± 2,39) a	11020 (± 3070) a	682,92 (± 73,8) a	8,64 (± 0,60) a

Os dados representam as médias (± DP) de quatro parcelas por tratamento em experimento a campo.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em $P > 0,05$ (teste de Tukey).

* AC32 (*Herbaspirillum frisingense*); UR51 (*Azospirillum* sp.). 0%, 50%, 100% N (% de fertilizante nitrogenado).

Tabela 7: Efeito dos biofertilizantes a base de AC32 e UR51 no conteúdo de N, P, K nas folhas de arroz em experimento a campo (Camaquã, RS).

Tratamento	Nitrogênio (mg g ⁻¹)	Fósforo (mg g ⁻¹)	Potássio (mg g ⁻¹)
AC32 + 50% N	43,84 (± 15,27) a	11,94 (± 3,96) a	158,85 (± 64,05) ab
UR51 + 50% N	33,07 (± 8,10) b	10,86 (± 3,90) a	134,97 (± 41,11) b
Controle 0% N	31,44 (± 17,66) b	10,49 (± 5,28) a	137,01 (± 72,01) b
Controle 50% N	35,05 (± 7,90) b	11,92 (± 3,09) a	143,65 (± 24,28) ab
Controle 100% N	45,10 (± 7,91) a	14,80 (± 3,95) a	209,64 (± 88,26) a

Os dados representam as médias (± DP) de quatro parcelas por tratamento em experimento a campo.

Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em $P > 0,05$ (teste de Tukey).

* AC32 (*Herbaspirillum frisingense*); UR51 (*Azospirillum* sp.). 0%, 50%, 100% N (% de fertilizante nitrogenado).

Os experimentos de biofertilização foram executados de acordo com as normas recomendadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) através do anexo à IN SDA 13, de 25/03/2011 (Requisitos mínimos para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, produtos e tecnologias relacionados a micro-organismos promotores de crescimento vegetal). De acordo com as normas, as avaliações de campo deverão ser conduzidas em, pelo menos, dois locais em condições edafoclimáticas distintas, tecnicamente adequadas à cultura, por no mínimo duas safras agrícolas.

Na presente invenção, os experimentos a campo foram realizados em duas regiões com condições edafoclimáticas distintas: Cachoeira do Sul e Camaquã, RS. No entanto, é importante ressaltar que experimentos adicionais a campo devem ser realizados para confirmar a potencialidade dos isolados na promoção de crescimento e aumento da produtividade no cultivo de arroz.

Reivindicações

COMPOSIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DE GRAMÍNEAS

1. Composição de biofertilizante à base de *Azospirillum* sp. UR51 e/ou *Herbaspirillum frisingense* AC32, que favoreçam a promoção de crescimento e aumento de produtividade de gramíneas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida composição biofertilizante modula a fixação de nitrogênio e/ou de fatores promotores de crescimento.

3. Composição biofertilizante caracterizada por compreender:

a) pelo menos um material biológico de espécies e/ou linhagens escolhidas que compreende *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32.

b) veículo agriculturalmente aceitável.

Resumo

COMPOSIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DE GRAMÍNEAS

A presente invenção descreve a composição de biofertilizante à base de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Na maioria dos resultados, os biofertilizantes da presente invenção mostraram eficiência no processo de promoção de crescimento e aumento de produtividade de arroz quando a dose de fertilizante nitrogenado foi reduzida. Os biofertilizantes da presente invenção compreendem as linhagens de *Azospirillum* sp. UR51 e *Herbaspirillum frisingense* AC32. Os dados apresentados aqui se encontram parcialmente publicados em Souza et al. (2013), no entanto, experimentos adicionais a campo serão necessários.

Referências bibliográficas

Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro FG, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Soil 356:245-264.

Boddey RM (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. Crit Rev Plant Sci 6:209-266.

Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília.

Glickmann E, Dessaux Y (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski Reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol 61:793-796.

Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth promoting rhizobacteria. Physiol Plant 118:10-15.

RELARE - Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas leguminosas. In.: Reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola. *Anais*. 2007. Londrina, PR. Embrapa Soja, 2007.

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 106:47-56.

Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R, Passaglia LMP (2012). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. Plant and Soil 366:585-603.

Sylvester-Bradley R, Asakawa N, La Torraca S, Magalhães FMM, Oliveira L, Pereira RM (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. Acta Amazônica 12:15-22.

Tedesco JM, Gianelo C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ (1995) Análises de solo, plantas e outros materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAPÍTULO 3

Diversity and evaluation of plant growth promoting activities of bacterial communities associated with rice cropped in iron stressed soils

Artigo submetido para publicação na revista *Biology and Fertility of Soils*

Diversity and evaluation of plant growth promoting activities of bacterial communities associated with rice cropped in iron stressed soils

Rocheli de Souza^a, Jacqueline Meyer^a, Rodrigo Schoenfeld^b, Pedro Beschoren da Costa^a, Luciane M. P. Passaglia^{a,*}

^a Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), Avenida Bonifácio Carvalho Bernardes 1494, 94930-030, Cachoeirinha, RS, Brasil.

*Corresponding author at Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, Prédio 43312, sala 207b, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brasil. Tel.: +55 51 3308 9813; Fax +55 51 3308 7311. E-mail address: luciane.passaglia@ufrgs.br (L. M. P. Passaglia)

E-mail addresses: Rocheli de Souza: rochelisouza@yahoo.com.br; Jacqueline Meyer jacque_meyer@hotmail.com; Rodrigo Schoenfeld: rodrigoschoenfeld@yahoo.com.br; Pedro B. da Costa: pedro201@gmail.com; Luciane Passaglia: luciane.passaglia@ufrgs.br.

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can promote plant growth using a wide variety of mechanisms as well as provide bioprotection against biotic and abiotic stresses. The objectives of this study were to isolate and characterize putative PGPR associated with rice cultivars with a distinct tolerance to iron toxicity grown in two areas: one with a well-established history of iron toxicity and another without iron toxicity. Bacterial strains were selectively isolated based on their growth in selective media and were identified by partial sequencing of their 16S rRNA genes. Bacterial isolates were evaluated for their ability to produce indolic compounds, siderophores, ACC deaminase, and solubilize tricalcium phosphates. *In vitro* biological nitrogen fixation was evaluated for bacterial isolates used in the inoculation experiments. A total

of 329 bacterial strains were isolated. The composition of the bacterial genera and the occurrence of different plant growth-promoting (PGP) traits were significantly affected by the iron conditions and by the cultivar. Strains belonging to the *Burkholderia* and *Enterobacter* genera were the most abundant of all the Gram negative isolates. The *Paenibacillus* and *Bacillus* genera were the most abundant of the Gram positive isolates. A large number of putative PGPR belonging to different bacterial genera presented several PGP traits. Strains belonging to *Burkholderia* sp., *Chryseobacterium* sp., *Ochrobactrum* sp., and *Paenibacillus* sp. genera presented the potential to interact positively with rice plants concerning plant growth and nutrient uptake in different iron conditions. Plants inoculated with FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*) in the presence of iron excess presented growth similar to control conditions, indicating that this bacterium as the most promising PGP isolate.

Keywords: PGPR; PGP traits, rice; iron toxicity; plant growth.

1. Introduction

The plant rhizosphere, which is the narrow zone of soil influenced by the roots, is a multidimensional and dynamic ecological environment of diverse microbe-plant interactions. Root-colonizing plant beneficial bacteria, commonly referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), are rhizospheric bacteria that can enhance plant growth using a wide variety of direct and indirect mechanisms (Glick, 2012). The favorable effects of PGPR inoculation on plant growth have been extensively reported (Ambrosini et al., 2012; Arruda et al., 2013; Glick, 2012; Sasaki et al., 2010).

Currently, the role of benefic microorganisms in the management of abiotic stresses is gaining great significance because plant-associated microorganisms, including rhizoplane and endophytic rhizobacteria and symbiotic fungi, can play an important role in conferring tolerance to these stresses (Grover et al., 2011). Several studies addressing the positive effects of bacterial strains in plants grown under abiotic stress have been conducted, demonstrating, for example, the enhancement of salt tolerance in rice (Bal et al., 2013), the enhancement of tolerance to high temperatures in sorghum seedlings (Ali et al., 2009), and mitigation of the negative effects of drought in the common bean (Figueiredo et al., 2008). Moreover, the subject of PGPR eliciting tolerance to abiotic stresses has also been reviewed recently in other works (Dimkpa et al., 2009a; Grover et al., 2011).

Iron (Fe) is an essential micronutrient for plants. It is required in large abundance, as it is involved in various important biological processes, such as photosynthesis, respiration, chlorophyll biosynthesis (Kobayashi and Nishizawa, 2012), and biological nitrogen fixation (Dixon and Kahn, 2004). In aerobic conditions, the solubility of iron is very low due to the predominance of ferric (Fe^{3+}) ions usually found as oxihydroxide polymers, limiting the Fe supply for plant uptake, especially in calcareous soils (Andrews et al., 2003; Lemanceau et al., 2009). In anaerobic and acid soils, high concentrations of ferrous (Fe^{2+}) ions generated by the reduction of iron oxides (Fe^{3+}) in flooded soils may lead to iron toxicity due to excessive Fe uptake (Stein et al., 2009). However, when absorbed in high concentrations by plants, it can generate oxidative stress (Stein et al., 2009). Iron toxicity is well-recognized as the most widely distributed nutritional disorder in lowland-rice production (Dobermann and Fairhurst, 2000). Rice genotypes differ widely in their tolerance to iron toxicity. Susceptible cultivars of rice plants grown in fields with high iron concentrations showed lower levels of chlorophylls and soluble proteins and possessed higher levels of carbonyls, indicating oxidative damage (Stein et al., 2009). The excess of iron was also shown to inhibit plant growth and caused a decrease in productivity.

