

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

ALYSSON LIMA DA SILVA

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
HIPERACUMULADORAS DE NÍQUEL EM SOLOS ULTRAMÁFICOS**

**Recife
2023**

Alysson Lima da Silva
Engenheiro Agrônomo

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
HIPERACUMULADORAS DE NÍQUEL EM SOLOS ULTRAMÁFICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientador: Prof. Dr. Clístenes Araújo do Nascimento

Coorientador: Dr. José de Paula de Oliveira

RECIFE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586b Silva, Alysson Lima da
Bactérias promotoras de crescimento de plantas hiperacumuladoras de níquel em solos ultramáficos /
Alysson Lima da Silva. - 2023.
52 f. : il.
- Orientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto.
Coorientador: Clistenes Williams Araujo do Nascimento.
Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo, Recife, 2023.
1. BPCP. 2. Fitoextração. 3. Lippia lupulina. 4. Justicia lanstykii. I. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro,
orient. II. Nascimento, Clistenes Williams Araujo do, coorient. III. Título

ALYSSON LIMA DA SILVA

**Bactérias promotoras de crescimento de plantas hiperacumuladoras de níquel
em solos ultramáficos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 16 de março de 2023

Prof. Dr^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto
Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento
UFRPE

Prof. Dr. Jakson Leite
IFPA

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Marilucia Maria da Silva e
Hamilton Lima dos Santos,
e minha irmã Hilana Lima da Silva. DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que desde o princípio cuidaram de mim e me educaram, sempre me apoiaram e me ajudaram a superar os obstáculos que aparecem. O que sou e o que tenho hoje devo muito a eles.

Faço um agradecimento conjunto a Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo pela oportunidade que foi me dada de aprimorar meus conhecimentos e ao mesmo tempo de mostrar que meu potencial pode contribuir positivamente para o programa, para a pesquisa e para a educação brasileira.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência de Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela parceria com a universidade e pelo apoio financeiro que foi fundamental para o desenvolvimento do projeto e sua conclusão.

Agradeço a orientação da Prof^a. Dr^a Giselle Gomes Monteiro Fracetto que foi fundamental para solucionar problemas que apareceram, além de fazer os ajustes necessários para que o projeto fosse bem conduzido.

Agradeço a todos os professores do programa, que são muito dedicados e deram a mim e meus colegas um ensino de excelência.

Agradeço aos colegas de laboratório Cíntia Gouveia, Raquel Rodrigues, Petrônio Mendes, Luiz Lima, Miduoin Lidélias e Isabel Correia, que sempre se dispuseram a me ajudar nos momentos que mais precisei para que as atividades fossem bem conduzidas.

Agradeço a todos os outros colegas do programa e externos que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma maneira.

Bactérias promotoras de crescimento de plantas hiperacumuladoras de níquel em solos ultramáficos

RESUMO

Os solos ultramáficos são oriundos de rochas ultramáficas e correspondem a aproximadamente 3% da superfície terrestre. Devido a sua mineralogia, apresenta altos teores de metais pesados e baixa fertilidade, o que o torna improdutivo para a atividade agrícola. Uma alternativa a agricultura de baixa produtividade é a atividade de agromineração, que consiste na obtenção de metais de importância econômica, como o níquel, por meio da fitoextração realizada por plantas hiperacumuladoras. Elas são capazes de reter altos teores de metais em seus tecidos. Pesquisas relataram que estes microrganismos podem favorecer o desenvolvimento das hiperacumuladoras, disponibilizando nutrientes e substâncias que conferem tolerância à elevada concentração de metais no solo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi elaborar uma coleção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) de solos ultramáficos e de plantas hiperacumuladoras de metais. Para isso, foram isoladas bactérias de amostras de solo rizosférico, das plantas hiperacumuladoras *Lippia lupulina* e *Justicia lanstyakii*, e de solo adjacente, oriundos de Niquelândia - GO. As rizobactérias foram isoladas em meio TSA 10 % e submetidas a teste de tolerância. Assim, obteve-se uma coleção composta por 66 bactérias tolerantes a 7,5 mM de NiSO₄ 6H₂O, que tiveram os mecanismos de promoção de crescimento caracterizados. Dos 66 isolados, 18 % produziram Ácido Indol Acético (AIA), 26 % solubilizaram fosfato de cálcio, 47% fizeram Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e 17 % produziram sideróforos. As BPCP que apresentaram pelo menos um mecanismo de promoção de crescimento foram identificadas pelo sequenciamento do gene 16SrRNA. Um total de 45 foram identificadas geneticamente, das quais 31 % pertencem ao gênero *Bacillus* sp., 22 % *Alcaligenes* sp., 15,55 % *Providencia* sp., 4 % *Enterobacter* sp. e 2 % *Priestia* sp. Com isso, pode-se inferir que a coleção elaborada tem potencial para utilização em pesquisas futuras para aprimorar a agromineração e a fitorremediação de solos contaminados por metais pesados.

Palavras-chave: BPCP. Fitoextração. *Lippia lupulina*. *Justicia lanstyakii*.

Growth promoting bacteria of nickel hyperaccumulator plants in ultramaphic soils

ABSTRACT

Ultramafic soils originate from ultramafic rocks and correspond to approximately 3% of the earth's surface. Due to its mineralogy, it has high levels of heavy metals and low fertility, which makes it unproductive for agricultural activity. An alternative to low productivity agriculture is agromining, which consists of obtaining economically important metals, such as nickel, through phytoextraction carried out by hyperaccumulating plants. They are able to retain high levels of metals in their tissues. Research has reported that these microorganisms may favor the development of hyperaccumulators, providing nutrients and substances that confer tolerance to the high concentration of metals in the soil. Therefore, the objective of this work was to elaborate a collection of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) from ultramafic soils and from metal hyperaccumulating plants. For this, bacteria were isolated from rhizospheric soil, from hyperaccumulating plants *Lippia lupulina* and *Justicia lanstyakii*, and from adjacent soil, originating from Niquelândia - GO. The rhizobacteria were isolated in TSA 10% medium and remained in the tolerance test. Thus, a collection consisting of 66 preparations tolerant to 7.5 mM NiSO₄ 6H₂O was obtained, which had the growth-promoting turn characterized. Of the 66 isolates, 18% produced Indole Acetic Acid (IAA), 26% solubilized calcium phosphate, 47% performed Biological Nitrogen Fixation (BNF) and 17% produced siderophores. The PGPB that presented at least one growth promotion mechanism were identified by sequencing the 16SrRNA gene. A total of 45 were genetically identified, of which 31% belong to the genus *Bacillus* sp., 22% *Alcaligenes* sp., 15.55% *Providencia* sp., 4% *Enterobacter* sp. and 2% *Priestia* sp. With this, it can be inferred that the elaborated collection has potential for use in future research to improve agromining and phytoremediation of soils contaminated by heavy metals.

Keywords: PGPB. phytoextraction. *Lippia lupulina*. *Justicia lanstyakii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Densidade populacional de bactérias em solos rizosféricos e adjacente.....	23
Figura 2 - Caracterização morfofisiológica dos isolados expressa em percentuais..	24
Figura 3 - Índices de solubilização de fosfato de cálcio do isolados avaliados.....	25
Figura 4 - Percentual de sideróforos produzido pelos isolados avaliados.....	26
Figura 5 - Produção de AIA pelos isolados avaliados expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$	27
Figura 6 - Percentual de isolados capazes de fixar N.....	28
Figura 7 - Árvore filogenética resultante do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização do solo de Niquelândia – GO.....	17
Tabela 2 - Mecanismos produzidos por isolados tolerantes a 7,5mM de NiSO ₄ 6H ₂ O.....	29
Tabela 3 - Identificação genética dos isolados com base no percentual de similaridade de sequências de nucleotídeos.....	31

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Hipóteses	11
1.2. Objetivo geral	11
1.2.1. Objetivos específicos	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Solos ultramáficos	12
2.2. Níquel	13
2.3. Agromineração	13
2.4. Plantas hiperacumuladoras de níquel	14
2.5. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP)	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Amostragem, caracterização do solo e identificação das plantas	17
3.2. Obtenção e caracterização dos isolados bacterianos	17
3.3. Teste de tolerância a doses de NiSO ₄ (Sulfato de Níquel)	18
3.4. Teste de Gram	18
3.5. Caracterização dos mecanismos de promoção de crescimento	16
3.5.1. Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio	16
3.5.2. Produção de Ácido Indol acético (AIA)	17
3.5.3. Produção de sideróforos	17
3.5.4. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio	18
3.6. Extração de DNA, amplificação para o gene 16SrRNA e sequenciamento	18
3.6.1. Extração de DNA	18
3.6.2. Amplificação para o gene 16S rRNA	19
3.6.3. Sequenciamento e identificação dos isolados	19
3.7. Análises estatísticas	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Caracterização do solo de Niquelândia	20
4.2. Densidade microbiana das amostras de solo de Niquelândia	20
4.3. Caracterização fenotípica dos isolados	21
4.4. Teste de tolerância a doses de NiSO ₄ .6H ₂ O	22
4.5. Teste de Gram	22
4.6. Solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio	22

4.7. Produção de sideróforos	23
4.8. Produção de AIA	24
4.9. Fixação biológica de N	25
4.10. Identificação dos isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA	28
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	35
APÊNDICE A - Meio de cultura Tryptona Soya Agar (TSA)	42
APÊNDICE B - Meio de cultura Tryptona Soya Broth (TSB)	42
APÊNDICE C - Meio de cultura líquido King B (KB)	42
APÊNDICE D – Meio de cultura sólido para determinação da solubilização de fosfato de cálcio bibásico (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001)	43
APÊNDICE E – Meio de cultura sólido para determinação da solubilização de fosfato de alumínio (HARA; OLIVEIRA, 2004)	43
APÊNDICE F – Meio de cultura semi-sólido JNFB	43
APÊNDICE G – Solução Cromo Azurol S (CAS)	44
APÊNDICE H – Reagente de Salkovisk	44
APÊNDICE I – Solução Fenólica	44
APÊNDICE J - Dendrograma de similaridade de isolados do Solo Adjacente de Niquelândia.	45
APÊNDICE K - Dendrograma de similaridade dos isolados do solo rizosférico de <i>J. lanstykii</i> .	46
APÊNDICE L - Dendrograma de similaridade dos isolados do solo rizosférico de <i>L. lupulina</i> .	47

1. INTRODUÇÃO

O solo é um sistema composto por elementos orgânicos e inorgânicos, que são fonte de recursos para a sobrevivência de grande parte de organismos que habitam o globo terrestre, dentre eles o ser humano que desenvolve técnicas na superfície do solo para a produção de alimentos. No entanto, existe um tipo de solo que não é adequado para a produção agrícola por conta de sua composição química, denominado solo ultramáfico. É um solo que, devido a sua mineralogia, apresenta altos teores de metais pesados em sua composição como cromo (Cr), cobalto (Co), chumbo (Pb), manganês (Mn) e níquel (Ni), e baixos teores de nutrientes essenciais para as plantas como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K).

