

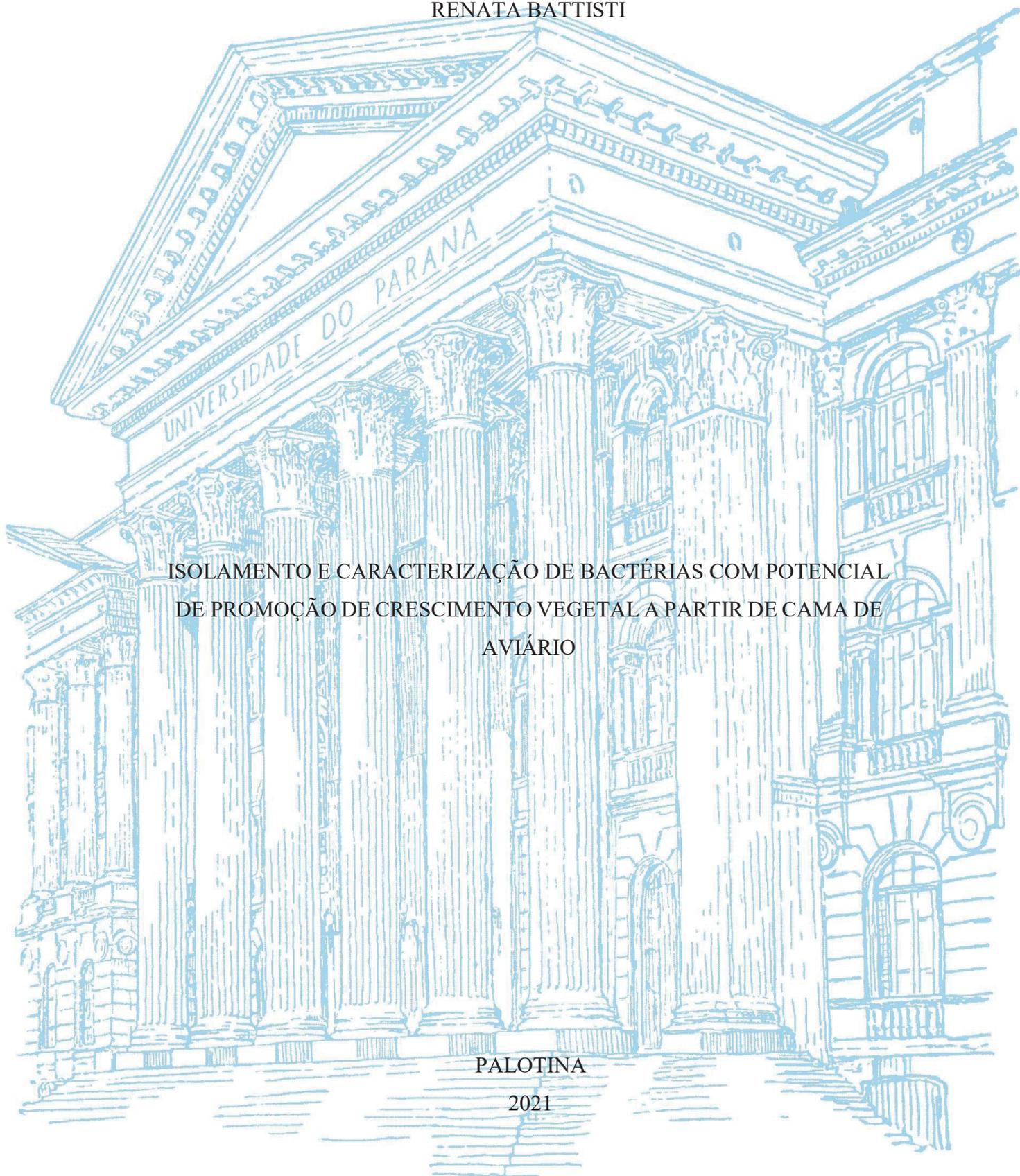
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ

RENATA BATTISTI

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL  
DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL A PARTIR DE CAMA DE  
AVIÁRIO

PALOTINA

2021



RENATA BATTISTI

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL  
DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL A PARTIR DE CAMA DE  
AVIÁRIO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Professora. Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.

Coorientadora: Professora Marise Fonseca Dos Santos.

PALOTINA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B336 Battisti, Renata  
Isolamento e caracterização de bactérias com potencial de promoção de crescimento vegetal a partir de cama de aviário / Renata Battisti – Palotina, 2021.  
76f.

Orientadora: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo  
Coorientadora: Marise Fonsceca dos Santos  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1. Biotecnologia. 2. Bactérias. 3. Aviário. 4. Microbiologia.  
I. Vendruscolo, Eliane Cristina Gruszka. II. Santos, Marise Fonsceca dos. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

ATA Nº37

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM BIOTECNOLOGIA

No dia dezoito de novembro de dois mil e vinte e um às 09:00 horas, na sala online, via Plataforma Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda RENATA BATTISTI, Intitulada: **Isolamento e caracterização de bactérias com potencial de promoção de crescimento vegetal a partir de cama de aviário, sob orientação da Profa. Dra. ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO.** A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), DANY ALBERTO MESA FIAGÁ (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE), ROBSON FERNANDO MISSIO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 18 de Novembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

22/11/2021 10:49:03.0

ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/11/2021 15:27:15.0

DANY ALBERTO MESA FIAGÁ

Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

Assinatura Eletrônica

18/11/2021 15:06:00.0

ROBSON FERNANDO MISSIO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de RENATA BATTISTI intitulada: **Isolamento e caracterização de bactérias com potencial de promoção de crescimento vegetal a partir de cama de aviário**, sob orientação da Profa. Dra. ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as Indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 18 de Novembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

22/11/2021 10:49:03.0

ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/11/2021 15:27:15.0

DANY ALBERTO MESA FIAGÁ

Avallador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

Assinatura Eletrônica

18/11/2021 15:06:00.0

ROBSON FERNANDO MISSIO

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus pais, Albino e Maria de Lourdes, e meus irmãos Dione Patrícia e José Fernando minha gratidão por sempre estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida e prestar todo apoio necessário para me tornar à pessoa que sou!

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por Ele ter concedido o dom da vida e toda a sabedoria para poder chegar até este momento. Gratidão por todas as pessoas que colocastes em meu caminho durante toda minha jornada sem dúvidas fez a diferença em meus dias.

A professora Doutora Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, primeiramente por me dar uma excelente oportunidade de conhecimento e crescimento como bolsista técnica, isso tudo sem nos conhecermos, também pela orientação neste presente trabalho, e apoio e todos os momentos de dedicação a minha formação. Minha gratidão por sempre se dedicar a buscar comigo os melhores resultados e me incentivar a ser uma profissional qualificada.

Obrigada por sempre estar disposta a esclarecer as dúvidas e agregar seu conhecimento para o desenvolvimento do mesmo.

À Profa. Dra. Adriana Fiorini, sempre atenciosa, e muito compreensível, obrigada pela amizade, pelas dicas, orientações e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Robson Missio, por todo o auxílio com a parte estatística do presente trabalho e por sempre auxiliar em todas as questões referentes ao programa de mestrado.

A todos os professores da UFPR Setor Palotina que sempre se dispuseram a me auxiliar nas pesquisas, matérias e todo o conhecimento adquirido ao longo de todo o período de estudos.

Aos meus pais Albino e Maria de Lourdes Battisti, que desde sempre apoiaram e colaboraram com minha educação, e nunca mediram esforços para que pudesse colher bons frutos em minha formação, tornando possível o sonho de conclusão da graduação.

Aos meus irmãos Dione Patrícia e José Fernando Battisti, que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar e dar suporte em todos os anos dedicados à pós-graduação.

Aos meus Amigos de LaBioGen Pedro, Danieli, Adriana e Kawana por todo apoio e parceria durante o período que estivemos trabalhando e elaborando juntos nossas pesquisas laboratoriais, gratidão por tudo que aprendi e compartilhei com cada um de vocês nesses meses de grande aprendizado que pude estar em vossas companhias, também agradeço pelos momentos de descontração, brincadeiras e risadas que juntos tivemos, fazendo desse período mais leve e agradável

As técnicas do bloco multidisciplinar, Adeline, Mara, Cleuza e Marina que sempre estiveram disponíveis em todos os momentos que precisei de seus preciosos saberes.

A Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFPR pela disponibilização da Bolsa Técnica, durante o período de 16 meses.

A empresa Biotecnal por disponibilizar as amostras de cama de aviário para realização do isolamento bacteriano.

À UFPR Setor Palotina e a todo seu corpo de servidores por terem contribuído direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, a cada um o meu muito obrigada.

A todas as pessoas que de alguma forma tanto direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho e a obtenção dos melhores resultados e também que fizeram parte de toda minha formação, meu muito obrigada.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação, mas se você não fizer nada, não existirão.”

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

A cama de aviário constitui todo o material distribuído em um galpão ou estábulo para servir de leito aos animais acolhendo excreções, restos de ração e penas. Basicamente é composta de resíduos do beneficiamento industrial da madeira como cavacos, maravalha, serragem e pó de lixadeira. Além do uso como forração de granjas, também tem sido amplamente usado como biofertilizante agrícola, aumentando a sua importância econômica. Todavia, poucos trabalhos relatam a composição microbiológica deste material ou o potencial biotecnológico de grupos bacterianos presentes neste material. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade bacteriana deste material or microbiologia tradicional, caracterizando alguns grupos em relação ao potencial de promoção de crescimento vegetal. Os isolados foram analisados quanto à capacidade de solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético (AIA), capacidade de fixação biológica de nitrogênio e antagonismo fúngico. Também foi determinado as identidades das sequências e o posicionamento taxonômico de 29 isolados com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e 3 isolados do gênero *Bacillus* foram escolhidos para ser avaliado o potencial de isolados bacterianos na promoção do crescimento de plântulas de *brachiaria in vitro*. Como resultados foram obtidos 67 isolados bacterianos de cama de aviário, sendo que destes, 29 foram caracterizados molecularmente e bioquimicamente. Os isolados foram alocados taxonomicamente nos seguintes gêneros: *Bacillus*, 27% foram do gênero *Staphylococcus*, 27% *Brevibacillus*, 37% foram *Bacillus* e o restante constava dos gêneros *Isoptericola*, *Microbacterium*, *Oxalicibacterium*, (3 % de cada um). Dentre os isolados avaliados, nenhum apresentou capacidade de solubilização de fosfato, 24 apresentaram capacidade positiva para a fixação biológica de nitrogênio pela formação de película. O isolado UFPRCA19 apresentou maior produção de AIA e o isolado UFPRCA128 apresentou menor produção de AIA. Em relação à capacidade antagonista, 11 isolados foram positivos para o antagonismo com o fungo *Aspergillus* spp e 25 foram positivos para *Trichoderma* spp. Na avaliação da capacidade de promoção de crescimento vegetal, dentre os isolados *Bacillus*, o isolado UFPRCA08 e UFPRCA19 se destacaram, promovendo as maiores altura das plântulas (ambos os gêneros, dos isolados utilizados) e acréscimos na biomassa das plântulas e de biomassa fresca de raiz das plântulas, respectivamente.

Palavras-chaves: 1. Biotecnologia 2. Bactérias 3. Aviário 4. Microbiologia

## ABSTRACT

The poultry litter is all the material distributed in a shed to serve as a bed for the animals, housing excreta, leftovers of feed and feathers. Basically, it is composed of residues from industrial wood processing, such as chips, wood shavings, sawdust and sander dust. In addition to its use as forage for farms, it has also been widely used as an agricultural biofertilizer, increasing its economic importance. However, few studies report the microbiological composition of this material or the biotechnological potential of bacterial groups present in this material. The objective of this work was to study the bacterial diversity of this material, characterizing some groups in relation to their potential to promote plant growth. The isolates were analyzed for phosphate solubilization capacity, indole-3-acetic acid (IAA) production, biological nitrogen fixation capacity and fungal antagonism. Sequence identities and taxonomic positioning of 30 isolates based on partial sequencing of the 16S rRNA gene were also determined and 3 isolates of the genus *Bacillus* were chosen to evaluate the potential of bacterial isolates in promoting the growth of brachiaria seedlings in vitro. As results obtained, 67 bacterial isolates from poultry litter were obtained, of which 30 were molecularly and biochemically characterized. *Bacillus* and the rest consisted of the genera *Isoptericola*, *Microbacterium*, *Oxalicibacterium*, (3.5% of each). Among the evaluated isolates, none showed phosphate solubilization capacity, 25 showed positive capacity for biological nitrogen fixation by pellicle formation. Regarding IAA production, the UFPRCA19 isolate had the highest capacity and the UFPRCA128 isolate, the least. Regarding antagonist capacity, 11 isolates were positive for antagonism with the *Aspergillus* spp fungus and 25 were positive for *Trichoderma* spp. In evaluating the capacity to promote plant growth, among the *Bacillus* isolates, the isolate UFPRCA8 and UFPRCA19 stood out, promoting the highest seedling height (both genera) and increases in seedling biomass and fresh weight of seedling root mass, respectively.

Keywords: 1. Biotechnology 2. Bacteria 3. Aviary 4. Microbiology

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: DENDOGRAMA DE SIMILARIDADE DE ISOLADOS *BACILLUS* SP ISOLADOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO E GRUPO EXTERNO DE *FUSARIUM OXYSPORUM*. OS NÚMEROS EM CADA FORQUILHA REPRESENTAM OS VALORES DE BOOSTRAP. ....47
- FIGURA 2: CARACTERÍSTICAS MORFO-FISIOLÓGICAS AVALIADAS EM PLÂNTULAS DE *BRACHIARIA* INOCULADAS IN VITRO COM OS ISOLADOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE TUKEY ( $P>0.05$ ) ( $N=9\pm SD$ ). ....48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CAMA DE FRANGO UTILIZADA NOS SISTEMAS DE MANEJO .....	17
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, FORMA E ASPECTO VISUAL DOS ISOLADOS .....	34
TABELA 3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E TESTE DE TUKEY DOS ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO .....	41
TABELA 4. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA PROVÁVEL DE ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO .....	44

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1	CAMA DE AVIÁRIO.....	16
2.1.1	Destinação da cama de aviário .....	18
2.1.2	Braquiária Ruziziensis ( <i>Urochloa ruziziensis</i> ) .....	19
2.2	BIOPROSPECÇÃO E BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	20
2.2.1	Fixação biológica de nitrogênio .....	21
2.2.2	Solubilização de fosfato .....	22
2.2.3	Produção de Ácido-3-Indolácético (AIA) .....	23
2.2.4	Mecanismos indiretos da promoção de crescimento .....	23
2.3	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM UROCHLOA SP .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS .....	26
3.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	26
3.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS .....	27
3.3.1	DNA genômico .....	27
3.3.2	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	27
3.3.3	Sequenciamento do gene 16s rDNA .....	27
3.3.4	Análise das sequências do gene 16s rDNA .....	28
3.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS.....	28
3.4.1	Capacidade de fixação biológica de nitrogênio.....	28
3.4.2	Capacidade de solubilização de fosfato.....	29
3.4.3	Produção do Ácido Indol-3-Acético (AIA).....	29
3.4.4	Capacidade antagonista ou anti-fúngica.....	30
3.5	CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO .....	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA .....	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO .....	43
4.4	AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTULAS DE BRACHIARIA.....	46
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO A.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial exige estoques cada vez mais significativos de alimentos. A produtividade das espécies agronômicas depende do uso de fertilizantes químicos de grande custo e impacto ambiental. Algumas estratégias biotecnológicas podem contribuir para a redução desses impactos, principalmente o uso de biofertilizantes e entre estes, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) como inoculantes agrícolas (Goswami et al., 2016a). Para a produção de inoculantes uma estratégia é o isolamento bacteriano a partir do solo, de resíduos produzidos pela pecuária, suinocultura e avicultura, entre outros substratos (Maciel et al., 2020).

O Brasil é o terceiro maior criador de frangos do mundo (Embrapa, 2021). A avicultura é uma atividade produtora de grande quantidade de resíduos e, um dos principais é a cama de aviário, entretanto, pode ser reutilizado também na agricultura.