As previously mentioned, some research has shown that inoculation with PGPR can alleviate abiotic stress effects in different plant species. However, there are no studies concerning the rhizospheric microbial diversity associated with rice cropped in iron toxicity conditions and none focusing on the contribution of PGPR in alleviating iron toxicity effects while promoting plant growth. It would be interesting to know if the excess of iron interferes with the interaction between these microorganisms and the host plant (rice in this work), as well with the PGP traits. Because the selection of microbial strains that exhibit the capability to stimulate plant growth under abiotic stress depends on traditional culture-based methods (Ambrosini et al., 2012), the aims of this work were to (i) assess the diversity of putative PGPR strains associated with rhizospheric soil and roots of rice plants cropped in a field with a history of iron toxicity; (ii) evaluate several plant growth promotion (PGP) activities of bacterial isolates, and (iii) test some of these bacteria for their ability to promote plant growth in different iron conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling and processing

Plants from two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars displaying different levels of tolerance to iron toxicity [BR-IRGA 409 (susceptible) and IRGA 420 (tolerant) (Bacha and Ishiy, 1986)] and the rhizospheric soil associated with them were collected from two regions in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: Camaquã (30°54'07.96"S, 51°51'26.25"W), which has a well-documented history of iron toxicity, and Cachoeirinha (29°56'51.91"S, 51°06'46.36"W), which was used as a control (it does not have an excess of iron); all samples were collected in December, 2010. Plants from the susceptible cultivar showed typical symptoms of iron toxicity (such as discoloration of leaves and necrosis in older leaves) only when grown at the iron-toxic site (Camaquã). Ten samples (0.5 kg each) of fresh weight soils were collected from each site down to a depth of 15 cm and were combined to obtain a representative composite sample. Three sub-samples (0.5 kg fresh weight) of soil from each site were analyzed for pH, clay, P, K, Fe, exchangeable Al, Ca, Mg, and organic matter (OM) contents using standard methods (Tedesco et al., 1995; Table 1).

2.2. Isolation of putative diazotrophic root and rhizospheric bacteria

Rhizospheric and root-associated bacteria were isolated from five independent plants with adhering (rhizospheric) soil that were spaced at least 2 m away from each other. Samples were randomly taken and bulked to obtain a representative composite sample. Bacteria from each sampling site were isolated according to Döbereiner (1988), using the nitrogen-free semi-solid NFb, LGI, and LGI-P media, with the modifications described by Ambrosini et al. (2012) and Souza et al. (2013). Bacilli and other Gram positive bacteria were isolated according to Seldin et al. (1983) with the modifications described by Beneduzi et al. (2008), except that only rhizospheric soil was used for the bacterial isolation. These bacterial isolates were individually analyzed by Gram-staining and immediately stored in sterile glycerol solution (50%) at -20°C.

2.3. Extraction of bacterial DNA

Bacterial DNA extraction was performed according to Ambrosini et al. (2012) and Souza et al. (2013). Phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation were performed as described by Sambrook and Russel (2001). The quality and integrity of the DNA were determined by electrophoresis in 0.8% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under UV light. Fifty nanograms of bacterial DNA were used as a template for PCR procedures.

2.4. PCR amplification and sequencing of the bacterial 16S rRNA gene

Partial sequences of the 16S rRNA gene (roughly 450 bp) from each Gram negative isolate were amplified using the conditions described by Souza et al. (2013). The identification of bacilli and other Gram positive bacteria at the species level was also done by analysis of the 16S rRNA gene (approximately 1,500 bp) using the BacPaeF (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, Stackebrandt and Liesac, 1993) and Bac1542R (AGAAAGGAGGTGATCCAGCC, Edwards et al., 1989) primers. Thermal cycling was performed according Garbeva et al. (2003). PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under UV light. Sequencing was determined in a Megabace 1000 automatic sequencer using a DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE HealthCare). Partial sequences of the 16S rRNA gene (approx. 650 bp) were used for identification or grouping of *Bacillus* species. According to Goto et al. (2000), the 5' end region (approx. 275 bp) was identified as the hypervariant region in the 16S rRNA gene and is highly specific for each strain type. Furthermore, this region is highly conserved within the *Bacillus* species.

Sequences were trimmed to exclude low quality sequenced nucleotides. DNA sequences were compared with sequences from the EzTaxon Server version 2.1 (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) and the GenBank using BLASTN software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The nucleotide sequences of the 329 partial 16S rRNA gene segments determined in this study have been deposited in the GenBank database (accession numbers KC550309 to KC550638).

2.5. Diversity indices

Diversity indices (H' and H'' , Shannon and Weaver, 1949) were estimated based on the total number of individuals and the number of genera/species identified for each sampled cultivar. Principal component analysis (PCA) was used to verify the correlation between soil properties and rhizospheric bacterial diversity (Rico et al., 2004).

2.6. Evaluation of the characteristics that promote plant growth

The putative PGP capacity of the bacterial isolates was evaluated by *in vitro* tests. Bacterial suspensions ($10 \mu\text{l}$ of 10^8 CFU ml^{-1}) of each isolate grown in LB medium at 28°C with agitation (125 rpm) for 48 h were used as inocula for the PGP

experiments. The production of indolic compounds (IC) and siderophores were assayed according to Glickmann and Dessaux (1995) and Schwyn and Neilands (1987), respectively. The phosphate solubilization capacity was determined as described by Ambrosini et al. (2012). The ACC deaminase activity was evaluated by the ability of the isolates to use 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) as nitrogen source and was determined as described by Souza et al. (2013). The nitrogen-fixing ability of the isolates was tested using the acetylene reduction assay (ARA) as described by Boddey (1987). For catalase production, bacteria were grown in LB medium at 28°C for 24-48 h. A loopful of each culture was mixed with 50 µl of 3% (v/v) H₂O₂ on a glass slide and incubated at room temperature to observe the release of oxygen, which was recorded as a positive reaction for catalase.

Each isolate was classified according to the level of IC production: level 1 isolates that produced between 0.1 and 10 µg of IC ml⁻¹ and level 2 isolates that produced more than 11 µg of IC ml⁻¹. For phosphate solubilization and siderophore production, the development of a halo around the bacterial colony was considered to be positive. The halo size was used as an estimate of the degree of phosphate solubilization/siderophore production: (+) = halos ranging from 0.1 to 0.6 cm; and (++) = halos larger than 0.6 cm.

2.7. In vivo experiments on plant growth promotion by native PGPR isolates

The growth chamber experiment was conducted with a photoperiod cycle of 14 h light at 28°C and 10 h dark at 20°C. The experimental units consisted of pots (15 X 20 cm) sterilized with 0.7% sodium hypochlorite solution before seeding. Rice seeds from the BR-IRGA 409 cultivar (susceptible to iron excess) provided by IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz, Brazil) were surface-disinfected as described by Souza et al. (2013). The sterilized seeds were immediately inoculated with different isolates (described below) for 30 min; treated seeds were planted in sterile vermiculite, 2 cm below the surface and irrigated with nutrient solution. The plant nutrient solution used was that reported by Yoshida (1981) with some modifications as follows: 0.1 mM KCl, 0.1 mM KH₂PO₄, 0.7 mM K₂SO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.5 mM MgSO₄, and micronutrients. After germination and growth in vermiculite and nutrient solution for 12 days, the plant roots were re-inoculated by submerging them in 10 ml bacterial culture for 5 min. and immediately transferred to pots containing 500 ml of nutrient solution and covered with aluminum foil. Five repetitions per treatment were performed. Each

pot harbored two plants, which were kept for 10 days in control solution. Plants were then transferred to different treatments: (1) excess of iron (500 mg l⁻¹ of Fe), or (2) control (6.5 mg l⁻¹ of Fe), both using Fe₂(SO₄)₃·5H₂O as the iron source, solution pH 5.0 ± 0.1. All solutions were replaced every 3 days.

Bacterial isolates (nine) were grown in LB medium with agitation (125 rpm) for 48 h at 28°C, and pure bacterial cultures were centrifuged and diluted to a final concentration of 10⁸ CFU ml⁻¹ in sterile saline solution. Seeds were inoculated with 10 ml aliquots of the cell suspensions. Two independent experiments were conducted. The first experiment was carried out with the following isolates: (a) FeS14, (b) FeS42, (c) FeS56 (d) FeS57, and (e) a non-inoculated control. The second experiment was carried out with bacilli isolates: (a) CaR114, (b) CaS40, (c) FeR64, (d) FeS24, (e) FeS53, and (f) a non-inoculated control. Both experiments were maintained for 30 days, after which several parameters were evaluated. Plants were harvested, and the length data were recorded. Shoots and roots were dried at 65°C to a constant weight to evaluate the dry matter. All shoot dry matter contents from each treatment were combined for elemental analysis. The shoot nutrient content was determined by the Kjeldahl method (detection limit 0.01%) for N and nitric-perchloric wet digestion/ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry; detection limit 0.01%) for P and K. The nutrient content of the plants was estimated for each treatment through uptake per gram of plant tissue multiplied by the total yield per treatment [(yield) X (percent nutrient per gram of plant tissue)] (Adesemoye et al., 2009).

2.8. Statistical analysis

The microbial community structure of each sample studied (cultivar x iron status) was compared via Pearson's Chi-squared test. A residue analysis was used to detect differences between individual bacterial genera, which were considered significant for standardized adjusted residues > |1.96|. Data from the pot trials were statistically analyzed using ANOVA, and the means were compared using Tukey's test ($p=0.05\%$). Homoscedasticity was verified using Levene's test and normality by histogram analysis.

3. Results

3.1. Isolation and identification of putative PGP bacteria

In this work, 329 cultivable and putative nitrogen-fixing and plant growth-promoting rhizobacteria were isolated. From those 329 bacterial strains, 229 were isolated based on their growth in nitrogen-free media under aerobic conditions (Table 2), and 100 were isolated based on their growth on nitrogen-free medium under anaerobic conditions (Table 3). Table 2 shows the 26 distinct bacterial genera related to Gram negative isolates and the one related to Gram positive isolate that were identified, whereas Table 3 shows the 27 bacterial species related to putative nitrogen-fixing bacilli and the other Gram positive isolates that were identified. Both tables show the bacterial genus/species identified and their frequency in the rhizospheric soil and root samples for the two rice cultivars investigated.

As can be observed in Table 2, bacterial isolates belonging to the *Burkholderia* and *Enterobacter* genera were the most abundant among all aerobic isolates. The bacterial genera composition was significantly affected by the cultivar ($p=0.001$) and by the environment ($p=0.01$), meaning that both cultivars presented different associated bacterial communities and that soil composition interfered with the bacterial community as well.

The associated bacterial communities of the tolerant cultivars changed according to environmental conditions ($p=0.002$): when samples from the tolerant cultivar cropped in the iron-stressed location (Camaquã) were analyzed, the most abundant strains identified belonged to the *Burkholderia* genus (20 isolates), whereas the same cultivar cropped in the Cachoeirinha locality (without excess of iron) presented only 10 isolates belonging to this genus, which was a significant decrease. Moreover, strains belonging to the *Cronobacter* and *Pantoea* genera were found preferentially in samples collected in the control location and strains belonging to *Leclercia* genus only found in samples collected in the iron-stressed location. On the other hand, the associated bacterial community of the susceptible cultivar did not change according to iron stress ($p=0.114$).