Por este motivo, é comum que ocorram atividades de mineração em áreas que apresentem esse solo. Porém, embora seja importante para fortalecer a economia da sociedade através da extração de matérias-primas, a mineração pode gerar impactos ambientais, como a contaminação de solos e lençóis freáticos. Uma alternativa aos métodos tradicionais para extrair metais de interesse econômico de maneira mais sustentável, é por meio da agromineração, que é baseada na fitoextração de metais com a utilização de plantas hiperacumuladoras. Entretanto, as plantas que possuem essa rara característica apresentam um baixo desenvolvimento de sua biomassa.

Esse crescimento vegetal pode ser aprimorado com o emprego de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Para isso, é importante que esses microrganismos sejam isolados, identificados e tenham seus mecanismos de promoção de crescimento caracterizados, constituindo uma coleção. Após a elaboração da coleção, as BPCP poderão ser selecionadas e empregadas em diferentes plantas hiperacumuladoras de metais para promover aumento da produção de biomassa vegetal e, conseqüentemente, maior acúmulo de metais. Com isso, há a possibilidade da prática de agromineração em solos ultramáficos de maneira mais eficiente e sustentável, assim como a fitorremediação de áreas contaminadas por metais.

1.1. Hipóteses

A rizosfera de plantas hiperacumuladoras do solo ultramáfico de Niquelândia contém bactérias promotoras de crescimento de plantas, tolerantes a altas

concentrações de níquel, que poderão ser utilizadas em pesquisas futuras visando a potencialização da fitorremediação de solos contaminados e a agromineração de Ni.

O solo ultramáfico de Niquelândia possui BPCP multifuncionais, capazes de produzir dois ou mais mecanismos.

1.2. Objetivo geral

Selecionar bactérias promotoras de crescimento de plantas hiperacumuladoras de níquel de solos ultramáficos.

1.2.1. Objetivos específicos

- Criar uma coleção de BPCP da rizosfera de plantas hiperacumuladoras de níquel.
- Caracterizar os mecanismos de promoção de crescimento das BPCP obtidas.
- Identificar geneticamente as BPCP obtidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Solos ultramáficos

Os solos ultramáficos correspondem a aproximadamente 3% da superfície terrestre. São oriundos dos processos de intemperismo de rochas ultramáficas, originadas por atividades vulcânicas. Essas rochas estão mais presentes em territórios específicos do globo terrestre como Cuba, Filipinas, Nova Caledônia, Omã e sul da Europa (KIERCZAK et al., 2020). No restante do mundo, estão distribuídas em menores proporções. A mineralogia desses materiais é constituída principalmente por crisotilo, lizardita, antigorita, olivina, piroxênios, cromita e magnetita e o restante de minerais félsicos (KIERCZAK et al., 2020; SIEBECKER; CHANEY; SPARKS, 2017; NASCIMENTO et al., 2020). Por isso, solos ultramáficos geralmente apresentam teores elevados de níquel (Ni), cromo (Cr) e cobalto (Co), cujas concentrações podem atingir valores superiores a 70.000; 17.000 e 7.000,0 mg kg⁻¹, respectivamente (VITHANAGE et al., 2019). Além da fitotoxicidade causada pelos metais, os solos ultramáficos possuem relação Ca:Mg muito baixa e baixos teores de matéria orgânica e macronutrientes (NPK), ou seja, são considerados de baixa fertilidade e improdutivos para a maioria das culturas de importância agrícola (SENEVIRATNE et al., 2015).

No Brasil, este tipo de solo encontra-se presente nos municípios de Niquelândia – GO e em Limoeiro - PE (NASCIMENTO et al., 2022). Niquelândia é o maior município do estado de Goiás, que possui uma população estimada de 47.064 pessoas e uma área territorial de aproximadamente 10.000 Km². Devido a sua pedogênese, possui uma das maiores reservas de níquel do mundo e a mineração desse metal se destaca como a principal atividade econômica do município, que chegou a atingir em 2014 uma produção de 47.657 toneladas (IMB, 2016). Além disso, possui uma flora muito diversificada que também se estabelece no solo ultramáfico da região contando com mais de 44 espécies de plantas hiperacumuladoras de níquel, dentre elas *Pfaffia sarcophylla* e *Lippia geminata*, que apresentaram teores de níquel de 2.956 mg Kg⁻¹ e 6.716mg Kg⁻¹ de massa seca vegetal (KIDD et al., 2007).

2.2. Níquel

Elemento químico presente em solos ultramáficos e em sedimentos marinhos, o níquel é um metal que tem uma importância econômica relevante por ser umas das matérias-primas de componentes eletrônicos e estruturais utilizados em diversos setores econômicos da sociedade. Por este motivo, é minerado em mais de 25 países do mundo, inclusive no Brasil. Além disso, é considerado um elemento benéfico para algumas espécies de plantas e microrganismos, por estar associado à atividade enzimática desses organismos (Nickel Institute, 2021).

Nos solos, é constituinte dos minerais olivina, piroxenos, argilominerais, minerais serpentinos e oxi-hidróxidos de Ferro (Fe) e Manganês (Mn) (KIERCZAK et al., 2020). É um micronutriente que atua na hidrólise da ureia e favorece uma absorção mais eficiente de N. Quando disponível na solução do solo, geralmente é absorvido pelas plantas na forma de Ni^{2+} , $NiOH^+$ ou $Ni^{2+}(H_2O)_5SO_4^2$ (HE et al., 2012).

Todavia, o Ni pode ser tóxico para a biosfera terrestre. A exposição a altas concentrações por um período prolongado pode causar problemas respiratórios e cutâneos em seres humanos. Na maioria das plantas, altas concentrações de Ni afetam diretamente o crescimento alterando a plasticidade da parede celular vegetal e provocando inibição da divisão celular. Também foi constatado que ele pode reduzir a absorção de Mg, Fe e Zn pelas plantas, por possuir um raio iônico de 78pm que o torna mais competitivo nos sítios de ligação química. Além disso, o Ni pode prejudicar a fotossíntese ao provocar alteração na estrutura de moléculas transportadoras de elétrons, como a plastoquinona QB, e modificar o balanço hídrico vegetal, ao provocar redução da área foliar e desidratação dos tecidos (BHALERAO; SHARMA; POOJARI, 2015).

2.3. Agromineração

A agromineração consiste na aplicação de técnicas agronômicas para extrair metais de importância econômica relevante, como Ni, Se, Tl e Mn. Nesta atividade, são cultivadas plantas hiperacumuladoras que extraem os metais do solo. No caso das hiperacumuladoras de Ni, após serem colhidas e incineradas suas cinzas obtidas passam por processos de refinamento, que incluem a lixiviação deste material. Após o refino, o Ni pode compor ligas metálicas com Fe ou produzir sal de Ni, como o $(Ni(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O)$ (NASCIMENTO et al. 2022).

Este método ainda é realizado em pequena escala, mas com o aprimoramento poderá ser aplicado em mais áreas que apresentem baixo potencial para a produção de alimentos, como as que são constituídas por solos ultramáficos ou aquelas constituídas por solos degradados devido ao descarte de rejeitos de mineração. Além disso, a depender da espécie hiperacumuladora cultivada, é possível obter um maior percentual de Ni das cinzas destas do que de minérios (JAFFRÉ et al., 2018; van der ENT et al., 2017; NASCIMENTO et al. 2022).

No entanto, apesar de ser uma alternativa mais sustentável para a obtenção de Ni, a agromineração deste metal tem um prazo de viabilidade que pode ser limitado a 30 ou a 60 anos. Isso porque, a depender da hiperacumuladora cultivada e da intensidade da atividade, as reservas de Ni disponíveis no solo tendem a se esgotar antes que sejam repostas por processos de intemperismo dos minerais que compõem os solos ultramáficos (van der ENT et al. 2015).

2.4. Plantas hiperacumuladoras de níquel

A hiperacumulação é um fenômeno raro na natureza, no qual determinadas plantas conseguem acumular metais ou metalóides em seus tecidos. As quantidades desse acúmulo são centenas ou milhares de vezes superiores em relação ao que pode ser armazenado pela maioria das outras espécies vegetais. A concentração mínima que define esse fenômeno varia com o metal considerado (REEVES et al., 2017). Por exemplo, para ser considerada hiperacumuladora de Mn é necessária uma concentração de 10.000 mg Kg⁻¹ de massa seca. Entretanto, para ser considerada hiperacumuladora de Cd, é 100 mg Kg⁻¹. Já as espécies hiperacumuladoras de Ni são aquelas capazes de acumular quantidades acima de 1000 mg Kg⁻¹ de massa seca e estão distribuídas, principalmente, nas famílias Violaceae, Brassicaceae, Euphobiaceae e Flacoutiaceae (KIDD et al., 2007).

Em Niquelândia, no cerrado brasileiro, é possível encontrar alguns exemplares de hiperacumuladores de níquel como é o caso de *Lippia lupulina* (Verbenaceae) e *Justicia lanstyiakii* (Achantaceae). São plantas nativas que estão presentes em áreas de solos ultramáficos, já adaptadas às condições edafoclimáticas locais e possuem potencial para emprego na fitorremediação de solos contaminados e agromineração de níquel. No entanto, ainda são pouco estudadas para essas finalidades (NASCIMENTO et al., 2021).

L. lupulina é uma planta de porte arbustivo, contida na família Verbenaceae, pode ser multiplicada por estacas, porém tem dificuldade de enraizamento e necessita de compostos promotores de crescimento, como auxinas, para que tenha um bom desenvolvimento (PIMENTA et al., 2007). *J. lanstykii* é uma das mais de 600 espécies do gênero *Justicia*, que apresenta um porte que pode variar de herbáceo a arbustivo, e tem boa adaptação a diferentes tipos de solo. Além disso, é de fácil propagação por suas sementes apresentarem uma boa taxa de germinação e bom desenvolvimento de mudas oriundas de estaquia (LIMA, 2012).

2.5. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP)

As BPCP são microrganismos que se estabelecem na rizosfera das plantas, interagem com estas impactando positivamente no desenvolvimento por meio da produção de mecanismos diretos e indiretos. Alguns dos principais mecanismos diretos são: síntese de AIA (ácido indolacético), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de sideróforos e solubilização de fosfatos (ULLAH et al., 2015; TIRRY et al., 2018).

O fitohormônio AIA é uma auxina responsável pelo alongamento e crescimento celular, que pode ser produzido por *Alcaligenes* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., dentre outros, ao colonizarem a rizosfera e absorverem nutrientes presentes nos exsudatos radiculares (PATTEN; GLICK, 1996). Além disso, outro importante mecanismo para o desenvolvimento de plantas é a FBN, na qual bactérias sintetizam enzimas do complexo nitrogenase que atuarão na redução de N_2 em NH_3 . A amônia produzida pode ser oxidada e gerar íons NH_4^+ , que quando disponíveis na solução do solo são assimilados pelas plantas (SUN, W.; SHAHRAJABIAN, M.H. e CHENG, K., 2021).