A cama de aviário constitui todo o material distribuído em um galpão para servir de leito aos animais acolhendo excreções, restos de ração e penas (Avila et al., 1992). Basicamente, a cama é composta de resíduos do beneficiamento industrial da madeira como cavacos, maravalha, serragem e pó de lixadeira. Além do uso como forração de granjas, também tem sido amplamente usado como biofertilizante agrícola, aumentando a sua importância econômica.

O isolamento de bactérias com interesse agronômico vem ganhando espaços nos estudos biotecnológicos, pois muitas das bactérias que são utilizadas para a obtenção de inoculantes, estão dispostas em matérias primas de fácil acesso. Bactérias de vários gêneros são responsáveis por promover o crescimento vegetal de culturas agronômicas e muitas vezes não estão disponíveis no solo onde as plantas são cultivadas. Por isso se faz necessário à inoculação das mesmas nas plantas desde antes do plantio e também no próprio solo.

As bactérias que são inoculadas em plantas auxiliam no desenvolvimento vegetal, com a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácido indolacético. Esses processos são importantes para o desenvolvimento da planta, quando realizados com sucesso, a planta tende a produzir maior biomassa (Santos et al., 2019).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar bactérias fixadoras de nitrogênio, avaliar a capacidade de solubilização de fosfato e produção de ácido indol-3-acético, com potencial de uso biotecnológico, através da cama de aviário. Bem como a avaliação da utilização desses isolados no crescimento vegetal da braquiária *Uroclhoa ruzizensis*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CAMA DE AVIÁRIO

A produção de frangos no Brasil se iniciou com a criação de animais pelas famílias de pequenos produtores onde os frangos chamados de “caipira” eram o que mais se produzia, principalmente para abastecer a demanda da própria família, assim como a produção de outros alimentos. As primeiras criações desses animais com fins comerciais ocorreram na região sudeste do país, em meados de 1930, com a chegada dos imigrantes de origem japonesa (Zen et al., 2015). A avicultura no Brasil se tornou com o passar dos anos uma das atividades do agronegócio e representa uma fatia considerável do produto interno bruto brasileiro nos últimos anos (Coelho et al., 2021). A atividade se desenvolveu muito rapidamente nas últimas três décadas colocando o Brasil como maior exportador e o terceiro maior produtor de frango de corte (Embrapa, 2021).

Esse desenvolvimento foi alicerçado nos avanços obtidos no melhoramento genético, nutrição, sanidade, manejo, biossegurança, instalação, assistência técnica e equipamentos (Zen et al., 2015). Denomina-se cama todo o material distribuído em um galpão para servir de leito aos animais. Mais especificamente chamam-se de cama de frango, o material que, permanecendo no piso de uma instalação avícola irá receber excreções, restos de ração e penas (Avila et al., 1992). Resíduos do beneficiamento industrial da madeira como cavacos, maravalha, serragem e pó de lixadeira compõem a material base para a cama de aviário. Há tentativas de substituição destes materiais por novos métodos e tecnologias. Alternativas de materiais para composição da cama de frango são restos de culturas como soja e milho, casca de arroz e amendoim, resíduos de madeira quimicamente beneficiada, feno. O uso pelo produtor depende de vários fatores como disponibilidade, custo e indicação técnica entre outros (Avila et al., 1992; Cursos CPT, 2020)

A cama de aviário tem uma série de funções importantes, tais como ser altamente absorvente, favorecendo a retenção da água das excretas; diluição das excretas, reduzindo o contato das aves com esta fonte de contaminação; isolamento das aves, especialmente quando jovens, do frio induzido pelo piso; proteção as aves do contato com uma superfície dura e desconfortável. Deste modo, a escolha de um material adequado para a cama é fundamental (Melo, 2018).

A cama de aviário é um fertilizante rico em fonte de Ca, C, P, Mg, N, K, Fe, N, Cu, Mn e Zn, S além de se apresentar com um pH levemente alcalino que pode apresentar

variação nos teores de cada um dos elementos de sua composição bem como a seu teor de umidade (Valadão et al., 2011) (Tabela 1). Por ter essa diversidade de composição, a cama de aviário é um fertilizante completo em nutrientes minerais, apreciável na agricultura, em diversas culturas, mas é preciso que seja utilizado de maneira sustentável, para que além de aumentar a produção, esse fertilizante não se torne um poluente (Correa and Miele, 2011).

Tabela 1. Caracterização química da cama de frango utilizada nos sistemas de manejo

Características	Composição base seca (110°C)	
	Cama de frango	
	Crua	Compostada
pH em CaCl <sub>2</sub> 0,001 mol L <sup>-1</sup>	8,0	8,8
Carbono total (g kg <sup>-1</sup> )	243,0	245,3
N total (g kg <sup>-1</sup> )	40,0	17,5
P total	37,7	30,3
K total	32,0	24,4
Ca total	64,2	64,0
Mg total	7,8	6,9
S total	3,3	2,1
Cu total	233,3	106,0
Mn total	194,5	122,0
Zn total	308,0	289,4
Fe total	2.274,9	1.803,0
B total	137,6	131,0
Relação C/N (C total/ N total)	6,0	14,0

FONTE: Adaptado de Valadão et al. (2011).

A cama de aviário quando aplicada em pastagens promove melhora na rentabilidade com a mesma área de produção (Portugal et al., 2009). Na agricultura, o uso de cama de aviário como fertilizante promove o crescimento vegetal de plantas forrageiras, folhas e colmos maiores e desenvolvidos e sementes mais resistentes (Ferreira et al., 2015). Estudos apontam que quando a cama de aviário é usada em baixas dosagens na composição final

(20%) da fertilização, promove maior desenvolvimento qualitativo das plantas forrageiras (Nascimento et al., 2020). Além do potencial nutricional deste biofertilizante, a cama de aviário pode contribuir para a diminuição de compactação da área onde a mesma será utilizada, pode auxiliar na manutenção da umidade do solo (Consolin Filho et al., 2020).

A cama de aviário se tornou uma opção de fonte de nutrientes para utilização agrônômica barata, se levada em conta o valor dos fertilizantes minerais que se encontram no mercado. No oeste paranaense com intensa atividade avícola, a utilização se dá em maior escala, pela reutilização da mesma na própria propriedade rural ou disponibilizá-la a outros produtores que estão próximos (Franz et al., 2020). Dados do IBGE apontam que no Brasil abateu em 2020, 6 bilhões de frangos e produziu uma quantidade de mais de 500 milhões de metros quadrados de cama de aviário (IBGE, 2021). Este valor representaria um montante de R\$ 60 bilhões, considerando o valor por tonelada de cama de aviário seja R\$ 70,00 a R\$80,00 por m<sup>3</sup> aproximadamente (comunicação informal).

Curtis (2020), ao fazer um estudo utilizando a cama de aviário composta com pó de rocha para adubação no milho obteve resultados satisfatórios, sendo que auxiliou no aumento de nutrientes tanto foliares como no solo, sendo que na estrutura foliar foi observado aumento na clorofila. A autora concluiu que essa é uma alternativa orgânica e mineral de composto para ser utilizado na plantação de milho.

### 2.1.1 Destinação da cama de aviário

A cama de aviário como resíduo da atividade avícola exige a destinação correta para não se tornar um poluente ambiental. O criador deve realizar o manejo adequado, desde o início da produção até o descarte do resíduo produzido desde o período incubatório até o abate das aves (Carvalho et al., 2013).

O manejo adequado deve ocorrer para que não represente riscos para a saúde animal, vegetal e humana pela sua reutilização dentro das granjas, alojando vários lotes de animais em seguida. Se por acaso, um lote de frangos adoecer com algum patógeno, essa cama deve ser substituída na sequência, pois o seu reuso promoverá a reinfecção do novo lote alojado na granja (Alves et al., 2021). Outro, porém, é que, para sua utilização como fertilizante agrícola se faz necessário alguns cuidados como a compostagem prévia, para a redução de alguns microrganismos potencialmente patogênicos, redução dos sólidos e sanitização da propriedade (Junior et al., 2010).

### 2.1.2 Braquiária Ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*)

*Urochloa ruziziensis* pertence à família Poaceae, ordem Poales, gênero *Urochloa*, tem como características botânicas ser uma gramínea forrageira que atinge no máximo a altura de 1,5 metros, com folhas que medem entre 6 a 15mm de largura, possuem aproximadamente de 10 a 25 cm de comprimento e tem grande quantidade de pelos em sua superfície, seus colmos são geniculados e decumbentes possuindo entrenós pequenos. Sua inflorescência maneira é uma panícula ereta com 5 a 7 racemos. Suas espiguetas estão dispostas de maneira que a superior é hermafrodita e a inferior é masculina, possuindo ciclo de vida perene (Machado et al., 2011).

Esta espécie possui boa capacidade de adaptação às altitudes, é tolerante ao sombreamento, apresentando boa cobertura do solo, porém, é pouco tolerante à seca, solos encharcados e queimadas, exigindo solos mais férteis do que as demais espécies de *Urochloa* (Machado et al., 2010). As espécies de maior importância econômica são *Urochloa brizantha*, *Urochloa decumbens*, *Urochloa humidicola* e *Urochloa ruziziensis* (*Brachiaria*) (Jank et al., 2014).

A *Brachiaria* está sendo amplamente utilizada no Brasil, por ser uma planta que se restabelece de maneira rápida, como forragem para alimentação de animais pelo fato de apresentar alta aderência pelos animais, ou seja, os animais se adaptam bem a essa alimentação, e um valor nutritivo considerado de excelente qualidade; como cobertura de solo, em áreas de pastagens degradadas e auxílio no sequestro de CO<sub>2</sub> da atmosfera e na integração com lavoura com o consórcio milho x braquiária que provou ser lucrativo e adequado para direcionar a produção de palha e grãos (Ceccon, 2013; Fukami et al., 2016; Jakelaitis et al., 2007). A produção de plantas forrageiras faz parte de uma cadeia produtiva da carne bovina e o Brasil é o maior exportador de sementes de forragens. Altas produtividades (10 a 15 toneladas) de massa seca por hectare ao ano, podem ser esperadas quando realizado os manejos necessários (Ceccon, 2013). Nos anos de 2013 a 2017 foram plantados 237 mil hectares de forrageiras dispostos em sua maior parte nos estados do centro oeste. Das forrageiras mais expressivas que são exportadas, 75% são do gênero *Urochloa ruziziensis* (*Brachiaria*) (Landau et al., 2018).

## 2.2 BIOPROSPECÇÃO E BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

A bioprospecção bacteriana pode ser definida como uma ciência que busca desenvolver tecnologia através da biodiversidade, onde se encontra um material de interesse econômico em um ser vivo, sendo esse material responsável por desenvolver um novo produto ou potencializar os resultados de um produto já existente (Junior, 2011). Pode-se encontrar produtos oriundos da bioprospecção bacteriana em diversas áreas, como biocombustíveis, indústria médica e farmacêutica, agricultura entre outras (Maciel et al., 2020).

A agricultura sustentável requer estratégias que aumentem a produtividade e minimizem os danos ambientais. Dentre as novas tecnologias sustentáveis em desenvolvimento, a formulação e aplicação de inoculantes e/ou biofertilizantes contendo bactérias que promovam o crescimento em plantas têm mostrado resultados promissores em diversas culturas agrícolas (Gontijo et al., 2018; Goswami et al., 2016b; Igiehon and Babalola, 2018; Naik et al., 2019).

O efeito benéfico do uso de BPCV pode ocorrer diretamente através da produção de fitohormônios (auxinas, giberelinas e citocininas), fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, sideróforos, reduzindo a aplicação de fertilizantes químicos entre outros (Alori and Babalola, 2018). Indiretamente, o benefício pode ser devido à ação antagonista aos fitopatógenos do solo e à resistência ao estresse abiótico e biótico (Afzal et al., 2019; Camaille et al., 2021).

Dentre estas, a produção de auxinas (AIA), solubilização de fosfatos, fixação biológica de nitrogênio e antagonismo fúngico tem sido usado como padrão na caracterização inicial de isolados com potencial de promoção de crescimento vegetal (De Araujo et al., 2012; Islam et al., 2016). Entre as estirpes bacterianas se destacam estão as pertencentes aos gêneros: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Zoogloea* (Babalola, 2010).

Especificamente em culturas forrageiras, as bactérias contribuem significativamente para o desenvolvimento de plantas e características como massa seca, número de panículas e teores de nitrogênio, contribuindo para a maior produção da forrageira (Vogel et al., 2014). O efeito benéfico da inoculação destas bactérias em pastagens pode afetar diretamente a

qualidade da forragem, onde apresentam uma emissão contínua de folhas e perfilhos, característica importante na restauração de área folhar sob condição de pastejo ou corte (Hungria et al., 2016).

### 2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos elementos essenciais requeridos pelas plantas para crescimento, desenvolvimento e produtividade adequados e desempenha um papel fundamental em várias estruturas, bioquímicas e fisiológicas e em processos metabólicos (Giller et al., 2019). Algumas espécies de BPCV apresentam a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) sendo o nitrogênio atmosférico não assimilável pelas plantas. O papel destes microrganismos é converter o nitrogênio (N<sub>2</sub>) em amônia, forma em que as plantas conseguem absorver (Biswas and Gresshoff, 2014). Esta FBN é possível apenas a um seletivo grupo de microrganismos, as bactérias diazotróficas, de vida livre (anaeróbias, aeróbias e facultativas) ou endofíticas. Estas bactérias possuem a enzima nitrogenase, cuja presença as torna capazes de reduzir o N<sub>2</sub> para a forma combinada inorgânica de amônia (NH<sub>3</sub>), que pode ser assimilado pelas plantas e outros organismos (Moreira and Siqueira, 2006). A reação geral da redução do N<sub>2</sub> a amônia sob condições normais é:



Essa reação é catalisada pelo complexo da enzima nitrogenase que atua na hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) e na transferência de elétrons para o processo de redução do N<sub>2</sub> atmosférico à NH<sub>3</sub>, na ausência de oxigênio (Burriss, 1964). Este processo consome uma quantidade significativa de energia na forma de ATP. O gene nitrogenase (*nif*) necessário para FBN é sensível ao oxigênio; para, portanto, prevenir o oxigênio de inibir a fixação de nitrogênio ao mesmo tempo fornecer oxigênio suficiente para os bacteroides dentro do nódulo para respirar, é essencial que a hemoglobina bacteriana que pode se ligar ao oxigênio livre é introduzido (Kundan et al., 2015).

Também foi relatado que os genes *nif* consistem de genes estruturais que ativam a proteína Fe, molibdênio, e outros genes reguladores que estão diretamente envolvidos na síntese e funções da enzima e eles estão presentes em ambos os sistemas simbióticos e de vida livre (Kundan et al., 2015). Como exemplos de bactérias fixadoras simbióticas estão os

seguintes gêneros, *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Sinorhizobium*, *Azoarcus*, *Mesorhizobium*, *Frankia*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium* e *Herbaspirillum* (Alori and Babalola, 2018; Babalola, 2010). Os grupos não simbióticos incluem: *Bacillus sp.*, *Herbaspirillum sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, e *Azotobacter sp.* (Roper and Gupta, 2016; Yousuf et al., 2017).

### 2.2.2 Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um nutriente essencial para as plantas, participando como um componente estrutural dos ácidos nucleicos, fosfolipídeos e trifosfato de adenosina (ATP), como um elemento-chave das vias metabólicas e bioquímicas, importante particularmente para FBN e fotossíntese (Kalayu, 2019; Richardson and Simpson, 2011). As plantas absorvem o P em duas formas solúveis: a monobásica ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) e a dibásica ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Walpolá and Yoon, 2012).

No entanto, uma grande proporção de P está presente em formas insolúveis e, conseqüentemente, não está disponível para nutrição de plantas. Baixos níveis de P refletem a alta reatividade do fosfato com outros componentes solúveis como alumínio em solos ácidos ( $\text{pH} < 5$ ) e cálcio em solos alcalinos ( $\text{pH} > 7$ ) (Alori et al., 2017).

Compostos orgânicos (incorporados à biomassa ou matéria orgânica do solo) e inorgânicos, principalmente na forma de complexos minerais insolúveis, são as principais fontes de P disponível no solo (Richardson e Simpson, 2011). Portanto, a disponibilidade de P depende da solubilidade desse elemento, que pode ser influenciada pela atividade das raízes das plantas e dos microrganismos no solo. Bactérias e fungos solubilizadores de fosfato constituem aproximadamente 1-50% e 0,1-0,5%, respectivamente, da população total de microrganismos cultiváveis no solo (Khan et al., 2007).