The proportion of bacterial genera was significantly different between the susceptible and tolerant cultivars (Table 2). In the iron-stressed location, the associated bacterial community was different for the two rice cultivars ($p=0.025$), with the occurrence of strains belonging to the *Leclercia* genus being more associated with the tolerant cultivar than with the susceptible cultivar. In the control location, the bacterial genera composition was also affected by the cultivar ($p=0.001$), with strains belonging to the *Burkholderia* genus being more associated with the susceptible cultivar than with

the tolerant cultivar, whereas strains belonging to the *Enterobacter* and *Cronobacter* genera were more associated with the tolerant cultivar than with the susceptible cultivar.

Table 3 shows that the strains belonging to the *Paenibacillus* and *Bacillus* genera were the most abundant groups among the putative nitrogen-fixing bacilli and the other Gram positive bacterial isolates. The associated bacterial community was significantly different in the susceptible cultivar at both environmental conditions ($p < 0.001$), with the occurrence of strains belonging to the *Paenibacillus zanthoxyli* and *P. durus* species being more associated with the iron-stressed location than with the control location. Similarly, strains belonging to the *Leifsonia* genus were only found in samples collected in the iron-stressed location. Our results also revealed that a larger number of strains of Gram positive bacteria were isolated from susceptible cultivar cropped in the control location compared with iron-stressed location. On the other hand, the associated bacterial community was similar concerning the tolerant cultivar at the same environmental conditions ($p = 0.152$).

The bacterial genera composition was significantly different between the cultivars in the control location ($p < 0.001$) but not in the iron-stressed location ($p = 0.247$) (Table 3). In the control location, strains belonging to the *Bacillus aryabhatai* species were more associated with the susceptible cultivar, whereas strains belonging to the *P. zanthoxyli*, *P. wynnii* and *P. durus* species were more associated with the tolerant cultivar.

Diversity indices for each sampling site are also presented in Tables 2 and 3. According to Table 2, the bacterial community isolated from samples obtained from the susceptible cultivar cropped in the iron-stressed location presented the highest genetic diversity ($H' = 2.23$), whereas that isolated from samples from the tolerant cultivar cropped in the same region presented the lowest diversity index ($H' = 1.65$). On the other hand, regarding to the diversity of the Gram positive bacteria (H'' ; Table 3), the bacterial community isolated from samples collected from the susceptible cultivar cropped in the control location presented the highest diversity index ($H'' = 2.53$), whereas much lower indices were obtained from those isolated from the other samples (Table 3).

The chemical analysis of soils (Table 1) indicated low pH values in both sampling areas. However, soil from the iron-stressed site showed higher values of pH and Fe, as well as lower levels of OMC and P, than samples from the control site. Principal coordinate analysis (PCA) was used to investigate the relationships between

bacterial diversity (H' and H'') and abiotic soil parameters (Figure 1). The first two dimensions of PCA (PCA1 and PCA2) explained 86.12% of the total variation, with component 1 accounting for 61.35% and separate clearly the control site (Cachoeirinha) from the iron-stressed site (Camaquã). Component 2 represent 24.77% of the variance and separate the susceptible from the tolerant cultivars. This analysis showed that the Al, clay, Ca, and OM contents were the soil factors that were more related to H' , while the K and P contents seemed to be the major soil parameters to affect the diversity of the Gram positive isolates (H'').

3.2. Screening of PGP traits of bacterial isolates

All 229 strains selectively isolated based on their growth on nitrogen-free media and aerobic conditions were analyzed for the presence of four plant growth promotion abilities (Table 4). According to Table 4, one of the most evident characteristic among these isolates was their ability to produce IC, which ranged from 0.11 to 50 μg of IC ml^{-1} , with 22 isolates producing more than 10 μg of IC ml^{-1} after 72 h of incubation. Of these 22 isolates, 16 were isolated from the susceptible cultivar cropped in the iron-stressed site (Camaquã). Additionally, the level of IC production was different according to the environment for the susceptible cultivar ($p=0.001$). There were more level 1 IC producers in the control site than in the iron-stressed site ($p<0.05$), while there were more level 2 IC producers in the iron-stressed site ($p<0.05$). For the tolerant cultivar, the IC production ability of the isolates presented very similar levels ($p>0.05$) for both sites. Strains identified as good IC producers belonging to the *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pantoea* genera.

Another ability displayed by most of the aerobic isolates was siderophore production (216 out of 229; Table 4), with 41 strains isolated from samples from the tolerant cultivar cropped in the iron-stressed site presenting larger halos (++) than those isolated from the same cultivar cropped in the control site ($p=0.002$). Isolates from the susceptible cultivar from both regions did not differ in the ability to solubilize iron ($p=0.076$). Isolates identified as belonging to the *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pantoea* genera were identified as good siderophore producers.

In addition to the above characteristics, 102 of 229 isolates were able to solubilize phosphates (Table 4). There was a difference in the phosphate solubilization ability by the isolates between both environments for the tolerant cultivar ($p=0.009$) as the best phosphate solubilizers were found in the control site (16 isolates with halo ++)

compared to iron-stressed site (3 isolates with halo ++) ($p < 0.05$). For the susceptible cultivar, however, there was no difference in the phosphate solubilization ability displayed by the isolates for both environments ($p = 0.387$). Isolates identified as belonging to the *Burkholderia* genus were identified as good phosphate-solubilizing strains.

According to Table 4, ACC deaminase activity was the rarest ability among the isolates (51 out of 229). The occurrence of ACC deaminase activity was dependent on both the environment and cultivar ($p = 0.012$). In the control site, the susceptible cultivar possessed a greater number of ACC deaminase producers ($p < 0.05$). On the other hand, in the iron-stressed site, the highest number of ACC deaminase producers was found in the tolerant cultivar ($p < 0.05$). Isolates belonging to the *Burkholderia* genus were identified as good ACC deaminase producers.

The PGP traits of putative diazotrophic bacilli and other Gram positive bacteria are shown in Table 5. The most evident characteristic among those Gram positive strains was the production of IC, as 94 isolates were able to produce IC *in vitro*, and seven of them produced more than $10 \mu\text{g}$ of IC ml^{-1} after 72 h of incubation. Only two strains were able to produce siderophores, 11 were able to solubilize phosphates, and four isolates presented ACC deaminase activity in our *in vitro* conditions. Bacterial communities isolated from the tolerant cultivar from control region did not present any strains displaying other ability than IC production. The rhizospheric soils from the samples collected from both cultivars cropped in the iron-stressed site presented the highest numbers of phosphate-solubilizing strains compared to those from the other site.

The biological nitrogen fixation and catalase activity *in vitro* assays were performed for nine bacterial isolates that were selected based on their taxonomic identification and PGP attributes for the *in vivo* experiment in a growth chamber. Table 6 shows the results of the PGP activities evaluated for these isolates. Four bacterial isolates were used to inoculate the seeds of rice plant in the first experiment and were identified as FeS14 (*Burkholderia* sp.) FeS42 (*Chryseobacterium* sp.), FeS56 (*Ochrobactrum* sp.), and FeS57 (*Lysinibacillus* sp.). The Gram positive isolates CaR114 (*Paenibacillus sonchi*), CaS40 (*Paenibacillus jamilae*), FeR64 (*Bacillus aryabhatai*), FeS24 (*Paenibacillus durus*), and FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*) were used in the second experiment.

3.3. First plant assay: growth-promoting effect of rice plants with bacterial treatments

To test the interaction between Gram negative PGPR and rice plants, an *in vivo* experiment was conducted in a growth chamber with the four previously identified selected isolates (Table 6). Plants were transferred to different treatments, including an excess of iron (500 mg l⁻¹ of iron) and the control treatment (6.5 mg l⁻¹ of iron), however, plants submitted to iron toxicity were not analyzed due to the small amount of samples obtained.

Under the growth chamber conditions, most of the PGPR used for the inoculation of rice plants resulted in satisfactory effects on plant growth in the iron control treatment (Table 7). For the dry shoot biomass, the inoculation of rice with the FeS14 and FeS42 strains presented significantly higher results than the non-inoculated control plants. Moreover, the inoculation of rice with the FeS42 and FeS56 strains presented significantly similar results for the length and dry biomass of roots compared to the non-inoculated control plants.

Plants inoculated with the FeS14 and FeS42 isolates enhanced the N uptake by rice compared with that of the non-inoculated plants. Moreover, plants inoculated with FeS14 and FeS42 strains showed a significant increase in the amount of K accumulated in the shoots compared to that in the non-inoculated control plants (data not shown).

3.4. Second plant assay: contribution to plant growth by Gram positive isolates

According to Figure 2, in the iron control condition, rice seeds inoculated with the CaR114 strain presented results significantly similar to the non-inoculated control plants in terms of dry shoot biomass. In the treatment with excess of iron, plants inoculated with the FeS53 isolate were statistically equivalent to plants without inoculation relative to dry matter of shoot (Figure 2). Moreover, the condition of iron excess reduced length and dry shoot biomass of plants comparing with those in the iron control treatment except for plants inoculated with the FeS53 isolate that presented statistically the same values for both conditions.

The potential role of bacilli isolates in the promotion of rice growth in different iron conditions was also evaluated through the concentration of nutrients accumulated in shoot tissue (Table 8). For most of the treatments, rice plants submitted to iron excess reduced the uptake of nutrients such as Ca, Mg, Cu, and Zn (data not shown) and N, P and K (Table 8) compared to those in the iron control treatment.

With respect to the plant nitrogen content (Table 8), the inoculation of rice with the CaR114 strain resulted in enhanced N uptake by the rice plants compared with that

of the non-inoculated control plants in the iron control condition. For the uptake of P and K for this same isolate, the results were significantly similar to the non-inoculated iron-control condition plants (Table 8). In the treatment with excess of iron, plants inoculated with the FeS53 isolate were statistically equivalent to plants without inoculation relative to NPK uptake, although the N and K content in the shoots was higher to FeS53. On the other hand, plants inoculated with the FeS53 strain showed satisfactory results in terms of N and K uptake compared with plants from the iron control and iron toxicity treatments (Table 8).

The concentration of Fe accumulated in rice shoot tissue was also evaluated (data not shown). In the condition of iron excess, rice plants presented high concentration of Fe in the shoot tissue when compared to that of the plants in the iron control condition. Moreover, it was observed that the inoculation of rice seeds with the bacilli isolates, including the isolate FeS53, resulted in a reduction in the concentration of Fe in the shoot tissue compared with the non-inoculated control plants.

