



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NILTON SÉRGIO HERNANDES FILHO

**DIVERSIDADE METABÓLICA E FISIOLÓGICA EM
AZOSPIRILLUM BRASILENSE AB-V5 CULTIVADO EM
FORMULAÇÕES INOCULANTES PARA A AGRICULTURA**

Londrina
2021

NILTON SÉRGIO HERNANDES FILHO

**DIVERSIDADE METABÓLICA E FISIOLÓGICA EM
AZOSPIRILLUM BRASILENSE AB-V5 CULTIVADO EM
FORMULAÇÕES INOCULANTES PARA A AGRICULTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira.

Coorientadora: Profa. Dra. Lara Munique Ferracin

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F481 Filho, Nilton Sérgio Hernandes .
Diversidade metabólica e fisiológica em *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cultivado em formulações inoculantes para a agricultura : Diversidade metabólica e fisiológica em *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cultivado em formulações inoculantes para a agricultura / Nilton Sérgio Hernandes Filho. - Londrina, 2021.
67 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez Oliveira .
Coorientador: Lara Munique Ferracin.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.
Inclui bibliografia.

1. inoculantes agrícolas - Tese. 2. Bactérias promotoras do crescimento vegetal - Tese. 3. metabôlômica - Tese. 4. metabolitos - Tese. I. Oliveira , André Luiz Martinez. II. Ferracin, Lara Munique . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

NILTON SÉRGIO HERNANDES FILHO

**DIVERSIDADE METABÓLICA E FISIOLÓGICA EM
AZOSPIRILLUM BRASILENSE AB-V5 CULTIVADO EM
FORMULAÇÕES INOCULANTES PARA A AGRICULTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski
Universidade Estadual de Ponta Grossa -
UEPG

Londrina, 25 de fevereiro de 2021.

*Dedico este trabalho á André Luiz
Martinez de Oliveira quem tenho como
exemplo profissional.*

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta dissertação marca uma etapa importante e muito almejada em minha vida, resultado de muita dedicação e esforço. E não poderia deixar de registrar minha sincera gratidão a todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para sua concretização.

À Deus agradeço, por trilhar em meu caminho e entregar meu destino nas mãos de pessoas tão especiais, meus pais...

Não poderia iniciar esta dedicatória sem realçar a insubstituível importância da minha família em minha vida. Ao meu pai Nilton Sérgio Hernandes e minha mãe Silvana De Freitas Rocha agradeço hoje e sempre por todo amor que me dedicaram e por toda educação que me proporcionaram. Vocês são meus exemplos de vida e meu alicerce de sustentação.

Ao meu orientador, Prof Dr. André Luís Martinez de Oliveira, que me ofereceu a oportunidade mais valiosa da minha vida acadêmica. Agradeço pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por saber reconhecer minhas limitações e poder torna-las mais um motivo de superação. Espero ter honrado todo o empenho que depositou em mim.

Ao programa de pós-graduação em biotecnologia e ao departamento de bioquímica e biotecnologia.

Aos professores do programa de pós-graduação em biotecnologia pelos ensinamentos, aos técnicos de laboratório do departamento de Bioquímica e Biotecnologia em especial à Silvia Borba uma mulher que possui uma alma esplendorosa agradeço por todo auxílio prestado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa pelo financiamento deste projeto.

A minha Co-orientadora Prof^a. Dr^a Lara Munique Ferracin, pessoa de extrema competência, que acreditou em mim a capacidade de aprender e me ensina brilhantemente o que é vida acadêmica. Lara obrigado pelo carinho, amizade, paciência e respeito.

Ao Prof Dr. Luiz Ricardo Olchanheski um agradecimento especial pela efetiva participação no desenvolvimento deste trabalho e pela grande disponibilidade e paciência que me ofereceu durante a sua elaboração.

A minha família, em especial á minha tia Nanci Hernandes pelo apoio, incentivo e companheirismo durante todos esses anos. Amo você!

Aos meus amigos, Aliny Simionato, Bárbara Ferreira, Cristina Aparecida Lopes e Diogo Mizumoto que são muito importantes para mim, agradeço pelo amor, amizade e companheirismo. Aos amigos distantes que sempre torceram por mim, em especial a Débora Barbosa e Paula Vanzela que mesmo longe sempre me deu força para ir em busca dos meus objetivos, sei o quanto torcem por mim e o mesmo é recíproco.

Aos colegas de curso e do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, especialmente à Andressa Jacqueline e Paloma Ferrari com quem compartilhei alegrias, tristezas e preocupações no decorrer desse tempo que passamos juntos. Obrigada pela amizade conquistada! Vocês são especiais.

Por fim, a todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho. Minha eterna gratidão! Que Deus continue iluminando o caminho de vocês!

*“Eu não poderia imaginar as coisas que me aconteceriam. O início foi incerto, confuso e incomum, onde todos os estranhos faziam parte da minha vida, onde todos os cantos teriam histórias escondidas. Fiz amigos, muitos dos quais, me acompanharão para sempre. Esse é um momento especial! É hora de olhar para trás e ver por tudo o que já passei. Sem dúvida, muitas tristezas e conflitos, mas felizmente, por inúmeros bons momentos, de alegria, de vitórias e de cumplicidade. Devo esquecer aqueles que me impuseram obstáculos infundados, e agradecer àqueles que me impulsionaram adiante. É hora, mais do que nunca, de valorizar as amizades e os conhecimentos adquiridos aqui. Pois, se nada tenho, por tudo lutei; e sem me arrepender de nada... No futuro poderei dizer: Tentei!... E, mesmo que a fortuna venha a mim; Por tudo que Deus me deu, direi a todos: **venci!**”*

(Autor desconhecido)

HERNANDES-FILHO, Nilton Sérgio. **Diversidade metabólica e fisiológica em *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cultivado em formulações inoculantes para a agricultura.** 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A agricultura atual mostra uma dependência da utilização de fertilizantes químicos, embora o mau uso destes insumos possa causar impactos ambientais negativos, além de encarecer a produção agrícola. Uma das alternativas para reduzir o uso de fertilizantes minerais solúveis em sistemas de produção agrícola consiste na utilização de insumos biológicos contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e comumente denominados de inoculantes. Na produção de inoculantes comerciais contendo BPCV, as condições de cultivo influenciam em grande extensão a qualidade fisiológica da biomassa celular obtida, incluindo o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos durante o período de cultivo destes microrganismos. Poucos trabalhos se dedicam ao estudo do metabolismo de BPCV em diferentes condições nutricionais de cultivo, e como estas condições de cultivo podem interferir na interação da BPCV com a planta hospedeira. Neste contexto, este trabalho buscou definir a cinética de produção de metabólitos por *Azospirillum brasilense* Ab-V5 em dois meios de cultivo formulados com condições nutricionais contrastantes, e relacionar diferenças no perfil do exometaboloma da bactéria com a eficácia da interação planta-bactéria. Para alcançar a este objetivo, foram conduzidos cultivos da bactéria *A. brasilense* em meios líquidos OAB e MCA4 sob as mesmas condições de temperatura e agitação, com coleta de alíquotas dos cultivos em intervalos regulares de tempo (6, 12, 24, 36 e 72 h) para determinação da cinética de crescimento e do perfil exometabolômico por meio de análises de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Em adição, foram realizados ensaios de inoculação em milho utilizando o sobrenadante de cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 obtido após diferentes tempos de cultivo, como forma de identificar compostos derivados do metabolismo microbiano que possam atuar positivamente na promoção do crescimento do milho. A análise da cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 demonstrou que o meio de cultivo MCA4, que apresenta maiores concentrações de nutrientes, foi capaz de promover maiores populações bacterianas e um menor decaimento destas populações após o alcance da fase estacionária de crescimento. Foram também identificados os fitormônios ácido-3-indol-acético (AIA) e o ácido salicílico (AS) a partir de 24 h de cultivo no meio MCA4, e ausência destes compostos em cultivos conduzidos no meio OAB. A análise metabolômica preliminar também possibilitou observar uma maior diversidade de compostos no sobrenadante de cultivos de *A. brasilense* em meio MCA4 em comparação à cultivos em meio OAB. A adição do sobrenadante de cultivo de *A. brasilense* em meio MCA4 permitiu verificar que existem compostos promotores do crescimento do milho em concentração suficiente para induzir aumentos na biomassa da planta após 60 h cultivo. Em conjunto, os resultados permitem confirmar a importância das condições de cultivo de BPCV para qualidade e quantidade de metabólitos produzidos pelo microrganismo, bem como a possibilidade de melhoria do desenvolvimento de plantas pela adição de metabólitos microbianos em uma resposta dose-dependente. Estas descobertas podem levar à melhoria de formulações inoculantes comerciais, bem como levar à

identificação de compostos bioestimulantes que possam levar a incrementos no desenvolvimento e produtividade de cultivos agrícolas comerciais.

Palavras-chave: metabolômica; bactérias promotoras do crescimento vegetal; metabolitos.

HERNANDES-FILHO, Nilton Sérgio. **Metabolic and physiological diversity in *Azospirillum brasilense* Ab-V5 grown in inoculant formulations for agriculture.** 2021, 67 p. Dissertation (Master in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Current agriculture shows a dependence on the use of chemical fertilizers, although the misuse of these inputs can result negative environmental impacts, in addition to increase the costs of agricultural crops production. One of the alternatives available to reduce the use of soluble mineral fertilizers in agricultural production systems is the use of biological inputs containing plant growth promoting bacteria (BPCV), known as agricultural inoculants. In the production process of commercial inoculants containing BPCV, the cultivation conditions greatly influence the physiological quality of the microbial biomass obtained, including the type and quantity of metabolites produced during their culturing period. Few studies have dedicated proper attention to study the BPCV metabolism under different nutritional conditions, and how these conditions can interfere in the interaction of BPCV with the host plant. In this context, this work aimed to define the kinetics of growth and metabolite production by *Azospirillum brasilense* AB-V5 in two culture media, formulated with contrasting nutritional conditions. In addition, differences in the bacterium exometaboloma profile were tracked with the effectiveness of the plant-bacterial interaction. To achieve this objective, cultures of *A. brasilense* were carried out in liquid media OAB and MCA4 under the same conditions of temperature and agitation, with sampling of aliquots of the cultures at regular intervals of time (6, 12, 24, 36 and 72 h) to determine growth kinetics and exometabolic profile by means of colony forming units count (CFU) and gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GC-MS). In addition, maize inoculation were carried out using the culture supernatants of *A. brasilense* Ab-V5 obtained after different cultivation times, to identify compounds derived from microbial metabolism that can act positively in promoting the plant growth. The analysis of the growth kinetics of *A. brasilense* Ab-V5 showed that the MCA4 culture medium, which has higher concentrations of nutrients, was able to promote larger bacterial populations and a lower decay of these populations after reaching the stationary growth phase. The phytohormones acid-3-indole-acetic (AIA) and salicylic acid (AS) were also identified after 24 h of cultivation in the MCA4 medium, and absence of these compounds in cultures conducted in the OAB medium. The preliminary metabolomic analysis allowed to observe a greater diversity of compounds in the supernatant of cultures of *A. brasilense* in MCA4 medium compared to cultures in OAB medium. The addition of supernatants from *A. brasilense* 60 h-cultures in MCA4 medium indicated the presence of compounds derived from bacterial metabolism in sufficient concentration to induce increases in plant biomass under greenhouse conditions. Together, the results obtained confirms the importance of BPCV cultivation conditions for the quality and quantity of metabolites produced by the microorganism, as well as the possibility of improving plant development by adding microbial metabolites in a dose-dependent response. These findings can lead to the improvement of commercial inoculant formulations, as well as lead to the identification of biostimulant compounds that can lead to increases in the development and productivity of commercial agricultural crops

Key-words: metabolomics; plant growth promoting bacteria; metabolites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** Rotas de síntese do ácido indol-ácetico (AIA) a partir do triptofano. A) Rota do ácido indolpirúvico; B) Rota da triptamina; C) Rota da indolacetaldoxima27
- Figura 02** Fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica alvo (A) análise metabolômica global (B).....30
- Figura 03** Visão geral das rotas de biossíntese de ácido-3-indol acético (AIA) propostas para bactérias do gênero *Azospirillum* sp.....53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01** População de *A. brasilense* Ab-V5 no meio de cultivo OAB e na formulação MCA4 em diferentes tempos de crescimento, determinadas por meio do número de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método da gota.....49
- Gráfico 02** Análise cromatográfica direcionada para identificação de fitormônios no sobrenadante de cultivo *A. brasilense* (Ab-V5) realizados em meio MCA4 sob diferentes tempos de incubação...51
- Gráfico 03** Análise quantitativa de sinais cromatográficos (picos detectáveis) no sobrenadante de cultivo *A. brasilense* AB-V5 em diferentes meios cultura (MCA4 e OAB) e tempos de crescimento.....54
- Gráfico 04** Biomassa de plantas de milho cultivado sem extrato metabólitos não esterilizado e adicionado de extratos de metabólitos produzidos por *A. brasilense* AbV5 obtidos a partir de diferentes tempos de cultivo em meio MCA4. Os resultados representam a média (n=10) da biomassa de plantas de milho (*Zea mays*) por 35 dias em casa de vegetação.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Composição química do meio de cultura MCA4	41
Tabela 02	Composição do meio de cultura OAB	42
Tabela 03	Composição química do meio cultura Dygs	42
Tabela 04	Informações da voltagem do cone, energia de colisão, massa do íon precursor, e massa do fragmento.....	46
Tabela 05	Informação da massa do íon precursor, e massa do fragmento	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol- acético
AS	Ácido salicílico
BPCV	Bactérias promotoras do crescimento vegetal
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cu(NO ₃) ₂ .H ₂ O	Dinitrato de cobre tridratado
EPS	Exopolissacarídeos
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
Fe CL ₃	Cloreto de ferro
Fe EDTA	EDTA férrico
GC – MS	Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas
GA	Giberelinas
JÁ	Ácido jasmônico
HMDB	Human Metabolome Database
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
IPDC	Índole-3-pyruvate descarboxlase
IAA	Auxina
KH ₂ HPO ₄	Fosfato monopotássico
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico
L.Trp	L- triptofano
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massas
MAPA	Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento
MgSo ₄	Sulfato de magnésio
MnSo ₄	Sulfato de manganês
MSI	Metabolomics Standards Initiative
N ₂	Nitrogênio gasoso
NaCl	Cloreto de sódio
NaMoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NEST	National Institute of Standards and Technology
NH ₃	Amônia
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônia
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia

OPLS-DA	Orthogonal partial least squares discriminant analysis
PGPB	Plant growth promoting bacterium
PHB	Polihidroxi-butirato
PNDA	Programa Nacional de Defensivos Agrícolas
PR	Paraná
PV	Polivinilpirrolidona
QC _s	Controle de qualidade
RMN	Ressonância magnética nuclear
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UEL	Universidade Estadual de Londrina
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO GERAL	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	FERTILIZANTES QUÍMICOS	18
3.2	BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	19
3.3	INOCULANTES	22
3.4	AZOSPIRILLUM BRASILENSE: FUNÇÕES FISIOLÓGICAS NAS PLANTAS.....	25
3.5	METABOLÔMICA	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	AZOSPIRILLUM BRASILENSE	39
4.3	PREPARO DO INÓCULO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	41
4.4	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)	41
4.5	COLETA DOS MEIOS DE CULTIVO OAB E MCA4 PARA ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	41
4.6	AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE METABÓLITOS NOS MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE EM CG-MS.....	42
4.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS NOS MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE LC-MS/MS.....	43
4.8	ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE A. BRASILENSE AB-V5 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO: DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)	47
5.2	PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS NOS MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE POR LC- MS	48
5.3	PERFIL METABOLÔMICO DE A. BRASILENSE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE POR GC-MS	51
5.4	ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO COM PLANTAS DE MILHO	52

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O manejo cultural e o melhoramento genético juntamente com a aplicação de fertilizantes químicos atribuíram um aumento relevante na produção agrícola. Desta forma, a agricultura atual mostra uma dependência da utilização desses produtos e isso vem gerando grande preocupação devido as aplicações descontroladas em ambientes agrícolas. O uso excessivo de fertilizantes químicos pode causar impactos ambientais além de encarecer a produção agrícola. Uma das alternativas para reduzir o impacto da aplicação destes é a utilização de inoculantes que contêm bactérias promotoras do crescimento vegetal. Inoculante é todo produto que possui na sua formulação microorganismos com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal (OLIVEIRA, 2014; SPOLADOR et al., 2016).