O mecanismo mais importante do fósforo inorgânico que é solubilizado por BPCV é a produção de solventes minerais compostos, como ácidos orgânicos, íons hidroxila, prótons e  $\text{CO}_2$  (Richardson & Simpson, 2011). Alguns outros mecanismos que auxiliam na solubilização de fosfato por BPCV incluem a produção de ácidos inorgânicos (como os ácidos sulfúrico, nítrico e carbônico, glucônicos e carboxílicos), a produção de substâncias quelantes e enzimólise ou liberação de enzimas (Alori et al., 2017; Khan et al., 2007; Rodríguez and Fraga, 1999).

### 2.2.3 Produção de Ácido-3-Indolácetico (AIA)

Diversas espécies bacterianas podem produzir compostos indólicos (CIs), como o fitohormônio auxina ácido indol-3-acético (AIA), que apresentam grande relevância fisiológica para as interações planta-bactéria, variando desde a patogênese até a fito estimulação (Spaepen et al., 2007). O AIA é uma auxina que está presente nas plantas naturalmente, mas algumas bactérias podem estimular a produção em maior escala pelas plantas. Esse fitohormônio se faz necessário para o desenvolvimento foliar e radicular dos vegetais (Vega-Celedón et al., 2016).

A síntese de CIs em bactérias depende da presença de precursores nos exsudatos radiculares. Dentre os diversos exsudatos, o L-triptofano foi identificado como o principal precursor da rota de biossíntese de CIs em bactérias. A caracterização de compostos intermediários levou à identificação de diferentes vias que utilizam o L-triptofano como principal precursor. As diferentes vias de síntese de AIA em bactérias mostram um alto grau de similaridade com as vias de biossíntese de AIA em plantas (Spaepen et al., 2007).

Várias vias de biossíntese de AIA são usadas por essas bactérias, com uma única cepa bacteriana às vezes contendo mais de uma via. O nível de expressão do AIA depende da via de biossíntese; a localização dos genes envolvidos e suas sequências regulatórias; e a presença de enzimas que podem converter AIA livre ativo em uma forma conjugada inativa (Patten and Glick, 1996). A biossíntese do triptofano codificado pelos genes *trp* ocorre em reações de cinco etapas do corismato (Spaepen and Vanderleyden, 2011). Em bactérias: o indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-pirúvico (IPyA), indol-3-acetonitrila (IAN), triptamina (TAM) e cadeia lateral de triptofano vias da oxidase (TSO) (Kochar et al., 2013a; Li et al., 2018)

Shockness (2016), ao avaliar a reinoculação de isolados bacterianos encontradas em plantas de braquiária demonstraram ser eficientes na produção desse hormônio e na promoção de crescimento de *Urochloa brizantha* cv Marandú.

### 2.2.4 Mecanismos indiretos da promoção de crescimento

Os mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal referem-se à capacidade das BPCV de reduzir os efeitos deletérios de fitopatógenos no crescimento da cultura. Isso envolve a síntese de antibióticos, resistência sistêmica induzida (RSI), síntese de cianeto de hidrogênio (HCN), competição e produção de enzimas líticas, incluindo quitinases, proteases, celulasas, lipases e 1,3-glucanases que podem lisar uma parte das paredes celulares

de muitos fungos patogênicos. (Kundan et al., 2015, Goswani et al., 2016).

O principal mecanismo empregado pelo BPCV para combater os efeitos deletérios de patógenos de plantas é a produção de um ou mais antibióticos (Raaijmakers and Mazzola, 2012). Antibióticos produzidos por micróbios antagônicos apresentam bioestatismo e efeitos biocidas em patógenos vegetais transmitidos pelo solo (Bhattacharyya et al., 2016)

A resistência sistêmica induzida é um mecanismo que protege as plantas de doenças via a indução sistêmica (ISR) (Alori & Babalola, 2018). Este mecanismo aumenta resistência em locais específicos de plantas em que a indução ocorreu, ou seja, o mecanismo de defesa de ISR está ativado apenas quando há um ataque de agente patogênico (Kundan et al., 2015). ISR não é específico ao patógeno, mas sim imuniza a planta contra uma variedade de patógenos diferentes.

O cianeto de hidrogênio (HCN) é um metabólito secundário que atua como um agente eficaz para o biocontrole de ervas daninhas. O HCN produzido por PGPR tem a capacidade de inibir a cadeia de transporte de elétrons e fornecimento de energia para a célula, resultando na morte das células. As BPCV produtoras de HCN são, portanto, agentes eficazes no controle biológico de ervas daninhas (Kundan et al., 2015), também pode atuar como um agente antifúngico (Olanrewaju et al., 2017).

### 2.3 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM *UROCHLOA SP*

A inoculação de *U. brizantha* cv. *Marandu* com *A. brasilense* resultou em ganhos na massa seca da parte aérea, comprimento de parte aérea e número de perfilhos (Pinc et al., 2020). Duarte et al., (2020) observaram que *Brachiaria* inoculada com BPCV (*Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Pantoea*) foram mais eficientes na produção de massa foliar de forragem nos diferentes cortes, forragem total, produção de massa de raízes e concentração de proteína bruta sem adição de N-fertilizantes (dose zero).

A inoculação de sementes de *brachiaria* com bactérias do gênero *Bacillus sp.* auxiliou na promoção do crescimento vegetal das plantas, na média de três cortes efetuados na cultura, importante característica para o desempenho das espécies forrageiras (De Araujo et al., 2012). Leme et al., (2014) observaram efeitos positivos sobre o desenvolvimento das raízes, parte aérea e matéria seca nas plantas além de uma melhoria na emergência das sementes da forrageira *Brachiaria brizantha* cv. *Marandú* quando o inoculante composto de *Bacillus subtilis* foi aplicado no sulco durante o plantio.

Todavia, o uso de BPCV nas espécies forrageiras também mostram resultados incongruentes com os acima mencionados. Hanisch et al., (2017) observaram uma influência

nula da interação entre a inoculação das sementes de *U. brizantha* cv. *Marandu* com *A. brasilense* sobre a disponibilidade e a composição química da forragem em nenhuma das 3 avaliações realizadas. Pinc et al., (2020) relataram ausência de ganho em massa seca da raiz em *Urochloa brizantha* inoculadas com *Azospirillum brasilense*.

A região oeste do Paraná se caracteriza pela pujante agropecuária, sendo a avicultura uma das principais atividades com alto grau de tecnificação das suas propriedades. Por outro lado, os agricultores sempre demandam por tecnologias que visem à diminuição dos custos e por alternativas sustentáveis como o destino da cama de aviário. Desta forma, estudos envolvendo o isolamento e a caracterização bacteriana deste material permitirá o seu reuso com segurança ambiental, bem como a utilização deste material como biofertilizante. Além do mais, a identificação de bactérias associativas com gramíneas permitirá usar este material como fonte de bactérias com potencial biotecnológico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Labiogen (Laboratório de Bioquímica e Genética) da UFPR -Setor Palotina. Amostras de cama de aviário (0,25g) fornecidas pela empresa. Biotecnal -Toledo/Pr, foram pesadas em microtubos e 1mL de água peptonada foi adicionada, agitadas em vortex por 2 min, centrifugadas por 10 min. Na câmara de fluxo laminar, foi retirada 100 $\mu$ L do sobrenadante que foram dispensados em placas Petri contendo meio de cultura (LB, YGA, NFB, DYGS e JMV) (Anexo A), o conteúdo foi espalhado com a alça de Drigalski. Ao todo foram 4 microtubos, portanto foram 4 placas de cada meio.

As placas com as amostras de cama de aviário foram lacradas e levadas a estufa BOD a 30°C para o crescimento bacteriano por 24h. Com auxílio de palitos de madeira esterilizados, foram escolhidas colônias de bactérias que cresceram nos meios para fazer a repicagem das mesmas, em placas com meio divididas em 4 partes para aumentar a rapidez de repicagem e economia de material. A repicagem foi realizada a cada 2 dias por 3 semanas até obter colônias puras. O protocolo para realização do isolamento foi adaptado para isolar a partir da cama de aviário e foi baseado no isolamento de bactérias a partir do solo de Milko, et al. (2008).

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

A partir do isolamento, as bactérias foram caracterizadas de acordo com o meio de crescimento, coloração da colônia, coloração de Gram e da forma das células bacterianas. Para coloração de Gram foi utilizada a metodologia segundo (Magnani, 2005) onde uma única colônia isolada em placa foi retirada com o auxílio de um palito e espalhada numa lâmina de vidro com uma gota de solução salina estéril. A fixação da bactéria na lâmina ocorreu pela submissão ao fogo durante 60 segundos, seguida de adição de solução cristal de violeta que foi deixada agir por 60 segundos e tratamento com lugol por mais 60 segundos. A descoloração foi realizada com álcool-acetona com concentração de 50% de álcool e 50% de acetona, tratamento com fucsina por 60 segundos e visualização em microscópio.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

#### 3.3.1 DNA genômico

O DNA genômico bacteriano foi extraído seguindo o protocolo de extração de DNA do kit Quick DNA Fecal/Soil Microbe Microprep. Para a amplificação do gene 16S rRNA foi utilizada a técnica de PCR utilizando-se um termociclador BIOER (Life Express). Para uma reação de PCR com volume final de 30  $\mu$ L, foi utilizado 3  $\mu$ L Tampão da Taq 10x; 2,25  $\mu$ L de

25 mM de  $MgCl_2$ ; 1  $\mu$ L de 10 mM de cada desoxiribonucleotídeo; 1  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador (primer 27F e 1492R na concentração de 4mM); 2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase; 2  $\mu$ L de DNA (50 a 100 ng) e água milli-Q estéril para completar um volume final de 30  $\mu$ L. As amostras foram amplificadas de acordo com o seguinte protocolo: 93°C, por 2 min; 35 ciclos de 93°C por 45 s, 62°C por 30 s, 72°C por 2 min, seguidos de uma extensão final por 5 min, a 72°C. Para confirmação da amplificação, 5  $\mu$ L da reação + 2  $\mu$ L do corante IV (Anexo A) foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE, juntamente com 3,5  $\mu$ L do marcador de peso molecular de 100 pb para checar a presença de bandas.

#### 3.3.2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Nas reações de amplificação do gene 16S rDNA foram usados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Senthilraj et al., (2016). O 27F (5' G A G T T T G A T C A T G G C T C A G 3') anela na ponta 5' do gene 16S rDNA e o 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') na 3', gerando um produto de amplificação que compreende quase todo o gene, de aproximadamente 1,5 Kb.

#### 3.3.3 Sequenciamento do gene 16s rDNA

O sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rDNA dos diferentes isolados foram realizados nas empresas ATCGene/Porto Alegre-RS (todos os isolados) e GoGenetic/Curitiba-Pr (isolados 2,19,27,83) para confirmação, em protocolos específicos de cada empresa que por motivos comerciais não foram disponibilizados.

### 3.3.4 Análise das sequências do gene 16s rDNA

As sequências obtidas pelo sequenciador ABI3500 xL saíram no formato do programa *ab1 sequencing analyses*, no formato FASTA – *Fast All* (alinhamentos rápidos para toda a informação biológica, disponível on-line no NCBI), e foram analisadas pelo programa *Mega* que serve para classificar taxonomicamente as sequências de acordo com a taxonomia bacteriana proposta no Bergey's Trust ou como classificadas pelo NCBI.

Para a busca de similaridade, foi realizada a análise dos dados através do programa BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997) usando o banco de dados do GenBank, (disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). As sequências de consenso foram inspecionadas visualmente usando o software MEGA v. 7 (Tamura et al., 2007). O alinhamento das sequências obtidas foi realizado por meio da interface MAFFT online ((Kato, 2008); <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>).

Para as análises filogenéticas baseadas em Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana, foi escolhido o melhor modelo evolutivo para o grupo de dados usando o software MrModelTest v. 2.3 (Nylander, 2004). MrBayes v. 3.1.1 (Ronquist F, 2003) foi usado para gerar as árvores filogenéticas sob critérios ótimos por partição de dados dentro do software Phylosuite (Zhang et al., 2020).

## 3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

### 3.4.1 Capacidade de fixação biológica de nitrogênio

Frascos de vidro (tipo penicilina) contendo com meio de cultura semi-sólido (LB, YGA, NFB, DYGS e JMV), os mesmos meios onde os isolados eram mantidos em crescimento, porém sem a adição dos reagentes nitrogenados em sua composição. Em fluxo laminar uma alíquota de cada colônia de bactéria foi retirada com o auxílio de um palito e transferida para o tubo de vidro. Os tubos foram incubados em estufa BOD a 30°C por 10 dias, após o período foram feitas as avaliações para constatação se houve ou não formação de uma película na parte superior do meio de cultura demonstrando assim a fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias, quando acontecia a presença da película. As avaliações foram realizadas em quintuplicata.

Em relação à capacidade de fixação biológica de nitrogênio avaliada por método indireto pela avaliação da presença de uma película de bactérias crescidas meio semissólido

sem nitrogênio, porém contendo amido ou glicerol como fonte de carbono e carbonato de cálcio.

O desenvolvimento de uma película abundante com estaria relacionada com uma alta atividade da nitrogenase e, conseqüentemente positiva capacidade para a fixação biológica de Nitrogênio (Baldani and Baldani, 2005).

### 3.4.2 Capacidade de solubilização de fosfato

As bactérias isoladas em colônias puras foram submetidas ao teste da solubilização do fosfato em meio de cultura NBRIP sólido (Anexo A). Em fluxo laminar, uma colônia bacteriana foi retirada com o auxílio de um palito esterilizado, e cada isolado foi inoculado em quatro pontos no meio NBRIP com 3 repetições. As placas foram incubadas em estufa BOD a 30°C, por 6 dias. Decorrido este tempo, foi realizada a avaliação da solubilização por meio da medição do diâmetro do halo de solubilização, e do halo da colônia com o auxílio de uma régua graduada. A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) para cada isolado por meio da fórmula:  $IS = f \text{ Halo (mm)} / f \text{ Colônia (mm)}$ , sendo f o diâmetro do halo ou da colônia (Berraquero et al., 1976). Com base nos índices de Solubilização obtidos, os isolados foram classificados como isolados com baixo ( $IS < 2$ ), médio ( $IS > 2$ ) e alto ( $IS \geq 4$ ) potencial de solubilização de fosfato. Dentro de cada índice foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (Cruz, 2013).

### 3.4.3 Produção do Ácido Indol-3-Acético (AIA)

Para a avaliação do ácido indol-3-acético os isolados foram inoculados foram inoculados em tubos falcon de 15 ml, contendo 10 ml do meio LB com e sem suplementação de L-Triptofano (0,2 M). Os tubos foram incubados sob agitação constante de 120 rpm, no período de 24 h e 48h, em quintuplicata. Após este período foram retiradas 2 mL do meio de cultura que posteriormente foi centrifugado à 10.000g (4°C) por 10 min. Em seguida, 1 mL do reagente de Salkowski (Sarwar and Kremer, 1995) foi adicionado a 1,5 mL do sobrenadante. Para desenvolvimento da cor das amostras, as mesmas foram deixadas em repouso por 30 min em local escuro. A avaliação de produção do AIA foi realizada por leitura de absorbância à 535 nm em espectrofotômetro (Asghar et al., 2002), utilizando uma curva padrão de ácido indol-3-acético ( $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) diluída em água, em diferentes concentrações que variaram de 0 a  $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ , adicionadas ao reagente de Salkowski. O restante do sobrenadante foi

descartado e o pellet foi congelado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação de proteínas totais (Lowry et al., 1951) com a finalidade de normalização das leituras de produção de AIA.