4. Discussion

4.1. Isolation and identification of putative PGP bacteria

To investigate how an excess of iron interferes with the diversity of putative PGP rhizobacteria associated with rice, specific bacterial communities were isolated from two areas used for rice cultivation having different iron concentrations. The toxic character of these experimental sites had been already determined by Stein et al. (2009), who observed a high concentration of ferrous (Fe^{2+}) ions (more than 280 mg l^{-1}) in soil samples from Camaquã compared to the control site, Cachoeirinha (29 mg l^{-1}). Our results suggested that the abiotic factors in the soil and the genotype of rice cultivar have significant effects on the Gram negative bacterial communities isolated from the roots and rhizospheric soils (Table 2), thus corroborating the hypothesis that plants can actively select their bacterial community under different nutrients conditions (Costa et al., 2013). Briones et al. (2002) also showed that different cultivars of the same plant species can affect populations of ammonia-oxidizing bacteria. Inceoglu et al. (2012) studied bacterial community in the potato rhizosphere using PCR followed by denaturing gradient gel electrophoresis and observed the effects of soil type and cultivar on the microbial community structures. These authors concluded that soil type was the most determinative parameter shaping the functional communities, whereas the cultivar type also exerted some influence.

Strains belonging to the *Burkholderia* and *Enterobacter* genera were more abundant in this study. Beneficial plant-microbial interactions can be established by strains belonging to *Burkholderia* genus when associated with plants and can promote plant growth through different mechanisms. For this reason, Gyaneshwar et al. (2011) suggested that the nitrogen-fixing species of the *Burkholderia* group should be placed into a new genus to separate them from the pathogenic species. Strains belonging to the *Enterobacteria* genus have been found in association with a large number of plant species of agronomic interest, and are also known to improve plant growth (Deepa et al., 2010).

Regarding to bacilli and other Gram positive bacteria (Table 3), our results suggested, as well as Gram negative bacterial communities, that the environment and the genotype of rice cultivar have an impact on Gram positive bacterial communities. Yadav et al. (2011) had previously performed diversity studies under stress conditions. These authors analyzed the biodiversity of plant growth-promoting bacilli isolated from moderately acidic soil and have revealed several *Bacillus* strains positive for multiple PGP attributes. Upadhyay et al. (2009) analyzed the genetic diversity of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from the rhizosphere of wheat under saline conditions, and they concluded that *Bacillus* and *Bacillus*-derived genera were the most abundant type of bacteria in their samples.

The present study showed a correlation between abiotic soil parameters and bacterial diversity (Figure 1). Although several soil parameters have been measured and analyzed in our study, it is still possible that other unevaluated variables such as root exudates, plant age, and plant community composition, can influence the diversity of microbial communities. Moreover, the differences in diversity among the bacterial communities can be the result of the combined effects of the weather and edaphic factors (Arruda et al., 2013). Palmer and Young (2000) observed that pH and the contents of clay and OM may affect bacterial diversity and Arruda et al. (2013) showed that the bacterial diversity of bacterial communities isolated from maize was associated with the soil clay content.

In this work, a culture-dependent approach was used to selectively isolate a fraction of the bacterial community present in the roots and rhizospheric soils of rice. However, it is well known that the analysis of bacterial communities associated with plants can be better explored by diverse culture-independent methods that provide

information about the impact of plant species on structure and function of rhizobacterial communities (Berg and Smalla, 2009).

4.2. Screening of PGP traits of bacterial isolates

Rhizospheric bacteria can enhance plant growth by a wide variety of mechanisms. Production of IC by PGPR is an important attribute for improvement of plant growth (Upadhyay et al., 2009) that can directly influence the root development thus allowing the uptake of essential nutrients. The data obtained in this work indicated that the level of IC production was different according to the environment. The susceptible cultivar was able to select the best IC producers under iron stress conditions, whereas the microbiota of the tolerant cultivar was unresponsive regarding this ability (Table 4). Moreover, more than 90% of all isolates were able to produce IC (Tables 4 and 5). These results are in agreement with other works (Ambrosini et al., 2012; Costa et al., 2013; Souza et al., 2013) as the IC production was the most prevalent plant growth-promoting characteristic in the majority of the isolates. Dimkpa et al. (2009b) observed that the presence of metals such as Al, Cd, and Ni, including Fe, inhibits auxin production in *Streptomyces* sp., however, auxin production is enhanced under siderophore-producing conditions. Siderophores promote auxin synthesis by chelating these metals, thereby protecting microbial auxins from degradation and enabling them to enhance plant growth.

Despite the fact that iron (Fe^{2+}) is typically available in flooded soil conditions and that paddy rice soils are subjected to periodic changes between oxic and anoxic conditions (Becker and Asch, 2005), another ability displayed by most of rhizospheric isolates was siderophore production (Table 4). Many microorganisms can produce siderophores involved in the sequestration of Fe^{3+} . In flooded soil conditions of rice cultivation, Fe^{3+} can act as electron acceptors for microbial respiration and sequentially become available to plants (Becker and Asch, 2005). Moreover, the rhizosphere of rice cultivars is a potential site of Fe^{2+} oxidation, leading to a considerable Fe^{3+} accumulation and the formation of an iron plaque around rice roots (Ando et al., 1983). In our work, the results obtained suggest that in the iron stress condition the tolerant cultivar was able to select the best siderophore producers from the associated bacterial community. The power of the rice root to oxidize iron has also been described as a possible mechanism used by tolerant rice cultivars to exclude high amounts of iron in the soil solution from the plant body (Ando et al., 1983). In experiments with

Azotobacter vinelandii, Kraepiel et al. (2009) showed that all of the nitrogenase metal cofactors (Fe, Mo, and V) were bound to siderophores. Moreover, even in Fe-replete cultures, the same authors showed that siderophore production, although reduced, was not suppressed at high Fe concentrations.

The ability of rhizospheric bacteria to convert insoluble forms of phosphorus to an accessible form is an important trait in PGPR. In this work, the best phosphate solubilizers to Gram negative bacteria were selected from the tolerant cultivar cropped in the control site compared to that from the iron-stressed site (Table 4). Regarding to bacilli and other Gram positive bacteria few strains were identified as phosphate-solubilizing bacteria (Table 5). The results are in agreement with the findings of Ambrosini et al. (2012) to Gram negative bacteria where low numbers of phosphate-solubilizing bacteria have been found. Beneduzi et al. (2008), in their study to evaluate the diversity of plant growth-promoting bacilli isolated from rice, found few phosphate-solubilizing strains of the bacterial isolates analyzed.

In the present investigation, few bacterial strains (Table 4 and Table 5) exhibit ACC deaminase activity, showing the competency of the isolates to use ACC as a nitrogen source. Recent study demonstrates the effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for enhancing salt tolerance and consequently improving the growth of rice plants under salt-stress conditions (Bal et al., 2013).

4.3. Contribution to plant growth of rice plants with bacterial treatments

Rhizospheric strains selected by their PGP traits were tested in an *in vivo* experiment in growth chamber (Table 6). Our results suggested that the strains analyzed in this work contribute to plant growth as well as enhanced nutrients uptake of the rice plants in growth chamber conditions (Tables 7; Table 8). The FeS14 (*Burkholderia* sp.) and FeS42 (*Chryseobacterium* sp.) isolates were not able to solubilize phosphate in our *in vitro* assay and showed low capacity to reduce acetylene (Table 6); these observations could indicate that other growth promotion mechanisms, such as IC production or others not evaluated improved nutrient uptake. Large numbers of PGPR of different bacterial genera with multifunctional traits have, therefore, been described for their potent application in boosting plant growth in modern agriculture (Bhattacharyya and Jha, 2012). Strains of *Chryseobacterium* and *Burkholderia* are well known for their abilities to promote plant growth (Ambrosini et al., 2012), being able to synthesize an array of metabolites.

Based on the *in vivo* experimental data (Table 8), the inoculation with the CaR114 (*Paenibacillus sonchi*) strain presented the potential to improvement in the nutrient uptake, mainly nitrogen. Beneduzi et al. (2008) demonstrated the effectiveness of plant-growth-promoting bacilli in promoting the plant growth of rice. Moreover, bacilli also are known by their abilities of biocontrol against phytopathogens, which can occur through antibiosis, production of siderophores, as well as by processes of induced systemic resistance (ISR) (Lugtenberg and Kamilova, 2009).

PGPRs can minimize the effect of abiotic stress through various mechanisms, among these, the presence of ACC deaminase activity. Our results suggested that the FeS53 (*Paenibacillus* sp.) strain containing ACC deaminase promoted the increase of the dry shoot biomass and maintains the nutrient uptake under iron-stress condition. It was found through the analysis of nutrients under iron-stress condition that all plants had lower rates of nutrients uptake when compared to iron control condition (Table 6). High concentrations of iron in the soil decreased the uptake of Ca^{2+} , Mg^{2+} and especially N, P and K by rice (Mehraban et al., 2008). However, plants inoculated with FeS53 in the presence of iron excess presented growth similar and nutrient uptake to iron control conditions, indicating that this bacterium as the most promising PGP isolate. Bal et al. (2013) demonstrated the effectiveness of rhizobacteria that contain ACC deaminase, such as *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., and *Ochrobactrum* sp., in inducing salt tolerance and consequently improving the growth of rice plants under salt-stress conditions; positive results on different growth parameters, such as germination percentage, shoot and root growth and chlorophyll content, were found compared to those of the uninoculated control. Other studies also indicated that bacteria presenting ACC deaminase activity reduced the level of stress caused by ethylene, thus resulting in better growth of plants under various stresses (Glick, 2012). Similar results were obtained by Arshad et al. (2008) when a strain of *Pseudomonas* spp. displaying ACC deaminase activity partially eliminated the effect of drought stress on growth of peas (*Pisum sativum* L.).

In summary, the results presented in this work shows the presence of a diverse population of plant growth-promoting bacteria interacting with rice cropped in sites with different iron concentrations. The iron conditions and cultivars have significant effects on the associated rhizobacterial communities. Moreover, the current study allows us to conclude that the bacterial isolates interacted positively with rice plants concerning plant growth and nutrient uptake in the tested conditions. The present work clearly

indicates that further research is necessary to evaluate the effectiveness of these strains under actual field conditions; however, it is equally important to study in detail the potentiality of these isolates, along with the mechanism of action involved in the growth of rice plants in different iron concentrations.

5. Acknowledgments

This work was financed by grants and fellowships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil), and INCT da Fixação Biológica do Nitrogênio (Brasil).

6. References

- Adesemoye, A.O., Torbert, H.A., Kloepper, J.W., 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology* 58, 921-929.
- Ali, Z.S., Sandhya, V., Grover, M., Kishore, N., Rao, L.V., Venkateswarlu, B., 2009. *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biology and Fertility of Soils* 46, 45-55.
- Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F.G., Vargas, L.K., Passaglia, L.M.P., 2012. Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356, 245-264.
- Ando, T., Yoshida, S., Nishiyama, I., 1983. Nature of oxidizing power of rice roots. *Plant Soil* 72, 57-71.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodríguez-Quinones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215-237.
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., Passaglia, L.M.P., Vargas, L.K., 2013. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology* 63, 15-22.
- Arshad, M., Shaharoon, B., Mahmood, T., 2008. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere* 18, 611-620.