As bactérias que promovem o crescimento vegetal incentivam o crescimento das plantas pela capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio, além de produzir metabólitos secundários e uma variedade de outras moléculas. *Azospirillum brasilense* é considerado um modelo de bactéria promotora do crescimento vegetal. Esta espécie de bactéria produz fitormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido indol-acético entre outros compostos que promovem o desenvolvimento vegetal (SPOLADOR et al., 2016).

A síntese de metabólitos secundários ocorre em situações de carência nutricional na presença de um indutor e diminuição da taxa de crescimento microbiano, sendo influenciada por diversos fatores ambientais como método de cultivo, temperatura, pH, meio de cultivo utilizado, período de incubação, luz e umidade. Por este motivo é importante que as condições de cultivo para trabalhos que envolvam análises metabolômicas sejam otimizadas para garantir que as quantidades máximas de metabólitos significativos sejam sintetizadas para garantir a defectibilidade (HORAK et al., 2019).

Os meios de cultivo utilizados influenciam sobre o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos durante o período de incubação, devido as diferenças no teor de nutrientes e nas vias metabólicas resultantes. Porém, poucos trabalhos se referem ao efeito de diferentes tipos de meios de cultivo nas atividades metabólicas microbianas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi definir a cinética de produção de metabólitos de *A. brasilense* AB-V5 em dois meios de cultivo utilizados na produção de inoculantes, buscando identificar compostos

relacionados com a eficácia da interação planta-bactéria (HORAK et al., 2019).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi definir a cinética de produção de metabólitos de *A. brasilense* AB-V5 em dois meios de cultivo utilizados na produção de inoculantes, buscando identificar compostos relacionados com a eficácia da interação planta-bactéria.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 FERTILIZANTES QUÍMICOS

Os fertilizantes químicos são definidos pela legislação brasileira (decreto 86.955, de 18 de fevereiro de 1982) como toda substância orgânica ou mineral, obtida de modo industrial ou natural, que proporcione às plantas os nutrientes básicos fundamentais para o seu desenvolvimento. Os elementos químicos presentes na formulação dos fertilizantes químicos podem ser divididos em duas categorias: micronutrientes, (ferro, cobalto, zinco molibdênio, boro, cobre e manganês) e macronutrientes (hidrogênio, carbono nitrogênio, cálcio, magnésio, fósforo, enxofre e potássio) (DIAS, FERNANDES, 2006).

A utilização de fertilizantes químicos juntamente com o manejo cultural e melhoramento genético gerou um acréscimo expressivo na produção agrícola (GALVÃO et al., 2014; SPOLADOR et al., 2016). No entanto, a agricultura atual mostra uma dependência elevada da utilização de fertilizantes químicos e isso vem gerando grande preocupação devido aos problemas ambientais que podem ser atribuídos ao uso descontrolado destes insumos, incluindo a diminuição da biodiversidade, a eutrofização do solo e águas subterrâneas, emissão de gases de efeito estufa, o aparecimento de problemas fitossanitários e alteração da composição do solo. A mudança do ecossistema e da morfologia de muitos vegetais e animais utilizados na alimentação humana também pode afetar negativamente a saúde humana (MARKS et al., 2013; SPOLAOR et al., 2016; FASSA, FARIA, MEUCCI, 2017). Além dos danos ambientais provocados pela utilização descontrolada de fertilizantes químicos, o mesmo contribui em mais de 28% dos custos da produtividade da cultura de milho, por exemplo, de acordo com os dados da CONAB (SPOLAOR et al., 2016).

Dentre as alternativas existentes para elevar a eficiência da aplicação de fertilizantes químicos, podendo levar a diminuição da quantidade aplicada em ambientes agrícolas, está o uso de inoculantes que contêm bactérias do crescimento vegetal (BPCV) (SPOLAOR et al., 2016). As BPCV compreendem um grupo de microrganismos que podem estimular o crescimento e o desenvolvimento

das plantas por diferentes formas sendo as mais importantes a capacidade de realizar a fixação de nitrogênio, produção de hormônios vegetais e uma variedade de outras moléculas. De modo geral, as bactérias que promovem o crescimento vegetal beneficiam o desenvolvimento das plantas por uma combinação mecanismos (HUNGRIA et al., 2010; BASHAN et al., 2014; SPOLAOR et al., 2016).

3.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal no Brasil tem enfoque desde década de 50, quando a Dr^a Johanna Döbereiner isolou de solos ácidos da Baixada Fluminense localizado na cidade do Rio de Janeiro, amostras da bactéria do gênero *Azotobacter*. Esses estudos receberam mais evidência com a descoberta de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera de poáceas, possibilitando o aumento de diferentes linhas de pesquisa na área (DOBEREINER, 1976). Desde então foram descobertas muitas características adicionais destes microrganismos, demonstrando que a fixação biológica de nitrogênio é apenas uma das diversas aplicações agrícolas resultantes da pesquisa com bactérias promotoras do crescimento vegetal (BALDANI; DOBEREINER, 1980; OLIVEIRA et al., 2014)

Essas bactérias caracterizam-se como um grupo heterogêneo de bactérias que pode colonizar diferentes órgãos das plantas, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse econômico de forma direta ou indiretamente. Diretamente através da solubilização de compostos minerais como fósforo, da fixação do nitrogênio atmosférico e da produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal como auxina que promove o crescimento das folhas, raízes e do caule, as citocininas que promovem a divisão celular, alongamento das células, também promovem a quebra da dominância apical e podem induzir a produção de gemas axilares; as giberelinas que são substâncias que podem ter seus efeitos iguais ao das auxinas, porém essas têm a sua ação quando aplicadas em uma planta intacta, e as auxinas possuem maior efeito em segmentos de plantas; e etileno que é um hormônio gasoso que causa o amadurecimento dos frutos das plantas (OLIVEIRA et al., 2014). E indiretamente por meio de controle biológico de insetos e fitopatógenos, elevando a resistência a

estresses bióticos e abióticos, além de outros mecanismos (BULGARELLI et al., 2013).

Segundo Oliveira et al., 2014, as bactérias promotoras do crescimento vegetal podem adentrar no tecido vegetal através de zonas de alongação, pontas de raízes, espaços intracelulares, também tem a capacidade de colonizar células do xilema e tecidos vasculares e axilas de emergência de raízes secundárias e então colonizam locais de células lisadas (OLIVEIRA et al., 2014). As mesmas apresentam comportamento epifítico ou endofítico, ou seja, habitam tecidos externos e internos das plantas, respectivamente. Seus efeitos positivos podem ser observados em plantas propagadas “in vivo” e “in vitro” essencialmente pelo aumento da altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, maior sobrevivência das mudas, redução do tempo de aclimatização e controle de doenças e aumento de produtividade (DARTORA et al., 2013).

De acordo com Babalola (2010), bactérias promotoras do crescimento vegetal se associam com um alto número de espécies de cereais, forrageiras, e gramíneas. Dentre as espécies de BPCV, destacam-se as pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter* e *Zoogloea*.

Bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas por estarem relacionadas com várias espécies de plantas atuando como promotora do crescimento vegetal seja pela sua capacidade de produzir substâncias que auxiliam no desenvolvimento das plantas ou pela sua capacidade de fixar nitrogênio (BASHAN, HOLGUIN, BASHAN, 2004; REIS, PEDRAZA, TEIXEIRA, 2010). Normalmente são encontradas habitando a rizosfera, porém há estirpes que possuem mecanismos específicos de interação com as raízes das plantas podendo colonizar o interior das mesmas (STEENHOUDT, VANDERLEYDEN, 2000).

Entre essas bactérias, as pertencentes ao gênero *Azospirillum* vem se destacando para a cultura de milho (DARTORA et al., 2013). Para Doornbos e colaboradores (2012), esse grupo de microrganismo é um dos mais estudados,

sendo inúmeros estudos relacionados com a síntese de fitormônios que induzem o crescimento radicular e melhoram a absorção de nutrientes e água pelas plantas .

Em termos de fisiologia e genética as espécies mais estudadas são *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (REIS, PEDRAZA, TEIXEIRA, 2010). Morfológicamente, *A. brasilense* é definida como gram negativa, pertencem à subdivisão α - proteobactéria, possuem uma morfologia celular em forma de bastonete com dimensões de 0,8- 1,0 μm de diâmetro e 2,0- 4,0 μm de comprimento. Possuem um padrão flagelar misto, em que um flagelo polar é sintetizado durante o crescimento em meio líquido e vários flagelos laterais são adicionalmente sintetizados durante o crescimento em meio sólido (HALL, KRIEG, 1984). Quando são supridas com fonte de nitrogênio, são aeróbias típicas, entretanto quando necessitam da fixação de N_2 são microaerófilas (DOBEREINER et al., 1995; REIS, PEDRAZA, TEIXEIRA, 2010).

As espécies do gênero *Azospirillum* sempre foram conhecidas por utilizarem ácidos tricarbóxicos como citrato, succinato, malato, α -cetoglutarato entre outros ácidos orgânicos, como sendo a única fonte de carbono. Entretanto estudos vêm demonstrando uma instabilidade na utilização de outras fontes de carbono (REIS, PEDRAZA, TEIXEIRA, 2010).

Em situações desfavoráveis como a limitação de nutrientes e dessecação, as células da bactéria desse gênero podem passar por mudanças morfológicas dando-se a formação de cistos (SADASIVAN, 1885; NEYRA, 1987). Estas mudanças são seguidas pela produção de exopolissacarídeos (EPS) e acúmulo intracelular de polihidroxibutirato (PHB), que podem ser utilizados como fonte de carbono e energia em situações de estresse (OKON, ITZIGSOHN, 1992; SKVORTSOV, IGNATOV, 1998; KONNOVA et al., 2001; KADOURI, JURKEVITCH, OKON, 2003).

No que se refere a produção de inoculantes, bactérias do gênero *Azospirillum* são bastante requeridas para a produção de inoculantes comerciais ou experimentais para agricultura, pois é considerada modelo de bactéria promotora do crescimento vegetal por estimular ou produzir na planta substâncias e compostos que promovam o seu desenvolvimento (BOTTINI et al., 1989). Conforme apresentado por Hungria e colaboradores (2010), inúmeros testes com inoculantes

que contém em sua formulação bactérias deste gênero já foram aplicados em diversas culturas de plantas, sob condições de campo, em muitos países, resultando várias respostas, mas o sucesso da inoculação depende da escolha da estirpe que será utilizada.

Vários trabalhos têm relatado bons resultados da utilização de bactérias do gênero *Azospirillum* na inoculação em plantas de trigo, arroz e milho. O mesmo possui algumas vantagens como: fixação de nitrogênio, produção de fitormônios, adaptação em todos os tipos de solo e clima, resistência a variações de temperaturas e antagonismo a agentes patogênicos (ARAUJO, 2008).

A inoculação com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* é realizada de modo semelhante à inoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium*. O produto pode ser aplicado na forma líquida ou sólida (como turfa). A aplicação do inoculante mais comum é pela via de sementes e a inoculação via sulco de semeadura vem sendo estudada como uma alternativa de evitar a toxidez nos produtos empregados no tratamento de sementes sobre a bactéria, pois alguns produtos químicos podem desestruturar o flagelo utilizado pela bactéria *A. brasilense* na associação com a planta (CROES et al., 1993). A inoculação da bactéria *A. brasilense* das estirpes AB-V5 e AB-V6 via sulco de semeadura ou via semente proporcionou um incremento na produtividade do milho equivalente (CROES et al., 1993).

O maior desenvolvimento das raízes pela inoculação com *A. brasiliense* pode induzir efeitos adicionais como incremento na absorção de minerais e água, maior tolerância a estresses como seca e salinidade, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva. Certamente pelo maior crescimento radicular e melhor nutrição das plantas, também há relatos de maior tolerância a agentes patogênicos de plantas (HOLGUIN, BASHAN, 2004; REIS, PEDRAZA, TEIXEIRA, 2010).

3.3 INOCULANTES

A aplicação de inoculantes vem sendo feita por mais de um século, tendo a comercialização inicial deste produto nos Estados Unidos, após o primeiro

registro de patente deste insumo contendo rizóbio ("Nitragin"), para a aplicação em leguminosas no ano de 1896 (NOBBE; HILTNER, 1896 apud BASHAN, 1998). Segundo o MAPA, por definição inoculante são formulações orgânicas líquidas ou sólidas, que utilizam células de microrganismos latentes ou vivos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas (MAPA, 2011).

Os inoculantes são obtidos do processo de fermentação. A comunidade microbiana varia de acordo com o processo de fermentação o substrato utilizado em sua produção e a disponibilidade de oxigênio (OLIVEIRA et al., 2017). De modo geral estes bioprodutos são orientados a serem aplicados sobre a superfície do vegetal, nas sementes ou no solo. Contudo, a definição e o termo inoculante podem sofrer ampliações e modificações à medida que o conhecimento avança (SILVA, 2009). Autores utilizam o termo biofertilizante (BRAHMA, PRAKASH, SAHU, 2012; HERRMANN, LESUER, 2013).

A produção industrial de inoculantes no Brasil iniciou na década de 50 (FREIRE, 1968). A partir de pesquisas de bactérias fixadoras de nitrogênio para a cultura de soja. Atualmente, a utilização de inoculantes em leguminosas como a soja é um recurso bem consolidado, levando o Brasil a liderança na utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio na agricultura (ARAUJO, 2014), sendo que o veículo empregado na produção desses inoculantes é fundamental para a manutenção e a viabilidade celular (ANPII, 2012).

Os inoculantes líquidos são compostos por um substrato aquoso estéril além das bactérias responsáveis pela promoção do crescimento de plantas. Este insumo mostra vantagens pela facilidade de esterilização evitando o aparecimento de contaminantes (HUNGRIA, CAMPO, MENDES, 2007). Os inoculantes sólidos são veiculados em turfa material resultante da decomposição anaeróbica lenta de restos vegetais de várias origens em diversos estágios de decomposição, possuindo mais de 90% de matéria orgânica em sua composição (SILVA, 2009). Há também um aumento na resistência da planta ao estresse hídrico e na respiração celular, por meio da ativação de enzimas da via glicolítica e do ciclo de Krebs. *A. brasiliense* também acelera a mobilização do nitrogênio na semente, estimula o crescimento das plântulas e o florescimento precoce. Além do mais, há relatos do aumento da largura da folha e do caule do milho inoculado, e da resistência contra patógenos (HUNGRIA et al., 2008).

Vários estudos já publicados indicam os benefícios da associação

Azospirillum - planta. Saubidet e associados (2002) observaram que as plantas de milho inoculadas com bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* apresentaram parte aérea e peso seco duas vezes maior do que as plantas controle não inoculadas, e também maior teor de nitrogênio e maior concentração de proteínas nos grãos (SAUBINET et al., 2002).

Reis e colaboradores (2008) verificaram o efeito da inoculação da bactéria *Azospirillum amazonense* em dois híbridos intervariantais sob diferentes doses de nitrogênio em um ensaio em casa de vegetação. Essa espécie de bactéria elevou a produção de matéria seca e o acúmulo de nitrogênio na raiz das plantas (REIS et al., 2008).