Indiretamente, elas podem promover a resistência das plantas ao estresse exercido por sais, metais pesados e poluentes por meio da produção de 1-aminociclopropano,1-carboxilato (ACC) deaminase, com consequente diminuição da síntese de etileno nos tecidos vegetais. Outra contribuição indireta é a produção de sideróforos, que são biomoléculas capazes de sequestrar o Fe disponível e impedem que este seja capturado por possíveis fitopatógenos. Além disso, as BPCP podem sintetizar compostos antibióticos e até mesmo apresentar alta competitividade por

nutrientes, o que também contribui para inibir o desenvolvimento de fitopatógenos. Assim, todos estes efeitos favorecem o aumento da biomassa e melhora no desenvolvimento radicular das plantas, inclusive das hiperacumuladoras de metais pesados presentes em solos ultramáficos (ARAÚJO et al., 2020; CABELLO-CONEJO et al., 2014; GLICK, 2010; MA et al. 2011; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

O aumento da biomassa vegetal provocado por BPCP foi observado por Duran et al. (2015), ao inocular isolados bacterianos em hiperacumuladoras de Ni e verificar aumento de 66,4% na produção de raízes e elevação de 79,6% na parte aérea. O sucesso no desenvolvimento das plantas foi atribuído à produção da enzima ACC deaminase e de AIA. Dessa forma, a eficiência da fitoextração do metal foi aprimorada.

Já na pesquisa desenvolvida por Ma et al. (2011), exemplares de uma coleção bacteriana tiveram seus mecanismos de promoção de crescimento caracterizados, selecionados e utilizados em testes de inoculação em *Alyssum serpyllifolium* e *Brassica juncea*, presentes em solos contaminados por metais pesados e em solos ultramáficos. Após a inoculação, constatou-se que a colonização de *Pseudomonas* sp. nas raízes estava associada ao aumento no desenvolvimento e produção de biomassa das plantas. Assim, por se tratar de uma situação de solo contaminado pode-se inferir que o emprego de hiperacumuladoras de Ni inoculadas com estas bactérias têm grande potencial para aumentar a eficiência do processo de fitorremediação de solos contaminados por metais, inclusive níquel.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem, caracterização do solo e identificação das plantas

O solo rizosférico foi coletado na profundidade de 0,0 – 0,2 m no município de Niquelândia, Goiás (14° 27' 28" S e 48° 27' 59" O), por ser a região que contém a maior extensão de solos ultramáficos do Brasil. O clima da região é do tipo Aw (tropical com inverno seco); com precipitação e temperatura média anual de 1500,0 mm e 20,0 °C, respectivamente. A vegetação predominante compreende plantas herbáceas e arbustos, típicas da região do Cerrado brasileiro (GARNIER et al., 2009).

Foram coletadas 3 amostras de solo rizosférico de *Lippia lupulina*, 3 de *Justicia lanstykii* e 3 amostras de solo adjacente em uma área de baixa interferência antrópica, constituída por solo ultramáfico. Ambas as plantas são hiperacumuladoras de Ni e foram identificadas no campo por meio de fluorescência de raio X portátil (NASCIMENTO et al., 2021). O solo rizosférico foi removido com os devidos cuidados da zona radicular e devidamente armazenado. Além disso, também foram coletadas 3 amostras aleatórias de solo ultramáfico de referência, descobertos de vegetação, para serem submetidas às análises de caracterização química e física das amostras de solo, que foram realizadas de acordo com Teixeira et al. (2017).

Após as caracterizações constatou-se que o solo apresenta baixos teores de nutrientes essenciais para as plantas, como está descrito na Tabela 1. Além disso, apresentou um teor de Ni total de 9.597,5mg kg⁻¹ e 220mg kg⁻¹ de Ni disponível.

Tabela 1 - Caracterização física e química do solo ultramáfico de Niquelândia.

pH(H ₂ O)	H + Al	Ca	Mg	Al	Na	K	P	COS*	Areia	Silte	Argila
1 : 2,5	-----cmol _c dm ⁻³ -----			-----			mg dm ⁻³	-----g kg ⁻¹ -----			
6,5	2,3	0,6	3,0	0,0	0,4	0,1	0,0	12,0	298,0	487,0	215,0

*COS = Carbono orgânico solúvel.

3.2. Obtenção e caracterização dos isolados bacterianos

Foi feito o isolamento bacteriano, das amostras de solo coletadas (exceto as de solo de referência), por meio de diluição seriada decimal. O processo de diluição foi iniciado ao diluir 10 g de solo em 90 mL de solução de NaCl (0,85%) estéril (diluição 10⁻¹). A partir desta diluição, foram feitas as diluições 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴, com 3 repetições

para cada diluição. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi inoculada, em triplicata, em meio de cultura TSA 10% (Apêndice A), em placas de petri. Após as inoculações, as amostras foram postas numa BOD a 30 °C por 12 dias (ABOUDRAR et al., 2007; CHAUDHARY et al., 2019).

Após este período, quantificou-se a densidade bacteriana e realizou-se os isolamentos. Cada isolado foi caracterizado morfofisiologicamente e semeado até a obtenção de colônias puras. Os isolados foram identificados da seguinte forma: ALX.X; LX.X e JX.X, onde AL = isolados de solo adjacente, L = isolados de solo rizosférico de *L. lupulina* e J = isolados de solo rizosférico de *J. lanstiaakii*. X.X = números utilizados para diferenciar isolados de um mesmo grupo. Avaliou-se as seguintes características morfológicas: formato de colônia, diâmetro (mm), coloração, elevação, produção de muco e transparência, além do tempo de crescimento (CHAWNGTHU et al., 2019).

3.3. Teste de tolerância a doses de NiSO₄ (Sulfato de Níquel)

Os isolados obtidos foram semeados em meio de cultura TSA 10 % suplementado com 4 concentrações diferentes de Ni, a partir de uma solução estoque esterilizada. O níquel foi adicionado na forma de NiSO₄.6H₂O, nas concentrações de 0,5; 5; 7,5 e 10 mM. Em seguida, os isolados foram incubados a 30°C por um período de 12 dias (ABOUDRAR et al., 2007). Os isolados que se desenvolveram na concentração 7,5 mM foram selecionados, preservados em meio King B (Apêndice C), para posteriormente serem submetidos as caracterizações de mecanismos de promoção de crescimento e teste de Gram.

3.4. Teste de Gram

Adotou-se o método proposto por Buck et al. (1982), no qual uma pequena fração de colônia (de isolado puro) foi retirada e esfregada em 30 µL de solução de KOH (3%). Após a formação de uma pasta, verificou-se a produção de fio ao levantar a alça. Esse procedimento foi realizado em todos os isolados selecionados no teste de tolerância descrito no item 3.3. Os isolados que formaram fio foram classificados como Gram(-), enquanto os que não formaram foram classificados como Gram(+).

3.5. Caracterização dos mecanismos de promoção de crescimento

Os seguintes mecanismos de promoção de crescimento foram caracterizados: produção de Ácido Indol Acético (AIA), solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio, Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) *in vitro* e produção de sideróforos.

3.5.1. Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio

A solubilização do fosfato de cálcio bibásico foi avaliada de acordo com Verma et al. (2001). Os isolados foram inoculados em meio de cultura sólido, suplementado com fosfato de cálcio e incubados a 28 °C por 72 h. Durante 15 dias avaliou-se a formação do halo translúcido ao redor da colônia, que indica a solubilização do fosfato. Quando presente, o halo foi medido durante o período citado e calculou-se o índice de solubilização (IS) de acordo com a seguinte equação: $IS = \text{Diâmetro halo} / \text{Diâmetro colônia}$. O cálculo do índice, permitiu classificar os isolados em três níveis: baixa solubilização ($IS < 2$), média solubilização ($2 < IS < 4$) e alta solubilização ($IS > 4$). A mesma metodologia foi aplicada para verificar a solubilização de fosfato de alumínio, diferindo na utilização do meio GL (APÊNDICE J) (HARA; OLIVEIRA, 2004).

3.5.2. Produção de Ácido Indol acético (AIA)

Os isolados foram cultivados em meio TSB (Apêndice B) líquido, suplementado com L triptofano (5 mM) por 5 dias. Após este período, os isolados foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 min. Transferiu-se 1mL do sobrenadante, de cada amostra, em triplicata, para outro recipiente e adicionou-se 1 mL do reagente de Salkowski (Apêndice H) (KUSS et al., 2007).

Após 30 min de reação, na ausência de luz, observou-se a mudança, ou não, de coloração da mistura. A produção de coloração rosada ou avermelhada indica a produção de AIA. As amostras que produziram a auxina foram submetidas a espectrofotometria, adotando um comprimento de onda de 530 nM. Os valores obtidos foram convertidos em concentrações equivalentes de AIA ($\mu\text{g} / \text{mL}$) usando a seguinte curva de calibração previamente elaborada, contendo os pontos 0, 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, representada pela equação: $Y = 0,0037x + 0,163$, com $R^2 = 0,9950$; onde $Y =$ leitura da amostra em nM e $x =$ concentração de AIA (MOHITE, 2013; LANA et al., 2017).

3.5.3. Produção de sideróforos

Os procedimentos foram realizados com base em Schwyn e Neilands (1987). Inicialmente, cultivou-se os isolados em meio KB (Apêndice C) líquido por 7 dias, sob agitação de 150 rpm. Após este período, os isolados foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 min. Em seguida, coletou-se 1 mL do sobrenadante para reagir com 1 mL da solução de Cromo Azurol S (Apêndice G).

A produção de sideróforos foi determinada ao verificar a mudança de coloração da mistura para laranja. As amostras que produziram o composto foram submetidas a espectrofotometria, adotando um comprimento de onda de 630 nm. Os valores obtidos foram convertidos em percentuais de sideróforos aplicando a equação: $[(A_B - A_A) / A_B] \times 100$; onde A_B é a absorbância em branco e A_A absorbância da amostra que produziu sideróforo (ALEXANDER; ZUBERER, 1990; MARESHWARI, R.; BHUTANI, N.; SUNEJA, P., 2019).

3.5.4. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi determinada com base no método de BODDEY, R.M.; BODDEY, L.H.; URQUIAGA (1990). Os isolados foram cultivados em meio líquido TSB por 5 dias a 28 °C, sob 150 rpm. Posteriormente, foram centrifugados a 12.000 rpm e lavados três vezes em solução de NaCl (0,85%). Após isso, o precipitado foi suspenso em 1 mL de H₂O estéril. Desse total, 100 µL da suspensão foram inoculados em 5 mL de meio JNFB (DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I., 1995) semi sólido e incubados em tubos de penicilina por 48 h a 30 °C, em triplicata. Também foram feitos controles negativos de forma semelhante, sem inoculação de isolados.

A fixação biológica foi detectada quando houve a formação de uma película esbranquiçada logo acima da colônia bacteriana ('véu de noiva'). Além disso, foi verificada mudança de pH para ácido ou alcalino em algumas amostras. Esta mudança foi verificada baseando-se na mudança de coloração das amostras, na qual a cor amarelada indica acidez, azul alcalinidade e verde neutralidade.