- Bacha, R.E., Ishiy, T., 1986. Toxicidad por hierro en arroz: metodología para seleccionar genótipos resistentes en Brasil. Boletín informativo del Programa de Arroz del CIAT 7, 1-4.
- Bal, H.B., Nayak, L., Das, S., Adhya, T.K., 2013. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366, 93-105.
- Becker, M., Asch, F., 2005. Iron toxicity in rice - conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 68, 558-573.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology* 39, 311-320.
- Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology* 68, 1-13.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1327-1350.
- Boddey, R.M., 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 6, 209-266.
- Briones, A.M., Okabe, S., Umemiya, Y., Ramsing, N., Reichardt, W., Okuyama, H., 2002. Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. *Applied Environmental Microbiology* 68, 3067-3075.
- Costa, P., Beneduzi, A., Souza R., Schoenfeld, R., Vargas, L.K., Passaglia, L.M.P., 2013. The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: guidelines for directed bacterial prospection and testing. *Plant Soil* 368, 267-280.
- Deepa, C.K., Syed, G., Dastager, S.G., Pandey, A., 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedling growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 1233-1240.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F., 2009a. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* 32, 1682-1694.

- Dimkpa, C., Merten, D., Svatos, A., Buchel, G., Kothe, E., 2009b. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 154-162.
- Dixon, R., Kahn, D., 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature* 2, 621-631.
- Döbereiner, J., 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110, 207-212.
- Dobermann, A., Fairhurst, T.H., 2000. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. The International Rice Research Institute, Manila. The Philippines, p. 191.
- Edwards, U., Rogall, T., Blockerl, H., Emde, M., Bottger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17, 7843-7853.
- Figueiredo, V.B., Burity, H.A., Martínez, C.R., Chanway, C.P., 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* 40, 182-188.
- Garbeva, P., Van Veen, J.A., Van Elsas, J.D., 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* 45, 302-316.
- Glick, B., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 1-15.
- Glickmann, E., Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski Reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 793-796.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., Sadaie, Y., 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *Journal of General and Applied Microbiology* 46, 1-8.
- Grover, M., Ali, S.K.Z., Sandhya, V., Rasul, A., Venkateswarlu, B., 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 27, 1231-1240.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F.B., Sprent, J.I., Young, J.P., James, E.K., 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 1276-1288.

- Inceoglu, Ö., Salles, J.F., Van Elsas, J.D., 2012. Soil and cultivar type shape the bacterial community in the potato rhizosphere. *Microb. Ecol.* 63, 460-470.
- Kobayashi, T., Nishizawa, N.K., 2012. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* 63, 131-52.
- Kraepiel, A.M.L., Bellenger, J.P., Wichard, T., Morel, F.M.M., 2009. Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *Biometals* 22, 573-581.
- Lemanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S., Briat, J.F., 2009. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321, 513-535.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541-546.
- Palmer, K.M., Young, J.P.W., 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grasssoils. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2445-2450.
- Rico, A., Ortiz-Barredo, A., Ritter, E., Murillo, J., 2004. Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology* 96, 302-310.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Eda, S., Mitsui, H., Hanzawa, E., Kisara, C., Kazama, Y., Kushida, A., Shinano, T., Minamisawa, K., Sat, T., 2010. Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 56, 636-644.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160, 47-56.
- Seldin, L., Van Elsas, J.D., Penido, E.G.C., 1983. *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant Soil* 70, 243-255.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Costa, P.B., Meyer, J., Vargas, L.K., Schoenfeld, R., Passaglia, L.M.P., 2013. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil* 366, 585-603.

- Stackebrandt, E., Liesack, W., 1993. *Nucleic Acids and Classification*. Academic Press, London, UK.
- Stein, R.J., Duarte, G.L., Spohr, M.G., Lopes, S.I.G., Fett, J.P., 2009. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology* 154, 269-277.
- Tedesco, J.M., Gianelo, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J., 1995. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Upadhyay, S.K., Singh, D.P., Saikia, R., 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Current Microbiology* 59, 489-496.
- Yadav, S., Kaushik, R., Saxena, A.K., Arora, D.K., 2011. Diversity and phylogeny of plant growth-promoting bacilli from moderately acidic soil. *Journal of Basic Microbiology* 51, 98-106.
- Yoshida, S., 1981. Growth and development of the rice plant. In: *Fundamentals of Rice Crop Science*. The International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp. 1-61.

Table 1. Abiotic soil characteristics of the sampling sites.

Sampling sites ^a	Clay (%)	OMC (%)	pH (H ₂ O)	P (mg dm ⁻³)	K (mg dm ⁻³)	Fe (%)	Ca _{exc} (cmol _c dm ⁻³)	Al _{exc} (cmol _c dm ⁻³)	Mg _{exc} (cmol _c dm ⁻³)
CaR	28	3.0	4.8	9.0	43.0	0.18	2.7	0.5	1.0
CaS	28	3.0	4.7	22.2	73.0	0.15	2.7	0.4	1.0
FeR	24	1.1	5.4	0.9	54.0	0.25	2.1	0.4	1.3
FeS	25	1.1	5.5	0.9	57.0	0.35	2.4	0.4	1.6

OMC organic matter content

exc exchangeable

^a CaR: tolerant cultivar, Cachoeirinha; CaS: susceptible cultivar, Cachoeirinha; FeR: tolerant cultivar, Camaquã; FeS: susceptible cultivar, Camaquã

Table 2. Bacterial genera found in association with the roots and rhizospheric soil of rice cultivars cropped in areas with different levels of iron and the Shannon diversity indices (H') for each sampling site.

Bacterial genus	Cachoeirinha ^a				Camaquã ^a				Total
	CaR ^b		CaS ^b		FeR ^b		FeS ^b		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>Achromobacter</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	2
<i>Bosea</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia</i>	4	6	15	8	13	7	12	3	68
<i>Cedecea</i>	-	-	-	1	-	-	2	-	3
<i>Chryseobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Cronobacter</i>	4	3	-	-	1	-	-	-	8
<i>Citrobacter</i>	1	1	1	1	1	6	2	1	14
<i>Dyella</i>	-	-	1	1	-	-	1	-	3
<i>Enterobacter</i>	12	8	1	4	5	14	2	11	57
<i>Escherichia</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	2
<i>Gluconacetobacter</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Herbaspirillum</i>	-	3	-	3	1	-	1	-	8
<i>Klebsiella</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Leclercia</i>	-	-	-	-	4	-	-	-	4
<i>Lysinibacillus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Luteibacter</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Microvirga</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Ochrobactrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Pandoraea</i>	1	-	2	-	-	-	2	-	5
<i>Pantoea</i>	1	6	1	8	-	1	1	3	21
<i>Pseudomonas</i>	3	-	3	-	1	1	2	4	14
<i>Rhizobium</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Rahnella</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Salmonella</i>	1	1	-	-	-	-	-	2	4
<i>Serratia</i>	1	-	1	2	-	-	-	-	4
<i>Spirillum</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Yokenella</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
H'	2.12		2.04		1.65		2.23		229

^a CaR: tolerant cultivar, Cachoeirinha; CaS: susceptible cultivar, Cachoeirinha; FeR: tolerant cultivar, Camaquã; FeS: susceptible cultivar, Camaquã

^b Bacterial genera isolated from: 1: rhizospheric soil, and 2: roots

(-) = not identified

Table 3. Gram positive bacterial species found associated with rhizospheric soil of rice cultivars cropped in areas with different levels of iron and the Shannon diversity indices (H'') for each sampling site.

Bacterial species	Cachoeirinha ^a		Camaquã ^a		Total
	CaR	CaS	FeR	FeS	
<i>Arthrobacter</i> sp.	-	-	-	2	2
<i>Bacillus acidiceler</i>	-	1	-	-	1
<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	7	3	-	10
<i>Bacillus bataviensis</i>	-	1	-	-	1
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	1	1
<i>Bacillus drementensis</i>	-	1	-	-	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	-	-	-	1
<i>Clostridium</i> sp.	-	1	-	-	1
<i>Leifsonia</i> sp.	-	-	3	5	8
<i>Micrococcus</i> sp.	-	-	1	-	1
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	-	2	-	1	3
<i>Paenibacillus borealis</i>	-	2	-	-	2
<i>Paenibacillus cineris</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus durus</i>	5	-	6	5	16
<i>Paenibacillus jamilae</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus oceanisediminis</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus odorifer</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus massiliensis</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus pabuli</i>	-	5	-	-	5
<i>Paenibacillus panacisoli</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus sabiniae</i>	1	-	-	-	1
<i>Paenibacillus sonchi</i>	1	5	-	-	6
<i>Paenibacillus telluris</i>	-	1	-	-	1
<i>Paenibacillus wynnii</i>	3	-	2	-	5
<i>Paenibacillus zanthoxyli</i>	6	2	10	7	25
<i>Sinomonas</i> sp.	-	-	-	1	1
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	1	1	2
H''	1.56	2.53	1.65	1.89	100

^a CaR: tolerant cultivar, Cachoeirinha; CaS: susceptible cultivar, Cachoeirinha; FeR: tolerant cultivar, Camaquã; FeS: susceptible cultivar, Camaquã

(-) = not identified

Table 4. Number of isolates, siderophores, ACC deaminase, and indolic compound (IC) producers, and phosphate solubilizers in the bacterial isolates at each sampling site.

Site ^a	Source	Number of isolates	Siderophore producers ^b		Phosphate solubilizers ^c		ACC deaminase producers	IC producers ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^d	
			+	++	+	++		1	2
1. CaR	Rhizosphere	30	15	14	9	7	5	29	1
	Root	30	16	14	8	9	3	29	1
2. CaS	Rhizosphere	28	5	21	5	8	7	26	2
	Root	29	13	15	7	5	8	28	1
3. FeR	Rhizosphere	28	3	23	15	2	13	24	1
	Root	29	10	18	5	1	7	28	0
4. FeS	Rhizosphere	27	6	15	8	4	6	21	6
	Root	28	19	9	5	4	2	18	10
TOTAL		229	216		102		51	203	22

^a CaR: tolerant cultivar, Cachoeirinha; CaS: susceptible cultivar, Cachoeirinha; FeR: tolerant cultivar, Camaquã; FeS: susceptible cultivar, Camaquã

^b Development of a yellow, orange or violet halo around a bacterial colony was considered as positive for siderophore production. The halo size was used as an estimate of the degree of siderophore production: halos from 0.1 cm to 0.6 cm (+) and halos larger than 0.6 cm (++)

^c Development of a halo around a bacterial colony was considered as positive for phosphate solubilization. The halo's size was used as an estimate of the degree of phosphate solubilization: halos from 0.1 cm to 0.6 cm (+) and halos larger than 0.6 cm (++)

^d Each isolate was classified according to the level of IC production: level 1 isolates that produced between 0.1 and 10 μg of IC ml^{-1} and level 2 isolates that produced more than 11 μg of IC ml^{-1}

Table 5. Number of isolates, siderophore, ACC deaminase, and indolic compound (IC) production, and phosphate solubilization abilities of Gram positive bacterial isolates from rhizospheric soil of rice cultivars.