Hungria e colaboradores (2010) inocularam estirpes de *Azospirillum* em trigo e milho, e tiveram bons resultados no desenvolvimento destas culturas, quando aplicaram bactérias da espécie *A. brasilense* e *A. lipoferum*. As estirpes de *A. brasilense* Ab-V6 e Ab-V5 elevaram o desenvolvimento das plantas de trigo em 27% e milho em 31%, resultando a recomendação das primeiras estirpes de *Azospirillum* a serem indicadas para produção de inoculantes comerciais no Brasil (HUNGRIA et al., 2010).

Galindo e colaboradores (2018) estudaram a viabilidade técnica e econômica da cultura de soja. O experimento foi realizado com dois cultivares de soja (“BRS Valiosa RR” e “BMX Potência RR”) com e sem a inoculação de bactérias da espécie *A. brasilense* das cepas Ab-V5 e Ab-V6. Concluíram que a coinoculação com *A. brasilense* eleva a produtividade dos grãos das cultivares (Potência e Valiosa), sendo economicamente viável destacando que a utilização da cultivar Potência coinoculada proporcionou a maior lucratividade.

A aplicação de inoculantes em ambientes agrícolas tem demonstrado um interesse crescente na atualidade e, em comparação com os produtos químicos, estes mostram as seguintes vantagens (BERG, 2009; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012): auxilia o desenvolvimento da planta sob condições de estresse, diminui a poluição ambiental causada pelo uso de fertilizantes e produtos químicos utilizados na agricultura, promove a melhoria da qualidade do solo, aumento no crescimento das plantas e na produtividade da cultura através da disponibilidade de nutrientes e fertilidade do solo, protege as plantas contra muitos patógenos do solo e oferece uma maior economia ao agricultor, uma vez que, os fertilizantes nitrogenados podem chegar a participar com

até 40% dos custos de produção (MC LAUGHLIN et al., 2000; HUNGRIA; VARGAS, 2000). Além disso, o baixo custo dos inoculantes cria também condições para que agricultores familiares e/ou de baixa renda utilizem estas tecnologias.

3.4 AZOSPIRILLUM BRASILENSE: FUNÇÕES FISIOLÓGICAS NAS PLANTAS

Conforme já descrito, o gênero *Azospirillum* destaca-se pela capacidade de sintetizar hormônios que promovem o crescimento vegetal, principalmente auxinas (BASTIAN et al., 1998; VESSEY, 2003; RODRIGUES, 2004; PERRIG et al., 2007; BABALOLA, 2010; COUILLEROT et al., 2013). A auxina produzida em maior quantidade por este microrganismo é o ácido-indol-3-acético (AIA). O AIA é produzido durante todas as fases de crescimento do *Azospirillum*, incluindo a fase estacionária (MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2009). Diversos tipos de auxina incluindo ácido indol-acetaldeído, ácido acético, ácido indol-láctico, indol-acetamida, ácido indol-butírico e indol-27 metanol já foram detectados em culturas de *Azospirillum* (CROZIER et al., 1988; FALLIK et al., 1989; COSTACURTA; KEIJERS; VANDERLEYDEN, 1994; SOMERS et al., 2005). A quantidade de auxina produzida depende da espécie: *A. irakense* sintetiza dez vezes mais AIA que *A. brasilense* SP7 (ZIMMER; APARICIO; ELMERICH, 1991).

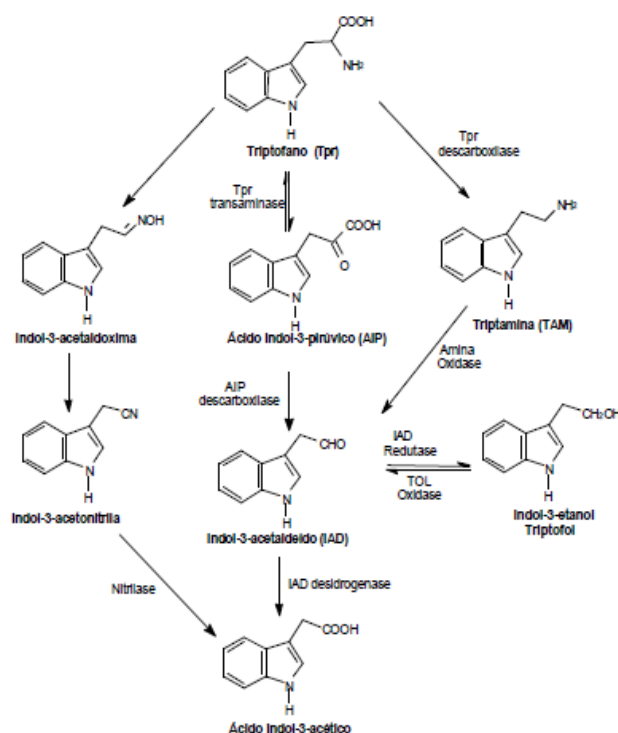
As auxinas elevam o fluxo de sais minerais e água no xilema e a formação de raízes, controlam o crescimento vegetativo, afetam a formação de pigmentos, a fotossíntese, a biossíntese de vários metabolitos e a resistência a estresses bióticos (BASTIÁN et al., 1998). O AIA quando é absorvido pelas plantas, causa alterações nas raízes, elevando o seu comprimento e influenciando a formação de raízes laterais e pelos radiculares. As alterações morfológicas das raízes, estimulada pela colonização de *Azospirillum* podem melhorar na captação de água e de nutrientes pelas plantas (KUSS, 2006). Melhorando a sua nutrição e tornando-as mais resistentes às intempéries.

Há evidências que bactérias, algas, fungos e leveduras podem selecionar uma rota em particular para a biossíntese de AIA, dentre as várias vias que possui de acordo com o ambiente. A maioria delas ocorre pela via dependente do triptofano (PATTEN, GLICK, 1996). Sabe-se que o aminoácido L-triptofano (LTrp) é um precursor fisiológico para a produção de auxina em diversas plantas e

microrganismos, e que a enzima chamada ipdC (índole-3-pyruvate descarboxilase- EC 4.1.1.74) é a enzima chave para a biossíntese deste fitormônio (LEBUHN, HARTMANN, 1993).

As bactérias do gênero *Azospirillum* possuem três diferentes vias metabólicas para a produção do AIA, sendo duas delas dependentes de L-triptofano, e a terceira via independente deste aminoácido mas dependente de outros precursores, como o ácido 3-indol pirúvico (OLIVEIRA et al., 2003; PATTEN, GLICK, 1996). A figura 01 apresenta as rotas de síntese do ácido indol acético (AIA) a partir do triptofano.

Figura 01 – Rotas de síntese do ácido indol acético (AIA) a partir do triptofano. a) Rota do ácido indolpirúvico; b) Rota da triptamina; c) Rota da indolacetaldoxima.



Fonte: TAIZ, ZEIGER (2008).

No Brasil cepas das bactérias *A. brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *A. lipoferum* vêm sendo alvo de estudos porque são capazes de sintetizar AIA (ácido indol-acético) a partir do triptofano e fixar N² atmosférico promovendo o crescimento de plantas (BABALOLA, 2010). Segundo Madhaiyan et al (2004) “quatro isolados de *G. diazotrophicus* dos tecidos da raiz da cenoura, rabanete, beterraba e café, produziram AIA na presença do triptofano”. Perrig et al. (2007) analisaram por meio de cromatografia gasosa- espectrometria de massa a

produção de AIA das estirpes Cd e Az 39 (*A. brasilense*) cultivadas no meio de cultura NFB sem triptofano e identificaram que a estirpe Cd produziu 10,8 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$, quantidade significativamente maior que a produzida por Az39 (2,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

As citocininas são derivadas da adenina. Nas plantas, são produzidas em pontas de raízes e sementes em fase de germinação. As citocininas são classificadas com este nome porque desempenham funções como a divisão celular e o desenvolvimento de gemas laterais. Além destas funções elas atuam na maturação dos cloroplastos, expansão foliar, disparam a morfogênese na raiz, atrasam a senescência e auxiliam na brotação (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; OKON, 2009). A produção de citocininas em meio de cultura contendo *Azospirillum* já foi mencionada em vários estudos (TAIZ, ZEIGER, 2009).

O etileno é o único fitormônio gasoso presente nas plantas e é sintetizado a partir do aminoácido metionina. Possui diferentes efeitos nas células dos vegetais: proporciona alterações metabólicas nos diversos estágios do desenvolvimento dos tecidos vegetais. Alguns dos efeitos causados pelo etileno são: formação de raízes adventícias, germinação de semente, diferenciação celular, indução da floração em algumas espécies, abscisão e senescência de folhas, flores e frutos. O etileno está relacionado também com o processo de amadurecimento dos frutos. O etileno também está envolvido nos processos de resposta a estresses de caráter biótico ou abiótico como ataques de patógenos e ferimentos nos tecidos vegetais (ETESAMI, 2009; TAIZ, ZEIGER, 2009).

As giberelinas estão envolvidas no processo de quebra de dormência de sementes alongação do caule, influência germinação das sementes, florescimento e frutificação em plantas superiores. Os importantes efeitos biológicos das giberelinas foram extensamente explorados com o intuito de favorecer as atividades agrícolas. A giberelina mais importante é o ácido giberélico, o qual é produzido pelo fungo *G.fujikuroi* que tem sido aplicado para auxiliar a germinação das sementes de cevada, produção do malte verde e frutas e verduras, além de estimular crescimento da cana de açúcar (GAUDIN et al., 1994; GUTIERREZ et al., 2001).

O ácido salicílico é um composto fenólico que atua em mecanismo de controle de resistência a patógenos (NA, MOU, 2011), fechamento dos estômatos (MELOTTO et al., 2006), a fotossíntese (UZUNOVA, POPOVA, 2000). A produção e excreção de ácido salicílico por *Azospirillum* provavelmente é um mecanismo

utilizado para evitar o estabelecimento de outras bactérias no sistema radicular, sejam elas benéficas ou patogênicas para a planta hospedeira (ALEN'KINA; TRUTNEVA; NIKITINA, 2013; ALEN'KINA et al., 2014 LEBEIS et al., 2015).

3.5 METABOLÔMICA

A metabolômica é um termo recente, inserido nos anos 2000 pelo Dr. Oliver Fiehn e associados (FIEHN et al., 2000), e que vem tornando-se relevante nesta era “OMICS” (ciência ômicas). As ciências ômicas apuram o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. Fazem parte deste conjunto de ciências, a transcriptômica, a proteômica, a genômica e a metabolômica que é descrita como uma quantitativa e qualitativa de metabólitos. A metabolômica tem como objetivo principal agregar o maior número possível de informações metabólicas de um sistema biológico ou de um organismo. Nas análises de metabolômica o interesse principal são moléculas que possuem baixa massa molar (< 1500 Da), que estão presentes em reações metabólicas, sendo estas informações utilizadas para adquirir melhor compreensão das vias bioquímicas (FIEHN et al., 2000).

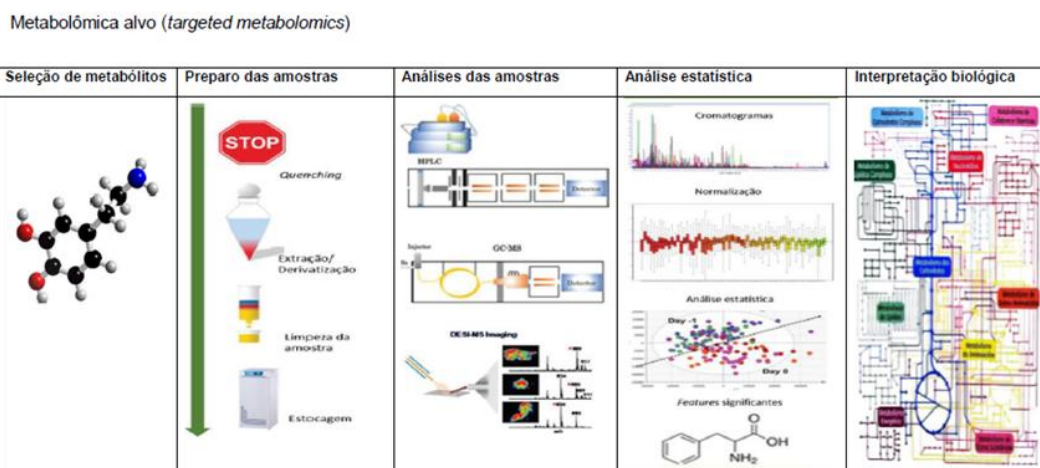
Além disto, são utilizadas duas abordagens principais e complementares nas investigações metabólicas, sendo elas: o perfil metabólico (do inglês, metabolic profiling), caracterizado como sendo análise de metabólitos previamente selecionados de rotas bioquímicas específicas e a impressão digital metabólica (do inglês, metabolic fingerprinting) descrita como sendo uma classificação de amostras de acordo com sua origem e relevância biológica (CANUTO et al., 2017; PEISE, SCHYMANSKI, WILMES, 2018). Além disso, também são encontrados os termos de análise global (do inglês, untargeted metabolomics) e análise alvo (do inglês, targeted metabolomics).

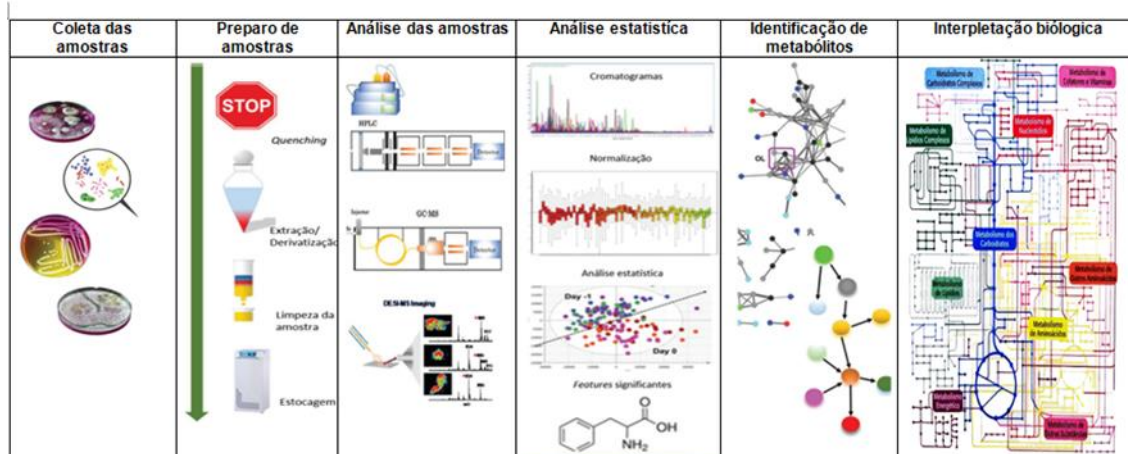
A análise alvo (do inglês, targeted metabolomics) concentra-se na análise quantitativa de um ou mais grupos de metabólitos, seja este grupo pertencente a uma determinada classe química ou relacionado a uma determinada via metabólica. Em grande parte dos casos a análise alvo é uma abordagem orientada por hipóteses e não uma abordagem para gerar hipóteses. Deste modo, os métodos analíticos são criados visando análise de compostos específicos (NAZ et

al., 2014; PEISE, SCHYMANSKI,WILMES, 2018). Os avanços tecnológicos nos últimos tempos têm promovido a ampliação na quantificação conjunta de um amplo número de substâncias (YANG, 2013; SMART, 2010).

A análise global (do inglês, untargeted Metabolomics) está relacionada a análise qualitativa do maior número possível de metabólitos, pertencentes a diversas classes químicas, contido no sistema biológico em estudo. Este tipo de análise é comumente utilizado como uma ferramenta de seleção para discriminar amostras de diferentes origens ou estados biológicos. Neste tipo de análise global as etapas de preparação de amostras podem ser excluídas ou até mesmo simplificadas. A principal vantagem da análise global em relação à análise alvo é que análise global permite que novas áreas do metabolismo sejam identificadas (CANUTO et al., 2017; NAZ et al., 2014; PEISE, SCHYMANSKI, WILMES, 2018). No desenvolvimento destas análises alvo ou global recomenda-se seguir uma série de etapas, que estão apresentadas resumidamente na figura 02.