Para a avaliação do conteúdo de proteína, os pellets foram descongelados em temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 1 mL de NaOH 0,1 M a cada amostra e, estas foram incubadas em banho-Maria por 10 min a  $90^{\circ}\text{C}$  para lise celular. Em seguida, foram submetidas à centrifugação, a 10.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferida para um microtubo onde se adicionou 1 mL da solução A (Anexo A) que ficou agindo por 10 min para posterior adição de 100  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu, e incubação por 30 min. A determinação de proteínas foi realizada por espectrofotometria a 660 nm em um espectrofotômetro. A partir das curvas padrão e das absorbâncias de AIA e proteína de cada amostra, foram realizados os cálculos, através da razão entre a concentração final de AIA e a concentração final da proteína, expressos como  $\mu\text{g AIA mg de proteína}^{-1}$ . Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (Cruz,2013).

#### 3.4.4 Capacidade antagonista ou anti-fúngica

O antagonismo à fungos foi ensaiado pelo método de cultura pareada, que consistiu no confronto direto do antagonista (bactérias endofíticas) e dos fungos *Trichoderma ssp* e *Aspergillus ssp* (Freitas et al., 2016) por serem fungos de fácil crescimento e adaptação. Os fungos foram cultivados em placas de Petri com meio Ágar Sabauroud (Anexo A) à  $28^{\circ}\text{C}$ , de 7 a 14 dias. Com o auxílio de uma alça de platina, foram retirados cubos de ágar de 5 mm de diâmetro, das bordas das colônias dos fungos em crescimento e colocados em placas de Petri com meio LB sólido, com o auxílio de palitos de madeira, foram inoculadas em dois lados dos fungos colônias das bactérias isoladas, incubou-se as placas por 10 dias em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  e posteriormente foi observado a olho nu quais bactérias foram resistentes ao fungo. Durante a incubação, foi analisada a inibição do crescimento do fungo e realizou-se os testes em triplicata.

### 3.5 CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

Para a avaliação do potencial de indução de crescimento vegetal, sementes de *Brachiaria ruziziensis* (cv Pastobrás) foram usadas em ensaio *in vitro*. Foram escolhidos 3 isolados (UFPRCA08, UFPRCA12 e UFPRCA19) que previamente apresentaram altos

índices de produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio. A bactéria *Azospirillum brasilense* foi usada como controle positivo.

Os isolados bacterianos foram mantidos em estufa tipo BOD a 30°C sendo repicadas por diversas vezes em seus meios específicos de crescimento. Para padronização da fase exponencial (log) de crescimento bacteriano foi realizada a curva de crescimento de cada isolado em meio LB líquido, avaliando-se os valores de espectrofotometria (600 nm) e da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) pela metodologia da microgota proposta por Romeiro (2001).

Para o preparo do inóculo, uma colônia de cada isolado foi transferida para a solução contendo 10 mL de meio LB líquido em tubo Falcon de 15 mL mantido a temperatura ambiente em uma incubadora do tipo Shaker a 120 rpm, por 24 h. Decorrido este tempo, foi realizada a leitura da D.O. (600nm), adequando-se o cálculo para a concentração  $1.10^6$  colônias bacterianas mL<sup>-1</sup>. semente<sup>-1</sup>. As células bacterianas suficientes para o inóculo foram centrifugadas, ressuspensas em solução salina (0,9%) e deste modo, estavam prontas para a inoculação das plântulas.

Sementes de brachiaria foram assepticamente tratadas onde cerca de 10g de sementes foram lavadas em água corrente utilizando-se uma peneira para o escoamento da água. Em fluxo laminar, as sementes foram postas em uma solução de lysoform e hipoclorito acidificado (Anexo A) por 20 min. Em seguida, as mesmas foram lavadas em água destilada esterilizada por 3 vezes, e em seguida, as sementes foram lavadas em álcool 70° por 5 min, e novamente lavadas em 10 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, foi adicionado 5mL do fungicida Standak (1:100) para evitar contaminações com fungos endofíticos. Decorridos 15 min, as sementes foram colocadas em um papel filtro para secagem. Em seguida, as sementes foram dispostas em meio ágar-água por 96 h em estufa BOD a 30°C para germinar.

As plântulas de *Brachiaria* pré-germinadas foram dispostas na região central de uma placa Petri autoclavada onde receberam o inóculo preparado como descrito anteriormente.

Para o crescimento das plântulas *in vitro*, foi utilizada um mix de areia e a vermiculita comercial (2:1) como substrato em tubo de ensaio de 30cm. Previamente, a areia foi lavada em uma solução de 10% de ácido clorídrico e 90% de água por 48 h, posteriormente foi lavada em água corrente 10 vezes. Procedeu-se novamente a imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) por 24h. Decorrido o tempo, a areia foi lavada em água corrente por 10 vezes e colocada para secar em estufa de secagem por 72 h. Aproximadamente uma camada de 10 cm do substrato preparado com areia e vermiculita foram adicionadas aos tubosque levados à autoclave para a esterilização.

As sementes com melhor germinação e plenamente desenvolvidas foram dispostas na parte central de uma placa de Petri autoclavada para fazer a inoculação das bactérias. Foram inoculadas 17 plântulas para cada um dos isolados e, deixados em repouso por 1 h para a completa inoculação das plântulas. A seguir, uma plântula por tubo de ensaio foi colocada no centro do substrato previamente umedecido com 8mL de solução MS (Murashige and Skoog, 1962) (Anexo A) autoclavada. Os tubos foram levados para a sala de cultivo com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 horas de escuro por 18 dias. A cada 5 dias, as plântulas receberam 2 ml de meio MS (Musharige & Skoog, 1962).

Decorrido o tempo de crescimento, as plântulas de cada tratamento foram retiradas dos tubos, medidas com régua graduada para obtenção da altura (cm) da plântula total, e as partes aéreas foram separadas das raízes, pesadas (mg) com balança analítica, para a determinação da massa fresca de parte aérea e de raiz. As mesmas amostras foram deixadas em estufa de secagem com circulação forçada a  $60^\circ\text{C}$  por 96 h, para a obtenção da massa seca de parte aérea e de raiz.

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio programa R (R Core Team, 2016).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO

Foram obtidos 136 isolados bacterianos a partir da cama de aviário, porém apenas 67 isolados foram considerados como colônia pura e, por isso foram caracterizados quanto a morfologia. Entre os isolados obtidos 55,23% foram gram negativas e 44,77% gram positivas. Dentre os 67 isolados, 38,81% em meio NFB, 26,87% em meio DYGS, 20,90% em meio LB, 8,96% em meio YGA e 2,99% em meio em JMV. As colorações verificadas nas colônias foram: 49,26% colônias brancas e opacas, 23,88% colônias incolores e 26,87% colônias amarelas (Tabela 2).

Após a verificação da morfologia e pureza do isolado, isto é, colônias de mesmo formato e sem contaminações por outros tipos bacterianos, foram escolhidos aleatoriamente 30 isolados para prosseguir com a caracterização bioquímica e molecular, isolados esses que se obteve os melhores resultados quando a caracterização genica.

*Tabela 2.* Características morfológicas, forma e aspecto visual dos isolados

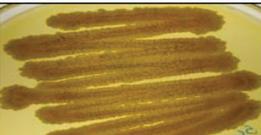
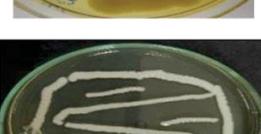
Características morfológicas, forma e aspecto visual dos isolados

ISOLADO	GRAM	FORMA	MEIO DE CULTURA	ASPECTO VISUAL DA COLONIA
UFPRCA01	+	cocos	LB	
UFPRCA02	+	cocos	LB	
UFPRCA03	+	cocos	LB	
UFPRCA06	-	bastonete	LB	
UFPRCA07	+	bastonete	LB	
UFPRCA08	-	bastonete	LB	
UFPRCA10	+	COCOS	LB	
UFPRCA12	-	COCOS	LB	
UFPRCA17	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA18	-	COCOS	NFB Malato	
UFPRCA19	-	bastonete	NFB Malato	

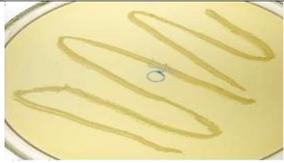
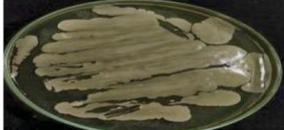
Continua na próxima página...

UFPRCA20	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA21	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA22	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA23	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA24	+	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA27	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA28	+	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA30	-	Cocos	JMV	
UFPRCA46	+	cocos	DYGS	
UFPRCA47	+	cocos	DYGS	
UFPRCA48	-	cocos	DYGS	

Continua na próxima página...

UFPRCA50	-	bastonete	YGA	
UFPRCA55	-	bastonete	YGA	
UFPRCA56	-	bastonete	YGA	
UFPRCA57	+	Cocos	LB	
UFPRCA60	+	Cocos	LB	
UFPRCA61	+	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA62	+	cocos	NFB Malato	
UFPRCA63	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA64	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA68	+	bastonete	JMV	

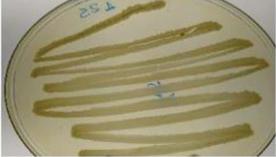
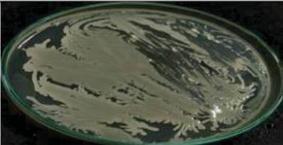
Continua na próxima página...

UFPRCA70	+	cocos	YGA	
UFPRCA71	-	cocos	YGA	
UFPRCA72	+	cocos	YGA	
UFPRCA75	+	cocos	LB	
UFPRCA77	-	Bastonete	LB	
UFPRCA81	+	bastonete	LB	
UFPRCA83	+	bastonete	LB	
UFPRCA92	+	cocos	JMV	
UFPRCA93	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA93b	-	cocos	NFB Malato	
UFPRCA94	-	bastonete	NFB Malato	

Continua na próxima página...

UFPRCA95	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA98	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA99	+	cocos	NFB Malato	
UFPRCA100	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA102	+	Cocos	NFB Malato	
UFPRCA105	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA106	-	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA107	+	cocos	NFB Malato	
UFPRCA108	+	bastonete	NFB Malato	
UFPRCA121	-	cocos	DYGS	

Continua na próxima página...

UFPRCA123	+	cocos	DYGS	
UFPRCA124	-	bastonete	DYGS	
UFPRCA125	-	bastonete	DYGS	
UFPRCA126	-	Cocos	DYGS	
UFPRCA127	-	Cocos	DYGS	
UFPRCA128	+	bastonete	DYGS	
UFPRCA129	-	Cocos	DYGS	
UFPRCA130	+	cocos	DYGS	
UFPRCA131	+	cocos	DYGS	
UFPRCA132	-	bastonete	DYGS	

Continua na próxima página...

UFPRCA133	+	cocos	DYGS	
UFPRCA134	+	Cocos	DYGS	
UFPRCA135	+	Cocos	DYGS	
UFPRCA136	-	bastonete	DYGS	

Fonte: O autor ( 2021)

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Os resultados do teste da solubilização do fosfato em meio de cultura NBRIP sólido estão demonstrados na Tabela 3. Dos 30 isolados avaliados nenhum apresentou a capacidade de solubilização de fosfato.

Dos 30 isolados avaliados 24 apresentaram capacidade positiva para a fixação biológica de nitrogênio pela formação de película. Este resultado representa que 83% dos isolados apresentam capacidade de fixar  $N_2$ , no entanto, este valor pode estar superestimado, uma vez que o método não possui a precisão de outros métodos laboratoriais de alto custo como a determinação do  $N_{15}$  ou da atividade específica da nitrogenase (Roper and Gupta, 2016).

Tabela 3. Características bioquímicas e teste de Tukey dos isolados obtidos a partir de cama de aviário

Isolado	Solubilização de P	FBN	Antagonismo		AIA/ Proteína ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) (24h)		AIA/ Proteína ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) (48h)	
			<i>Aspergillus ssp.</i>	<i>Trichoderma ssp.</i>	sem TRP	com TRP	sem TRP	com TRP
01	-	+	-	+	4.00 c	2.21 d	2.68 b	3.96 b
02	-	+	-	+	3.95 c	2.47 d	2.84 b	2.43 c
06	-	+	+	+	3.88 c	4.91 b	3.68 a	4.15 b
08	-	+	-	+	3.98 c	1.96 d	1.75 b	2.40 c
12	-	+	+	+	3.28 d	3.04 c	2.76 b	3.44 b
17	-	-	-	+	1.51 e	2.44 d	0.26 c	0.66 e
18	-	-	-	+	6.18 b	3.50 c	2.82 b	2.84 c
19	-	+	-	+	7.85 a	16.60 a	3.65 a	16.02 a
21	-	-	-	+	0.00 f	0.61 e	2.02 b	1.46 d
24	-	-	-	+	0.15 f	1.01 e	0.88 c	1.13 d
27	-	-	+	+	0.14 f	1.40 e	3.41 a	2.55 c
46	-	+	+	+	1.43 e	0.05 f	0.99 c	1.91 c
47	-	+	-	+	0.25 f	0.62 e	0.54 c	0.93 d
50	-	+	+	+	1.01 e	0.33 f	0.70 c	1.29 d
56	-	+	+	+	1.21 e	0.09 f	0.77 c	0.44 e
57	-	+	-	+	0.10 f	0.02 f	1.41 c	0.71 e
60	-	+	-	+	0.62 f	0.81 e	0.16 c	0.54 e
70	-	+	-	-	0.01 f	1.35 e	0.16 c	0.33 e
81	-	+	+	+	1.89 e	1.06 e	0.00 c	0.48 e
83	-	+	+	+	0.01 f	0.03 f	0.35 c	0.70 e
94	-	+	-	+	0.05 f	0.24 f	2.47 b	1.16 d
98	-	+	-	+	0.01 f	0.24 f	0.73 c	1.26 d
100	-	+	-	-	0.03 f	0.04 f	0.46 c	0.09 e

107	-	+	-	-	0.00 f	0.03 f	0.18 c	0.22 e
108	-	+	-	-	0.26 f	0.12 f	0.40 c	0.37 e
125	-	+	+	+	0.00 f	1.13 e	0.00 c	0.10 e
126	-	+	+	+	0.00 f	0.08 f	0.56 c	0.29 e
128	-	+	+	+	0.00 f	0.00 f	0.20 c	0.49 e
134	-	+	-	+	0.14 f	0.11 f	1.09 c	0.75 e

\*Médias seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A avaliação da produção do ácido indol-3-acético (AIA) dos isolados pelo método colorimétrico apontou diferenças na capacidade produtora de AIA entre os isolados. Os valores obtidos para o conteúdo de AIA variaram entre 24h e 48h e, com e sem adição do triptofano como indutor (Tabela 3). Na análise de produção de AIA, entre todos os isolados coletados em cama de aviário, o isolado UFPRCA19 formou grupo distinto e superior aos demais em relação, apresentando os maiores valores de AIA nos diferentes tempos avaliados e com e sem indutor (3,65 a 16,60  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína).

Destaca-se também, os isolados UFPRCA06 e o UFPRCA27 que sem triptofano e com 48h de crescimento apresentaram altos níveis de AIA (3,68 e 3,41  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína, respectivamente). Por outro lado, o isolado UFPRCA128 apresentou resultados próximos à zero para o conteúdo de AIA com 24h de crescimento e baixa produção com 48h de crescimento.

Os resultados estão demonstrados na Tabela 3. Onze isolados foram positivos para o antagonismo com o fungo *Aspergillus* spp e 25 foram positivos para *Trichoderma* spp. Freitas et al, 2016, observaram a partir de isolados que um grande número de bactérias endofíticas de plantas amazônicas apresentaram potencial antagônico a *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp. (inibidos por 21 e 19 isolados bacterianos, respectivamente).

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE CAMA DE AVIÁRIO

Os resultados dessa comparação estão apresentados na Tabela 4. Essa análise apresentou valores de identidade variando entre 80.43% e 99.85%, sendo o isolado UFPRCA81 o que apresentou a menor identidade e o isolado UFPRCA100, o maior valor (99.85%). Do total de isolados, 27% eram do gênero *Staphylococcus*, 27% *Brevibacillus*, 37% eram *Bacillus* e o restante constava de gêneros *Isoptricola*, *Microbacterium*, *Oxalicibacterium*, (3,5 % de cada um).