3.6. Extração de DNA, amplificação para o gene 16SrRNA e sequenciamento

3.6.1. Extração de DNA

Os isolados que apresentaram pelo menos um mecanismo de promoção de crescimento foram selecionados para a caracterização genética. Sendo assim, dos 66

isolados, 45 foram sequenciados. O DNA foi extraído pelo método 'bead beating', que consistiu na diluição de uma pequena fração de colônia bacteriana em 500 µl de solução tampão TE, em um tubo eppendorf (1,5 mL). Em seguida, adicionou-se 10 µl de dodecil sulfato de sódio a 10 % e duas esferas de vidro. Posteriormente, a mistura foi agitada em vórtex por 15 min, culminando no rompimento da parede celular bacteriana. Após esse processo, adicionou-se a mistura agitada 500 µL de solução fenólica (Apêndice I) e fez-se uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 5 min. Logo após, foi adicionado ao sobrenadante 40 µL de acetato de sódio (5M; pH 5,0) e 400 µl de isopropanol e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e centrifugado a 12.000 rpm por 2 min. O DNA foi suspenso em 50 µL de água esterilizada e armazenado a -20°C. A qualidade do DNA foi verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose (0,5%) a 100V por 30 minutos. Após este processo, o gel foi visualizado em um transiluminador UV - BOX (ARAÚJO et al., 2020; SANDHYA et al., 2010).

3.6.2. Amplificação para o gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR utilizando os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGGACCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (LANE, 1991). Para isso, utilizou-se 2 µl de DNA; 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 5 µl de solução tampão 10x PCR Buffer, 1 µl de dNTP's (10mM), 10 µl de cada um dos primers (10 µM), 0,6 µl da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/ µl) e água ultrapura para completar o volume. A reação ocorreu da seguinte maneira: desnaturação a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s) e extensão da Taq polimerase (72 °C por 1,5 min) e uma extensão final de 72 °C, por 7 min. O resultado da amplificação foi verificado através de eletroforese em gel de agarose (0,5%) a 100V por 30 minutos. Após este processo, o gel foi visualizado em um transiluminador UV - BOX (CHAWNGTHU et al., 2019; SANDHYA et al., 2010).

3.6.3. Sequenciamento e identificação dos isolados

Semelhante ao que foi desenvolvido por Araújo et al. (2020), os produtos amplificados foram enviados, para serem sequenciados, à empresa sul coreana Macrogen. Submeteu-se as sequências de nucleotídeos obtidas às análises comparativas no banco de dados de nucleotídeos do National Center for

Biotechnology Information (NCBI). Em seguida, foram alinhadas através da ferramenta BLAST e agrupadas de acordo com a similaridade filogenética pelo método Neighbor-Joining, usando os parâmetros Kimura-2 do programa MEGA-11, aplicando um *bootstrap* com um mínimo de 1.000 repetições.

3.7. Análises estatísticas

As médias obtidas de cada mecanismo foram comparadas ao serem submetidas a Análise de Variância, aplicando o Teste de Tukey e adotando um nível de significância de 5%. Para isso, utilizou-se o software SAS (versão SAS OnDemand).

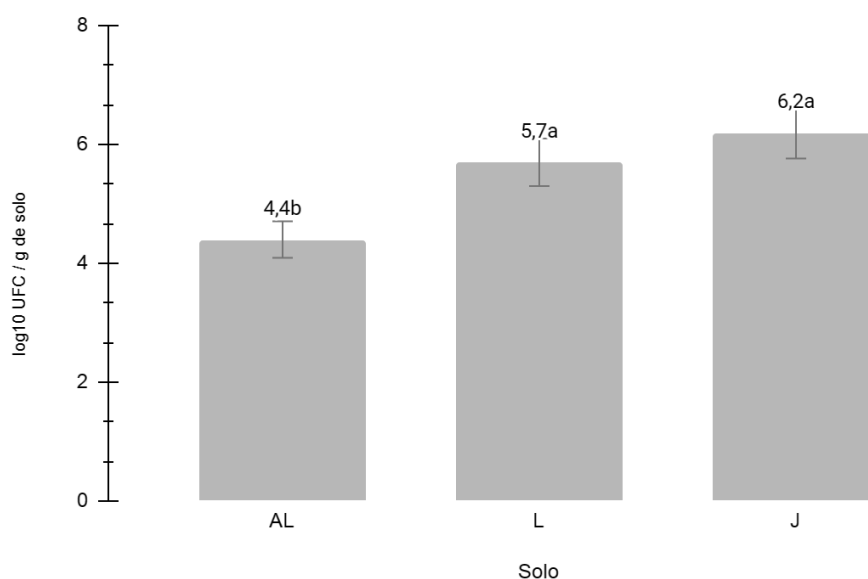
Para a elaboração dos dendrogramas de similaridade dos grupos de isolados, pelo método UPGMA, adotando o índice de Jaccard, utilizando o software PAST 3.

4. RESULTADOS

4.2. Densidade microbiana das amostras de solo de Niquelândia

Após o isolamento das bactérias calculou-se a densidade microbiana das amostras de solo adjacente, rizosférico de *L. lupulina* e *J. lanstykii*. Os valores foram expressos em \log_{10} UFC g de solo⁻¹. Observou-se que os solos rizosféricos apresentaram densidades microbianas superiores ao do solo adjacente (Figura 1).

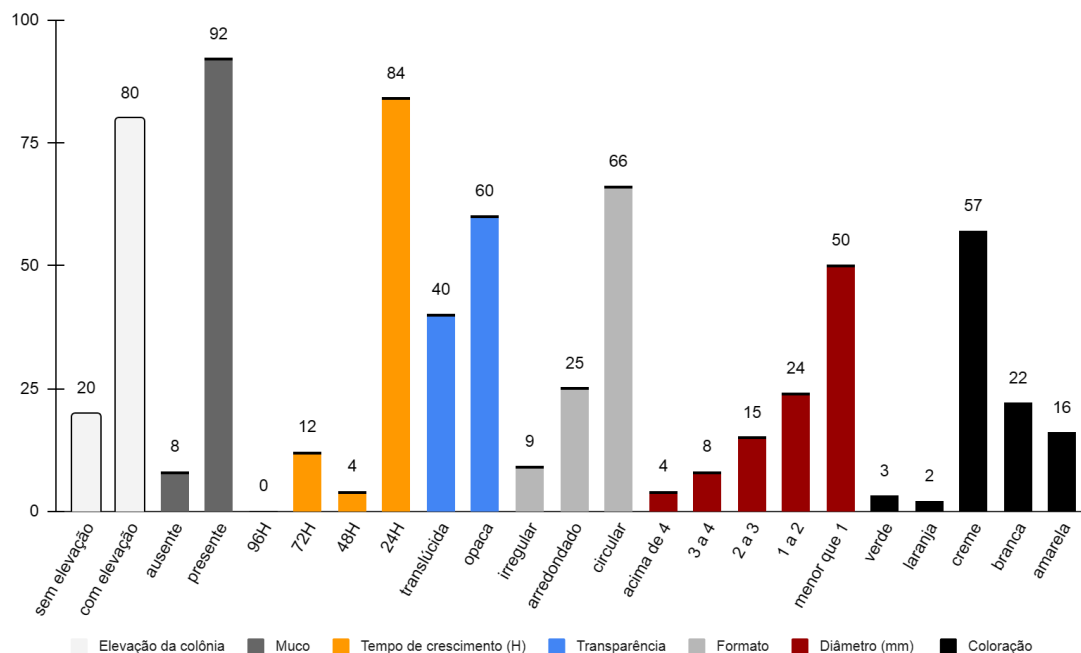
Figura 1 - Densidade populacional de bactérias em solos rizosféricos e solo adjacente.



AL = Solo Adjacente. L = Solo rizosférico de *L. lupulina*. J = Solo rizosférico de *J. lanstakii*. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. CV = 7,53%. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias.

4.3. Caracterização fenotípica dos isolados

Foram obtidos 117 isolados. Destes, 57% apresentaram coloração creme, 50% diâmetro inferior a 1mm, 66% formato circular, 60% superfície opaca, 82% produziram muco, 66 % apresentaram baixa elevação da superfície e 84% possuem crescimento rápido (Figura 2). Além disso, foram elaborados dendrogramas de similaridade para cada um dos grupos de isolados, com base nas características morfofisiológicas avaliadas (Apêndices J, K e L).

Figura 2 - Características morfofisiológicas dos isolados expressas em percentuais.

4.4. Teste de tolerância a doses de NiSO₄.6H₂O

Em todas as amostras foram encontrados isolados tolerantes. Dos 109 isolados obtidos, 66 se desenvolveram em meio de cultura TSA enriquecido com a dose 7,5 mM de NiSO₄.6H₂O, sendo 9 oriundos do solo adjacente, 27 do solo rizosférico de *L. lupulina* e 30 do solo rizosférico de *J. lanstykii*. 31 isolados foram tolerantes a dose de 10 mM. Destes, 4 pertencem ao solo adjacente, 13 ao solo rizosférico de *L. lupulina* e 14 ao solo rizosférico de *J. lanstykii*. Para as outras duas doses mais baixas, todos os 117 isolados se desenvolveram, sendo 15 pertencentes ao solo adjacente, 45 ao solo rizosférico de *L. lupulina* e 57 ao solo rizosférico de *J. lanstykii*.

4.5. Teste de Gram

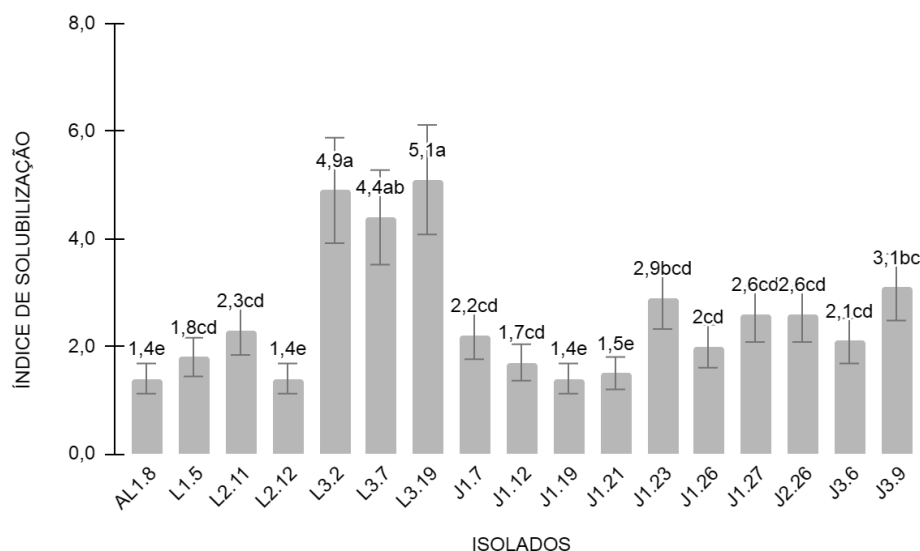
Dos 66 isolados, 18 % foram Gram(-), enquanto que 82 % foram Gram(+).

4.6. Solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio

Dos 66 isolados testados, 17 (25,75%) foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio bibásico, sendo 1 oriundo do solo adjacente, 6 do solo rizosférico de *L. lupulina* e 10 do solo rizosférico de *J. lanstykii* (Figura 3). Três isolados (17,64%), pertencentes à rizosfera de *L. lupulina*, se destacaram ao apresentar um alto IS. Oito

(47,05%) apresentaram médio IS e 6 (35%) apresentaram baixo IS. Em contrapartida, nenhum isolado foi capaz de solubilizar o fosfato de alumínio.