Figura 02- Fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica alvo (A) e na análise metabolômica global (B).



Metabolômica global (*untargeted metabolomics*)

Fonte: Adaptado de KHOOMRUNG, et al., (2017).

De modo geral, a sequência de trabalho como análise metabolômica consiste da etapa de preparo de amostra, que envolve principalmente o *quenching* e a extração de metabólitos, análise instrumental, processamento e análise dos dados. Com o aumento dos trabalhos aplicando abordagens metabolômicas, a Sociedade de Metabolômica (do inglês, Metabolomics Society) desenvolveu em 2005, o Metabolomics Standards Initiative (MSI), que determina uma padronização no procedimento empregado nos trabalhos e publicações de estudos em metabolômica, com a finalidade de oferecer uma descrição clara do sistema biológico estudado e todos os componentes de estudo, de forma com que os dados sejam efetivamente compartilhados, aplicados e reutilizados pela sociedade acadêmica.

Para o desenvolvimento de um estudo metabolômico, a definição do problema biológico a ser estudado é a primeira etapa no desenvolvimento do estudo, para definir o tipo de abordagem metabolômica (global ou alvo). Em seguida as etapas de planejamento experimental e análises químicas são delineadas e o experimento metabolômico é conduzido (CANUTO et al., 2017; KHOOMRUNG et al., 2017).

O preparo de amostra para análise metabolômica é a segunda etapa, considerada uma das etapas mais importante, pois os metabólitos derivados dos microrganismos podem sofrer variações metabólicas muito rápidas durante a etapa de preparo de amostras (geralmente em 1-2s). Isto ocorre devido à complexidade das amostras biológicas, grande faixa de concentração dos metabólitos presentes. Por isto é essencial que a coleta e a manipulação das

amostras ocorram de forma rápida. Um passo importante comumente efetuado durante a coleta é denominado de quenching metabólico, que se refere à interrupção imediata das amostras com uso de nitrogênio líquido ou gelo seco, ou podem também ser utilizados solventes orgânicos para interrupção das mesmas (ALVAREZ, CAPOTE, CASTRO, 2010).

De modo geral a etapa de extração dos metabólitos é uma etapa de extrema importância na metabolômica microbiana, apesar de que alguns casos esta etapa acabe sendo negligenciada (PINU, VILLAS-BOAS, AGGIO 2017). Para análise metabolômica global uma preparação de amostras no mínimo não seletiva é de modo geral preferido. O objetivo da análise global é extrair a maior quantidade de metabólitos de inúmeras classes químicas de forma quantitativa e não tendenciosa com perdas do menor número possível de metabolitos. Portanto as amostras são analisadas priorizando o preparo de amostras mínimo, com precipitação de proteínas, remoção de sais, diluição, filtração e centrifugação (GOODACRE et al., 2004).

A análise metabolômica global dos metabólitos extracelular, usualmente envolvem apenas etapas de extração do meio extracelular e diluições. Para metabólitos intracelulares, geralmente são aplicados procedimentos fundamentais que permitam a lise celular e logo em seguida a utilização da extração líquida- líquida a fim de minimizar a distinção de classes químicas para análise global (SOBÓN et al., 2018). E, em alguns casos, empregam-se etapas de centrifugação e agitação. De modo geral, trabalhos recentes têm aplicado este tipo de extração diversificando os solventes utilizados, dependendo especialmente do microrganismo em estudo (KIM, KIM, 2017; HERMAN et al., 2017; MANDELLI et al., 2017).

Na análise metabolômica alvo, a extração deve beneficiar a recuperação quantitativa dos compostos químicos de interesse e remover os interferentes, assim os compostos químicos específicos de interesse são selecionados. Na análise alvo a metodologia é seletiva a um composto ou classe de compostos químicos, e envolvem várias etapas de extração sequenciais contendo diversos solventes, evaporação, filtração, centrifugação ou até mesmo etapas utilizando cartuchos de extração sólida. São também utilizadas metodologias de extração mais complexas em fase sólida e extração líquida- líquido (HERMAN et al., 2017; MANDELLI et al., 2017).

Como mencionado anteriormente, o preparo das amostras deve ser compatível com a técnica de análise aplicada. Para análises de cromatografia gasosa os metabólitos devem ser voláteis, a principal metodologia aplicada é a microextração em fase sólida (SPME). O grande benefício de se utilizar a técnica de SPME é a possibilidade da realização *in vivo*. Quando são aplicadas técnicas de eletroforese capilar as amostras preferencialmente devem estar em fase aquosa, sendo essencial a evaporação de todos os solventes orgânicos e logo em seguida a ressuspensão do solvente em água (KUEHNBAUM et al., 2015). Os experimentos utilizando ressonância magnética nuclear necessitam de diluição dos extratos em solventes deuterados.

A terceira etapa é a escolha da técnica analítica a ser utilizada, para análise das amostras biológicas. Mas o grande desafio da metabolômica microbiana é cobrir todos os compostos por uma única técnica analítica, uma vez que existe uma imensa variedade química de metabólitos com concentração variada (GOODACRE et al., 2004). Desta forma, a aquisição dos dados metabolômicos, vem sendo efetuada com a utilização de análises multiplataformas, que gerem maior cobertura em termos de compostos químicos detectados de modo que proporcione um maior entendimento biológico do microrganismo estudado (VILLAS-BÔAS, BRUHEIN, 2007). Dentro da metabolômica microbiana as principais técnicas analíticas aplicadas são a NMR (Ressonância magnética nuclear), GC-MS (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e LC-MS (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), é resultado de uma técnica de separação, com uma técnica de identificação e quantificação. A GC-MS é muito aplicada em estudos metabolômicos, em que inúmeros de centenas de compostos podem ser analisados ao mesmo tempo, incluindo açúcares, aminas aromáticas, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos, dentre outros; em alguns casos a derivatização é necessária (CANUTO et al., 2017).

A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica que analisa as propriedades magnéticas de certos núcleos atômicos para definir propriedades químicas e físicas de moléculas ou átomos nos quais eles estão contidos. É uma técnica muito simples e muito abrangente, que solicita o mínimo ou nenhuma manipulação das amostras, podendo ser analisadas amostras

biológicas sólidas e semi-sólidas (PUTRI et al., 2013; LENZ, WILSON, 2007). Esta técnica tem como vantagem de requerer pouca quantidade de amostra e não destruir a mesma após análise, mesmo contaminado com solventes deuterados. (NICHOLSON, LINDON, 1999).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LCMS) é atualmente a técnica analítica mais utilizada nos estudos metabolômico, visto que apresenta alta sensibilidade, seletividade, ser de fácil operação e alta robustez. O LC-MS é a técnica mais propícia para análises de compostos apolares e polares pouco voláteis, nos quais não são necessárias reações de derivatização (XU et al., 2014). Inúmeras opções estão disponíveis para analisadores de massas e fonte de ionização em sistemas LC-MS viabilizando a prática tanto de análise global e análise alvo o que faz do LC-MS um grande atrativo para estudos metabolômicos. Esta técnica permite efetuar tanto análises qualitativas como análises quantitativas fornecendo informações estruturais a partir de dados MS/MS e quantificação simultaneamente sem necessidades de altas resoluções cromatográficas (CANUTO et al., 2017).

A quarta etapa dos estudos metabolômicos é o pré-processamento dos dados gerados pelas análises analíticas, pois resultados das amostras biológicas são abundantes e complexos. Por este motivo são necessárias ferramentas adequadas de tratamentos de dados, para evitar erros e manter a integridade das variações biológicas inspecionadas. A maior parte destas plataformas e softwares de pré-processamento de dados metabolômicos partilham funções gerais de deconvolução e detecção de sinais analíticos, filtragem de ruído, correção da linha base e preenchimento de lacunas e alinhamento de picos (CANUTO et al., 2017).

A filtragem de ruído tem como objetivo separar o sinal procedente de um composto na amostra biológica de um sinal proveniente de interferência instrumental ou química. O objetivo da detecção e deconvolução de pico é quantificar e identificar os sinais compatíveis com os compostos nas amostras. O método de detecção de pico eficaz deve identificar os sinais verdadeiros e excluir os falsos positivos, além do mais a detecção e deconvolução diminuem a complexidade dos dados e os torna a posterior análise viável (BELINATO et al., 2019).

A normalização é aplicada para realizar a correção sistemática e escalar dos dados para que diferentes amostras em um estudo possam ser

comparadas entre si. É, é aplicado dividindo cada linha da tabela de dados por um fator de normalização. Duas estratégias principais são geralmente aplicadas para fazer a remoção do viés sistemático indesejado nas medidas. A primeira estratégia é considera sofisticada com a utilização de amostras controle de qualidade (QCs, do inglês quality control), em cada procedimento da aquisição a fim de visualizar a variabilidade global de um sistema de medição. As amostras de controle de qualidade (QCs) são uma mistura de volumes iguais de todas as amostras envolvidas no estudo. A finalidade das QCs é de avaliar o desempenho e a estabilidade instrumental durante a aquisição de dados. Uma vez que a QCs é avaliada em intervalos pré- estabelecidos, sendo sua leitura intercalada á das amostras, durante todo o processo de análise estatístico. A segunda estratégia é a utilização de padrões internos no qual a seleção destes padrões pode ser baseada em regiões específicas de RT ou m/z, mas RT e m/z, porém, nem sempre são descritos de todas as propriedades químicas e matriciais levando obscurecer a variação de dados (BELINATO et al., 2019).

A quinta etapa do trabalho metabolômico, são as análises estatísticas, para retirar informações pertinentes dos dados, por meio de análises multivariadas e univariada. Nas análises multivariadas, a classificação e a discriminação de entidades ou metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras são realizadas através da avaliação do conjunto da matriz de dados extraídos na etapa de trabalho anterior. São aplicados métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, partial least squares discriminant analysis), e projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, orthogonal partial least squares discriminant analysis). Já nas análises univariada, as variáveis de estudo (entidades ou metabólitos) são avaliadas particularmente e, ao contrário dos métodos multivariados, são descartadas as relações entre elas. Os testes estatísticos como anova, teste de student ou de mann- whitney v, são frequentemente utilizados (SUGIMOTO et al., 2012; CANUTO et al., 2018).

A sexta etapa do trabalho metabolômico é a identificação dos metabólitos um processo demorado e desafiador, principalmente na metabolômica microbiana. Isto ocorre por que os microrganismos podem produzir uma série diversificada de metabólitos em diferentes condições, que pode não ser usualmente reconhecidas em bibliotecas padrões.

Para análises metabolômica global a identificação dos metabolitos é feita aplicando biblioteca de espectros construídas no próprio laboratório de análise ou pela utilização de bibliotecas comerciais como a *Nist* (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*). A identificação dos metabólitos putativos pode ser realizada por meio de análise metabolômica em fluxo, aplicando compostos marcados isotopicamente ou por meio de análise de NMR-2D ou MS/MS para elucidação estrutural, além de adição por spiking de padrões analíticos às amostras. E sua identificação é realizada em bases de dados públicos online, como HMDB (do inglês, Human Metabolome Database), MassBankos, Metlin entre outras (TAUTENHAHN et al., 2012).

A sétima etapa é a interpretação biológica que é executada através da correlação dos metabólitos alterados com as rotas bioquímicas, utilizando-se bibliotecas como metaboLigths, metacyc,KEGG (do inglês, Encyclopedia of Genes and Genomes), MetaCyc, MetaboLights, entre outros. Para comprovar a interpretação dos efeitos bioquímicos, uma validação biológica é recomendada, onde novos experimentos são desenvolvidos com novas amostras e estas são submetidas à análise metabolômica (CANUTO et al.,2018; BELINATO et al.,2019).

Quando se tratam de microrganismos, os trabalhos metabolômicos têm colaborado para a descoberta de caminhos metabólicos únicos e interações regulatórias, sendo estas descobertas de grande importância e úteis para o entendimento do metabolismo global das células (REES et al., 2018). A metabolômica microbiana tem sido aplicada em diversos campos microbiológicos como na pesquisa de genes funcionais, identificação de vias metabólicas de microrganismo, mutação celulares (CANUTO et al.,2018; BELINATO et al., 2019). Em comparação a outros estudos a desvantagem da metabolômica de microrganismo está na alta complexidade dos metabolitos ainda pouco estudados e em poucos casos, de difícil identificação.

Os metabólitos são compostos químicos de baixo peso molecular (<1000 Da) que exerce um papel importante no metabolismo microbiano (conversão química) (PINU et al., 2017). Os metabólitos podem ser classificados com base em sua função como primária ou secundária. O metabolismo primário é o conjunto de reações químicas e processos anabólicos e catabólicos indispensáveis ao crescimento celular e fortemente conservados entre as espécies e gênero de microrganismos, o metabolismo secundário origina compostos orgânicos que não

estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos (BRIEN, WRIGHT, 2011).

Os metabólitos secundários são sintetizados por gêneros específicos, por razões fisiológicas, predatórios ou sociais, estando intimamente ligados à ecologia dos organismos (BRIEN, WRIGHT, 2011). Normalmente as vias metabólicas secundárias são ativadas em situações de carência nutricional, biossíntese ou na presença de um indutor e diminuição da taxa de crescimento microbiano. Estas situações de carência geram sinais que impulsionam uma cascata de eventos regulatórios, ocasionando diferenciações químicas, que ativam as vias metabólicas secundárias (DEMAIN, 1998). A insuficiência nutricional é a situação usual na natureza que resulta na diminuição na taxa de crescimento bacteriano e em consequência, favorece a produção de metabólitos secundários (DEMAIN, FRANG, 2000).

Os metabolitos microbianos secundários incluem moléculas de pigmentos, toxinas, antibióticos, e efetores de competição ecológica, enzimas inibitórias, receptoras antagonistas e agonista, feromônios, pesticidas, promotores do crescimento vegetal e animal, agentes anti-tumorais (DEMAIN, 1998). Menciona-se que os metabolitos secundários são mais comuns em organismos de organização corporal mais simples, que não possuem sistema imune. A biossíntese destes compostos depende das condições ambientais e de crescimento. Normalmente são codificados por genes agrupados no DNA cromossomal ou com menos frequência no DNA plasmidial (DEMAIN, 1998).

As estruturas químicas mais encontradas entre os metabolitos secundários são peptídeo cíclicos, açúcares, aminoácidos não proteicos, nucleosídeos não usuais, β - lactâmicos, poliacetileno insaturados, grupos nitrilas, terpenoides, grandes anéis de macrolídeos, entre muitos outros (DEMAIN, FANG, 2000). Apesar do metabolismo secundário não fazer parte do metabolismo primário, as vias metabólicas do metabolismo secundário decorrem do metabolismo primário, uma vez que os compostos iniciais utilizados no metabolismo secundário originam-se das principais vias biosintéticas. Os metabolitos secundários exercem diversas funções como: hormônios sexuais, estruturas transportadoras de metais, estruturas de diferenciação intra e extra celular, promotores de crescimento microbiano e de plantas, moléculas que propiciam a simbiose entre microrganismos e plantas, nematoides, insetos e animais superiores e estrutura de defesa contra agentes

externos sejam eles fungos, bactérias (antibióticos), plantas, insetos ou animais de grande porte (HORAK et al., 2019).

A síntese de metabólitos por microrganismos é influenciada por diversos fatores ambientais (KIM, KIM, 2017), como temperatura, pH, método de cultivo (cultura em lote vs cultura contínua), meio de cultivo utilizado (meio complexo vs meio mínimo) , período de incubação, luz e umidade (TYC et al., 2016). Por este motivo é importante que as condições de cultivo para trabalhos metabolômicos sejam otimizadas para garantir que as quantidades máximas de metabólitos significativos sejam sintetizadas para garantir a defectibilidade.