Tabela 4. Classificação taxonômica provável de isolados obtidos a partir de cama de aviário

Isolado	Classificação	Tamanho do fragmento	E-value	% identidade	Acesso no Genbank
1	<i>Staphylococcus colnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	1494	1e-138	92.70%	<a href="#">NR_037046.1</a>
2	<i>Staphylococcus lentus</i> strain MAFF 911385	1480	2e-179	96.62%	<a href="#">NR_043418.1</a>
5	<i>Bacillus sonorensis</i> strain NBRC 101234	1475	8e-140	96.97%	<a href="#">NR_113993.1</a>
6	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	1550	0.0	97.85%	<a href="#">NR_112116.2</a>
8	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	1550	0.0	88.99%	<a href="#">NR_112116.2</a>
12	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> strain BGSC 3A28	1550	0.0	96.28%	<a href="#">NR_104873.1</a>
18	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	1508	4e-46	86.71%	<a href="#">NR_157609.1</a>
19	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	1508	2e-165	97.92%	<a href="#">NR_157609.1</a>
21	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	1508	0.0	95.77%	<a href="#">NR_157609.1</a>
24	<i>Microbacterium maritropicum</i> strain DSM 12512	1437	6e-15	94.00%	<a href="#">NR_042351.1</a>
27	<i>Bacillus haynesii</i> strain nrrl b-41327	1508	8e-140	96.97%	<a href="#">NR_157609.1</a>
46	<i>Staphylococcus colnii</i> subsp. <i>urealyticus</i> strain CK27	1494	2e-100	91.29%	<a href="#">NR_037046.1</a>
47	<i>Staphylococcus colnii</i> subsp. <i>urealyticus</i> strain CK27	1494	0.0	90.39%	<a href="#">NR_037046.1</a>
50	<i>Brevibacillus halotolerans</i> strain LAM0312	1440	2e-118	91.69%	<a href="#">NR_156834.1</a>
56	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain DSM 25	1486	0.0	89.85%	<a href="#">NR_112212.1</a>
57	<i>Staphylococcus lentus</i> strain MAFF 911385	1480	0.0	96.56%	<a href="#">NR_043418.1</a>
60	<i>Staphylococcus equorum</i> strain PA 231	1494	1e-88	88.66%	<a href="#">NR_027520.1</a>
66	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain NBRC 15654	1461	8e-180	88.57%	<a href="#">NR_112727.1</a>
70	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC 100911	1476	0.0	90.77%	<a href="#">NR_113957.1</a>
81	<i>Brevibacillus halotolerans</i> strain LAM0312	1440	0.0	99.85%	<a href="#">NR_156834.1</a>
83	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain nbrc 15654	1461	0.0	99.37%	<a href="#">NR_112727.1</a>
94	<i>Bacillus piscis</i> strain 16MFT21	1474	3e-70	90.50%	<a href="#">NR_165685.1</a>

100	<i>Isoptricola nanjingensis</i> strain H17	1404	6e-91	80.43%	<u>NR_117941.1</u>
107	<i>Brevibacillus panacihumi</i> strain DCY35	1473	0.0	96.62%	<u>NR_044485.1</u>
108	<i>Oxalicibacterium faecigallinarum</i> strain YOx	1489	3e-138	85.56%	<u>NR_112834.1</u>
119	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	1550	0.0	90.45%	<u>NR_075005.2</u>
125	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain NBRC 15654	1461	0.0	93.55%	<u>NR_112727.1</u>
126	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	1550	0.0	94.44%	<u>NR_112116.2</u>
128	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain NBRC 15654	1461	3e-163	89.20%	<u>NR_112727.1</u>
134	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. urealyticus strain CK27	1494	6e-102	93.46%	<u>NR_037046.1</u>
<p><b>Tamanho do fragmento:</b> tamanho da sequência <b>Score:</b> pontuação do alinhamento. <b>E-value:</b> probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas sequências. <b>Identidade:</b> porcentagem de identidade entre a sequência do isolado e o organismo relacionado.. <b>Acesso no GenBank:</b> número de acesso da sequência do organismo relacionado.</p>					

Das sequências obtidas para o gênero *Bacillus* foi feita uma comparação filogenética com dois tipos de cepas para a conferência da classificação taxonômica (Figura 1). Como resultados obtidos, observou-se que os isolados pertencem à classificação dentro da família *Bacillaceae*, *phylum Firmicutes* como era esperado.

#### 4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTULAS DE BRACHIARIA

Para a avaliação do potencial de indução ao crescimento em plantas, apenas três isolados com os maiores conteúdos de AIA foram escolhidos. A bactéria *Azospirillum brasilense* foi usada como controle positiva da interação além do tratamento que não recebeu inoculação (controle negativo). Como resultados para a biomassa fresca da parte aérea de plântulas de *Brachiaria* com 18 dias após germinação, apenas o isolado UFPRCA8 promoveu acréscimos na biomassa das plântulas, similar ao tratamento com *A. brasilense* e distinto do controle (sem inoculação) (Figura 2A).

Em relação à biomassa aérea seca, apenas o isolado UFPRCA19 apresentou biomassa menor e distinta em relação aos demais tratamentos (Figura 2B e 2C). Todavia, o isolado UFPRCA19 foi o que promoveu aumento significativo de massa fresca de raiz das plântulas avaliadas em relação aos demais tratamentos. Na biomassa seca radicular, o isolado UFPRCA19 apresentou resultados similares ao controle, porém superior ao tratamento com *A. brasilense* (Figura 3D). Em relação à altura das plantas, os isolados UFPRCA8, UFPRCA19 e *A. brasilense* promoveram as maiores médias para esta característica, enquanto que o isolado UFPRCA12 e o controle tiveram as menores médias de altura em cm (Figura 2E).

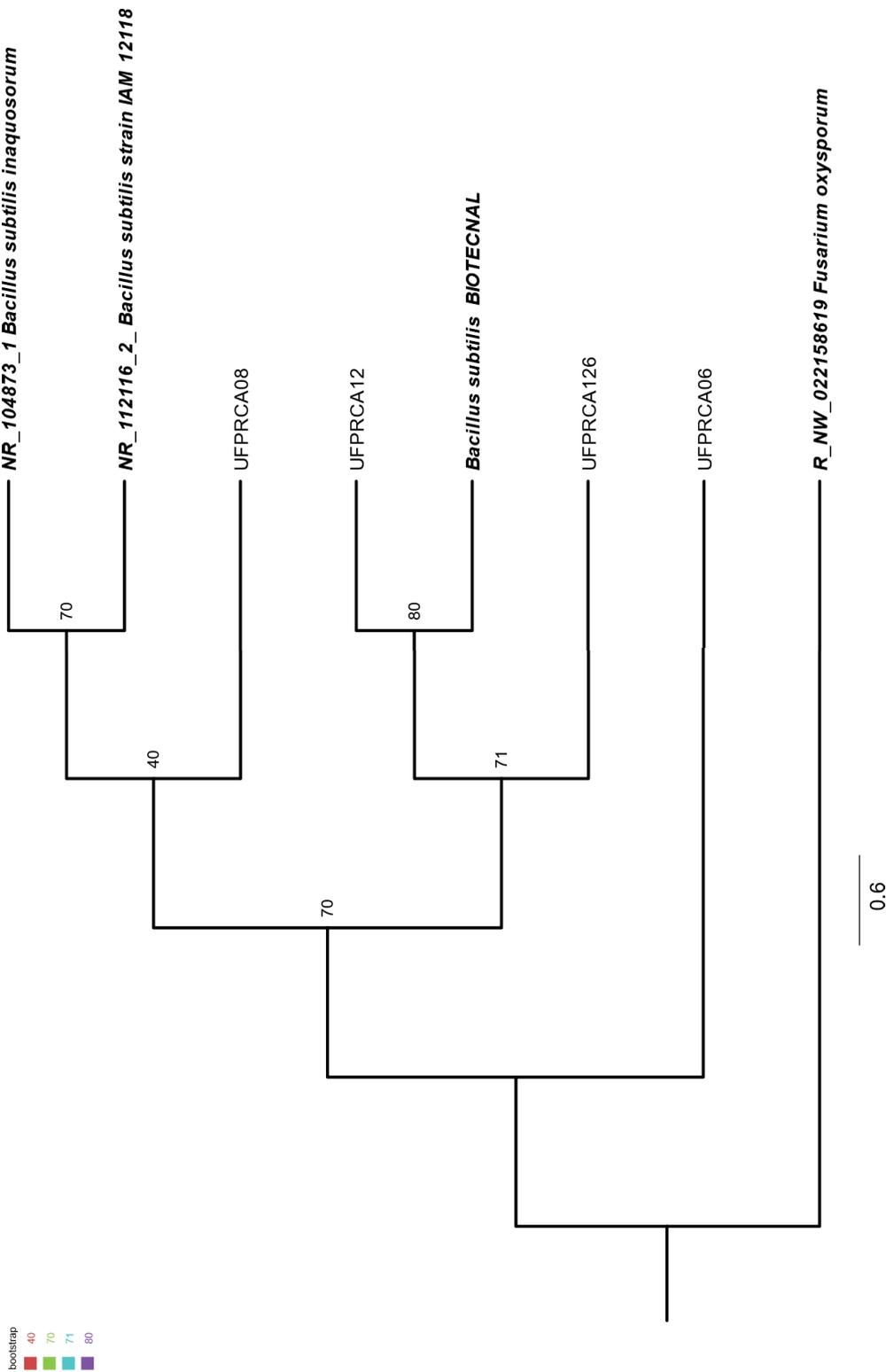


Figura 1: Dendrograma de similaridade de isolados *Bacillus* sp isolados a partir de cama de aviário e grupo externo de *Fusarium oxysporum*. Os números em cada forquilha representam os valores de Bootstrap.

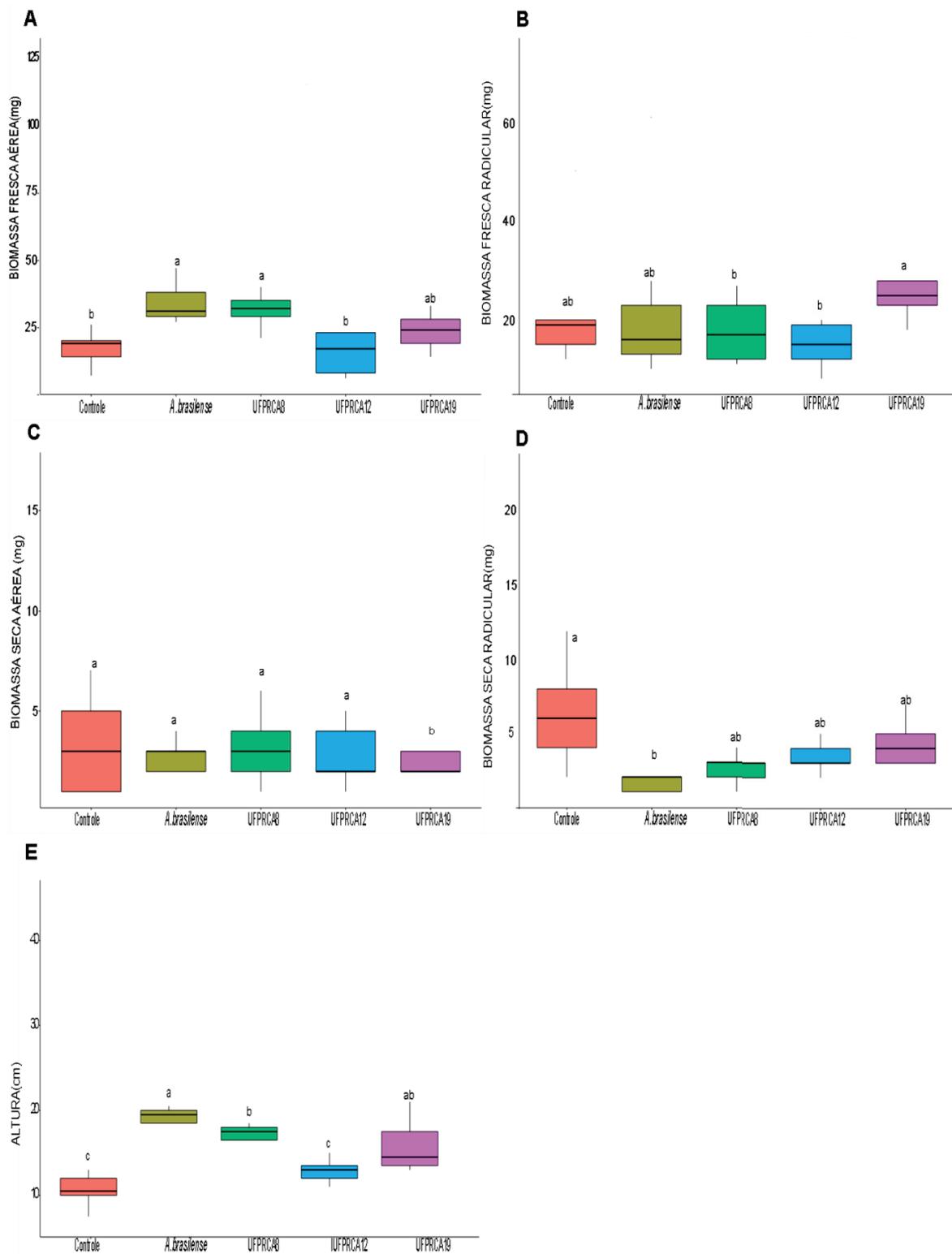


Figura 2: Características morfo-fisiológicas avaliadas em plântulas de *Brachiaria* inoculadas in vitro com os isolados a partir de cama de aviário. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ( $P > 0.05$ ) ( $n = 9 \pm SD$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A cama de aviário por ser constituídas de material orgânico com excretas, restos de ração e penas (Ävila et al., 1992), possui uma microbiota bacteriana diversa composta principalmente pelos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Escherichia coli* em estudos utilizando o sequenciamento massivo (Bindari et al., 2021; Wang et al., 2016). Ngodigha & Owen, (2009) ao estudarem a composição bacteriana da cama de aviário sem tratamento térmico observaram que os grupos mais abundantes foram *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *E. coli* e *Staphylococcus*. A composição bacteriana da cama de aviário parece estar correlacionada à microbiota intestinal das aves que habitam na granja (Bindari et al., 2021; Valeris-Chacin et al., 2021) além do fato de que, por apresentar alto pH (próximo a 9), ocorreria a restrição do crescimento de alguns grupos bacterianos, tornando a comunidade microbiana mais homogênea (Vaz Moreira et al., 2008).

Os isolados obtidos ficaram distribuídos nos filos Firmicutes (94%) e Actinobacteria (6%). Estes dados concordam com os obtidos por Vaz Moreira et al., (2008) que relataram Firmicutes o como o principal filo de cama de aviário. Não foram observados entre os isolados, gêneros como *Listeria*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Salmonella* entre outros, comuns a estudos de sequenciamento massivo de amostras de cama de aviário (Guttala et al., 2017; Lu et al., 2003). A ausência destes grupos poderia ser possivelmente explicado por vários fatores, entre eles, a composição dos meios de cultura usados para o processo de isolamento, a ausência de tratamento térmico das amostras (Trawińska et al., 2016) e a necessidade de anaerobiose para o pleno desenvolvimento de algumas espécies como *Campylobacter* e *Clostridium* (Voss-Rech and Vaz, 2012). Além disso, espécies necessitariam de meios específicos como *Salmonella* que requer pH mais alcalinos - meio Brilliant Green Broth (pH 6.9±0.2) (Atlas, 2005) ou BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar-pH (7,4±0,2) (Malheiros et al., 2007) e *Enterococci* -Tryptic Soy Agar (TSA) pH (7,3± 0,2) entre outros.

Os gêneros bacterianos levantados neste trabalho são similares aos obtidos por Sule et al., (2019) que observaram várias espécies de *Staphylococcus* e *Bacillus* na composição de cama de aviário coletadas na região de Kwara (Nigéria). Dumas et al., (2011) citam o gênero *Staphylococcus* como o 2º mais abundante em cama de aviário, estando este grupo relacionado com patogenicidade de aves (Szafraniec et al., 2020) e a espécie *S. cohnii* como proveniente dos dejetos das aves.