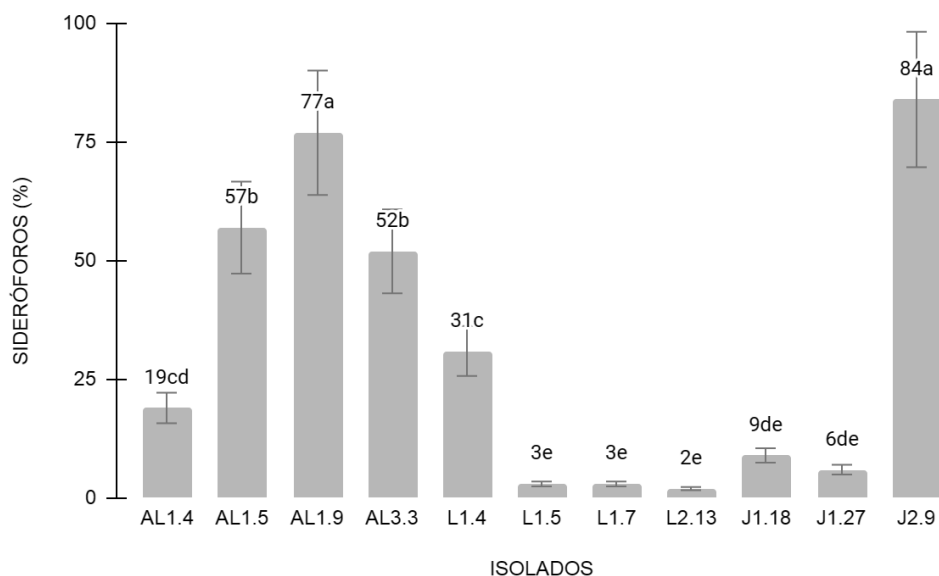
Figura 3 - Índices de solubilização de fosfato de cálcio bibásico produzidos pelos isolados.



Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. CV = 20,45%. Barras de erro, indicam o desvio padrão das médias.

4.7. Produção de sideróforos

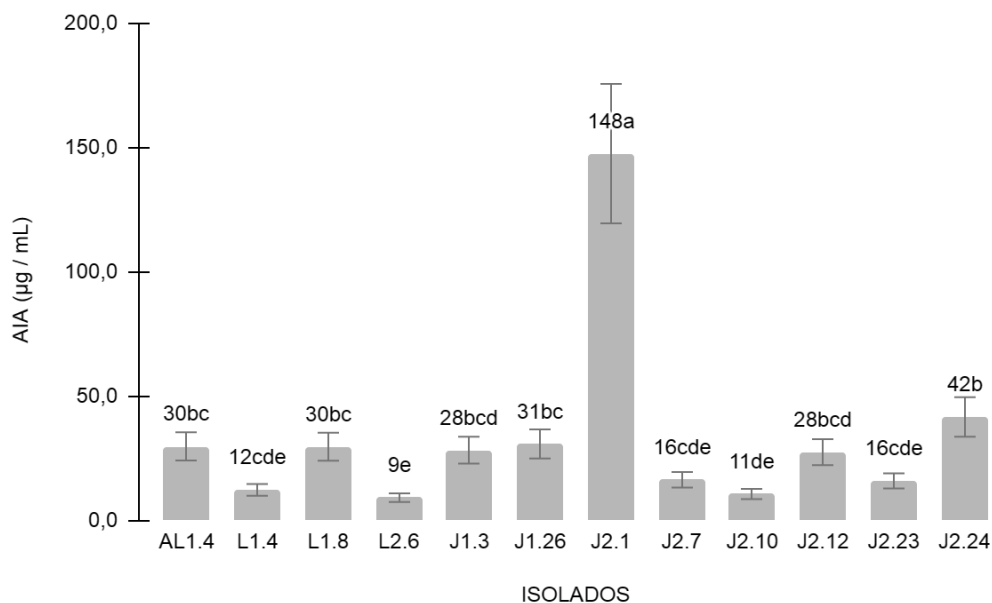
Dos 66 isolados testados, 11 (17%) foram capazes de produzir sideróforos, sendo 4 oriundos do solo adjacente, 4 do solo rizosférico de *L. lupulina* e 3 do solo rizosférico de *J. lanstykii*. Deste total, os isolados AL1.5, AL1.9, AL3.3 e J2.9 se destacaram na produção do composto, produzindo 57%, 52%, 77% e 84%, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 - Percentuais de sideróforos produzidos pelos isolados.

Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem entre si, ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey. CV = 17,52%. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias.

4.8. Produção de AIA

Dos 66 isolados, 18% foram capazes de sintetizar AIA foi sintetizado, sendo 1 oriundo de solo adjacente, 3 da rizosfera de *L. lupulina* e 8 da rizosfera de *J. lanstykii*. Dentre estes, os isolados AL1.4, L1.8, J1.26, J2.1 e J2.24 se destacaram por apresentar alta produção de AIA (>30ug / mL) (Figura 5).

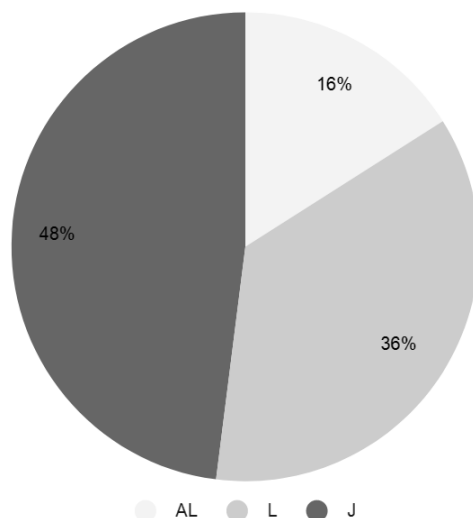
Figura 5 - Isolados sintetizadores de AIA.

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. CV = 19,25%. Barras de erro indicam o desvio padrão das médias.

4.9. Fixação biológica de N

Dos 66 isolados testados, 31 (47%) formaram a película aerotóxica no meio de cultura JNFB, o que evidencia a FBN. Em relação a alteração de pH após a fixação, 32,26% acidificaram o meio, 6,45% alcalinizaram e 61,29% não provocaram alteração. Além disso, 48% dos fixadores de N identificados pertenciam a rizosfera de *J. lanstykii*, 36% a rizosfera de *L. lupulina* e 16% ao solo adjacente (Figura 6).

Figura 6 - Percentual de isolados fixadores de N de cada grupo de origem.



AL = isolados oriundos de solo Adjacente. L = isolados oriundos da rizosfera de *L. lupulina*. J = isolados oriundos da rizosfera de *J. lanstykii*.

Após as caracterizações dos mecanismos verificou-se que, dos 66 isolados, 45 (68,18%) produziram ao menos um mecanismo. Deste total, 6 (13%) são oriundos do solo adjacente, 13 (28,88%) oriundos da rizosfera de *L. lupulina* e 26 (57,77%) oriundos da rizosfera de *J. lanstykii*. Além disso, verificou-se que 18 isolados (27%) produziram dois mecanismos, 2 isolados (3%) produziram três mecanismos e 20 isolados (30%) não produziram nenhum dos mecanismos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 - Mecanismos produzidos por isolados tolerantes a 7,5mM de NiSO₄·6H₂O.

Isolados	Solubilização de fosfato de cálcio	Produção de AIA	Produção de Sideróforos	FBN	Gram
AL1.4		X	X	X	+
AL1.5			X	X	+
AL1.7					+
AL1.8	X				+
AL1.9			X		+
AL1.10				X	+
AL3.3			X		+
AL3.4					+
AL3.5					+
L1.3					+
L1.4		X	X		-
L1.5	X		X		+
L1.6				X	-
L1.7			X		+
L1.8		X		X	-
L1.9				X	+
L2.1				X	+
L2.2					+
L2.3				X	+
L2.6		X		X	+
L2.7					+
L2.8					+
L2.9					+
L2.11	X			X	+
L2.12	X				+
L2.13			X		+
L3.1					-
L3.2	X			X	-
L3.3					+
L3.7	X				+
L3.8				X	+
L3.10					+
L3.14				X	+
L3.15					-
L3.18					+
L3.19	X			X	+
J1.3		X		X	+
J1.6	X				+
J1.7	X				+
J1.12	X			X	+
J1.13					+

J1.16					-
J1.18			X		-
J1.19	X			X	-
J1.20				X	+
J1.21	X				-
J1.22					-
J1.23	X				+
J1.24					+
J1.25					+
J1.26	X	X		X	+
J1.27	X		X		-
J2.1		X		X	+
J2.2				X	+
J2.5					+
J2.7		X		X	+
J2.9			X		+
J2.10		X		X	+
J2.11					+
J2.12		X		X	+
J2.23		X		X	+
J2.24		X		X	+
J3.6	X			X	+
J3.9					+
J3.11				X	+
J3.12				X	+

Marcações com "X" indicam que o isolado produziu mecanismo de promoção de crescimento.

4.10. Identificação dos isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA

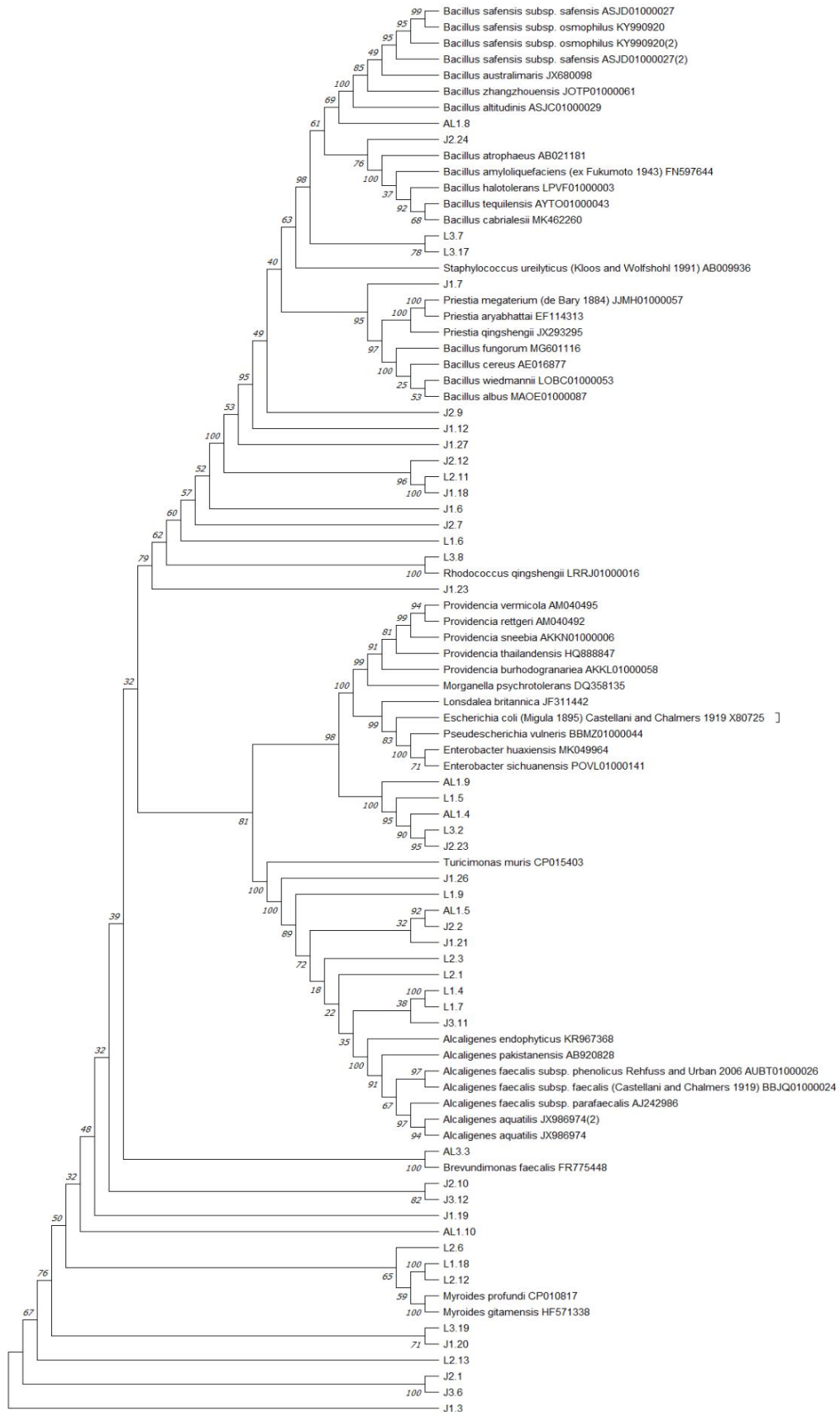
Após o alinhamento, as sequências obtidas foram submetidas ao banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e comparadas com sequências já registradas. Assim, foi possível elaborar uma árvore filogenética (Figura 7). Além disso, foi possível estimar com base no percentual de similaridade os gêneros de BPCP predominantes. Destes, 31% são *Bacillus* sp., 22% *Alcaligenes* sp., 15,55% *Providencia* sp., 4% *Enterobacter* sp. e 2% *Priestia* sp.. Além disso, 6% não apresentam similaridade com o banco de dados consultado (Tabela 3).