Os meios de cultivo utilizados influenciam sobre o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos durante o período de incubação, devido às diferenças no teor de nutrientes e nas vias metabólicas resultantes. Porém poucos trabalhos investigaram o efeito de diferentes tipos de meios de cultivo nas atividades metabólicas microbianas (HORAK et al., 2019).

Kim e Kim (2017) comparou o perfil metabólico de *Escherichia coli* e *S. cerevisia* e em dois meios de cultivos (meios mínimos vs meios complexos). Os meios complexos utilizados foram o caldo YP e o caldo Luria-Bertani, enquanto os meios M9 e um caldo à base de nitrogênio de levedura foram usados como meios mínimos. O cultivo que usou meios complexos resultou em maiores taxas de crescimento microbiano e densidades celulares finais, quando comparado com o cultivo de meios mínimos. Além disso, o cultivo em meio complexo rendeu níveis significativamente maiores de aminoácidos, enquanto a produção de açúcares, ácidos graxos e álcoois de açúcar foi maior no caldo mínimo. Metabolitos intracelulares específicos do meio e do organismo foram comparados para determinar se o perfil do metabólito obtido dependia do tipo de meio de cultivo ou do próprio microrganismo. Meios de comunicação semelhantes exibiram perfis de metabólitos semelhantes, independentemente do microrganismo (*E. coli* ou *S. cerevisiae*). Concluiu-se que as diferenças específicas dos meios de cultivo superaram as diferenças específicas do organismo, mostrando que a captação e o metabolismo dos nutrientes é um fator crítico na determinação da produção de metabólitos.

Oliveira e colaboradores (2017) enriqueceram a biomassa celular de *A. brasilense* (Ab-V5) com biopolímeros de EPS e PHB, para serem aplicados na formulação de inoculantes líquidos e turfosos. Os inoculantes foram aplicados em

sementes de plantas de milho. Os resultados deste tratamento foram comparados com o meio de cultura OAB utilizados como controle. Um ensaio de inoculação com milho realizado em casa de vegetação e utilizando células de *A. brasilense* Ab-V5 enriquecidas com biopolímeros demonstrou a importância do EPS e PHB para a viabilidade bacteriana em longo prazo no solo e para a eficácia da inoculação.

As alterações dos exopolissacarídeos de *A. brasilense* são frequentemente retratadas como resposta a diferentes condições de crescimento e estadas fisiológicas. Além do mais, a composição relativa dos exopolissacarídeos varia dentro das linhagens e espécies de microrganismos (FICHER, MIGUEL, MORI 2003). A produção de EPS pelos microrganismos interage com as plantas podendo auxiliar em várias situações de estresse ambiental como: estresse salino, hídrico, variações de temperatura, entre outros. Este composto possibilita também a melhor aderência e colonização dos microrganismos em superfícies sólidas proporcionando um acúmulo de nutrientes e minerais. Os EPS protegem as células microbianas do dessecação, estresses ambientais, além de poder ajudar na melhor fixação de nutrientes e minerais nas áreas próximas do microrganismo (KONOVA et al., 2001; KADOURI, JURKEVITCH, OKON, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AZOSPIRILLUM BRASILENSE

A bactéria utilizada nesse experimento é a *Azospirillum brasilense*, estirpe Ab-V5, cedida pelo laboratório de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR, e está armazenada sob criopreservação no laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Essa estirpe está registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para uso como inoculante nas culturas de milho, trigo e arroz (MAPA, 2011).

4.2 Composição e preparo dos meios de cultura

A bactéria *Azospirillum brasilense* Ab-v5 foi cultivada nos meios de cultura MCA4 e OAB, conforme apresentados nas tabelas 01 e 02.

Tabela 01- Composição química do meio de cultura MCA4.

Reagente	Quantidade
Glicerol	100 g/L
Sacarose	50 g/L
Extrato de levedura	50 g/L
Goma xantana	1,0 g/L
PVP	1,0 g/L
FeEDTA (sol. 0,5 M)	2,0 mL/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g/L
NaCl	0,1 g/L
KH ₂ HPO ₄	4,0 g/L
K ₂ HPO ₄	6,0 g/L
NH ₄ NO ₃	1,5 g/L
Solução de micronutrientes*	5,0 mL/L
Solução de micronutrientes*	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,0 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,18 g/L
H ₃ BO ₃	1,40 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,20 g/L

FONTE: DOBEREINER et al.,1995; MILANI,2014.

Tabela 02- Composição do meio de cultura OAB.

Reagentes	Quantidade
Ácido DL- málico	5 g/L
NaOH	3 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L
CaCl ₂	0,02 g/L
NaCl	0,1 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
Extrato de levedura	0,1 g/L
FeCl ₃	0,01 g/L
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	2 g/L
MnSO ₄	2,1 g/L
H ₃ BO ₃	2,8 g/L
Cu (NO ₃) 2 »3H ₂ O	0,04 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,24 g/L
K ₂ HPO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	6 g/L

FONTE: BASHAN et al., 1993.

Os reagentes dos meios de cultura OAB e MCA4 foram solubilizados em 1000 mL de água destilada, e após o ajuste do pH para o valor de 6,8 e meios foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121°C por 15 minutos (BASHAN et al., 1993; MILANI, 2014).

Para o pré inoculo dos meios de cultivo OAB e MCA4, a cultura criopreservada de *A. brasilense*, foi inoculada em meio Dygs líquido como descrito na tabela 03. A tabela 03 apresenta a composição química do meio de cultura Dygs líquido.

Tabela 03- Composição química do meio de cultura Dygs líquido.

Reagentes	Quantidade
Glicose	2,0 g/L
Peptona	1,5 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
K ₂ PO ₄	0,5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/L

Fonte: RODRIGUES et al., 1986.

Os reagentes que foram utilizados para o preparo do meio de cultura Dygs foram diluídos em 1000 mL de água destilada e adicionados na ordem apresentada na Tabela 04. O pH foi ajustado para 6,8 utilizando uma solução de KOH a 10% e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, seguindo protocolo estabelecido por RODRIGUES et al., 1986.

4.3 PREPARO DO INÓCULO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A partir de 100 µL da cultura de Ab-V5 criopreservada, foi preparado um meio de cultivo contendo 5 mL de meio Dygs (RODRIGUES NETO et al, 1986), onde foi incubado por 24 horas em agitador orbital a 180 rpm e 28°C. Após este período de crescimento, a densidade de células no cultivo foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Paralelamente, foram preparados frascos Erlenmeyers (volume de 250 mL) contendo 50 mL de cada um dos meios de cultivo MCA4 e OAB ensaiados (tabela 01 e tabela 02). Os frascos contendo os meios de cultivo foram esterilizados sob temperatura de 121°C e pressão de 1 atm durante 15 minutos, e inoculados com uma suspensão de células de *A. brasilense* Ab-V5 crescidas em meio Dygs líquido. A concentração celular inicial nos cultivos realizados em frascos Erlenmeyers foi de 1×10^6 células de *A. brasilense* Ab-V5 por mL de meio de cultura. Após a inoculação, os frascos foram incubados em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C por até 72 horas, em quadruplicada.

4.4 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)

A avaliação da viabilidade celular de Ab-V5 nos meios de cultivo foram realizadas através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método de MIELES, MISRA, (1938). Amostras de 1,0 mL dos cultivos foram seriadamente diluídas (1/10) em solução salina de (NaCl 0,85%), e alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-3} a 10^{-8} foram plaqueadas em meio Dygs sólido. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C pelo período de 24 horas, sendo efetuada, a seguir, a contagem do número de colônias em cada diluição. Os resultados foram expressos como número de unidades formadoras de colônia por mL de cultivo (UFC/mL).

4.5 COLETA DOS MEIOS DE CULTIVO OAB E MCA4 PARA ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Foram coletadas amostras de 40 mL de cada um dos meios cultivos MCA4 e OAB, após 6, 12, 24, 36 e 72 horas de incubação, seguidas de centrifugação a 6000 giros a 4 °C por 10 min para sedimentação da biomassa celular. Em seguida, os extratos foram filtrados em membrana de celulose (poro de 0,22 µm) para obtenção de extratos livres de células (ELC).

4.6 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE METABÓLITOS NOS MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE EM CG-MS

Alíquotas de 4 mL do sobrenadante de cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 nos meios de cultivo MCA4 e meio OAB foram coletadas para análises cromatográficas. Alíquotas de mesmo volume foram coletadas de meios de cultivo (MCA4 E OAB) não inoculados e utilizados como branco nas análises. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000 giros a 4 °C por 10 min, os extratos foram filtrados em membrana de celulose (poro de 0,22 µm) e 1,0 mL do sobrenadante filtrado foi transferido para frascos de vidro (vials, 1,5 mL de volume), onde foram adicionados 150 µL de solução padrão de D-glicose e ácido salicílico (50 ug mL⁻¹). Posteriormente, as amostras foram submetidas a extração em fase sólida utilizando um cartucho de extração Strata-X® (200 mg/3 mL; Phenomemex), de acordo com o seguinte procedimento: O cartucho foi ativado com 5 mL de metanol e equilibrado com 5 mL de H₂O ultrapura. Os cartuchos ativados foram carregados com 4 mL dos extratos previamente filtrados contendo os compostos padrão. Em seguida, foi efetuada a lavagem dos cartuchos com 20 mL de H₂O ultrapura para a remoção de sais. Após esta etapa, aos cartuchos foi adicionado 1 mL de metanol para eluição dos metabólitos, seguindo a secagem dos extratos metanólicos em estufa com circulação de ar a 50 °C por 24 horas para a concentração das amostras. Às amostras secas foram adicionados 50 µL de solução de cloridrato de metoxiamina em piridina e N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (500 ug mL⁻¹) para derivatização, e foram incubadas em banho maria a 37 °C por 90 minutos seguido por um período de 9 horas em temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 40 µL de solução de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida e foi feita a incubação por 30 minutos a banho maria a 37°C. As análises foram conduzidas em quadruplicata para cada tratamento.

Alíquotas de 1 µL das amostras derivatizadas foram injetadas no equipamento GC-MS QP2010SE (SHIMADZU) equipado com uma coluna capilar RTX- 5MS RESTEK (30 m, Ø 0,25 mm ID, espessura de filme de 0,2 µm), detector de ionização de chama (CG-DIC) e injetor AOC-5000. A separação dos compostos foi realizada com a temperatura do injetor e detector a 250°C, utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As condições de operação do cromatógrafo compreenderam uma temperatura inicial de 60 ° C, seguida por uma rampa de 15 ° C até 310 ° C, isoterma a 310 ° C por 10 min. As temperaturas da

linha de transferência e da fonte de íons foram 250°C e o intervalo de massa foi dinâmico de 45 a 700 *m/z*.

Os espectros obtidos foram analisados na plataforma Galaxy online seguindo o protocolo descrito por Petera et al. (2020). Brevemente, os espectros GC-MS (amostras e branco) foram carregados na plataforma Galaxy online, transformados para o formato de análise (MSnbase readMSData), feita a identificação de picos com intensidade superior ao ruído para cada amostra (xcms FindChromPeaks), agrupamento das repetições e branco de cada tratamento (xcms findChromPeak Merger), alinhamento dos cromatogramas (xcms groupChromPeaks) e correção do tempo de retenção (xcms adjustRtime) com base no composto padrão D-glicose. Foram geradas listas contendo compostos (picos) presentes em pelo menos duas de quatro repetições para cada tratamento, excluindo-se os compostos identificados nas amostras provenientes dos meios de cultivo não inoculados (branco).

4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS NOS MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE LC-MS/MS

Foram coletados 40 mL do meio OAB e MCA4, onde foi adicionado 1 mg/ml de Padrão Interno (Paraquat). Desses 40 mL foram coletadas amostras de 10 mL do meio OAB e MCA4, as quais foram submetidas à extração utilizando cartucho SPE de Strata-X® (200 mg/3 mL; Phenomemex), de acordo com o seguinte procedimento: O cartucho foi ativado com 5 mL de metanol e equilibrado com 5 mL de H₂O ultrapura. O cartucho de extração Strata-X® foi carregado com 10 mL da MCA4 e do meio OAB, em seguida o cartucho Strata-X® foi lavado com 20 mL de H₂O ultrapura e logo após os metabólitos foram eluídos com 1 mL de metanol, e alocados em vials para análise de LC-MS/MS.

As análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas no sistema Waters Avquity UPLC-Class-Xevo TQD, equipado com ionização por eletrospray em modo positivo e negativo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 2.1 x 50 mm (1.7-µm porosity), como fase móvel: H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A), e Metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (B). O volume de injeção foi de 10 µl.

As condições para ácido salicílico, auxina, ácido abscísico e ácido

jasmônico foram as seguintes: perfil do gradiente: gradiente linear de 90% H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico para 55% H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico durante 5 minutos, gradiente para 20% H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico em 5,5 min, após foi submetido a limpeza da coluna durante 1,5 min (100% B), e reestabelecimento da coluna em 90% H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico durante 1,5 min. O fluxo foi de 0,4 mL/min-1. A temperatura da coluna foi mantida em 35 °C. Os parâmetros da fonte foram os seguintes: fluxo de gás do cone, 60 L/h; fluxo do gás de dessolvatação, 550 L/h; capilaridade, 2,8 kV; temperatura de dessolvatação, 350 °C. A voltagem do cone, energia de colisão, massa do íon precursor, e massa do fragmento estão demonstradas na tabela 04. A detecção dos íons foi realizada no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Tabela 04- Informação da voltagem do cone, energia de colisão, massa do íon precursor, e massa do fragmento.

Molécula	Íon precursor	Fragmento	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
AS	137	92	24	15
IAA	174	130	19	10
JÁ	209	58	27	15
ABA	263	153	27	10

Legenda: AS (ácido salicílico), IAA (auxina), Já (ácido jasmônico), ABA (ácido abscísico).

As condições para análise de giberilinas foram as seguintes: perfil do gradiente: gradiente linear de 90% H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico para 55% H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico durante 5 min, gradiente para 20% A em 5,5 min, após foi submetido à limpeza da coluna durante 1,5 min (100%B), e reestabelecimento da coluna em 90% H₂O ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico durante 1,5 min. O fluxo foi de 0,4 mL/min-1. A temperatura da coluna foi mantida em 35 °C. Os parâmetros da fonte foram os seguintes: Fluxo de gás do cone, 2 L/h; fluxo do gás de dessolvatação, 650 L/h; capilaridade, 1,5kV; temperatura de dessolvatação, 150 °C, temperatura da fonte, 150 °C, voltagem do cone, 30 V; energia de colisão, 25 eV. A massa do íon precursor, e massa do fragmento estão demonstradas na tabela 07. A detecção dos íons foi realizada no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Tabela 05- Informação da massa do íon precursor, e massa do fragmento.

Molécula	Íon precursor	Fragmento
GA ₈	363	275
GA ₂₉	347	303
GA ₃	345	239
GA ₁	347	259
GA ₆	345	119
GA ₅	329	145
GA ₂₀	331	287
GA ₁₃	377	259
GA ₄₄	345	301
GA ₁₉	361	273
GA ₃₄	347	259
GA ₅₁	331	287 (243)
GA ₇	329	223
GA ₄	331	287 (257)
GA ₅₃	347	329
GA ₂₄	345	257
GA ₉	315	271
GA ₁₅	329	257
GA ₁₂	331	313
GA _{ald}	317	273

Fonte: O próprio autor.