Outro gênero encontrado em grande abundância entre os isolados foi *Brevibacillus* (*laterosporus*, *panacihumi*, *halotolerans*), que possivelmente, devem ser provenientes dos dejetos dos animais, uma vez que há aplicação de probióticos produzidos à base de *Brevibacillus laterosporus*, é recomendado no manejo de aves por aplicar aos animais proteção contra infecções de *Salmonella* (Purba et al., 2020) ou diminuir a incidência de moscas na granja (Ruiu et al., 2013). O controle de patógenos acontece pela produção de antibióticos dos tipos laterosporamina, laterosporina, tauramamida e lolotina. Estes antibióticos são competentes para o controle de bactérias gram positivas (*Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium*) como gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas putrefasciens*) e fungos (*Candida albicans*) (Hassi et al., 2012; Kasmani et al., 2018; Ruiu, 2013; Sanders et al., 2003), entre outras espécies.

O gênero *Bacillus* também achado em grande abundância, parece ter origem nos dejetos das aves, uma vez que a administração de probióticos com *B. subtilis* é amplamente recomendado pelos pesquisadores, substituindo antibióticos e promovendo maior desempenho de crescimento corpóreo e visceral (Ciurescu et al., 2019; Yu et al., 2020).

No isolamento de bactérias, houve a redução no número de unidades formadoras de colônias durante as repicagens, pelo fato da não sobrevivência de algumas bactérias após um período de preservação, o que indica a dependência destes microrganismos de compostos possivelmente fornecidos através do material orgânico (cama). Além disso, apontam para a presença de um grande percentual de bactérias fastidiosas, cujas necessidades nutricionais são desconhecidas e com impossibilidade de cultivo *in vitro* por práticas laboratoriais de rotina (Elbeltagy et al., 2001; Stoltzfus et al., 1997). Dey et al., (2012) relatam que apenas 1% da população microbiana pode ser cultivada *in vitro*. Como o objetivo do trabalho foi isolar bactérias potencialmente promotoras de crescimento vegetal, vários meios de cultura com esta finalidade foram utilizados: LB, NFB, DYGS, JMV e YGA com pH variando entre 5.5 a 7 (Baldani et al., 1996)(Anexo A).

Dentre as características que definem uma bactéria como potencialmente promotora de crescimento vegetal, está a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico do solo e disponibilizá-lo às plantas. Nenhum dos 30 isolados apresentou esta capacidade, o que é possivelmente explicado pelo tipo de substrato orgânico da qual foram isoladas, no caso da cama de aviário, composto basicamente por maravalha que é rica em lignina e hemicelulose (Avila et al., 1992) e pobre em macronutrientes, incluindo o P inorgânico. A fixação biológica de nitrogênio consiste na conversão do nitrogênio atmosférico em formas mais acessíveis para as plantas, no caso amônia e nitratos em mecanismos simbiótico e não

simbiótico (Tkacz et al., 2015; Yousuf et al., 2017). Os genes para fixação de nitrogênio, chamados nitrogenase (*nif*) são encontrados em sistemas simbióticos e de vida livre. Esses genes incluem genes estruturais, envolvido na ativação da proteína Fe, biossíntese do cofator ferro-molibdênio, doação de elétrons e genes necessários para a síntese e função da enzima (Tiwari et al., 2019). Vários estudos apontaram a presença do gene *nif* nos gêneros *Bacillus* e atividade da acetilase reductase no gênero *Brevibacillus* (Nehra et al., 2016).

Embora a fixação biológica de nitrogênio foi detectada pela formação de película, que é um método qualitativo e pouco acurado, foi observado a atividade da nitrogenase em quase todos os isolados avaliados com exceção dos isolados UFPRCA17, UFPRCA18, UFPRCA21, UFPRCA24 e UFPRCA27. Destes, os isolados UFPRCA17, UFPRCA21 e UFPRCA27 foram classificadas taxonomicamente como *B. haynessi* e UFPRCA24 como *Microbacterium maritypicum*. O gênero *Microbacterium* parece estar relacionado a condições salinas, associadas a plantas halófitas (Alishahi et al., 2020) e apesar deste gênero apresentar genes com homologia ao *nifH* (Zakhia et al., 2006) não foi observada a formação de película em meio semi-sólido.

Para ser considerada uma bactéria promotora de crescimento, uma das características mais solicitadas é a capacidade de síntese de AIA que estimula e facilita o crescimento das plantas, aumentando a área da superfície da raiz (Goswami et al., 2016b). Dentre os isolados obtidos, estirpes do gênero *Bacillus* foram os que apresentaram os maiores conteúdos de AIA. Neste gênero, o AIA pode ser sintetizado a partir de IPyA, IAM, IAN e uma via independente de TRP tendo TRP como um precursor durante todos os estágios de crescimento da cultura (Pedraza et al., 2020; Prinsen, 1993) com a via IPyA sendo a mais significativo para esta espécie (Antonia and Jos, 1995; Kunkel and Harper, 2018).

Os isolados 18 e 19, classificados como *Bacillus haynesii* e *Bacillus subtilis* (UFPRCA 06 , UFPRCA08 e UFPRCA12) apresentaram os maiores índices de AIA. Chagas Jr et al (2015) observaram em estirpes *Bacillus* sp grande capacidade de biossintetizar auxina tendo triptofano como precursor. A biossíntese de AIA também foi relatada em espécies *Staphylococcus* sp (isolados UFPRCA01, UFPRCA02, UFPRCA46, UFPRCA47, UFPRCA60 e UFPRCA134) (Mike-Anosike et al., 2018; Shahzad et al., 2017). Também, esta espécie é considerada endofítica na cultura do milho, o que aponta para sua natureza de associação (Mendonça et al., 2020). Isolados classificados como *Brevibacillus* sp (isolados UFPRCA50, UFPRCA56, UFPRCA81, UFPRCA83; UFPRCA125 e UFPRCA128) parecem não ter a capacidade de síntese pelo fato de os valores de AIA serem próximos a zero (Tabela 3).

Os dados obtidos para a concentração de AIA variaram nos diferentes períodos de crescimento avaliados. Quinze isolados (UFPRCA21, UFPRCA24, UFPRCA27, UFPRCA47, UFPRCA57, UFPRCA70, UFPRCA83, UFPRCA94, UFPRCA98, UFPRCA100, UFPRCA108, UFPRCA107, UFPRCA126, UFPRCA128 e UFPRCA134) apresentaram maiores conteúdos de AIA após 48h de crescimento bacteriano. Destas apenas 4 (UFPRCA47, UFPRCA83, UFPRCA98 e UFPRCA128) apresentaram valores numéricos maiores de AIA com a adição do TRP ao meio de cultura (Tabela 3). Chagas et al., (2015) também observaram que o período de 48h de crescimento bacteriano e adição do TRP ao meio proporcionaram maiores volumes de AIA bacterianos em isolados do gênero *Bacillus sp.* Os demais isolados (UFPR01, UFPRCA02, UFPRCA06, UFPRCA08, UFPRCA12, UFPRCA17, UFPRCA18, UFPRCA19, UFPRCA46, UFPRCA50, UFPRCA56, UFPRCA60 e UFPRCA81) tiveram os maiores índices de AIA com 24h de crescimento.

A adição de TRP só permitiu aumentos de AIA em 4 isolados com 24h de crescimento (UFPRCA06, UFPRCA17, UFPRCA19 e UFPRCA60). A possível explicação para o fato de que as bactérias produzam mais AIA com a adição ou na ausência do TRP é que síntese do AIA é regulada pela enzima triptofano 2-monooxigenase e limitado pelos níveis de triptofano, também apresenta uma inibição em feedback pela concentração de índole-acetamida e AIA (Hutchesons and Kosuge, 1985; Patten and Glick, 1996).

Comparando-se o isolado UFPRCA19 (maior conteúdo de AIA) e a estirpe controle-*A. brasilense*, o isolado UFPRCA19 apresentou conteúdos de AIA 6x e 24x maiores para crescimento de 24h, sem e com TRP, respectivamente. Com 48h de crescimento os aumentos foram de 23x e 100x, sem e com TRP, respectivamente. Também são destaques, os isolados UFPRCA06 e UFPRCA27, com produção de AIA significativamente maior após 48h de crescimento sem indutor (21x e 23x, respectivamente) em relação à *A. brasilense*.

Um dos mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal é a capacidade de biocontrole de fitopatógenos que podem ser bactérias, fungos, nematóides (Tiwari et al., 2019). A realização do teste de antagonismo ocorre pelo fato de que os gêneros *Aspergillum* e *Trichoderma* liberariam antibióticos e outros produtos químicos que são prejudiciais as bactérias e inibiriam o crescimento (antibiose) (Leelavathi et al., 2014). Em relação à capacidade antagonista, é possível observar o efeito positivo em relação aos 2 tipos de fungos avaliados em alguns isolados *B. subtilis* e *B. haynessi* (UFPRCA6, UFPRCA8, UFPRCA12, UFPRCA27 e UFPRCA126) e parcial (somente contra *Trichoderma*) dos isolados UFPRCA8, UFPRCA17, UFPRCA18, UFPRCA19 e UFPRCA21. Esta capacidade de biocontrole do crescimento fúngico, é explicada pela capacidade das diferentes espécies *Bacillus* em produzir

moléculas como iturinas, engicinas, surfactinas, micosubtilinas, lipopeptídeos, bacilomicinas efetivas no controle de fungos (Hashem et al., 2019; Kerr, 2009; Sahu et al., 2020). Isolados do gênero *Staphylococcus* (UFPRCA01, UFPRCA02, UFPRCA46, UFPRCA47, UFPRCA57 e UFPRCA134) também apresentam na sua maioria biocontrole positivo do fungo *Trichoderma* e negativo para *Aspergillus*. Leelavathi et al., (2014) citam que *Staphylococcus aureus* foi susceptível a *Trichoderma* principalmente em altas concentrações do extrato (100µl/ml). Isolados do gênero *Brevibacillus sp.* (UFPRCA50, UFPRCA81, UFPRCA83, UFPRCA107, UFPRCA125 e UFPRCA128) foram eficazes no antagonismo a fungos *Trichoderma* e *Aspergillus* (Tabela 3). Estes resultados concordam com os resultados obtidos por Joo et al., (2015) e Saikia et al., (2011) que observaram a inibição de crescimento de diversas espécies fúngicas incluindo *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus spp.*, *Rhizoctonia sp* e *Penicillium spp* pela presença deste gênero. O isolado UFPRCA100 (*Isophtericola nanjingensis*) e UFPRCA108 (*Oxalicibacterium faecigallinarum*) apresentaram resposta negativa ao antagonismo para ambos fungos avaliados. O isolado UFPRCA24 (*Microbacterium maritpicum*) apresentou apenas antagonismo a *Aspergillus*. Estes 3 últimos isolados ainda não tiveram o teste de antagonismo realizado por outros autores, ficando difícil a comparação com outros trabalhos.

Para avaliar a capacidade de promoção de crescimento, 3 isolados (UFPRCA08, UFPRCA12 e UFPRCA19) do gênero *Bacillus* e com alta produção de AIA foram usados em experimento *in vitro*, tendo como controle positivo a bactéria *Azospirillum brasilense*, amplamente recomendada como inoculante em gramíneas (Hungria, 2011). Apesar de ser esperado que as plantas de maior biomassa (fresca e seca) tivessem as maiores biomassas radiculares, isto não foi observado no experimento *in vitro*. *A. brasilense* e o isolado UFPRCA8 apresentaram a biomassa fresca e a altura das plantas (Figura 2A e E) superior aos demais, porém em relação à biomassa radicular, os resultados apontam para valores similares ao tratamento controle sem inoculação. Comparando-se a biomassa seca da parte aérea, *A. brasilense* e UFPRCA8 tiveram valores similares ao controle sem inoculação e em termos de biomassa seca radicular. *A. brasilense* obteve os menores resultados de biomassa, ficando abaixo da massa produzida pelo tratamento controle sem inoculação (Figura 2).

O isolado UFPRCA19, classificado como o de maior produção de AIA, não promoveu incrementos substanciais na biomassa fresca e na altura das plântulas de braquiária (Figura 2A e E), porém aumentos significativos foram observados na região radicular destas plântulas em relação aos demais. No entanto, plântulas inoculadas com este isolado apresentaram as menores biomassa aérea seca em relação aos demais e a biomassa seca

radicular foi similar ao controle sem inoculação. Estes resultados apontam inconstâncias na resposta das plântulas em condição *in vitro* e à presença de bactérias. Gange & Gadhave, (2018) também observaram inconstâncias nos resultados com a inoculação por bactérias promotoras de crescimento do gênero *Bacillus* em experimentos à campo, promovendo efeitos desiguais, geralmente mais aparentes, na biomassa área das plantas.

Vários autores tem relatado o gênero *Bacillus* como potencial promotor de crescimento vegetal, especialmente *B. subtilis*: Macieira (*Malus domestica*) (Karakurt and Aslantas, 2010); pepino (*Cucumis sativus*) (Khabbaz et al., 2015); feijão mungo (*Phaseolus sp*) (Gabre et al., 2020), cebola (*Allium cepa*) (Harthmann et al., 2010). Kundan et al., (2015) citam que o efeito de promoção de crescimento das bactérias *Bacillus* seria pela modulação das respostas bioquímicas da planta que poderiam aumentar a tolerância às respostas de estresse abiótico (Kundan et al., 2015). Todavia, o isolado UFPRCA19, classificado como *Bacillus haynessi*, uma bactéria gram-positiva, móvel, com formato redondo, formadora de endósporos e termófila (Rehman et al., 2019) e ainda não existem relatos do uso desta espécie como promotora de crescimento vegetal em gramíneas. Inoculação de *B. brizantha* com bactérias diazotróficas do gênero *Bacillus spp.* apresentaram aumento na massa de forragem, área foliar, intensidade de verde foliar, número de folhas e perfilhos na média dos três cortes (Araujo and Bragante, 2012).

O aumento da demanda por alimentos, o interesse em uma agricultura sustentável e aumento de casos de resistência de pragas e patógenos à agroquímicos, fazem aumentar o interesse global em inoculantes microbianos (Santos et al., 2019). Para o desenvolvimento de novos inoculantes, a identificação de novas cepas ou estirpes é o primeiro passo, seguida da caracterização bioquímica e fisiológica quanto a promoção de crescimento vegetal. Como resultado deste trabalho, foi possível levantar isolados que atendem as estas características e podem ser usados como grupos de grande potencial biotecnológico.

## 6 CONCLUSÕES

A cama de aviário é composta basicamente por grupos bacterianos dos filos Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*) e Actinobacteria (*Microbacterium*, *Isoptericola*). A caracterização bioquímica apontou resultados distintos para características de promoção de crescimento, destacando-se o gênero *Bacillus* com os grupos de melhor capacidade de produção do AIA (UFPRCA 6, UFPRCA8, UFPRCA 12, UFPRCA18 e UFPRCA19), além da maioria apresentar antagonismo à pelo menos um dos gêneros fúngicos e capacidade provável de fixação biológica. Dentre estes, o isolado UFPRCA19 (*Bacillus haynessi*) foi o que apresentou maior produção de AIA, o que resultou em um aumento na biomassa radicular das plântulas inoculadas em relação aos demais. Também, o isolado UFPRCA08 (*Bacillus subtilis*) se destacou promovendo acréscimos na altura das plântulas e acréscimos na biomassa das plântulas e massa fresca de raiz das plântulas, respectivamente. Como conclusão deste trabalho, foi possível levantar isolados que atendem as características de bactérias promotoras de crescimento vegetal e podem ser usados como grupo de grande potencial biotecnológico.