Tabela 3 - Identificação genética dos isolados com base no percentual de similaridade de seqüências de nucleotídeos.

Isolados	Origem	Espécie correlacionada	Cobertura	Erro	% Similaridade	N° acesso
AL1.4	Solo Adjacente	<i>Providencia vermicola</i>	95,00%	0	93,69	KC456565.1
AL1.5	Solo Adjacente	<i>Alcaligenes sp. SCAU 14</i>	90,00%	0	96,33	KP125990.1
AL1.8	Solo Adjacente	<i>Bacillus pumilus</i>	95,00%	0	98,06	OP223364.1
AL1.9	Solo Adjacente	<i>Providencia rettgeri</i>	92,00%	0	91,62	CP017671.1
AL1.10	Solo Adjacente	<i>Streptomyces sp.</i>	77,00%	2,00E-74	73,66	GQ848482.1
AL3.3	Solo Adjacente	<i>Brevundimonas diminuta</i>	98,00%	0	81,47	MN803288.1
L1.4	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98,00%	0	96,72	MZ026438.1
L1.5	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Providencia vermicola</i>	84,00%	0	91,74	KU984707.1
L1.6	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	90,00%	0	83,58	MK774761.1
L1.7	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98,00%	0	95,49	KX118706.1
L1.8	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Myroides odoratimimus</i>	55,00%	2,00E-124	80,64	CP037427.1
L1.9	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98,00%	0	92,56	MG027658.1
L2.1	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	95,00%	0	94,26	KF641855.1
L2.3	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98,00%	0	92,82	KF641851.1
L2.6	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Alcaligenes aquatilis</i>	71,00%	0	92,09	MT572474.1
L2.11	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Bacillus cereus</i>	87,00%	0	94,74	MT912767.1
L2.12	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Myroides odoratimimus</i>	49,00%	1,00E-52	74,91	MF407352.1
L2.13	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	SEM SIMILARIDADE	-	-	-	-
L3.2	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	88,00%	0	94,2	CP017671.1
L3.7	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	98,00%	0	94	MH801801.1
L3.8	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Rhodococcus sp. AMF3537</i>	72,00%	0	96,09	JQ316223.1
L3.14	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	<i>Bacillus safensis</i>	98,00%	0	96,08	KX364927.1
L3.19	Rizosfera de <i>L. lupulina</i>	SEM SIMILARIDADE	-	-	-	-
J1.3	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	SEM SIMILARIDADE	-	-	-	-
J1.6	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	87,00%	0	88,08	MT476752.1
J1.7	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	99,00%	0	94,87	MK571702.1
J1.12	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	99,00%	0	89,65	MN581181.1
J1.18	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus cereus</i>	77,00%	0	95,8	MT912767.1
J1.19	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus sp. PDK002</i>	53,00%	0	94,42	GU075851.1
J1.20	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	27,00%	8,00E-49	79,8	KM213759.1
J1.21	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	93,00%	0	93,57	MG027658.1

J1.23	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	98,00%	0	83,96	MK412021.1
J1.26	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Alcaligenes sp. S3PI79</i>	94,00%	0	89,76	KU145675.1
J1.27	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Priestia megaterium</i>	95,00%	0	88,13	MH261080.1
J2.1	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Providencia sp.</i>	25,00%	1,00E-56	81,85	MT210823.1
J2.2	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	99,00%	0	96,38	JQ724535.1
J2.7	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus tequilensis</i>	98,00%	0	85,64	JX473585.1
J2.9	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus sp. KT116</i>	92,00%	0	92,84	KJ733964.1
J2.10	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	98,00%	0	86,97	KT766080.1
J2.12	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,00%	0	86,11	CP044978.1
J2.23	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	98,00%	0	96,39	CP059345.1
J2.24	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Bacillus sp. Não cultivado</i>	99,00%	0	98,64	MG825097.1
J3.6	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Providencia vermicola</i>	49,00%	5,00E-85	78,78	MH620758.1
J3.11	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Pusillimonas sp.</i>	98,00%	0	95,11	KC109821.1
J3.12	Rizosfera de <i>J. lanstykii</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	93,00%	0	82,6	KT766063.1

Figura 7 - Árvore filogenética resultante do sequenciamento do gene 16S rRNA.



5. DISCUSSÃO

Pode-se constatar que o solo ultramáfico de Niquelândia apresenta baixos teores dos nutrientes Ca, Mg e K, e nenhum teor de P. Paralelamente, apresenta elevados teores de Ni total e Ni disponível. Características semelhantes a estas também foram observadas em solos ultramáficos situados em outros territórios do globo terrestre (HE et al., 2012; SENEVIRATNE et al., 2015). Apesar disso, a rizosfera das hiperacumuladoras *L. lupulina* e *J. lanstykii*, presentes neste solo, continha BPCP, inclusive na sua adjacência. No entanto, os solos rizosféricos foram os que apresentaram uma maior densidade populacional de bactérias, por ser um microambiente que oferece mais nutrientes a estes microrganismos devido a produção de exsudatos radiculares (BAIS et al. 2006). Além disso, alguns exemplares conseguiram se desenvolver quando expostos a concentrações de Ni (em meio de cultura TSA) mais elevadas do que as do solo ultramáfico, o que sugere que eles podem conter genes que lhes conferem tolerância aos altos teores de Ni e por isso se adaptaram ao meio (ABOUDRAR et al., 2007; LOPEZ et al. 2019).

Das 60 bactérias, tolerantes a 7,5mM de NiSO₄, 45 produziram os seguintes mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento: síntese de AIA, solubilização de fosfato de cálcio, produção de sideróforos e FBN (MA et al., 2011; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Dos isolados que sintetizaram AIA, 5 apresentaram alta produção (>30µg / mL) do composto indólico, que é fundamental para o desenvolvimento radicular e de parte aérea vegetal (BRIGIDO et al., 2017). Por isso, eles apresentam potencial para serem utilizados em pesquisas para promover o aumento de biomassa vegetal, como foi verificado em um dos testes da pesquisa de Yousef (2018).

Já em relação às BPCP produtoras de sideróforos, 54,54% produziram um percentual acima dos 20% do quelante, semelhante ao que foi constatado por Gonin et al. (2013). Isto evidencia que estes microrganismos têm potencial para quelar Fe e o deixá-lo indisponível para possíveis fitopatógenos, e que também podem contribuir para reduzir o estresse oxidativo nas hiperacumuladoras, provocado por metais pesados presentes no solo (HUO et al., 2021).

As análises também revelaram que a rizosfera de *L. lupulina* e de *J. lanstykii* apresentaram percentuais maiores de BPCP que realizam FBN (36% e 48%, respectivamente) do que o solo adjacente (16%). O que sugere que essa maior presença tem grande relevância para o fornecimento de N para que estas plantas se desenvolvam. Mas vale salientar que, mesmo em um menor percentual, a presença de bactérias que realizam FBN no solo adjacente sugere que estas possam ser de vida livre e são muito relevantes para a manutenção da comunidade bacteriana presente nas rizosferas das hiperacumuladoras, devido ao fornecimento de N (VOLPIANO et al., 2022).

Em relação a solubilização de fosfato de cálcio, constatou-se que 64,70% (11) dos isolados avaliados expressaram de média a alta solubilização, o que reforça a importância desses microrganismos para o fornecimento de Ca e P às plantas que estão estabelecidas em uma área com deficiência destes nutrientes (GUPTA et al., 2021). Mas vale ressaltar que, a capacidade de solubilizar fosfato está relacionada à síntese de metabólitos que, em alguns casos, também pode dissolver sais que contenham metais pesados como o Cd. Dessa forma, íons Cd^{2+} disponíveis na solução do solo podem causar toxicidade em possíveis fitopatógenos das plantas hiperacumuladoras (YANG et al., 2018).

Após a caracterização dos mecanismos, verificou-se que o solo adjacente e os solos rizosféricos possuem bactérias multifuncionais, capazes de produzir mais de um mecanismo de promoção de crescimento (SILVA et al., 2022).

Com a realização das análises filogenéticas foi possível constatar que os isolados, que produziram ao menos um mecanismo de promoção de crescimento, pertencem a alguns dos principais gêneros que englobam BPCP: *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Providencia sp.*, *Enterobacter sp.* e *Priestia sp.* É importante destacar que, o estabelecimento de diferentes gêneros bacterianos pode estar diretamente relacionado à relação solo-planta-micro-organismo. Características do solo ultramáfico como pH, teor de carbono orgânico solúvel e baixos teores de nutrientes, paralelamente a produção de exsudados radiculares pelas hiperacumuladoras, influenciam no estabelecimento de comunidades microbianas específicas. Pesquisas já revelaram que, apesar de possuírem características edáficas extremas, os solos ultramáficos podem apresentar uma rica diversidade da comunidade bacteriana, que

se assemelha às de florestas tropicais que não possuem este tipo de solo, mas que está estruturada diferente. E esta estrutura, além de outras condições ambientais, contribui para a definição de quais espécies vegetais que irão se estabelecer na área. Por isso, é comum que diferentes áreas de solo ultramáfico tenham diferentes espécies vegetais estabelecidas. Outro fator relevante que afeta a estrutura da comunidade bacteriana de um solo ultramáfico é o manejo. Portanto é possível que o solo deste trabalho, oriundo de uma área sem atividade antrópica, tenha uma maior riqueza bacteriana do que o solo de uma área que sofreu uma intensa atividade de mineração. Diante disso, percebe-se que a caracterização dos mecanismos e a identificação dos gêneros de BPCP citados anteriormente gerou mais informações sobre a constituição do solo ultramáfico de Niquelândia, principalmente em relação à fração microbiológica. Além disso, reforça que a coleção tem potencial biotecnológico para utilização em pesquisas que visem elevar a biomassa das hiperacumuladoras de Ni, e de outros metais (RIBEIRO et al., 2010; ECHEVARRIA et al., 2020; BORDEZ et al., 2022).