4.8 ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Em vasos contendo 1,0 kg de substrato formado pela mistura em iguais proporções de Latossolo vermelho distrófico e areia lavada, foram semeados sementes de milho (*Zea mays*) tratadas com 1,0 mL de extratos com metabólitos de *A. brasilense* Ab-V5 produzidos por cultivo em meio MCA4. Para a obtenção do extrato metabólico foi feito um pré inoculo de 100 µL da cultura de Ab-V5 criopreservada, foi preparado um meio de cultivo contendo 5 mL de meio Dygs como descrito na tabela 04 (RODRIGUES NETO et al, 1986), o qual foi incubado por 24 horas em agitador orbital a 180 rpm e 28°C. Após este período de crescimento, a densidade de células no cultivo foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Paralelamente, foram preparados frascos Erlenmeyers (volume de 250 mL) contendo 50 mL do meio de cultivo MCA4 ensaiado (tabela 01). Os frascos contendo os meios de cultivo foram

esterilizados sob temperatura de 121°C e pressão de 1 atm durante 15 minutos e inoculados com uma suspensão de células de *A. brasilense* Ab-V5 crescidas em meio Dygs líquido. A concentração celular inicial nos cultivos realizados em frascos Erlenmeyers foi de 1×10^6 células de *A. brasilense* Ab-V5 por mL de meio de cultura. Após a inoculação, os frascos foram incubados em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C por até 60 horas.

Foram coletadas alíquotas de 5 mL destes cultivos após diferentes tempos de incubação: 12, 36 e 60 horas. Estas alíquotas de cultivo foram centrifugadas a 7.000 giros a 4 °C por 10 min para sedimentação da biomassa celular. Em seguida, os extratos foram filtrados em membrana de celulose (poro de 0,22 µm) para obtenção do extrato metabólitos. As plantas tratadas com os extratos metabólitos foram mantidas por 35 dias para crescimento, e após este período, foram removidas dos vasos, lavadas e postas para secar em estufa de circulação de ar a 50 °C por um período de 48 horas, para determinar o peso seco das mesmas. O ensaio foi conduzido sob delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos e dez repetições, compreendendo a aplicação do extrato contendo metabólitos extracelulares de *A. brasilense* produzido em diferentes tempos de cultivo e um tratamento controle, sem adição de *A. brasilense*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *A. BRASILENSE* AB-V5 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO: DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

O gráfico 01 apresenta os valores de UFC para avaliação do crescimento de *A. brasilense* nos meios de cultivo MCA4 e OAB após 6, 12, 24, 36 e 72 horas de cultivo. Foi observado que a velocidade de crescimento e a densidade populacional de *A. brasilense* Ab- V5 foram superiores na formulação MCA4 quando comparado com o meio de cultivo OAB (é quase de 10.000 vezes superiores nas contagens após 12 horas de cultivo). A densidade populacional máxima de *A. brasilense* Ab-V5 em meio de cultivo OAB foi de $6,91 \times 10^6$ células mL⁻¹, observada após 36 horas de cultivo, enquanto para o meio MCA4, a densidade populacional máxima foi de $9,77 \times 10^9$ células mL⁻¹ após 24 horas de cultivo. Além disso, estatisticamente houve diferença na cinética de crescimento do microrganismo entre os meios de cultivo testado, com início do decaimento populacional após 36 horas de cultivo testadas, com o início do decaimento populacional após 36 horas de cultivo para o meio OAB, enquanto no meio MCA4 este decaimento teve início após 24 horas de cultivo.

Gráfico 01- População de *A. brasilense* Ab-V5 no meio de cultivo OAB e na formulação MCA4 em diferentes tempos de crescimento, determinadas por meio do número de unidades formadoras de colônia (UFC) pelo método da gota (drop plate).

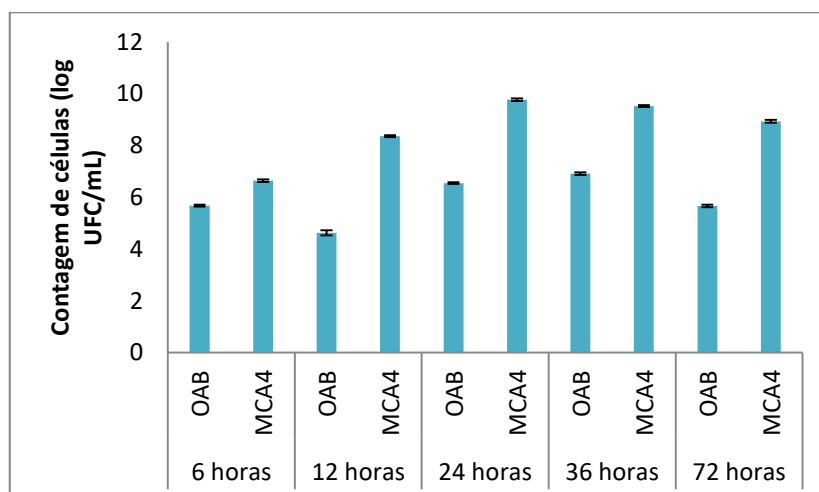


Gráfico contém erro padrão

Embora estas diferenças sugiram o envelhecimento precoce da população de *A. brasilense* cultivado em meio MCA4, os resultados de contagem por UFC indicam que a velocidade de decaimento populacional foi menor em meio MCA4 do que em meio OAB. A queda populacional observada em meio MCA4 foi aproximadamente 10% entre as contagens realizadas após 72 h de cultivo comparativamente ao valor máximo de contagem (24 h de cultivo), enquanto no meio OAB esta queda chegou a quase 20% entre os valores de contagem de 72 h e o máximo observado em 36 h de cultivo. As diferenças observadas estão diretamente relacionadas com a composição nutricional dos meios de cultivo utilizados, como demonstrado anteriormente por Oliveira et al. (2017). A formulação MCA4 constitui de um meio de cultivo com maior quantidade de nutrientes, contendo altas concentrações de compostos ricos em nitrogênio e carbono, portanto capaz de suportar uma densidade de células muito maior e por mais tempo, comparado com o meio OAB.

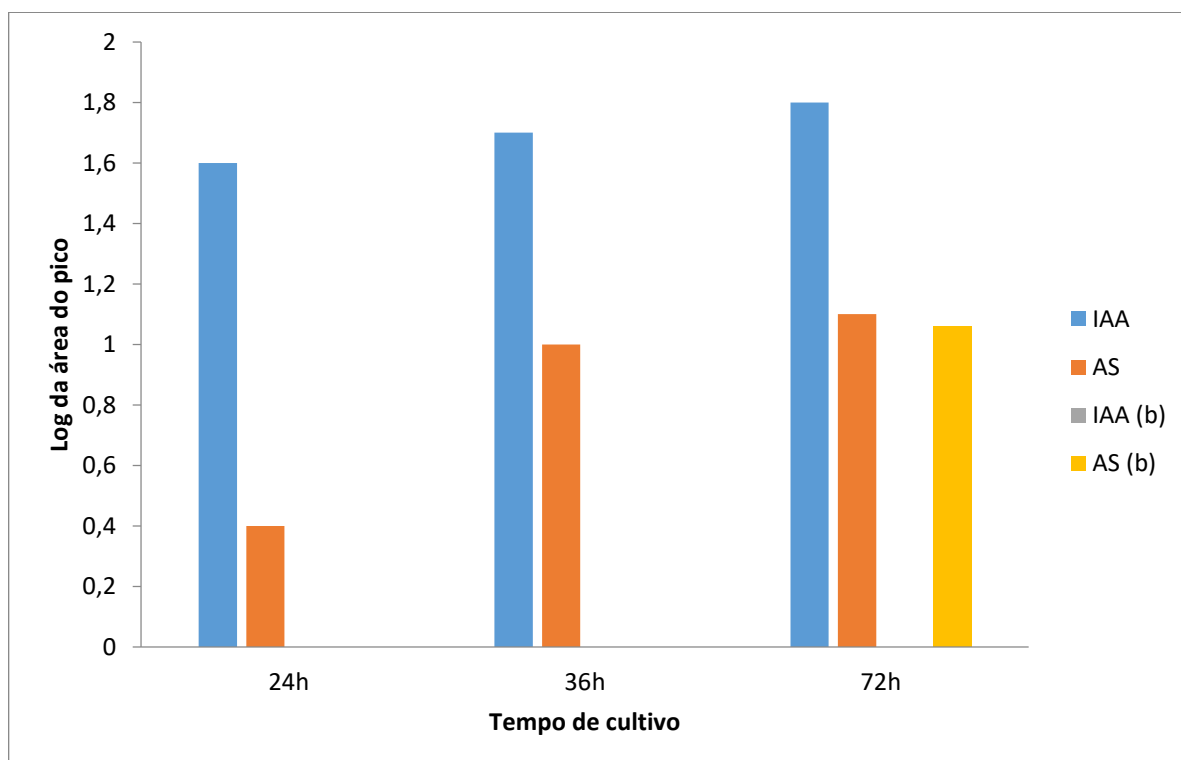
Além disso, a formulação MCA4 possui alta concentração de glicerol (1% *p/v*) e sacarose (5% *p/v*) em sua formulação. O glicerol protege as células da desidratação diminuindo a taxa de dessecação, fato de extrema importância para manter as células viáveis por longos períodos de tempo (BASHAN, TREJA, 2011). Tarrand, Krieg e Döbereiner (1978) empregaram glicerol em seu meio de cultura como fonte de carbono, obtiveram excelentes resultados no crescimento bacteriano de *Azospirillum*. Albareda et al. (2008) e Manikandan et al. (2010) também empregaram glicerol em meios de cultivos utilizando outros gêneros de bactérias como *Rhizobium spp.* e *Pseudomonas fluorescens* e observaram que o glicerol pode interferir positivamente no crescimento bacteriano, e beneficiar a manutenção de elevadas populações durante o período de armazenamento dos inoculantes.

5.2 PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS NOS MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE POR LC-MS

A análise cromatográfica direcionada para a identificação da presença dos fitormônios ácido jasmônico (AJ), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), e ácido indolacético (AIA), como produto do metabolismo celular de *A. brasilense* Ab-V5 demonstrou ausência destes fitormônios nos cultivos conduzidos no meio OAB, em qualquer dos tempos de cultivo. Por outro lado, nos cultivos realizados MCA4 indicou a presença de ácido salicílico e o ácido indolacético nos

cultivos superiores a 24 horas. O gráfico 02 apresenta o resultado da análise cromatográfica do sobrenadante dos cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 no meio de cultivo MCA4.

Gráfico 02- Análise cromatográfica direcionada para identificação de fitormônios no sobrenadante de cultivos *A. brasilense* (Ab-V5) realizados em meio MCA4 sob diferentes tempos de incubação.



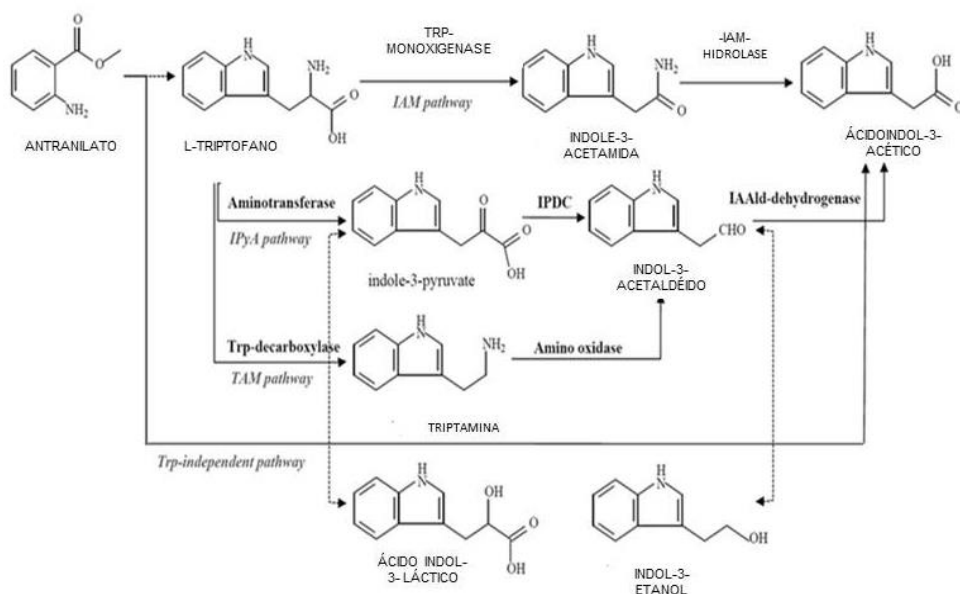
Ácido indolacético (IAA), ácido salicílico (AS), ácido indolacético IAA (b), ácido salicílico AS (b).

Os resultados da análise por LC-MS demonstram a presença de ácido indolacético e ácido salicílico no sobrenadante dos cultivos realizados em meio MCA4 a partir de 24 horas de crescimento, coincidindo com o fim da fase de crescimento exponencial do microrganismo, como demonstrado na tabela 09. Além disso, é possível verificar que a concentração dos fitormônios identificados aumentou ao longo do tempo de cultivo, com maiores valores observados para as avaliações realizadas em cultivos de 72 h. também foi realizada a prospecção dos fitormônios AJ, ABA, AS, E AIA em meios de cultivo não inoculados e mantidos sob a mesma agitação orbital e temperatura aplicada aos meios MCA4 e OAB inoculados *A. brasilense* Ab-V5, para certificar sua origem como fruto do metabolismo celular. Nenhum dos fitormônios foi identificado no meio de cultivo OAB não inoculado, em nenhum dos tempos de incubação. Por outro lado, foi detectada a

presença de ácido salicílico no meio MCA4 não inoculado e incubado por 72 h sob as mesmas condições aplicadas aos meios inoculados, com quantidade similar a observada nos sobrenadantes de cultivos de 72 h em meio MCA4. Este resultado pode indicar a contaminação dos cultivos, evento descartado se considerado o aspecto visual dos meios de cultivo MCA4 não inoculados após 72 h de incubação (ausência de turbidez, ausência de precipitados, ausência de biofilme). Outra possibilidade é a transformação química de componentes nutricionais submetidos à agitação orbital (aeração, portanto pressão oxidativa) sob temperatura constante. A conversão química de fenóis em ácido salicílico é explorada pela indústria farmacêutica (LIJIMA, YAMAGUCHI, 2008), e este fenômeno pode ter ocorrido espontaneamente no meio de cultivo MCA4 após um período longo de incubação, onde os aminoácidos como a tirosina ou outros fenóis presentes no extrato de levedura poderiam ser os precursores. Uma nova análise das amostras de meio MCA4 não inoculadas será conduzida para confirmar a presença de AS.

Outro fitormônio identificado em cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 realizados em meio MCA4 corresponde ao ácido indolacético, onde provavelmente o aminoácido triptofano foi utilizado como precursor. Embora nenhum dos meios de cultivo tenha incluído triptofano como constituinte, este aminoácido está presente nas proteínas do extrato de levedura, um composto utilizado na formulação de ambos os meios de cultivo testado, embora em proporção muito maior no meio MCA4 (500 vezes). O extrato de levedura é um composto rico em vitaminas, especialmente complexo B, aminoácidos e outros fatores de crescimento celular, e sua concentração no meio OAB pode ter sido insuficiente para ativar a biossíntese de AIA por *A. brasilense*. Bactérias de diferentes grupos filogenéticos possuem a capacidade de biossíntese de AIA, que se constitui um composto do metabolismo secundário destes microrganismos (OLENSKA et al., 2020). Pelo menos quatro vias metabólicas para a biossíntese de auxina foram propostas e descritas para o gênero para bactéria *Azospirillum*, sendo três vias dependentes do aminoácido triptofano (via do indol-3-piruvato - IPyA, via da indol-3-acetamida - IAM e, via da triptamina - TAM) além de uma via independente do triptofano (PRINSEN et al., 1993; LÓPEZ et al., 2000). A via do indol-3-piruvato é prevalente, sendo a enzima indol-3-piruvato descarboxilase (codificada pelo gene *ipdc*) a principal desta via. A figura abaixo mostra uma visão geral das rotas de biossíntese de AIA propostas para o gênero *Azospirillum*.