Site ^a	Source	Number of isolates	Siderophore producers	Phosphate solubilizers	ACC deaminase producers	IC producers ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^b	
						1	2
CaR	Rhizosphere	17	0	0	0	13	4
CaS	Rhizosphere	34	1	1	1	33	1
FeR	Rhizosphere	26	0	4	0	25	1
FeS	Rhizosphere	23	1	6	3	16	1
TOTAL		100	2	11	4	87	7

^a CaR: tolerant cultivar, Cachoeirinha; CaS: susceptible cultivar, Cachoeirinha; FeR: tolerant cultivar, Camaquã; FeS: susceptible cultivar, Camaquã

^b Each isolate was classified according to the level of IC production: level 1 isolates that produced between 0.1 and 10 μg of IC ml^{-1} and level 2 isolates that produced more than 11 μg of IC ml^{-1}

Table 6. Plant growth-promoting abilities of selected bacterial isolates.

Isolate ^a	Phosphate solubilization	Siderophore production	IC production ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	ARA		
				(nmol C_2H_4 mg protein h^{-1})	ACC deaminase activity	Catalase Activity
FeS14	-	+	3.33	29.60	+	+
FeS42	-	+	6.81	0.38	-	+
FeS56	-	+	3.91	0.39	-	+
FeS57	+	+	14.04	0.56	-	+
CaR114	-	-	5.85	259.53	-	+
CaS40	-	+	2.95	0.16	-	+
FeR64	-	-	3.91	1.89	-	+
FeS24	+	-	0.51	4.14	+	+
FeS53	-	-	Nd	1.45	+	+
<i>Control Sp7</i>	Nd	nd	Nd	112.59	Nd	Nd
<i>Control SBR5</i>	Nd	nd	Nd	501.95	Nd	Nd

nd (not determined); IC (indolic compounds); ARA (acetylene reduction assay)

(+), positive for siderophore production, phosphate solubilization, ACC deaminase and catalase activity

(-), negative for siderophore production, phosphate solubilization, ACC deaminase and catalase activity

^a FeS14 (*Burkholderia* sp.); FeS42 (*Chryseobacterium* sp.); FeS56 (*Ochrobactrum* sp.); FeS57 (*Lysinibacillus* sp.); CaR114 (*Paenibacillus sonchi*); CaS40 (*Paenibacillus jamilae*); FeR64 (*Bacillus aryabhatai*); FeS24 (*Paenibacillus durus*); and FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*). Controls: Sp7 (*Azospirillum brasilense*) and SBR5 (*Paenibacillus riograndensis*)

Table 7. Results of *in vivo* experiments with selected bacterial isolates in the growth promotion of rice plants under growth chamber conditions.

Isolates ^a	Shoot growth		Root growth	
	Length (cm)	Dry matter (mg)	Length (cm)	Dry matter (mg)
FeS14	57.71 (± 0.91) a	240 (± 20.2) a	15.87 (± 0.46) b	75 (± 6.20) ab
FeS42	57.37 (± 0.97) a	248 (± 12.1) a	17.30 (± 1.18) a	85 (± 5.50) a
FeS56	57.51 (± 1.91) a	230 (± 10.1) ab	17.75 (± 1.32) a	84 (± 12.5) a
FeS57	56.85 (± 0.70) a	205 (± 14.3) c	16.24 (± 0.78) ab	68 (± 3.91) b
Non-inoculated	57.75 (± 1.92) a	221 (± 19.8) b	16.29 (± 1.16) ab	76 (± 5.82) ab

Data represent the means (\pm SD) of 5 replicates of plants grown in vermiculite in a photoperiod chamber

Values in the same column followed by the same letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test)

^a FeS14 (*Burkholderia* sp.); FeS42 (*Chryseobacterium* sp.); FeS56 (*Ochrobactrum* sp.); FeS57 (*Lysinibacillus* sp.)

Table 8. Influence of inoculation with native bacilli on nutrient uptake in rice plants under different iron treatments in growth chamber conditions.

Treatment ^a	Nitrogen (N) (mg g ⁻¹)		Phosphorus (P) (mg g ⁻¹)		Potassium (K) (mg g ⁻¹)	
	Control of iron	Excess of iron	Control of iron	Excess of iron	Control of iron	Excess of iron
CaR114	8.59 (±0.32) aA	6.03 (±0.58) bB	1.18 (±0.04) aA	0.58 (±0.06) aB	11.04 (±0.41) abA	8.57 (±0.82) abB
CaS40	6.27 (±0.52) cA	5.09 (±0.42) cB	0.97 (±0.08) bA	0.44 (±0.04) bB	8.77 (±0.73) dA	7.22 (±0.60) cB
FeR64	6.99 (±0.30) bcA	5.87 (±0.40) bcB	1.13 (±0.05) aA	0.48 (±0.03) bB	10.21 (±0.44) bcA	6.92 (±0.47) cB
FeS24	6.95 (±0.39) cA	5.67 (±0.36) bcB	0.97 (±0.05) bA	0.48 (±0.03) bB	8.86 (±0.46) dA	7.51 (±0.52) bcB
FeS53	6.71 (±0.39) cA	6.94 (±0.63) aA	0.95 (±0.06) bA	0.58 (±0.05) aB	9.35 (±0.55) cdA	9.25 (±0.84) aA
NI	7.84 (±0.53) bA	6.47 (±0.51) abB	1.21 (±0.08) aA	0.63 (±0.05) aB	11.87 (±0.80) aA	8.63 (±0.69) abB

Data represent the means (± SD) of 5 replicates of plants grown in vermiculite in a photoperiod chamber

Values in the same column followed by the same lower case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test)

Values in the same line followed by the same upper case letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test)

^a CaR114 (*Paenibacillus sonchi*); CaS40 (*Paenibacillus jamilae*); FeR64 (*Bacillus aryabhatai*); FeS24 (*Paenibacillus durus*); and FeS53 (*Paenibacillus zanthoxyli*), NI (non-inoculated)

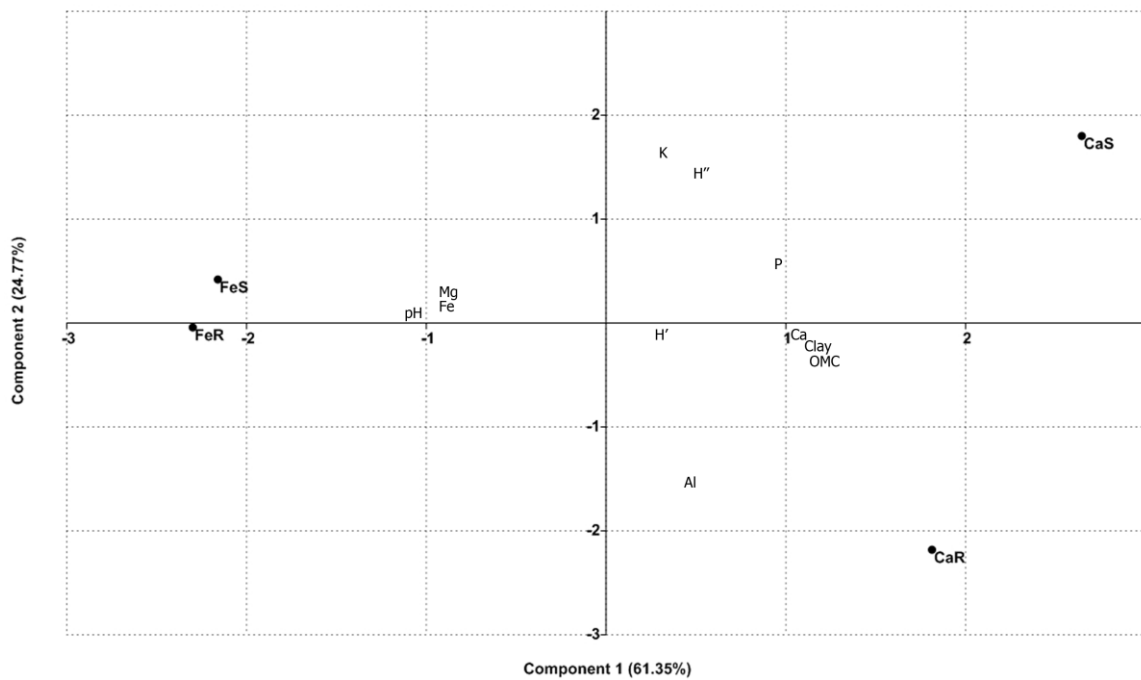


Figure 1

Principal component analysis (PCA) of the diversity indices (H' and H'') of the sampling sites (CaR: tolerant cultivar, Cachoeirinha; CaS: susceptible cultivar, Cachoeirinha; FeR: tolerant cultivar, Camaquã; FeS: susceptible cultivar, Camaquã) in relation to different soil properties (clay, organic matter content (OMC), pH, P, K, Fe, Ca, and Al). Principal component 1 and component 2 accounted for 61.35% and for 24.77% of the total variation, respectively.