## 7 REFERÊNCIAS

- Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S., 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Res.* 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Alishahi, F., Alikhani, H.A., Khoshkholgh-sima, N.A., Etesami, H., 2020. Mining the roots of various species of the halophyte Suaeda for halotolerant nitrogen-fixing endophytic bacteria with the potential for promoting plant growth. *Int. Microbiol.*
- Alori, E.T., Babalola, O.O., 2018. Microbial Inoculants for Improving Crop Quality and Human Health in Africa. *Forntiers Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02213>
- Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front. Microbiol.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Alves, M., Migliavacca, S., Andolfato, L., Nesi, C., 2021. Quantificação de nutrientes em cama de frangos sob diferentes lotes, in: Anais Eletrônicos [Do] II Circuito Regional Do XXVII Seminário de Iniciação Científica. E, XIV Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão /. Universidade do Oeste de Santa Catarina., Joaçaba- SC.
- Antonia, C., Jos, V., 1995. Synthesis of Phytohormone by Plant-Associated Bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 1–18.
- Araujo, F.F. De, Bragante, C.E., 2012. Controle genético , químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. *Pesqui. Agropecu. Trop.* 42, 220–224.
- Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M., Khaliq, A., 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in Brassica juncea L. *Biol. Fertil. Soils* 35, 231–237. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0462-8>
- Astachul, S.F., Maden, T., Schaeffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.2503/jjshs.58.977>
- Atlas, R., 2005. *Handbook of Microbiological Media*, 4th Editio. ed. Taylor and Francis Group.
- Avila, V.S., Mazzuco, H., Figueiredo, E.A.P., 1992. Cama de aviário, Circular Técnica-16-. Concórdia-SC.
- Babalola, O.O., 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32, 1559–1570. <https://doi.org/doi: 10.1007/s10529-010-0347-0>

- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants : special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 549–579.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Dobereiner, J., 1996. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas- Comunicado Técnico 12.
- Berraquero, F.R., Baya, A.M., Cormenzana, A.R., 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *ARS Farmacéutica* 17, 399–406.
- Bhattacharyya, P.N., Goswami, M.P., Bhattacharyya, L.H., 2016. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. *J. Physiol.* 26–41. <https://doi.org/doi: 10.19071/jp.2016.v8.3022>
- Bindari, Y.R., Moore, R.J., Van, T.T.H., Hilliar, M., Wu, S., Walkden-brown, S.W., 2021. Microbial communities of poultry house dust , excreta and litter are partially representative of microbiota of chicken caecum and ileum. *PLoS One* 16, 1–26.
- Biswas, B., Gresshoff, P., 2014. The Role of Symbiotic Nitrogen Fixation in Sustainable Production of Biofuels. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7380–7397.
- Burris, R.H., 1964. *Nitrogen Fixation - Assay Methods and Techniques*, Assay Methods and Techniques.
- Camaille, M., Fabre, N., Cl, C., Barka, E.A., 2021. Advances in Wheat Physiology in Response to Drought and the Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Trigger Drought Tolerance. *Microorganisms* 9, 687.
- Carvalho, S.M.M. de, Mércia Rodrigues Barros, Bastos, F.J.F., 2013. Resíduos Da Produção De Frangos De Corte : Incubatório Waste of Production of Broiler : Hatchery, in: III Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais 1. pp. 14–17.
- Ceccon, G., 2013. Consórcio Milho-Braquiária. Dourados-MS.
- Chagas, A., Santos, G., da Silva, A.L.L., Costa, J., 2015. Production of indole-3-acetic acid by bacillus isolated from different soils. *Biulgarian J. Agric. Sci.* 21, 282–287.
- Ciurescu, G., Dumitru, M., Gheorghe, A., Untea, A.E., Draghici, R., 2019. Effect of *Bacillus subtilis* on growth performance , bone mineralization , and bacterial population of broilers fed with different protein sources. *Poult. Sci.* 99, 5960–5971. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.075>
- Coelho, A.E.G., Domingues, J.A.G., Silva, E.J., 2021. Exportação brasileira do frango de corte. *Processando o saber. Rev. Fatecpg* 124–137.
- Consolin Filho, N.E., Faria, A.J.B., Consolin, M.F.B., Piza, M.A., Crespan, E.D.R., 2020.

- Estudo de viabilidade da cama de aviário peletizada não compostada como adubo orgânico. *Nat. Resour.* 10, 145–161.
- Correa, J.C., Miele, M., 2011. A cama de aves e os aspectos agronômicos, ambientais e econômicos. Concórdia-SC.
- Cursos CPT, 2020. Os melhores materiais para se fazer a cama do aviário. Cursos CPT 1–4.
- Curtis, J.C.D, 2020. Adição de remineralizador na cama de aviário e seu efeito na disponibilidade de nutrientes e crescimento do milho. Palotina- PR.
- Cruz, C.D., 2013. GENES - Software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. *Acta Sci. - Agron.* 35, 271–276. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>
- de Araujo, F.F., Guaberto, L.M., da Silva, I.F., 2012. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. *Rev. Bras. Zootec.* 41, 521–527. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000300007>
- Dey, R., Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., 2012. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* 82, 341–352. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0030-4>
- Duarte, C.F.D., Cecato, U., Fernandes, H.J., Galbeiro, S., Biserra, T.T., Mamédio, D., 2020. Inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em *Urochloa Ruziziensis*. *Res. Soc. Dev.* 9, e630985978.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., Glick, B.R., 2014. Indole-3-acetic acid in plant – microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 85–125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- Dumas, M.D., Polson, S.W., Ritter, D., Ravel, J., Jr, J.G., Morgan, R., Wommack, E., 2011. Impacts of Poultry House Environment on Poultry Litter Bacterial Community Composition. *PLoS One* 6, e24785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024785>
- 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. <https://doi.org/10.1128/aem.67.11.5285-5293.2001>
- Embrapa, 2021. Estatísticas e Desempenho da produção.
- Ferreira, S.G.C., Cerveira, K.S., A., A.M., 2015. Viabilidade da utilização da cama de aviário como fertilizante em pastagens, in: Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, IX EPCC. pp. 7–10.
- Franz, M.R., Lopes, C.L., Andrade, E.A., Zanão, L.A.J., 2020. Composição química de cama

- de aviário condicionada com gesso agrícola ou cal virgem. *Acta Iguazu* 9, 24–32.
- Freitas, A.D.G.A., Souza, A.Q.L., Maki, C.S., Silva, N.M., 2016. Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da amazônia contra o fungo simbionte *L. gongylophorus*, e dos fungos associados presentes nos ninhos de *Atta sexdens*. *Sci. Amaz.* 5, 1–14.
- Fukami, J., Nogueira, M.A., Araujo, R.S., Hungria, M., 2016. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>
- Gabre, V.V., Venancio, W.S., Moraes, B.A., de Goes Furmam, F., Galvão, C.W., Gonçalves, D.R.P., Etto, R.M., 2020. Multiple Effect of Different Plant Growth Promoting Microorganisms on Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Crop. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 63, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-solo-2020190493>
- Gange, A.C., Gadhawe, K.R., 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria promote plant size inequality. *Sci. Rep.* 8, 13828. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32111-z>
- Giller, K.E., Kanampiu, F., Hungria, M., Vanlauwe, B., 2019. The role of nitrogen fixation in African smallholder agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.* 285, 106601. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106601>
- Gontijo, J.B., Vidal, G., Andrade, S., Baldotto, M.A., Estrela, L., Baldotto, B., 2018. Bioprospecting and selection of growth-promoting bacteria for *Cymbidium* sp. orchids. *Sci. Agric.* 75, 368–374.
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., 2016a. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria ( PGPR ): A review. *Cogent Food Agric.* 19, 1–19. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., 2016b. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric.* 2. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Guttala, V.P., Medrano, E.G., Bray, J., Clack, B., 2017. Utilization of Pyrosequencing to Monitor the Microbiome Dynamics of Probiotic Treated Poultry ( *Gallus gallus domesticus* ) during Downstream Poultry Processing. *Agric. Sci.* 8, 675–691. <https://doi.org/10.4236/as.2017.87051>
- Hanisch, A.L., JR Balbinot, A.A., Vogt, G.A., 2017. Desempenho produtivo de *Urochloa brizantha* cv . Marandu em função da inoculação com *Azospirillum* e doses de nitrogênio. *Rev. Agro@ambiente* 11, 200–208.
- Harthmann, O.E.L., Mógor, Á.F., Wordell Filho, J.A., da Luz, W.C., 2010. Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. *Cienc. Rural* 40, 462–465.

<https://doi.org/10.1590/s0103-84782009005000256>

Hashem, A., Tabassum, B., Allah, E.F.A., 2019. *Bacillus subtilis* : A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 1291–1297.

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>

Hassi, M., Guendouzi, S., Haggoud, A., David, S., Ibnsouda, S., Houari, A., Iraqui, M., 2012. Antimycobacterial activity of a *brevibacillus laterosporus* strain isolated from a moroccan soil. *Brazilian J. Microbiol.* 1516–1522.

Hungria, M., 2011. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina-Pr.

Hungria, M., Nogueira, M.A., Araujo, R.S., 2016. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agric. Ecosyst. Environ.* 221, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>

Hutchesons, S.W., Kosuge, T., 1985. Regulation of 3-Indoleacetic Acid Production in *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 260, 6281–6287. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)88968-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)88968-2)

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Em 2020, cresce o abate de suínos e frangos e cai o de bovinos. Distrito Federal, Brasília, 2021. Disponível em: <<https://censoagro2017.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/30316-em-2020-cresce-o-abate-de-suínos-e-frangos-e-cai-o-de-bovinos>>

(Acesso outubro de 2021).

Igiehon, N.O., Babalola, O.O., 2018. Rhizosphere Microbiome Modulators : Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 574. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040574>

Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T., Hossain, M.M., 2016. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. *Forntiers Microbiol.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01360>

Jakelaitis, A., Santos, J.B., Vivian, R., Silva, A.A., 2007. Atividade microbiana e produção de milho (*Zea mays*) e de *Brachiaria brizantha* sob diferentes métodos de controle de plantas daninhas. *Planta Daninha* 25, 71–78. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582007000100008>

Jank, L., Barrios, S.C., Do Valle, C.B., Simeão, R.M., Alves, G.F., 2014. The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop Pasture Sci.* 65, 1132–1137. <https://doi.org/10.1071/CP13319>

- Joo, H.J., Kim, H., Kim, L., Lee, S., Ryu, J., Lee, T., 2015. A *Brevibacillus* sp. antagonistic to mycotoxigenic *Fusarium* spp. *Biol. Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.010>
- Junior, M.A.P.O., Orrico, A.C.A., Junior, J.D.L., 2010. Compostagem dos resíduos da produção avícola: cama de frangos e carcaças de aves. *Eng. Agrícola* 30, 538–545.
- Junior, N.L.S., 2011. Desafios da bioprospecção no Brasil. IPEA 1415–4765.
- Kalayu, G., 2019. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers 2019.
- Karakurt, H., Aslantas, R., 2010. Effects of some plant growth promoting rhizobacteria treated twice on flower thinning, fruit set and fruit properties on apple. *African J. Agric. Res.* 5, 384–388.
- Kasmani, F.B., Torshizi, M.A.K., Mehri, M., 2018. Effect of *Brevibacillus laterosporus* Probiotic on Hematology, Internal Organs, Meat Peroxidation and Ileal Microflora in Japanese Quails Fed Aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Agric. Sci. Technol.* 20, 459–468.
- Katoh, T., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment *Science. Brief. Bioinform.* 9, 286–298.
- Kerr, J.R., 2009. Microbial Ecology in Health and Disease Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. *Microb. Ecol. Health Dis.* 11, 129–142. <https://doi.org/10.1080/089106099435709>
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27, 29–43. <https://doi.org/10.1051/agro>
- Kochar, M., Vaishnavi, A., Upadhyay, A., Srivastava, S., 2013a. Bacterial Biosynth-3-Acetic Acid: Signal Messenger Service, in: Frans J. de Bruijn (Ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley and Sons, pp. 309–325.
- Kochar, M., Vaishnavi, A., Upadhyay, A., Srivastava, S., 2013b. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid: signal messenger service. *Mol Microb Ecol Rhizosph* 1, 309–325. <https://doi.org/doi:10.1002/9781118297674.ch29>
- Kundan, R., Pant, G., Jadon, N., Agrawal, P.K., 2015., 2015. Plant growth promoting rhizobacteria: Mechanism and current prospective. *J. Fertil. Pestic.* 6, 155. <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000155>
- Kunkel, B.N., Harper, C.P., 2018. The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *J. Exp. Bot.* 69, 245–254. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx447>
- Landau, E.C., Simeão, R.M., Neto, F.C., 2018. Evolução da Área Ocupada por Pastagens, in: *Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo Em Livro Científico (ALICE)*. . Embrapa Milho e Sorgo-

Capítulo em livro científico (ALICE)., p. 16.

Leelavathi, M.S., Vani, L., Pascal, R., 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3, 96–103.

Leme, A.C.M., Mazzuchelli, R.C.L., Araujo, F.F., 2014. Uso de sementes com tratamento biológico no crescimento de *brachiaria*. *Colloq. Agrar.* 10, 83–91. <https://doi.org/10.5747/ca.2014.v10.nesp.000141>

Li, M., Guo, R., Yu, F., Chen, X., Zhao, H., Li, H., Wu, J., 2018. Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *arthrobacter pascens* zz21. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19020443>

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Lu, J., Sanchez, S., Hofacre, C., Maurer, J.J., Harmon, B.G., Lee, M.D., Al, L.U.E.T., 2003. Evaluation of Broiler Litter with Reference to the Microbial Composition as Assessed by Using 16S rRNA and Functional Gene Markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 901–908. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.901>

Machado, L.A.Z., Ceccon, G., Adegas, F.S., 2011. *Integração Lavoura-Pecuária-Floresta. 2, Identificação e Implantação de Forrageiras na Integração Lavoura-Pecuária*, Embrapa.

Machado, L.A.Z., Lempp, B., Valee, C.B., Jank, L., Batista, L.A.R., Postiglioni, S.R., Resende, R.M.S., Fernandes, C.D., Verzignassi, J.R., Valentim, J.F., Assis, G.M.L., 2010. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte, in: *Bovinocultura de Corte*. Piracicaba-SP, pp. 375–417.

Maciel, F.L., Souza, C.B.R.S., Vieira, C.B.R.C., Salbego, E.L.S., Balzan, G.D., Re, I., Savio, V.M., 2020. *Microrganismos com Potencial Biotecnológico*. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves-RS.

Magnani, G.S., 2005. *Diversidade de bactérias endolíticas em cana-de-açúcar*. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba-Pr.

Malheiros, S., Minéia, C., Paula, D.D.E., Tondo, E.C., 2007. Cinética de crescimento de *Salmonella Enteritidis* envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 27, 751–755.

Melo, E., 2018. Qualidade e sanidade da cama de aviário. *O Present. Rural* 10.

Mendonça, J.J., Junior Lira, M.A., Carvalho, E.X., Fracetto, G.G.M., Fracetto, F.J.C., Alves, M.J.G., Oliveira, J.P., 2020. Diversidade , mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas , usando milho como cultura exemplo. *Pesqui. Agropecuária Pernambucana* 25, e2282252020.