Figura 03- Visão geral das rotas de biossíntese de ácido-3-indol acético (AIA) propostas para bactérias do gênero *Azospirillum* sp.



Fonte: CASSÁN, VANDERLEYDEN, SPAEPEN, 2014.

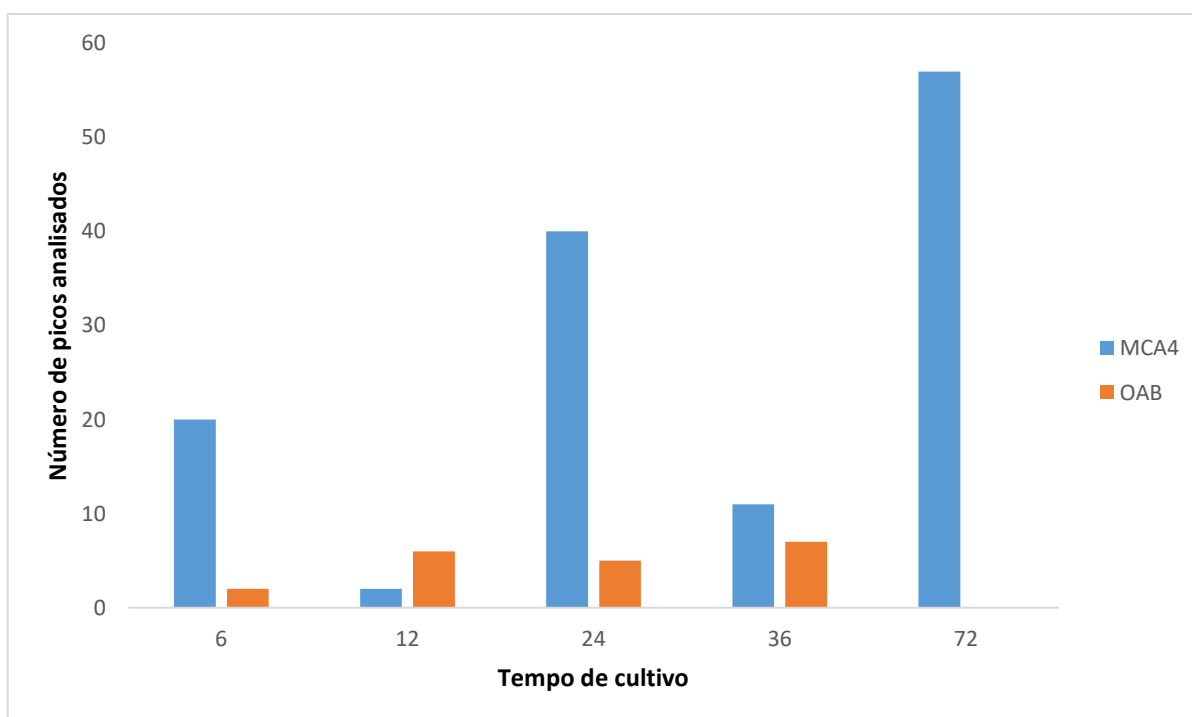
Autores como RIVERA et al. (2018) e Zakharova et al (1999) avaliaram o metabolismo global do AIA, em diferentes estirpes de *A. brasilense* cultivadas em meio de cultura suplementado com o aminoácido triptofano, e afirmaram que a suplementação com este aminoácido aumentou a produção de AIA. Khawas, Adachi (1999) investigaram a produção de auxina por bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* e *Klebsiella* sp em meio de cultivo com triptofano, verificando a produção de grandes quantidades de AIA. Embora os meios de cultivo utilizados neste trabalho não tenham sido suplementados com triptofano, a presença de AIA nos cultivos realizados em meio MCA4 sugere que a elevada concentração de extrato de levedura utilizada nesta formulação pode ter provido o precursor para a biossíntese de AIA por *A. brasilense*.

5.3 PERFIL METABOLÔMICO DE *A. BRASILENSE* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO: ANÁLISE POR GC-MS.

Os metabólitos contidos no sobrenadante de cultivos de *A.*

brasilense nos meios MCA4 e OAB, em diferentes tempos de crescimento, estão sendo analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) não direcionadas. Até o momento, foi determinado o conjunto de sinais (picos cromatográficos) relevantes para as diferentes condições de crescimento (meios MCA4 e OAB) e tempos de cultivo, como apresentado no gráfico 03. É possível verificar que a quantidade de picos detectáveis nos extratos de meio MCA4 é superior em relação a identificada no meio de cultura OAB. Estão sendo conduzidas análises para identificação dos compostos selecionados, com o objetivo de elucidar melhor as relações entre o desenvolvimento celular, status nutricional e a fisiologia bacteriana.

Gráfico 03- Análise quantitativa de sinais cromatográficos (picos detectáveis) no sobrenadante de cultivo de *A. brasilense* AB-V5 em diferentes meios de cultura (MCA4 e OAB) e tempos de crescimento.



Fonte: O próprio autor.

5.4 ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO COM PLANTAS DE MILHO

O gráfico 04 mostra os resultados do ensaio de inoculação com *A. brasilense* Ab-V5 conduzido em casa de vegetação, onde foram adicionados

extratos com metabólitos coletados no sobrenadante de cultivo deste microrganismo em meio MCA4 sob diferentes estádios fisiológicos. Os resultados obtidos demonstraram que as sementes tratadas com extrato de cultivos em MCA4 com 12 e 36 horas de cultivo não resultaram incrementos na biomassa das plantas em comparação com o tratamento de referência (controle), a adição de ELC obtido de cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 após 72 horas de crescimento resultou em incrementos na biomassa das plantas de milho. É importante ressaltar que os ELC obtidos após 72 h de cultivo proporcionaram a seleção de 57 sinais cromatográficos relevantes, um valor 140% superior ao identificado no ELC de 24 h de cultivo, e mais de 500% superior ao observado no ELC de 36 h. De maneira interessante, a análise direcionada para AIA e AS sugere que estes compostos não foram determinantes para os resultados observados, uma vez que as respectivas análises indicam que estes compostos não apresentaram grande variação quantitativa nos ELC obtidos de cultivos de 36 ou 72 h.

Gráfico 04- Biomassa de plantas de milho cultivado sem extratos de metabólitos não esterilizado e adicionado de extratos de metabólitos produzidos por *A. brasilense* Ab-V5 obtidos a partir de diferentes tempos de cultivo em meio MCA4. Os resultados representam a média (n=10) da biomassa de plantas de milho (*Zea mays*) por 35 dias em casa de vegetação.

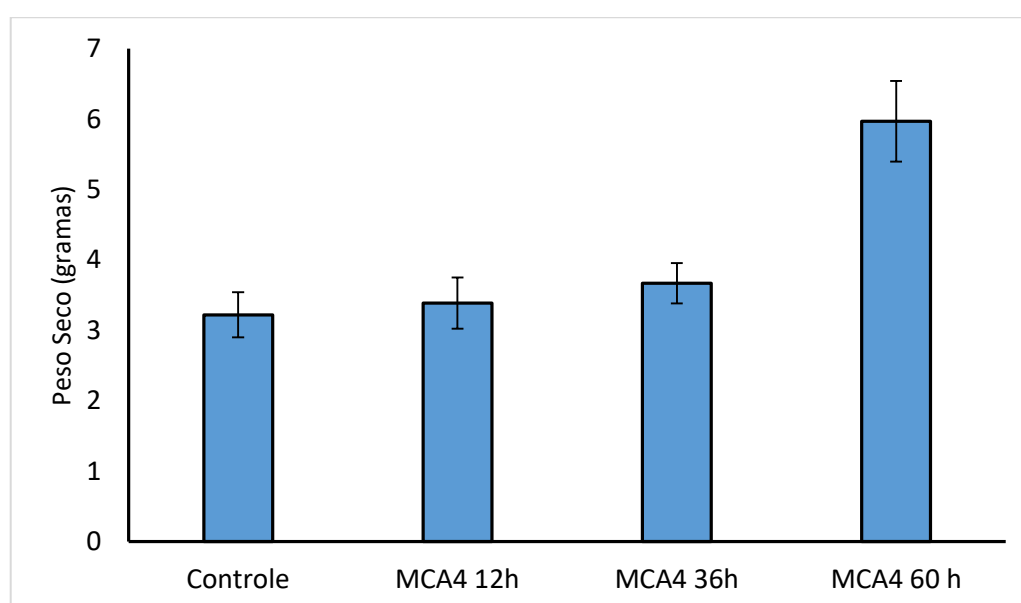


Gráfico contém erro padrão.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição nutricional do meio de cultivo utilizado para o crescimento de BPCV, como *A. brasilense* Ab-V5, apresentou grande influência na cinética de crescimento e no metabolismo bacteriano. O meio de cultivo MCA4, com maiores concentrações de nutrientes, foi capaz de promover maiores populações bacterianas e um menor decaimento destas populações após o alcance da fase estacionária de crescimento. Foram identificados os fitormônios ácido-3-indol-acético (AIA) e o ácido salicílico (AS) no sobrenadante de cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 em meio MCA4 após 24 h de cultivo, e sua ausência em cultivos conduzidos no meio OAB. A análise metabolômica preliminar possibilitou observar uma maior diversidade de compostos no sobrenadante de cultivos de *A. brasilense* em meio MCA4 em comparação à cultivos em meio OAB. A adição do sobrenadante de cultivo de *A. brasilense* em meio MCA4 permitiu verificar que existem compostos promotores do crescimento do milho em concentração suficiente para induzir aumentos na biomassa da planta após 60 h cultivo. Em conjunto, os resultados permitem confirmar a importância das condições de cultivo de BPCV para qualidade e quantidade de metabólitos produzidos pelo microrganismo, bem como a possibilidade de melhoria do desenvolvimento de plantas pela adição de metabólitos microbianos em uma resposta dose-dependente.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F. Pesticides in brazilian freshwaters: a critical review. **Environ Sci Process Impacts**, v.18, n.7, p. 779-787, jul 2016.

ÁLVAREZ-SÁCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. **Trends Anal. Chem.**, v.29, p.120-127, fev.2010.

ALVES, E. J.; OLIVEIRA, M. A. Práticas culturais. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília: Embrapa-SPI /Embrapa-CNPMPF, 1999. p. 335-352.

ALVES, E. J.; OLIVEIRA, M. A.; DANTAS, J. L. L.; OLIVEIRA, S. L. Exigências climáticas. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EmbrapaSPI/ Embrapa-CNPMPF, 1997. p. 335-351.

ANPII - **Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes**. Disponível em: Acesso em: 28 abr. 2020.

ARAÚJO, S.C. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/?artigos/6/a_evolucao_da_producao_de_inoculantes_no_brasil/30/> Acesso em: 30 abr. 2020.

ARAÚJO, I. M. M.; OLIVEIRA, A. G. R.C. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. **Trab. educ. saúde**, Rio de Janeiro, v.15, n.01, p.117-129, 2017.

BABALOLA, O.O.; OSIR, E.O.; SANNI, A.I.; ODHIAMBO, G.D.; BULIMO, W.D. Amplification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soil. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p.157-160, 2003.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de Azospirillum en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: **Asociación Argentina de Microbiología**, 2008. p.49-59.

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for Sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.

BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. HOST-PLANT SPECIFICITY IN THE INFECTION OF CEREALS WITH AZOSPIRILLUM SPP. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 433-439, 1980.

BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 2004.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, E. **Bacteria**. In: **Encyclopedia of Soils in the Environment**. Hilliel, D. (ed). Oxford. v.1, p. 103-115, 2005.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium Azospirillum promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77–136, 2010.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.;HERNANDEZ, J. B.; (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, (online), V.378, p.1-33. nov. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>. Acessado em 30 de abr de 2020.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 1886, 19 nov. 2013.

BASHAN, Y.; TREJO, A.; DE-BASHAN, L. E. Development of two culture media for mass cultivation of Azospirillum spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 8, p. 963-969, 7 abr. 2011.

BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.

BASHAN, Y., BASHAN, L. E., PRABHU, S. R. e HERNANDEZ, J. B. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998- 2013). **Plant and Soil**, 378, 1-33, 2014.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.

BELINATO, J. R.; BAZIOLIA J. M.; SUSSULINIA, A.; AUGUSTO A. F.; FIIL, T. P. METABOLÔMICA MICROBIANA: INOVAÇÕES E APLICAÇÕES. **Quim. Nova**, V. 42, N. 5, p.546-559, 2019.

BEM, REBAH, F. Agro- industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. **Bioresour. Technol.**, Washington, v. 98, p. 3535- 3546, 2007.

BONTEMPO A. F.; CARNEIRO, G. D.; Guimarães, F. A. Residual tembotrione and atrazine in carrot. **Jornal de Ciência e Saúde Ambiental**, v. 51, n.07, abr. 2016.

BONTEMPO A. F.; CARNEIRO, G. D.; Guimarães, F. A. Residual tembotrione and atrazine in carrot. **Jornal de Ciência e Saúde Ambiental**, v. 51, n.07, abr. 2016.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R.P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for Sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.

BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. Na ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 552-558, 2011.

BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review Of Plant Biology**, [S.l.], v. 64, n. 1, p.807-838, 29 abr. 2013.

CALLAGHAN, M.; GERARD, E. M.; JOHNSON, V. W. Effect of soil moisture and temperature on survival of microbial control agents. *Pasture Weeds & Pests*; N. Z. **Plant Protect.**, v. 54, p. 128-135, 2001.

CANUTOA, G. A. B.; COSTA J. L.; CRUZA P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIOA, A.T.; KLASSENC, A.; RODRIGUESA, K. T.; TAVARESA, M. F. M. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Quim. Nova**, Vol. 41, N. 1, p.75-91, 2018. Disponível em:<https://www.scielo.br/pdf/qn/v41n1/0100-4042-qn-41-01-0075.pdf>. Acessado em 20 de jul. 2020.

CANUTO, G.; COSTA, J. L.; CRUZ, P.; SOUZA, A.; FACCIO, A.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K.; TAVARES, M. Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. **Adv Exp Med Biol**, v.965, p. 03-17, 2017. Disponível em: DOI: 10.1007/978-3-319-47656-8_1. Acessado 20 de jul. de 2020

CREMONESE, C.; FREIRE, C.; MEYER, A. Exposição a agrotóxicos e eventos adversos na gravidez no Sul do Brasil, 1996-2000. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.28,n.7,p.1263-1272, jul. 2012.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v.01, p. 259-264, 1998.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. In: SCHEPER, T. (Ed). **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**. Berlin: Springer Verlag, 200, p. 01-39.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.

DOBEREINER, J. *Azotobacter paspali*, sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 1-6, 1966.

DOBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 5, p. 155-161, 1970. DOBEREINER, J. *Azotobacter* em solos ácidos. **Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola**, v. 11, p. 1-36, 1953.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.;

NYMAN, C. T. (Ed.). **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, V.2, p. 518-538, 1976.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPASPI, 1995. 60p.

DODD, I. C.; RUIZ-LOZANO, J. M. Microbial enhancement of crop resource use efficiency. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 236-242, 2012.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H.A.; AKBARI, A.A. Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes. **World Applied Sciences Journal**, v.6, n.11, p.1576- 1584, 2009.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A.G.; MEUCCI, R. D. Occupational exposure to pesticides, nicotine and minor psychiatric disorders among tobacco farmers in southern Brazil. **Neurotoxicology**. (online), v. 45, p. 347- 354, dez 2014, DOI: 10.1016/j.neuro.2014.05.002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24875484>. Acessado em: 02 de out de 2020.