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as bactérias, presentes na rizosfera de *L. lupulina* e de *J. lanstykii* e no solo adjacente, toleram altas concentrações de Ni, produzem mecanismos de promoção de crescimento e podem ser consideradas como BPCP.

A coleção elaborada contém BPCP multifuncionais, capazes de produzir dois ou mais mecanismos de promoção de crescimento.

O sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu identificar, no solo adjacente e na rizosfera de *L. lupulina* e *J. lanstykii*, os gêneros de BPCP: *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp., *Providencia* sp., *Enterobacter* sp. e *Priestia* sp.

Por fim, pode-se inferir que a coleção bacteriana elaborada tem potencial para ser empregada em pesquisas voltadas para a agromineração de Ni e também para a fitorremediação de solos contaminados por metais pesados.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABOUDRAR, W.; SCHWARTZ, C.; BENIZRI, E.; MOREL, J. L.; BOULARBAH, A. Soil microbial diversity as affected by the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* under natural conditions. **International Journal of Phytoremediation**, v. 9, n. 1, p. 41-52, 2007. DOI: <https://10.1080/15226510601139417>

ALEXANDER, D. B.; ZUBERER, D. A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, n. 1, p. 39-45, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00369386>

ARAÚJO, V.L.V.P.; LIRA JUNIOR, M.A.L.; SOUZA JÚNIOR, V.S.; ARAÚJO FILHO, J.C.; FRACETTO, F.J.C.; ANDREOTE, F.D.; ... e FRACETTO, G.G.M. Bacteria from tropical semiarid temporary ponds promote maize growth under hydric stress. **Microbiological Research**, v. 240, p. 126-564, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126564>

BAIS, H. P. WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.

BHALERAO, S.A.; SHARMA, A.S.; POOJARI, A.C. **Toxicity of Nickel in Plants**. International Journal of Pure and Applied Bioscience, v. 3, p. 345 - 355, 2015. Disponível em: <http://www.ijpab.com/form/2015%20Volume%203,%20issue%202/IJPAB-2015-3-2-345-355.pdf>>. Acesso em: 06 de mar de 2023.

BODDEY, R.M.; BODDEY, L.H.; URQUIAGA, S. **A Técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio**. Itaguaí, Editora Universidade Rural, 1990.

BORDEZ, L.; CAVALOC, Y.; JOURAND, P.; DUCOUSSO M.; JUILLOT F.; AMIR, H.. Effects of ultramafic topsoil stockpiling during mine activities on its microbial diversity and other microbiological and physicochemical characteristics. **Ecological Engineering**, 2022, 177, pp.106563. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2022.106563>.

BRIGIDO, C.; GLICK, B.R.; OLIVEIRA, S. Survey of Plant Growth-Promoting Mechanisms in Native Portuguese Chickpea Mesorhizobium Isolates. **Microbial Ecology**, v. 73, p. 900 – 915, 2017. DOI: 10.1007/s00248-016-0891-9

BUCK, J.D. Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.4, p. 992-993, 1982. DOI: <https://10.1128/aem.44.4.992-993.1982>.

CABELLO-CONEJO, M.I.; BECERRA-CASTRO, C.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A.; MONTERROSO, C.; SAAVEDRA-FERRO, A.; MENCH, M.; KIDD, P.S. Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. **Plant Soil**, v. 1, p. 35–50, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2043-7>

CHAUDHARY, D.K., KHULAN, A. e KIM, J. Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. **Scientific Reports** 9, n.6666, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43182-x>.

CHAWNGTHU, L.; HNAME, R. e LALFAKZUALA, R. Isolation and Characterization of Rhizospheric Phosphate Solubilizing Bacteria from Wetland Paddy Field of Mizoram, India. **Geomicrobiology Journal**, v.37, n.4, p.366-375, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1709108>.

CORDEIRO, M.C.R.; PAES-LEME, V.B.; NAGATA, T. et al. Estudo da Expressão de Genes em Plantas Hiperacumuladoras de Níquel Nativas da Região de Barro Alto, GO. **Conference: II Workshop sobre Relações entre metais do solo e a biodiversidade no Cerrados: ferramentas para a conservação ambiental e a recuperação de áreas degradadas**. Vol.1, Brasília, 2010.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, DF, **Embrapa-SPI**, 1995.

DURAND, A.; PIUTTI, S.; RUE, M.; MOREL, J. L.; ECHEVARRIA, G.; BENIZRI, E. Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 399, p. 179-192, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156435>

ECHEVARRIA, G.; LOPEZ, S.; MOREL, J.L.; GOUX, X.; CALUSINSKA, M.; BENIZRI, E. Community diversity and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of nickel hyperaccumulators found in Albania. **Science of the Total Environment**. v.654, p. 237-249, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.056>

ECHEVARRIA, G.; LOPEZ, S.; SUGAU, J.B. et al. Bacterial community diversity in the rhizosphere of nickel hyperaccumulator plant species from Borneo Island (Malaysia). **Environmental Microbiology**. v.22, p.1649-1665, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14970>

FAYIGA, A. O.; SAHA, U. K. Arsenic hyperaccumulating fern: Implications for remediation of arsenic contaminated soils. **Geoderma**, v.284, p. 132-143, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.09.003>

GARNIER, J.; QUANTIN, C.; GUIMARAES, E.; GARG, V. K.; MARTINS, E. S.; BECQUER, T. Understanding the genesis of ultramafic soils and catena dynamics in Niquelândia, Brazil. **Geoderma**, v. 151, p. 204-214, 2009.

GLICK, B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 367- 374, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001>

GONIN, M.; GENSOUS, S.; LANGRANGE, A. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 59, p. 164 – 174, 2013. DOI: 10.1139/cjm-2012-0570.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000300002>

HE, S.; YANG, X.; HE, Z.; BALIGAR, V.C. Mechanisms of nickel uptake and hyperaccumulation by plants and implications for soil remediation. **Advances in Agronomy**, v. 117, p. 117 – 189, 2012. DOI: <https://10.1016/B978-0-12-394278-4.00003-9>.

HUO, Y.; KANG, J.P.; ANH, J.C.; KIM, Y.J.; PIAO, C.H.; YANG, D.U.; YANG, D.C.. Siderophore-producing rhizobacteria reduce heavy metal-induced oxidative stress in *Panax ginseng* Meyer. **Journal of Ginseng Research**, v. 45, p. 218 - 227, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.008>

Instituto Mauro Borges de Estatística e Estudos Socioeconômicos (IMB). Estatísticas Municipais (Séries Históricas). 2016. Disponível em: https://www.imb.go.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=218>. Acesso em: 16 de out. de 2021.

JAFFRÉ, T.; REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M.; SCHAT, H.; VAN DER ENT, A. The discovery of nickel hyperaccumulation in the New Caledonian tree *Pycnandra acuminata* 40 years on: an introduction to a Virtual Issue. **New Phytologist**. n. 218, p. 397-400, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15105>

KIERCZAK, J.; PIETRANIK, A.; PEDZIWIATR, A. Ultramafic geoecosystems as a natural source of Ni, Cr, and Co to the environment: A review. **Science of Total Environment**. v.755, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142620>

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459–1465, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013>

KIDD, P.S.; CASTRO, B.C.; LÉSTON, M.G.; MONTERROSO, C. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L.. **Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente**. p.26-43, 2007. DOI: <https://doi.org/10.22201/enesmorelia.9786070294525e.2017>

LANA, U.G.P.; RIBEIRO, V.P.; GOMES, E.A.; OLIVEIRA, C.A. Seleção em larga escala de bactérias produtoras do hormônio ácido indolacético (AIA), auxina associada à promoção de crescimento em plantas. **Documentos / Embrapa Milho e Sorgo**, ISSN 1518-4277; 218. p. 7–11, 2017.

LANE, D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons: West Sussex.

LIMA, M.R. Estratégias de propagação para espécies arbustivas de Acanthaceae Juss. com potencial ornamental. **Dissertação em Botânica**. Universidade de Brasília. Brasília - DF. 165p. 2012.

LOPEZ, S.; GOUX, X.; ECHEVARRIA, G.; CALUSINSKA, M.; MOREL, J.L.; BENIZRI, E. Community diversity and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of nickel hyperaccumulators found in Albania. **Science of the Total Environment**, v. 654, n. 1, p. 237 - 249, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.056>

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; LUO, Y.; FREITAS, H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—effects on plant growth and Ni uptake. **Journal of Hazardous Materials**, v. 195, p. 230-237, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.034>

MARESHWARI, R.; BHUTANI, N.; SUNEJA, P. Screening and characterization of siderophore producing endophytic bacteria from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum* plants. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 7, n.5, p. 7-14, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.7324/JABB.2019.70502>

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649. 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>

NASCIMENTO, C. W. A.; HESTERBERG, D.; TAPPERO, R.; NICHOLAS, S.; SILVA, F.B.V. Citric acid assisted accumulation of Ni and other metals by *Odontarrhena muralis*: Implications for phytoextraction and metal foliar distribution assessed by m-SXRF. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114025>

NASCIMENTO, C.W.A.; LIMA, L.H.V.; SILVA, J.A.B.S.; BIONDI, C.M. Ultramafic soils and nickel phytomining opportunities: A review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. p. 1-17, 2022. DOI: <https://doi.org/10.36783/18069657rbcS20210099>

NKRUMAH, P. N.; CHANEY, R. F.; MOREL, J. L. Agronomy of 'Metal Crops' Used in Agromining. **Agromining: Farming for Metals**, p. 19-22, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/es506031u>
Nickel Institute. 2021. Disponível em: <<https://nickelinstitute.org/about-nickel/#mining>>. Acesso em: 17 de out. de 2021.

OLANREWAJU, O.S.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 197, 16 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

PATTEN, C.L. e GLICK, B.R.. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 207-220, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1139/m96-032>.

PIMENTA, M.R.; FERNANDES, L.S.; PEREIRA, U.J.; GARCIA, L.S.; LEAL, S.R.; LEITÃO, S.G.; SALIMENA, F.R.G.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Floração, Germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. Vol.30, n.2, p.211-220, abr.-jun. 2007.

REEVES, R.D.; BAKER, A.J.M.; BECQUER, T.; ECHEVARRIA, G.; MIRANDA, Z.J.G. The flora and biochemistry of the ultramafic soils of Goiás state, Brazil. **Plant and Soil**. v.293, n.1, p.107-119. 2007.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M.; JAFFRÉ, T.; ERSKINE, P. D.; ECHEVARRIA, G.; VAN DER ENT, A. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. **New Phytologist**, v. 218, p. 397-400, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14907>

RIBEIRO, M.R.; ANDRADE, L.R.M.; MENDES, I.C. et al. Atributos químicos e biológicos e estrutura das comunidades bacterianas em solos ultramáficos com variações na disponibilidade de Ni. **XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas; XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas; XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo; VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo**. Guarapari - ES, Brasil. 2010.