- Mike-Anosike, E.E., Braide, W., Adeleye, S., 2018. Studies on Indole Acetic Acid ( IAA ) Production by Rhizobacteria and Growth promoting potentials. *Internacional J. Adv. Res. Biol. Sci.* 5, 133–140. <https://doi.org/10.22192/ijarbs>
- Milko, A. J.; Hernández, M. T.; Regel, Z.; Marschner, P.; Moura, M. de La L. Isolation of culturable phosphobacteria with both phy-mineralization and phosphate-solubilization activity from The rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and fertility of soils.* Vol 44. P.1025-1034. 2008
- Moreira, F.M.S., Siqueira, O.S., 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, 2nd ed. UFLA, Lavras-MG.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–495.
- Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Kumar, P., 2019. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Plant growth promoting microbes : Potential link to sustainable agriculture and environment. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101326. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>
- Nascimento, Z.M., Miranda, R.C., Silva, M.V.S., 2020. Efeito de diferentes dosagens de cama de aviário no desenvolvimento de mudas de feijão-caupi. *Brazilian J. Dev.* 6, 87522–87530.
- Nehra, V., Saharan, B.S., Choudhary, M., 2016. Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton ( *Gossypium hirsutum* ) crop. *Springerplus* 5, 948. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2584-8>
- Ngodigha, E.M., Owen, O.J., 2009. Evaluation of the bacteriological characteristics of poultry litter as feedstuff for cattle. *Sci. Res. Essay* 4, 188–190.
- Nylander, J.A.A., 2004. *MrModeltest v2*. Uppsala.
- Olanrewaju, O.O., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteri. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42, 207–220. <https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Pedraza, R.O., Filippone, M.P., Fontana, C., Salazar, S.M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., Baca, B.E., 2020. *Azospirillum, Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00006-x>
- Pinc, M.M., Neto, M.B., Polli, E., Dalmagro, M., Otênio, J.K., 2020. Crescimento e nutrição da *Urochloa brizantha* cv. Marandu inoculada com bactéria promotora de crescimento vegetal e sob diferentes doses de nitrogênio. *Res. Soc. Dev.* 9, e7309108925.
- Portugal, A.F., Ribeiro, D.O., Carballal, M.R., Vilela, L.A.F., Araújo, E.J., Gontijo, M.F.D.,

2009. Efeitos da utilização de diferentes doses de cama de frango por dois anos consecutivos na condição química do solo e obtenção de matéria seca em *Brachiaria brizantha* cv. MARANDÚ, in: I Simpósio Internacional Sobre Gerenciamento de Resíduos de Animais Uso Dos Resíduos Da Produção Animal Como Fertilizante. Florianópolis-SC, pp. 137–142.
- Prinsen, E., 1993. Azospirillum brasilense Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway . Mol. Plant-Microbe Interact. <https://doi.org/10.1094/mpmi-6-609>
- Purba, M.A., Pizado, S.A., Cai, H., Haile, T.H., Zheng, A., Liu, J., 2020. A study about Protective Effect of *Brevibacillus laterosporus texasporus* Culture on Broiler Chickens Infected with *Salmonella Pullorum*. Int. J. Sci. Technol. Manag. 1, 68–78.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em: <<https://www.R-project.org>> (Acessado em outubro 2021).
- Raaijmakers, J.M., Mazzola, M., 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 50, 403–424. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- Rehman, S., Jermy, B.R., Akhtar, S., Borgio, J.F., Azeez, A., Ravinayagam, V., Jindan, R. Al, Alsalem, Z.H., Buhameid, A., Gani, A., 2019. Isolation and characterization of a novel thermophile ; *Bacillus haynesii* , applied for the green synthesis of ZnO nanoparticles. Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.47, 2072–2082. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1620254>
- Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2011. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. Plant Physiol. 156, 989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17, 319–339. [https://doi.org/doi:10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Ronquist F, H.J., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19, 1572–4.
- Roper, M.M., Gupta, V.V.S.R., 2016. Enhancing Non-symbiotic N<sub>2</sub> Fixation in Agriculture. Open Agric. J. 10, 7–27. <https://doi.org/10.2174/1874331501610010007>
- Ruiu, L., 2013. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. Insects 4, 476–492. <https://doi.org/10.3390/insects4030476>
- Ruiu, L., Satta, A., Floris, I., 2013. Administration of *Brevibacillus laterosporus* spores as a poultry feed additive to inhibit house fly development in feces : A new eco-sustainable

concept. *Poult. Sci.* 93, 519–526.

Sahu, P.K., Singh, S., Gupta, A.R., Gupta, A., Singh, U.B., Manzar, N., Bhowmik, A., Singh, H. V., Saxena, A.K., 2020. Endophytic bacilli from medicinal-aromatic perennial Holy basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) modulates plant growth promotion and induced systematic resistance against *Rhizoctonia solani* in rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Control* 150, 104353.

Saikia, R., Mazumder, S., Gogoi, D.K., Yadav, A., Sarma, R.K., Gogoi, B.K., Bora, T.C., 2011. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring from Assam, India. *Microbiol. Res.* 166, 216–225.

Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins, T.A., 2003. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, and *Brevibacillus*. *Compr. Rev. FOOD Sci. FOOD Saf.* 2, 101–110.

Santos, M.S., Nogueira, M.A., Hungria, M., 2019. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

Sarwar, M., Kremer, R.J., 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in applied microbiology. Lett. Appl. Microbiol.* 20, 282–285.

Senthilraj, R., Prasad, G.S., Janakiraman, K., 2016. Sequence-based identification of microbial contaminants in non-parenteral products 52.

Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A.L., Al-Hosni, K., Kang, S.M., Seo, C., Lee, I.J., 2017. Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biol. Hung.* 68, 175–186. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000300007>

Shockness, L. dos S.F., 2016. Contribuição das Bactérias Diazotróficas no Crescimento de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. UFRRJ Instituto de agronomia curso de pós-graduação em agronomia ciência do solo.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, 1–13. <https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a001438>

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>

Stoltzfus, J., So, R., Malarvithi, P., 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* 194, 25–36.

Sule, I.O., Oorunferi, A.A., Otori, A.O., 2019. Mycological and bacteriological assessment of poultry droppings from poultry pens within ilorin, Kwara, Nigeria. *Sci. World J.* Vol. 14, 11-

16.

Szafranec, G.M., Szeleszczuk, P., Dolka, B., 2020. A Review of Current Knowledge on *Staphylococcus agnetis* in Poultry. *Animals* 10, 1421.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., S, K., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.

Tiwari, S., Prasad, V., Lata, C., 2019. *Bacillus*: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00003-1>

Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A., Poole, P.S., 2015. Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *ISME J.* 9, 2349–2359. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.41>

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2012. *Microbiologia*. Artemed, Porto Alegre.

Trawińska, B., Chmielowiec-Korzeniowska, A., Nowakowicz-Dębek, B., Tymczyna, L., Bombik, T., Pyrz, M., Tymczyna-Sobotka, M., 2016. Evaluation of microbial contamination of feces and soil on a laying-hen farm depending on sampling site and season. *Rev. Bras. Zootec.* 45, 190–196.

Valadão, F.C. de A., Maas, K.D.B., Weber, O.L. dos S., Valadão, D.D., da Silva, T.J., 2011. Variação nos atributos do solo em sistemas de manejo com adição de cama de frango. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 35, 2073–2082. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000600022>

Valeris-Chacin, R., Pieters, M., Hwang, H., Johnson, T.J., Singer, R.S., 2021. Association of Broiler Litter Microbiome Composition and *Campylobacter* Isolation. *Front. Vet. Sci.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.654927>

Vaz Moreira, I., Silva, M.E., Manaia, C.M., Nunes, O.C., 2008. Diversity of Bacterial Isolates from Commercial and Homemade Composts. *Microbiol. Ecol.* 55, 714–722.

Vega-Celedón, P., MartínezZ, C.H., González, M., Seeger, M., 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultiv. Trop.* 37, 33–39.

Viscardi, B.S., Ferreira., E.S.G., Leone, L., Souza, I., Santos, M., Oliveira, S., 2009. *Indicadores IBGE*. Brasília-DF.

Vogel, G.F., Martinkoski, L., Ruzicki, M., 2014. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: Importâncias e resultados Effects of *Azospirillum brasilense* in use of forage grasses: Amounts and results. *ACSA- Agropecuária Científica do Semiárido* 10, 1–6.

Voss-Rech, D., Vaz, C.S.L., 2012. Técnicas laboratoriais para isolamento de *Campylobacter*

em material avícola Isolamento laboratorial Aspectos gerais. Concórdia.

Walpolá, B.C., Yoon, M., 2012. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils : A review. *African J. Microbiol. Res.* 6, 6600–6605. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.889>

Wang, L., Lilburn, M., Yu, Z., 2016. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. *Front. Microbiol.* 7,1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00593>

Yousuf, J., Thajudeen, J., Rahiman, M., Krishnankutty, S., Alikunj, A.P., Abdulla, M.H., 2017. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. *J. Basic Microbiol.* 1–11. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700072>

Yu, W., Hao, X., Zhlyue, W., Haiming, Y., Lei, X., 2020. Evaluation of the effect of *Bacillus subtilis* and *Pediococcus acidilactici* mix on Serum Biochemistry, Growth promotion of Body and Visceral Organs in Lohmann Brown Chicks. *Brazilian J. Poult. Sci.* 22, 001–008.

Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudie, P., 2006. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb Ecol.* 51, 375–93. <https://doi.org/doi:10.1007/s00248-006-9025-0>

Zen, S. de, Iguna, M.D., Ortelan, C.B., Santos, V.H.S. dos, Felli, C.B., 2015. Evolução da avicultura no Brasil Mercado internacional, Informativo Cepea. Piracicaba-SP.

Zhang, D., Gao, F., Jakovlić, I., Zou, H., Zhang, J., Li, W.X., Wang, G.T., 2020. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. 2020. 20(1): p. 348–355. DOI: 10.1111/1755-0998.13096. *Mol. Ecol. Resour.* 20, 348–355.

## 8 ANEXO A

Meio LB (Luria Bertani)

5g de extrato de levedura

10g de Na Cl

10g de iriptona (ou peptona)

Solução: colocar 600 ml de água destilada em um Becker de 1.000 ml no agitador e ligar o mesmo, colocar os reagentes na sequência que estão descritos. Após os reagentes terem sido diluídos, conferir o pH do meio, que deve ser ajustado a 6,8. Na sequência colocar a solução em uma proveta de 1.000 ml e completar até a marca com água destilada.

15g de ágar para meio sólido.

1,8g de ágar para meio semissólido.

Meio JMV

5g de Manitol

0,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,2g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,1g de Na Cl

0,2g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2ml de azul de bromotimol (Solução em 0,5% em 0,2N KOH)

2ml de solução de micronutrientes

1ml de solução de vitaminas

4ml de FeEDTA

Solução: colocar 600 ml de água destilada em um Becker de 1.000 ml no agitador e ligar o mesmo, colocar os reagentes na sequência que estão descritos. Após os reagentes diluídos, conferir o pH do meio, que deve ser ajustado a 4,36. Na sequência colocar a solução em uma proveta de 1.000 ml e completar até a marca com água destilada.

Acrescentar 2,5g de ágar para meio semissólido.

20g de ágar e 50mg de extrato de levedura para meio sólido

Solução de Macro nutrientes

16g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

19g de  $\text{KNO}_3$

4,4g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3,7g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,7g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,28g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Solução: colocar cada um dos reagentes em um Becker e um pouco de água destilada, agitando o mesmo no agitador, após isso transferir para uma proveta e completar o volume para 100 ml com a água destilada. Ao final alíquota em tubos de plásticos, 10ml de solução em cada um dos tubos. Sempre enumerar os tubos de 1 á 6 e conserva-los na geladeira.

Solução de Micronutrientes

0,062g de  $\text{H}_3\text{Bo}_3$

0,169g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,1059g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,0083g de KI

0,0025g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,00025g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,00025g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Solução: colocar todos os reagentes em um Becker e um pouco de água destilada, agitando o mesmo no agitador, após isso transferir para uma proveta e completar o volume para 10 ml com a água destilada. Ao final alíquota em tubo de Eppendorf, 1 ml de solução em cada um dos tubos. Identificar os mesmos e conserva-los em geladeira.

Solução de Vitaminas

0,991g de Inositol

0,0098g de Ácido nicotínico

0,0155g de Cloreto de puridoxina

0,0506g de Tiamina

0,02g de Glicina

Solução: colocar todos os reagentes em um Becker e um pouco de água destilada, agitando o mesmo no agitador, após isso transferir para uma proveta e completar o volume para 10 ml com a água destilada. Ao final alíquota em tubo de Eppendorf, 1 ml de solução em cada um dos tubos. Identificar os mesmos e conserva-los em geladeira.

Meio MS

30g de sacarose

10 ml de FeEDTA

1ml de micronutrientes

10ml de macronutrientes (colocar todos os tubos enumerados de 1 á 6)

1 ml de vitaminas

2g de fitagel

Solução: em um Becker de 1000ml colocar um pouco de água destilada e ligar o agitador, ir colocando os reagentes na sequência. Após isso conferir o pH a 5,7 ou 5,8 e em uma proveta de 1000ml transferir a solução e completar com água destilada o volume de 1000ml.

#### Solução Salina

3,4g de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	(0,68g)
0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(0,04g)
0,1g de $\text{NaCl}$	(0,02g)
0,02g de $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	(0,004g)
2ml de micronutriente	(0,4ml ou 400 $\mu\text{l}$ )
4ml de FeEDTA	(0,8ml ou 800 $\mu\text{l}$ )
4,5g de $\text{KOH}$	(0,9g)
Água peptonada	
1,5g de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	
3,5g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	
5g de $\text{NaCl}$	
1g de Peptona	

Solução: em um Becker de 1000 ml colocar 800ml de água destilada e levar ao agitador, na sequencia adicionar os reagentes conforme descritos. Ao final conferir o pH: em 7,2 e despejar o liquido em uma pipeta graduada de 1000ml para conferir o volume. Após distribuir em vidrarias para ser auto clavado.

#### Meio NFB Malato

0,5g de ácido málico
0,5g de $\text{K}_2\text{HPO}_4$
0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,1g de $\text{NaCl}$
0,02g de $\text{CaCl}_2$
2ml de solução de micronutrientes
2ml de azul de bromotimol (solução 0,5% e, 0,2 NKOH)
4ml de FeEdta (solução 1,64%)
1ml de vitaminas
4,5g de $\text{KOH}$

Solução: em um Becker de 1000 ml colocar 800ml de água destilada e levar ao agitador, na sequencia adicionar os reagentes conforme descritos. Ao final conferir o pH: em 6,5 a 6,8 e despejar o liquido em uma pipeta graduada de 1000ml para conferir o volume.

15g de ágar para meio solido

1,8g de ágar para meio semissólido.

Meio YGA

10g de extrato de levedura

20ml de glicerina

20g de peptona

Solução: colocar 600 ml de água destilada em um Becker de 1.000 ml no agitador e ligar o mesmo, colocar os reagentes na sequência que estão descritos. Após os reagentes terem sido diluídos, conferir o pH do meio, que deve ser ajustado a 6,8. Na sequência colocar a solução em uma proveta de 1.000 ml e completar até a marca com água destilada.

15g de ágar para meio solido

1,8g de ágar para meio semissólido.

Meio DYGS

2g de glicose

2g de ácido málico

1,5g de peptona

2g de extrato de levedura

0,5g de  $K_2HPO_4$

0,5g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

1,5g de ácido glutâmico

Solução: colocar 600 ml de água destilada em um Becker de 1.000 ml no agitador e ligar o mesmo, colocar os reagentes na sequência que estão descritos. Após os reagentes terem sido diluídos, conferir o pH do meio, que deve ser ajustado a 6,5. Na sequência colocar a solução em uma proveta de 1.000 ml e completar até a marca com água destilada.

15g de ágar para meio solido

1,8g de ágar para meio semissólido.

Meio NBRIP

10g de glicose

2,5g de  $CaHPO_4$

0,2g de NaCl

0,1g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,002g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

0,014g de azul de bromofenol

Completar 1l de água destilada

Solução: colocar 600 ml de água destilada em um Becker de 1.000 ml no agitador e ligar o mesmo, colocar os reagentes na sequência que estão descritos. Após os reagentes terem sido diluídos, conferir o pH do meio, que deve ser ajustado a 7. Na sequência colocar a solução em uma proveta de 1.000 ml e completar até a marca com água destilada.

15g de ágar para meio solido

1,8g de ágar para meio semissólido.

Reagentes para avaliação do AIA

Solução de Salkowski

2 ml de  $\text{FeCl}_3$  (0,5M)

66,6 ml de água destilada

40 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Solução: coloca os primeiros dois reagentes em uma proveta de vidro e na sequencia o acido aos poucos, para que ele não borbulhe muito. Após o resfriamento da solução armazenar em um vidro escuro envolto com papel alumínio. Usar a solução em até 4 dias

Reativo A

20g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

4g de  $\text{NaOH}$

1000 ml de água destilada

Reativo B

1g de  $\text{CuSO}_4$

1000 ml de água destilada

Reativo C

2g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

1000 ml de água destilada

Solução A

1 ml de reativo B

1 ml de reativo C

Completar para 100 ml com reativo A

Hipoclorito Acidificado

0,19g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

10 ml de  $\text{NaOCl}$  (10%)

0,360 ml de  $\text{HCl}$

0,02 ml de Tween

200 ml de água destilada

### Ágar Sabouraud

40 g de dextrose

10 g de peptona

20 g de ágar

Solução: colocar 600 ml de água destilada em um Becker de 1.000 ml no agitador e ligar o mesmo, colocar os reagentes na sequência que estão descritos. Após os reagentes terem sido diluídos, conferir o pH do meio, que deve ser ajustado a 5.6. Na sequência colocar a solução em uma proveta de 1.000 ml e completar até a marca com água destilada.