FASSA, A. C. G.; FARIA, N. M. X.; MEUCCI R. D. Green tobacco sickness among tobacco farmers in southern Brazil. **Am J Ind Med**. V.57,n.6,p.726-735, jun,2014,DOI: 10.1002/ajim.22307. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526387>. Acessado em 30 de abr de 2020.

FAYEZ, K. A.; BAIZAD, S. A. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, Riyadh**, SA, v.13, n.1, p.45-55, jan. 2014.

Fiehn, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol Biol**, v.48, p.155–171, (2002). Disponível em <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>. Acessado em 02 de jul, 2020.

FREIRE, J.R. J. Trabalhos em Rizobiologia no Rio Grande do Sul. IN: Reunião Latino- Americana. Inoculantes Leguminosa, **Anais**,v. 04, p.19-241,968, Porto Alegre.

FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M. A.; CAPE, J. N.; REIS, S.; SHEPPARD, L. J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, J. N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A. F.; BUTTERBACHBAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society*^B, 368, 20130164, 2013. doi:10.1098/rstb.2013.0164.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v.61, p.819-828, nov./dez. 2014, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201461000007>.

GARCIA DE SALAMONE, I.E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by ^{15}N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, p.249-256, 1996.

GAUDIN, V.; VRAIN, D.; JOUANIN, L. Bacterial genes modifying hormonal balance in plant. **Plant Physiology and Biology**, v.32, p.11-29, 1994.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. **Trends Biotechnol.** v. 07, p. 257-265. Jul.2004.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends Biotechnol.** v.22,n.5,p.245-252, mai. 2004. Disponível em: DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.03.007. Acessado 20 de jul. de 2020.

GUTIERREZ-MANERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.206-211, 2001.

HAYAT, R.; Ali, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: **a review. Annal Microbiology**,v. 60, p HERMAN, N. A.; KIM, S. J.; Li, J. S.; CAI, W.; KOSHINO, H.; ZHANG, W. The industrial anaerobe *Clostridium acetobutylicum* uses polyketides to regulate cellular differentiation. **Nat. Commun.** V. 15, n. 08, nov. 2017..579–598, 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, (online), v. 331, p.413-425, jan. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acessado em 30 de abr de 2020.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina: Embrapa Soja, 2011.36p. (Documentos/Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CAMPO. R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n. 1-2, p.413-425, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: IZAGUIRRE- MAYORAL, M.L.; LABANDERA, C.; SANJUAN, J. (ED.). **Biofertilizantes en liberoamérica: visión, técnica, científica y empresarial.** Motevideo: cyted/biofag, p 22-31, 2007.

HORAK, I.; ENGELBRECHT, G.; JANSEN,P.J.; JANSEN V. R.; Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for

utilizing *Bacillus* species as biocontrol agents. **Journal of Applied Microbiology** 127, 326-343, 2019.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244-3250, 2003.

KAHL, V. F. S.; SILVA, J.; SILVA, F. R. Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: A biology system approach. **Elsevier** (online), v. 791-792, p. 19-26, set-out 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.08.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0027510716300227>. Acessado em 01 de ago de 2020.

KAHL VFS, SIMON D, SALVADOR M, Telomere measurement in individuals occupationally exposed to pesticide mixtures in tobacco fields. **Environ. Mol. Mutagen.** (online), v.57, n.01 Jan. 2016, DOI: 10.1002 / em. 21984. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26426910>. Acessado em 03 de abr de mar de 2020.

KUEHNBAUM, N. L.; GILLEN, J. B.; KORMENDI, A.; LAM, K. P.; DIBATTISTA, A.; GIBALA, M. J.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Multiplexed separations for biomarker discovery in metabolomics: Elucidating adaptive responses to exercise training. **Electrophoresis**, v. 36, n. 08, p. 2226-2236. Disponível em: DOI: 10.1002/elps.201400604.. 2015. Acessado 20 de jul. de 2020.

KHAN M. I. R., IQBAL N., MASOOD A., PER T. S., KHAN N. A. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. **Plant Signaling & Behavior**, Estados Unidos, v. 8, n. 11, p. 237-246, dez./set. 2013. Disponível em: DOI: 10.4161/psb.26374 . Acesso em: 20 JUN. 2017.

KHAN, M. I. R.; ASGHER, M.; KHAN, N. A. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). **Plant Signaling & Behavior**, Estados Unidos, v. 80, p. 67-74, jul./abr. 2014.

KHOOMRUNG, S.; WANICHTHANARAK, K.; NOOKAEW, I.; Thamsermsang, O.; SEUBNOOCH, P.; LAOHAPAND, T.; AKARASEREENONT, P. Metabolomics and Integrative Omics for the Development of Thai Traditional **Medicine.Front. Pharmacol**, v.8, p.474. Disponível em: DOI: 10.3389/fphar.2017.00474. Acessado em 20 jul. de 2020.

KIM, D. S.; WELLER, D. M.; COOK, R. J. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. **Phytopathology**, v.87, p. 559-564, 1997.

KONNOVA, S. A. BRYKOVA, O. S.; SACHKOVA, O. A.; EGORENKOVA, I. V.; IGNATOV, V. V. Protective Role of the Polysaccharide-containing Capsular Components of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 436-440, 2001.

KRAWCZYK, N.; MEYER, A.; FONSECA, M. Suicide mortality among agricultural workers in a region with intensive tobacco farming and use of pesticides in Brazil. **J. Occup. Environ. Med.** (online), v. 56, n. 09, p. 993- 1000, set 2014. DOI: 10.1097 / JOM.0000000000000214. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25046321>. Acesso em: 20 de set. 2020.

KUMAR, D. Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science**, Nova York, v. 228, n. 228, p. 127–124, nov. 2014.

KIM, J. and KIM, K.H. Effects of minimal media vs.complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* . *Process Biochem* 57,64–71, 2017.

LEBUHN, M.; HARTMANN, A.; Method for the determination of índole-3- acetic acid and related compounds of l-tryptohan catabolism in soils. **Journal of chromatography, Amsterdan**, v. 629, p. 255-266, 1993.

LIMA, G.P.P.; TEIXEIRA, S. J.A.; BERNHARD A. B. Organic and conventional fertilisation procedures on the nitrate, antioxidants and pesticide content in parts of vegetables. **Food Addit. Contam. Part B.** (online), v.25, n.3, p.188-193, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24779784>. Acessado em 30 de abr de 2020.

Machado C. S.; Alves R. I. S.; Fregonesi B. M.; et al. Chemical contamination of water and sediments in the Pardo River, São Paulo, Brazil. **Procedia Eng**, v.162, p. 230-237, 2016.

MELLADO, C. J.; CARCACO-MONTIEL, M.; MASCARUAESPARZA, M.A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, v.13, p.243-253, 1992.

MANDELLI, F.; COUGER, M. B.; PAIXÃO, D. A. A.; MACHADO, C. B.; CARNIELLI, C. M.; ARICETTI, J. A.; POLIKARPOV, I.; PRADE, R.; CALDANA, C.; PAES L. A. F.; MERCADANTE, A. Z.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; SQUINA, F. M. Thermal adaptation strategies of the extremophile bacterium *Thermus filiformis* based on multi-omics analysis. **Extremophiles**, v. 04, p. 775-788. Jul. 2017.

MARCELINO, P. R. F. **Desenvolvimento de Formulações para Utilização como Veículo Inoculante de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-Pr, 2006.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; NOGUEIRA, M. A. HUNGRIA, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, (online), v. 3, n.21, p. 2-10, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-3-21>. Acessado em 30 de abr de 2020.

MEDEIROS, M. N. C.; MEDEIROS, M. C.; SILVA, M. B. A. Intoxicação aguda por agrotóxicos anticolinesterásicos na cidade do Recife, **Epidemiol. Serv. Saúde**. Pernambuco, v.23, n.04, p. 509-518, 2014.

MILES, A. A.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of hygiene**. Cambridge, v. 38, p. 732-749, 1938.

MILANI, K. M. L. **Desenvolvimento de Formulação para Produção de Biomassa de Azospirillum brasilense com alta qualidade fisiológica**. Universidade Estadual de Londrina, p.123, Londrina, 2014.

NAIMAN, A. D.; LATRÓNICO, A.; GARCÍA DE SALAMONE, I. E. Inoculation of wheat with Azospirillum brasilense and Pseudomonas fluorescens: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 44–51, 2009.

NAZAR, R.; UMAR, S.; KHAN, N.; SAREER, O. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. **South African Journal of Botany**, v. 98, p. 84–94, mai. 2015.

NAZ, S.; Vallejo, M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Method validation strategies involved in non-targeted Metabolomics. **J Chromatogr A**, v. 01, n. 1353, p. 99-105, ago. 2014. Disponível em: DOI: 10.1016/j.chroma.2014.04.071. Acessado em 20 jul de 2020.

NEVES, P. D. M.; BELLINI, M. Intoxicações por agrotóxicos na mesorregião norte central paranaense, Brasil – 2002 a 2011. **Ciênc. Saúde Colet**, Rio de Janeiro v.18, n.11, p.3147- 3156, nov. 2013.

NICHOLSON, J.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, nov. 1999.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106-113, jan. 2008.

OLIVEIRA, L. M. A; SANTOS, J.A.P.O; MARCELINO, R.F.P; MILANI, M.L.K; ZULUGA, Y. A. M; ZUCARELI, C; GONÇALVES, S.A.L; Maize Inoculation with Azospirillum brasilense Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input. **ront. Microbiol.**, 26 September 2017.

OLIVEIRA, L.M.A; SANTOS, J.A.P.O; MILANI, M. L. K; ZULUGA, Y.A.M; FERREIRA, C. D; Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **BBR - BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY REPORTS** Jan./jul., v.3, n.1, p. 56-77, 2014.

OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D.C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; BARBOSA, M.S.; ZULUGA, M. Y. A. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura, **BBR - BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY REPORTS**, v.3, n.1, p. 56-77, Jan./jul., 2014. Disponível em: DOI 10.5433/2316-5200.2014v3n1p56. Acessado em 01 de maio de 2020.

OLIVEIRA, A. L. M.; SANTOS, O. J. A. P.; MARCELINO, P. R. F.; MILANI K. M. L.; ZULUAGA, M.Y. A.; ZUCARELI, C.; GONÇALVES, L. S. A. Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input. **Front. Microbiol.**, 26 Set 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>. Acessado em 19 de out. de 2020.

OLENSKA, E.; MALEK, W.; MALGORZATA, W.; SWIECICKA, I.; THIJS, S.; VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **ELSEVIER**, v. 743, n.15 Nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>. Acessado em 19 de outubro.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β - 3-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **FEMS Microbiology reviews**, v. 103, p. 131-139, 1992.

OMURA, S. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. **Journal of industrial microbiology**, v. 10, n. 03-04, p. 135-152, 1992.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid. Canadian. **Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 207-220, 1996.

PEISL, B. Y. L.; SCHYMANSKI, E. L.; WILMES, P. Dark matter in host-microbiome metabolomics: Tackling the unknowns-A review. **Anal Chim Acta**,v.11,n.1037,p.13-27, dez. 2018. Disponível em: DOI: 10.1016/j.aca. 2017.12.034. Acessado 20 jul. de 2020.

PINU, F.R., VILLAS-BOAS, S.G. and Aggio, R. Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: quenching and extraction protocols. **Metabolites** 7, 53, 2017.

REETZ, H. F. **Fertilizantes e seu uso Eficiente**. Paris: International Fertilizer Industry Association, 2016. 179 p. Tradução: Alfredo Scheid Lopes. Edição em português, ANDA, São Paulo, Brasil, Setembro 2017. Disponível em: . Acesso em: 30 out. 2018.

REIS, V. M. Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante para Aplicação em Gramíneas. **Embrapa Agrobiologia**, p. 22, 2007.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. D. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 20, 2010.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M.M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.30, n.7, p.1-3, jul. 2014.

RODRIGUES, E.P. **Isolamento e Caracterização de Mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na produção de auxinas**. Tese de Doutorado em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de ciências da Saúde, Rio de Janeiro, 2008

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. **citri** tipo **B.Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.12, p.16,1986.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. **Journal of bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 716-23, ago. 1985.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in Aging Cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145t. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 4, 1987.

STEPHENS, J. H.G.; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam. NL, v.65, p. 249-258, 2000.

SKVORTSOV, I. M.; IGNATOV, V. V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. **FEMS microbiology letters**, v. 165, n. 2, p. 223-9, 15 ago. 1998.

SIQUEIRA, D. F.; MOURA R. M.; CARNEIRO G.E. Análise da exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos. **Rev. Bras. Prom. Saúde**, Fortaleza, v.26, n.2, p.182-191, abr. 2013.

SILVA, M. F. DA. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar. 2009**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

SPOLAOR, L.T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A.; BERTAGMA, F. A. B.; KUKI, C. K. Bactérias promotoras de crescimento associadas à adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônomo de milho pipoca. **Bragantia**, Campinas v. 75, n. 1, p.33-40, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.330>. . Acessado em 30 de abr de 2020.

SMART, K. F.; AGGIO, R. B. M.; VAN HOUTTE, J. R.; VILLAS-BÔAS, S. G Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nat Protoc**, v. 5, n. 10, p. 1709-1729, set. 2010. Disponível em: DOI: 10.1038/nprot.2010.108. Epub 2010 Sep 30. Acessado em 20 jul. de 2020.

SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; Soga, T.; TOMITA, M. Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. **Curr Bioinform**, v. 07, n. 01, p. 96- 108, mar. 2012. Disponível em: DOI 10.2174/157489312799304431. Acessado 20 de jul. de 2020.

STEPHENS, J. H.G.; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam. NL, v.65, p. 249-258, 2000.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 487-506, out. 2000.

STRIGUL, N. S.; KRAVCHENKO, L. V. Mathematical modelling of PGPR inoculation into the rhizosphere. **Environ. Modell. Softw**, v.21, p. 1158-1171, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4.ed., Porto Alegre: ARTMED, p.820, 2009.

TAKAYUKI, I.; TATSUAKI, Y. K₂CO₃-catalyzed direct synthesis of salicylic acid from phenol and supercritical CO₂. **Elsevier**, v.345, n. 01, p. 12-17, Jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2008.03.037>. Acessado 20 de out. de 2020.

TAUTENHAHN, R.; CHO, K.; URITBOONTHAI, W.; ZHU, Z. J.; PATTI, G. J.; SIUZDAK, G. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 09, p. 826-84, 2012. Disponível em : DOI: 10.1038/nbt.2348. Acessado 20 de jul. de 2020.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with description of a new genus, Azospirillum gen. nov., and two species, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) com nov. and Azospirillum brasilense sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by Azospirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet (Pennisetum americanum L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

TYC, O., SONG, C., DICKSCHAT, J.S., VOS, M. GARBEVA, P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends Microbiol** 25, 280–292, 2017.

VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.K.S.; BALDANI, V.L.D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não leguminosas**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 234).

VILLAS-BÔAS, S.G.; MOXLEY, J.F.; ÅKESSON, M.; STEPHANOPOULOS, G.; STEPHANOPOULOS, J. NIELSEN, High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts, **Biochem. J.**, V. 388, p. 669–677, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; BRUHEIM, P. The potential of metabolomics tools in bioremediation studies. **OMICS**, v.11, n.3, p.305-313, fev.2007. Disponível em: DOI: 10.1089/omi.2007.0005. Acessado 20 de jul. de 2020.

WITTEK, F.; KANAWATI, B.; WENIG, M.; HOFFMANN, T.; FRANZ-OBERDORF, K.; SCHWAB, W.; VLOT, A. C. Folic acid induces salicylic acid-dependent immunity in Arabidopsis and enhances susceptibility to Alternaria brassicicola. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 6, p. 616-622, ago./dez. 2015.

ZHANG, Y.; XU, S.; YANG, S.; CHEN, Y. Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (Cucumis melo L.). **Protoplasma**, Alemanha, v. 252, n. 3, p. 911–924. mai./nov. 2015.