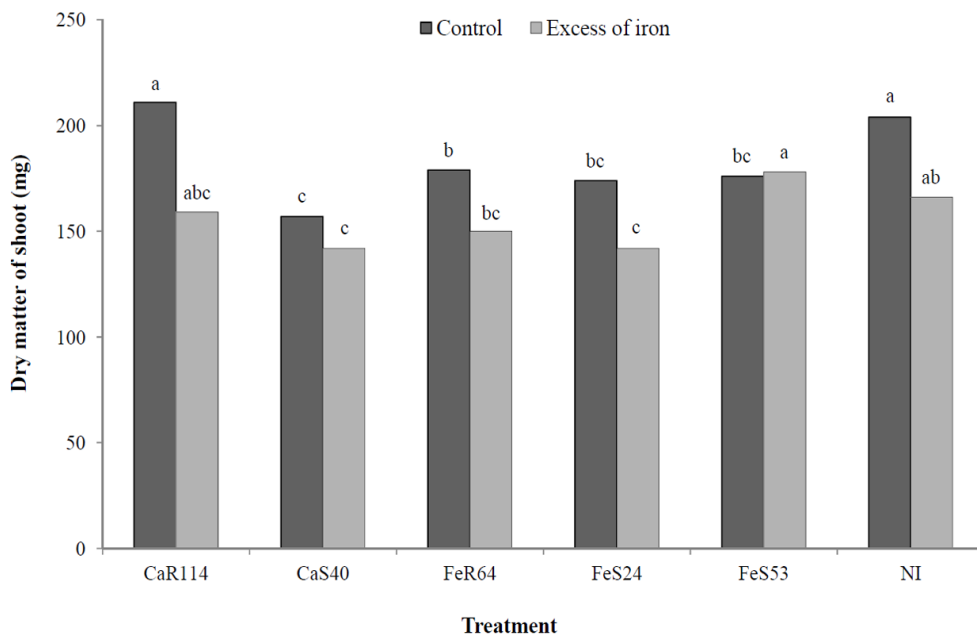


Figure 2

Growth response of rice plants inoculated with selected native bacilli (CaR114: *Paenibacillus sonchi*; CaS40: *Paenibacillus jamilae*; FeR64: *Bacillus aryabhatai*; FeS24: *Paenibacillus durus*; and FeS53: *Paenibacillus zanthoxyli*; NI: non-inoculated) under growth chamber conditions. Values represent means (\pm SD) of 5 replicates of plants. All bacterial treatments are compared only to respective non-inoculated treatment. Dark bars (control) are compared only to each other, as are grey bars (excess of iron). Bars followed with same letter did not differ significantly at $P > 0.05$ (Tukey's test).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas podem ser consideradas um microecossistema complexo onde diferentes nichos são explorados por uma variedade de micro-organismos. Neste conjunto, as bactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser classificadas como endofíticas ou associativas (Shenoy et al., 2001), não patogênicas, que atuam diretamente ou indiretamente promovendo o crescimento vegetal (Vessey, 2003). Atualmente, a capacidade de bactérias associadas às plantas em estimular o crescimento vegetal tem recebido especial atenção, pois estas bactérias podem influenciar o crescimento, o desenvolvimento e a saúde da planta. As associações benéficas comumente evoluem a partir de relações específicas entre determinados tipos de plantas e bactérias. Bactérias benéficas podem dispor de distintos sistemas biológicos envolvidos na interação com espécies vegetais, tais como: fixação de N_2 e disponibilização total ou parcial de N à planta; solubilização de minerais, tais como fósforo, ao redor das raízes; produção de sideróforos (quelantes de ferro); produção de reguladores de crescimento vegetal (auxinas); e metabolização do precursor de etileno, hormônio vegetal produzido sob condições de estresse. Além disso, muitas espécies de micro-organismos são capazes de competir e inibir a proliferação de fitopatógenos com a produção de substâncias antagonistas, ou, ainda, suprimir doenças através da indução de mecanismos de resistência.

Adicionalmente, o papel de bactérias benéficas no gerenciamento de estresses abióticos está ganhando grande importância, pois tais organismos, quando associados às plantas, podem desempenhar um papel importante em conferir tolerância a diferentes estresses ambientais (Grover et al., 2011). O desenvolvimento de variedades tolerantes a estresse por meio de engenharia genética e melhoramento de plantas é essencial. Porém, é um processo longo, ao passo que a inoculação com PGPBs pode minimizar os sintomas de estresses nas plantas além de ter menor custo, ser um método mais rápido e prático (Grover et al., 2011). A inoculação de plantas com bactérias não patogênicas pode fornecer “bioproteção” podendo aumentar a tolerância das plantas aos diferentes estresses abióticos (Dimkpa et al., 2009). Diversos estudos abordam os efeitos positivos de estirpes bacterianas na promoção de crescimento vegetal em plantas cultivadas sob estresse abiótico (Figueiredo et al., 2008; Ali et al., 2009; Bal et al., 2013). Por isso, o termo tolerância sistêmica induzida tem sido proposto para alterações físicas e químicas induzidas por PGPBs que resultam no aumento da tolerância para estresses abióticos (Grover et al., 2011).

Sendo o arroz uma das culturas mais cultivadas no mundo, é extremamente importante saber sobre as interações microbianas solo-planta, a fim de que uma menor quantidade de fertilizantes nitrogenados seja aplicada no cultivo de arroz. Na síntese química dos fertilizantes nitrogenados são empregadas altas temperaturas e pressões, obtidas a partir de derivados de petróleo, para quebrar a tripla ligação do N₂, o que os torna os adubos mais caros do mercado. Para a síntese de amônia são necessárias grandes quantidades de petróleo e os adubos nitrogenados aplicados ao solo não são completamente absorvidos pela cultura. A volatilização, a desnitrificação e a lixiviação são processos que provocam não só a perda do N, mas também podem causar danos ecológicos sérios, como a eutrofização e a contaminação de mananciais (Siqueira et al., 1994).

Para alcançar os objetivos propostos neste trabalho foram integradas diferentes metodologias dependentes de cultivo que incluíram desde a identificação e caracterização da comunidade bacteriana, ensaios de inoculação em câmara de crescimento e a campo, até a produção de um produto inoculante. Combinações de técnicas podem representar um passo fundamental para uma correta descrição das análises das comunidades microbianas. Em vista do potencial das PGPBs para o uso na agricultura, todas as etapas desenvolvidas nesse estudo permitiram auxiliar no conhecimento e no desenvolvimento de um produto inoculante (biofertilizante).

Neste trabalho, foram isoladas 665 estirpes bacterianas associadas ao solo rizosférico e raízes de arroz, cultivadas em diferentes regiões produtoras do Sul do Brasil. Estirpes pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Burkholderia* foram as mais abundantes entre todos os isolados Gram negativos, em todas as condições. Após a identificação e caracterização dos isolados, cinco foram selecionados e submetidos a experimentos de inoculação de sementes, em ensaio a campo. Plantas de arroz inoculadas com os isolados *Herbaspirillum* sp. (AC32), *Burkholderia* sp. (AG15), *Pseudacidovorax* sp. (CA21) e *Azospirillum* sp. (UR51) em conjunto com a metade da dose de fertilizante nitrogenado atingiram resultados semelhantes às aquelas tratadas com a dose total de fertilizante, sem inoculação (Capítulo 1), demonstrando, assim, o potencial dessas estirpes na formulação de produtos inoculantes para a cultura do arroz.

O capítulo 3 mostra o potencial de isolados bacterianos em promover o crescimento de plantas de arroz cultivadas em diferentes condições de ferro, bem como o estudo da diversidade de PGPBs em cultivares de arroz com diferentes níveis de tolerância ao excesso de ferro no solo. Até o momento, não se conhece nenhum trabalho

publicado com esta mesma abordagem. Como principal resultado foi demonstrado que plantas inoculadas com estirpes pertencentes aos gêneros *Burkholderia* sp., *Chryseobacterium* sp., e *Paenibacillus* sp. apresentaram efeitos satisfatórios em relação ao crescimento e captação de nutrientes, nas condições testadas. Esses resultados comprovaram que estirpes bacterianas apresentam um grande potencial para interagir positivamente com arroz. No entanto, para melhor investigar a capacidade das estirpes testadas é necessário um experimento de campo, assim como o mecanismo de ação envolvido no crescimento das plantas.

Quanto aos experimentos de biofertilização, esses devem ser executados de acordo com as normas recomendadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento) através do anexo à IN SDA 13, de 25/03/2011 (Requisitos mínimos para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, produtos e tecnologias relacionados a micro-organismos promotores de crescimento vegetal). Tais requisitos correspondem a práticas agrícolas empregadas para uma correta avaliação da produtividade vegetal. A etapa de produção de inoculante é fundamental para que o biofertilizante apresente adequadas condições de sobrevivência, respeitando um prazo de validade. Nesta etapa, os experimentos de biofertilização a campo foram realizados em duas regiões com condições edafoclimáticas distintas: Cachoeira do Sul e Camaquã, RS (Capítulo 2). No entanto, é importante ressaltar que experimentos adicionais a campo devem ser realizados para confirmar a potencialidade dos isolados na promoção de crescimento e aumento da produtividade no cultivo de arroz para a posterior indicação como um produto inoculante.

O uso de inoculantes microbianos pode contribuir tanto para uma maior eficiência agrônômica quanto para a redução de custos e poluição ambiental, pois a utilização de fertilizantes químicos pode ser reduzida total ou parcialmente no caso de aumento da produtividade vegetal por inoculantes eficientes. Devido à viabilização da agricultura sustentável e à grande demanda por tecnologias ‘limpas’, pode-se esperar que, futuramente, uma percentagem maior dessas bactérias venha a ser usada na produção agrícola. Inoculantes atuam como “adubos naturais” por serem desenvolvidos a partir de micro-organismos simbiotes ou associativos com atuação favorável ao crescimento vegetal, os quais são previamente isolados das raízes ou solo adjacente de plantas com as quais mantêm uma interação específica.

Por fim, esses resultados reforçam, mais uma vez, os benefícios econômicos e ambientais que resultam da substituição dos fertilizantes nitrogenados pela inoculação

de bactérias benéficas. As bactérias promotoras de crescimento vegetal são microorganismos bastante estudados e de grande potencial para utilização na agricultura, representando um grupo bastante diverso de bactérias de fácil acesso e caracterização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akbari GA, Arab SM, Alikhani HA, Allahdadi I, Arzanesh MH (2007) Isolation and Selection of Indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of Superior Strains Effects on Wheat Roots. *World Journal of Agricultural Sciences* 3(4):523-529.

Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S (2009) Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology Biotechnology* 25:519-526.

Alves BJR, Boddey RM e Urquiaga S (2004) The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant Soil* 252:1-9.

Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro FG, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356:245-264.

Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215-237.

Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB, Pühler A (1988) Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* 203:715-738.

Arshad M, Saleem M, Hussain S (2007) Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology* 25:356-362.

Arshad M, Shaharoon B; Mahmood T (2008) Inoculation with *Pseudomonas* spp. Containing ACC-Deaminase Partially Eliminates the Effects of Drought Stress on Growth, Yield, and Ripening of Pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere* 18:611-620.

Bal HB, Nayak L, Das S, Adhya TK (2013) Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366:93-105.

Baudoin E, Lerner A, Mirza MS, Zemrany HE, Prigent-Combaret C, Jurkevich E, Spaepen S, Vanderleyden J, Nazaret S, Okon Y, Moënne-Loccoz Y (2010) Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. *Research in Microbiology* 161:219-226.

Becker M, Asch F (2005) Iron toxicity in rice - conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 68:558-573.

Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agentes. *Genetics and Molecular Biology* 35:1044-1051.

Benite AMC, Machado SP, Machado BC (2002) Sideróforos: “uma resposta dos micro-organismos”. *Química Nova* 25:1155-1164.

- Bishop PE, Premakumar R (1992) Alternative nitrogen fixation systems. In: Stacey G; Burris DR; Evans H J (Eds). Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York. pp. 736-762.
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB, Irbg R, Irbg B (2000) Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci Soc Am J* 64:1644-1650.
- Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134:189-207.
- Boukhalfa H, Crumbliss AL (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15:325-339.
- Braun V, Hantke K (2011) Recent insights into iron import by bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 15:328-34.
- Buysens S, Höfte M, Poppe J (1995) Biological control of *Pythium* sp in soil and nutrient film technique systems by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Acta Horticulturae* 382:238-245.
- Chabot R, Antoun H e Cescas MP (1993) Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can J Microbiol* 39 :941-7.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33-41.
- Cheng Q (2008) Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *J Integr Plant Biol* 50(7):784-796.
- Chipperfield JR, Ratledge C (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* 13(2):165-8.
- Chubatsu LS, Monteiro RA, Souza EM, Oliveira MAS, Yates MG, Wasseem R, Bonatto AC, Huergo LF, Steffens MBR, Rigo LU, Pedrosa FO (2012) Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedica*. *Plant Soil* 356:197-207.
- Counce PA, Keisling TC, Mitchell AJ (2000) Uniform, objective and adaptive system for expressing rice development. *Crop Science* 40:436-443.
- Crowley DE, Reid CPP, Szaniszlo PJ (1988) Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Phys* 87:680-685.
- Datta M, Banish S, Dupta RK (1982) Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil* 69:365-73.
- De Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ (1997) Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertil Soils* 24:358-364.

- Dimkpa C, Merten D, Svatos A, Buchel G, Kothe E (2009) Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biol & Biochem* 41:154-162.
- Dixon R, Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2:621-631.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV, Vanderleyden J (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutante strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212:155-164.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22:107-149.
- Döbereiner J, Pedrosa FO (1987) Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. Science Tech, Madison and Springer Verlag, Berlin.
- Dobermann A, Fairhurst TH (2000) Rice: Nutrient disorders and nutrient management. The International Rice Research Institute, Manila. The Philippines, p. 191.
- Doyle LMG, Scharf S, Silva Filho GN (1990) Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos de solos cultivados com fruteiras temperadas em Santa Catarina. *Biotemals* 2:59-76.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Microbiology* 67(11):5285-5293.
- Fageria NK, Slaton NA, Baligar VC (2003) Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. *Advances in Agronomy* 80:63-152.
- Figueiredo VB, Burity HA, Martínez CR, Chanway CP (2008) Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* 40:182-188.
- Franche C, Lindström K, Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321:35-59.
- Gaur AC, Ostwal KP (1972) Influence of phosphate dissolving bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian J Exp Biol* 10:393-4.
- Glass ADM (1989) Plant Nutrition: An Introduction to Current Concepts. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, USA. 234 pp.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109-117.

Glick BR, Patten CL, Holguin G e Penrose DM (1999) Biochemical and genetics mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.

Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiol Lett 251:1-7.

Gomes AS, Magalhães Júnior AM (2004). Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília, Embrapa, 899 p.

Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biol Biochem 37:395-412.

Grover M, Ali SKZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. World Journal Microbiology and Biotechnology 27:1231-1240.

Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, Bontemps C, Estrada-de Los Santos P, Gross E, Dos Reis FB, Sprent JI, Young JP, James EK (2011) Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. Molecular Plant-Microbe Interactions 24:1276-1288.

Hakoyama T, Niimi K, Watanabe H, Tabata R, Matsubara J, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Jichun L, Matsumoto T, Tatsumi K, Nomura M, Tajima S, Ishizaka M, Yano K, Imaizumi-Anraku H, Kawaguchi M, Kouchi H, Suganuma N (2009) Host plant genome overcomes the lack of a bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation. Nature 462:514-518.

Harris JN, New PB, Martin PM (2005) Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilising bacteria on plants. Soil Biology & Biochemistry 38:1521-1526.

Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil 237:173-195.

Höfte M, Pahn B (2007) Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In: Varma A, Chincholkar S (Eds). Microbial siderophores. Springer-Verlag, Berlin Heildeberg, pp. 121-133.

Holford ICR (1997) Soil phosphorus, its measurements and its uptake by plants. Austr J Soil Res 35, 227-239.

Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsubishi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2006) Rice plants take up iron as Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. Plant Journal 45:335-346.

Jensen JB, Egsgaard H, OnckeleN HV, Jochimsen BU (1995) Catabolism of Indole-3-Acetic Acid and 4- and 5-Chloroindole-3-Acetic Acid in *Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Bacteriology 177:5762-5766.

- Jha Y, Subramanian RB, Patel S (2011) Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. *Acta Physiol Plant* 33:797-802.
- Jha CK, Saraf M (2012) Hormonal Signaling by PGPR Improves Plant Health Under Stress Conditions. In: Maheshwar DK (Ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 119-140.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil* 205:25-44.
- Khan AG (2005) Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* 18:355-364.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agron Sustain Dev* 27:29-43.
- Knoblauch R, Reis MS (2004) Arroz irrigado em sistema de cultivo pré-germinado. Belo Horizonte, Informe Agropecuário 25:44-51.
- Kobayashi T, Nishizawa NK (2012) Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* 63:131-52.
- Kpombekou K, Tabatabai MA (1994) Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci* 158:442-453.
- Kraepiel AML, Bellenger JP, Wichard, Morel FMM (2009) Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *Biometals* 22:573-581.
- Kravchenko LV, Azarova TS, Makarova NM, Tikhonovich IA (2004) The Effect of Tryptophan Present in Plant Root Exudates on the Phytostimulating Activity of Rhizobacteria. *Microbiology* 73:156-158.
- Krewulak HD, Vogel HJ (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* 1778:1781-804.
- Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat JF (2009) Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321:513-535.
- Leveau JHJ, Lindow SE (2005) Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2365-2371.
- Lynch JM (1990) *The rhizosphere*. Wiley-Interscience, Chichester, England, 458 p.
- Lyndsay WL (1979) *Chemical equilibrium in soil*. New York, J. Willey & Sons. 449p.

- McLaughlin MJ, McBeath TM, Smernik R, Stacey SP, Ajiboye B, Guppy C (2011) The chemical nature of P accumulation in agricultural soils-implications for fertiliser management and design: an Australian perspective. *Plant Soil* 349:69-87.
- Mehraban P, Zadeh A, Sadeghipour H (2008) Iron Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.), under Different Potassium Nutrition. *Asian Journal of Plant Sciences* 7:251-25.
- Moat AG, Foster JW (1995) Nitrogen metabolism; in Moat AG and Foster JW (eds) *Microbial Physiology*. Wiley-Liss, New York, pp. 436-461.
- Neilands JB (1995) Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 270:26723-26726.
- Okon Y (1985) *Azospirillum* as a potential inoculum for agriculture. *Trends Biotechnol* 3:223-228.
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795-3801.
- Paul EA, Clark FE (1989) *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego, 272 p.
- Ponnamperuma FN (1972) The chemistry of submerged soils. *Advances in Agronomy*, 24:29-96.
- Prinsen E, Costacurta A, Michiels K, Vanderleyden J, Onckelen H (1993) *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol Plant-Microbe Interact* 6:609-615.
- Qin L, Jiang H, Tian J, Zhao J, Liao H (2011) Rhizobia enhance acquisition of phosphorus from different sources by soybean plants. *Plant Soil* 349:25-36.
- Quispel A (1991) A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. *Plant Soil* 137:1-11.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2001). Regulando o crescimento e o desenvolvimento: hormônios vegetais. In: Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (Ed.). *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. pp. 646-675.
- Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes JL, Mendez N, Toscano V, Mulling M, Galvez L, Vanderleyden J (2008). Effect of *Rhizobium-Azospirillum* co-inoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312:25-37.
- Richardson AE, Simpson RJ (2011) Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology* 156:989-996.

Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339.

Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287:15-21.

Rosado A, Duarte GF, Seldin L, Van Elsas JD (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments. *Appl Environ Microbiol* 64:2770-2779.

Rudolph G, Hennecke H, Fischer HM (2006) Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* 30:631-48.

Saikia SP, Jain V (2007) Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? *Current Science* 92(3):317-322.

Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:635-648.

Saravanakumar D, Samiyappan R (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology* 102:1283-1292.

Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and ¹⁵N₂ Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and Nif Mutant Strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:358:366.

Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA (2006) Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett Appl Microbiol* 42:155-159.

Shaharoon B, Naveed M, Arshad M, Zahir ZA (2008) Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 79:147-155.

Shenoy VV, Kalagudi GM, Gurudatta BV (2001) Towards nitrogen autotrophic rice. *Current Science* 81(5):451-457.

Shridhar BS (2012) Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiological Research* 3(1):46-52.

Siqueira JO, Moreira FMS, Grisi BM, Hungria M, Araújo S (1994) *Microorganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental*. Embrapa, Brasília, p. 142.

SOSBAI - Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (2010) Arroz irrigado: Recomendações técnicas para o Sul do Brasil. Bento Gonçalves, RS, 188 p.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31(4):425-48.

Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J (2008) Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312:15-23.

Stein RJ, Duarte GL, Spohr MG, Lopes SIG, Fett JP (2009) Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. *Annals of Applied Biology* 154:269-277.

Taiz L, Zeiger E (2009) Fisiologia do estresse. In: Taiz L, Zeiger E (Org). *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre, Artmed, 819 p.

Tanaka A, Loe R, Navasero AS (1966) Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 12:32-38.

Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews* 7:847-859.

Touati D (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 373:1-6.

Trolove SN, Hedley MJ, Kirk GJD, Bolan NS, Loganathan P (2003) Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Australian Journal of Soil Research* 471-499.

Vandendergh PA, Gonzalez CF (1984) Methods for protecting the growth of plants employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida*. US Patent No. US4 479936.

Vessey JK (2003) Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.

Wei Jin C, Xin Li G, Hui Yu X, Zheng SJ (2010) Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Annals of Botany* 105:835-841.

Weller DM (1998) Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26:379-407.

Xie H, Pasternak JJ, Glick BR (1996) Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr Microbiol* 32:67-71.

Yamauchi M, Peng XX (1995) Iron toxicity and stress-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Soil* 173:21-28.

Sites

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da economia mundial (2009). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2009). Disponível em <http://www.fao.org>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2012). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>

IRGA - INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ (2013). Disponível em: http://www.irga.rs.gov.br/upload/20131024101611producao_rs_e_brasil.pdf