SENEVIRATNE, M.; SENEVIRATNE, G.; MADAWALA, H.; IQBAL, M.; RAJAKARUNA, M.; BANDARA, T, VITHANAGE, M. A preliminary study of the role of bacterial–fungal co-inoculation on heavy metal phytotoxicity in serpentine soil. **Australian Journal of Botany**, v. 63, p. 261–268, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1071/BT14270>

SHAH, V.; DAVEREY, A. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, p. 1-16, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>

SCHWYN, B. e NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**. v.160, p.47–56, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

SIEBECKER, M. G.; CHANEY, R. L.; SPARKS, D. L. Nickel speciation in several serpentine (ultramafic) topsoils via bulk synchrotron-based techniques. **Geoderma**, v. 298, p. 35-45, 2017.

SILVA, M.A.; NASCENTE, A.S.; REZENDE, C.C. et al. Multifunctional rhizobacteria: use in agriculture. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 4, p. 4 - 6, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i4.26971

SUN, W.; SHAHRAJABIAN, M.H. e CHENG, K. Nitrogen Fixation and Diazotrophs – A Review. **Romania Biotechnological Letters**, v. 26, n. 4, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.25083/rbl/26.4/2834.2845>

TEIXEIRA, P.C.; DONAGEMMA, G.K.; FONTANA, A. e TEIXEIRA, W.G. Manual de métodos de análise de solo. 3.ed., p.574, Brasília, DF: **Embrapa**, 2017. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1085209>> Acesso em: 06 de mar de 2023.

TIRRY, N.; JOUTEY, N.T.; SAYEL, H.; KOUCHOU, A.; BAHAFID, W.; ASRI, M.; EL GHACHTOULI, N. Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: prospects in phytoremediation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 613-619, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1016%2Fj.jgeb.2018.06.004>

ULLAH, A.; HENG, S.; MUNIS, M.F.H.; FAHAD, S.; YANG, X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28-40, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>

van der ENT, A.; BAKER, A.J.M.; REEVES, R.D.; CHANEY, R.L. et al. Agromining: Farming for Metal in the Future?. **Environmental Science and Technology**. v. 49, n. 8, p. 4773-4780. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/es506031u>

van der ENT, A.; PRZYBYLOWICZ, W. J.; JONGE, M. D.; HARRIS, H. H.; RYAN, C. G.; TYLKO, G.; PATERSON, D. J.; BARNABAS, A. D.; KOPITTKE, P. M.; PRZYBYLOWICZ, J. M. X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyperaccumulator plants. **New Phytologist**, v. 218, p. 432-452, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14810>

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00333-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00333-9)

VISIOLI, G.; D'EGIDIO, S.; VAMERALI, T.; MATTAROZZI, M.; SANANGELANTONI, A. M. Culturable endophytic bacteria enhance Ni translocation in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. **Chemosphere**, v. 117, p. 538-544, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.014>

VITHANAGE, M.; KUMARATHILAKA, P.; OZE, C.; KARUNATILAKE, S.; SENEVIRATNE, M.; HSEU, Z.; GUNARATHNE, V.; DASSANAYAKE, M.; OK, Y. S.; RINKLEBE, J. Occurrence and cycling of trace elements in ultramafic soils and their impacts on human health: A critical review. **Environment International**, v. 131, p. 1-17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104974>

VOLPIANO, C.G.; LISBOA, B.B.; SÃO JOSÉ, J.F.B.; BENEDUZI, A.; GRANADA, C.E.; VARGAS, L.K. Soil-plant-microbiota interactions to enhance plant growth.

Revista Brasileira de Ciência do Solo, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.36783/18069657rbcS20210098>

YANG, P.; ZHOU, X.F.; WANG, L.L.; LI, Q.S.; ZHOU, T.; CHEN, Y.K.; ZHAO, Z.Y.; HE, B.Y. Solubilizing Bacteria on the Mobility of Insoluble Cadmium and Metabolic Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 7,. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fijerph15071330>

YOUSEF, N.M.H. Capability of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. **European Journal of Biological Research**, v.8, n.4, p. 174 - 182, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1412796>

APÊNDICE A - Meio de cultura Tryptona Soya Agar (TSA)

Tryptona (Enzimatic digest of casein).....15g/L

Peptona de soja.....5g/L

NaCl.....5g/L

Ágar.....15g/L

Glicerina.....250mL/L

pH = 7,3

OBS.: A glicerina foi utilizada para compor este meio apenas para a estocagem dos isolados.

APÊNDICE B - Meio de cultura Tryptona Soya Broth (TSB)

Peptona de caseína.....17g/L

Peptona de soja.....3g/L

Glicose.....2,5g/L

NaCl.....5g/L

K₂HPO₄.....2,5g/L

L-Triptofano.....1,02g/L

pH = 7,3

OBS.: L- Triptofano foi utilizado para suplementar este meio apenas para determinação de Ácido Indol Acético.

APÊNDICE C - Meio de cultura líquido King B (KB)

Peptona Bacteriológica.....20g/L

MgSO₄ * 7H₂O.....1,5g/LK₂HPO₄.....1,5g/L

Glicerina.....10mL/L

pH = 7,2

APÊNDICE D – Meio de cultura sólido para determinação da solubilização de fosfato de cálcio bibásico (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001)

Glucose.....	10g/L
NH ₄ Cl.....	5g/L
NaCl.....	1g/L
MgSO ₄ * 7H ₂ O.....	1g/L
CaHPO ₄	4g/L
Ágar.....	15g/L
pH = 7,2	

APÊNDICE E – Meio de cultura sólido para determinação da solubilização de fosfato de alumínio (HARA; OLIVEIRA, 2004)

Manitol.....	10g/L
Extrato de levedura.....	2g/L
K ₂ HPO ₄	6g/L
AlCl ₃ * 6H ₂ O.....	9,67g/L
Ágar.....	18g/L
pH = 4,5	

APÊNDICE F – Meio de cultura semi-sólido JNFB

Ácido málico.....	5,0g/L
K ₂ HPO ₄	0,6g/L
KH ₂ PO ₄	1,8g/L
MgSO ₄ * 7H ₂ O.....	0,2g/L
NaCl.....	0,1g/L
CaCl * 2H ₂ O.....	0,02g/L
Fe EDTA.....	4mL/L
KOH.....	4,5g/L
Solução de Micronutrientes.....	1mL/L
Solução de Vitaminas.....	1mL/L
Azul de Bromotimol.....	1mL/L
Ágar.....	2,34mL/L
pH = 6,8	

APÊNDICE G – Solução Cromo Azurol S (CAS)

CAS é uma mistura de 4 soluções (A + B + C + D) descritas a seguir:

Solução A

Cromo azurol S.....12,2mg

Água deionizada.....10mL

Solução B

HCl (concentrado).....84µL

Água deionizada.....100mL

FeCl₃ * 6 H₂O.....27mg

Solução C

HDTMA.....21,9mg

Água deionizada (morna).....25mL

Solução D

Piperazina anidra.....4,307g

Água deionizada.....40mL

pH = 5,6 (A + B + C + D)

APÊNDICE H – Reagente de Salkovisk

H₂SO₄.....370,37mL / L

Água destilada.....617,28mL / L

FeCl₃ * 6 H₂O.....12,34mL / L

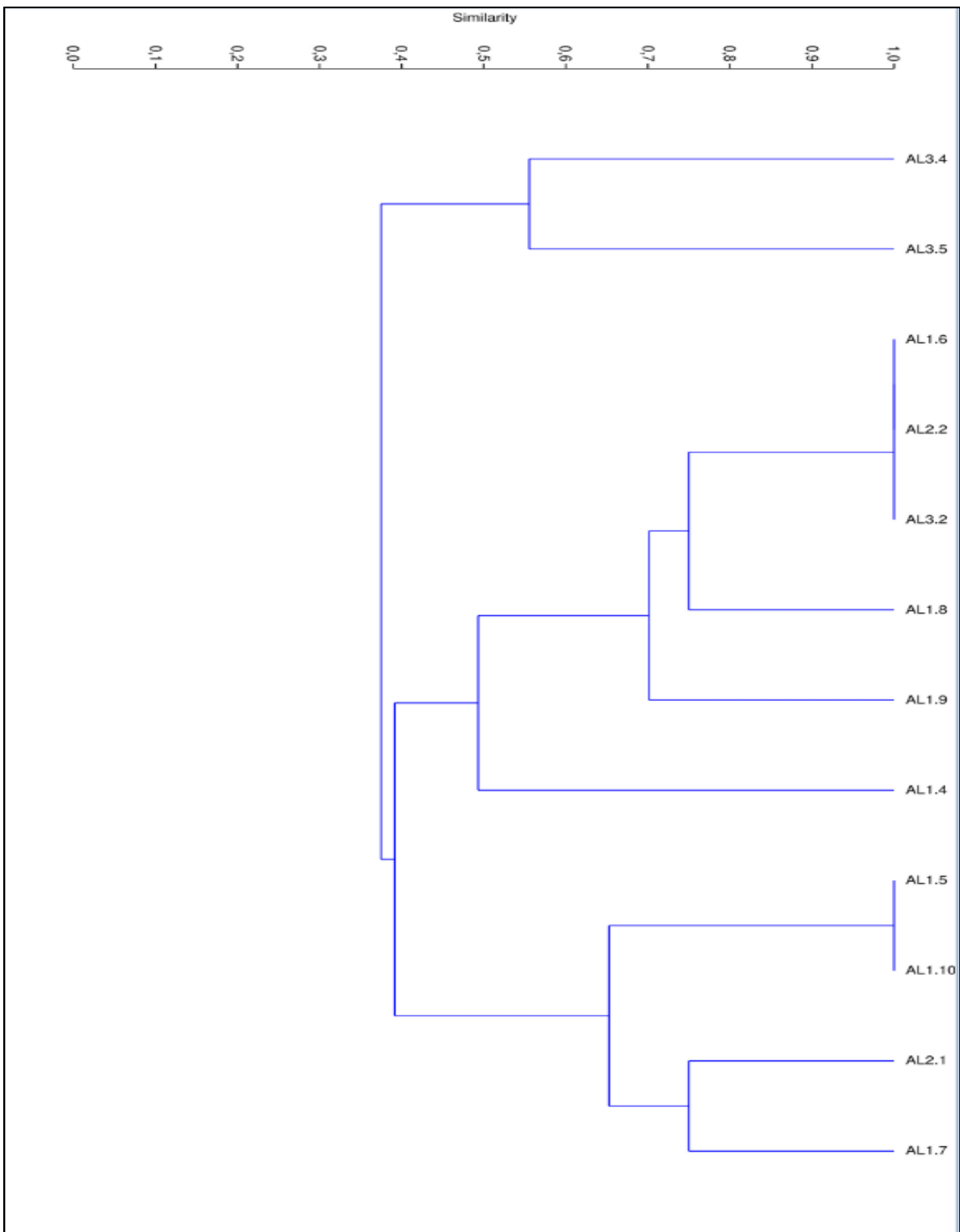
APÊNDICE I – Solução Fenólica

Fenol.....25mL

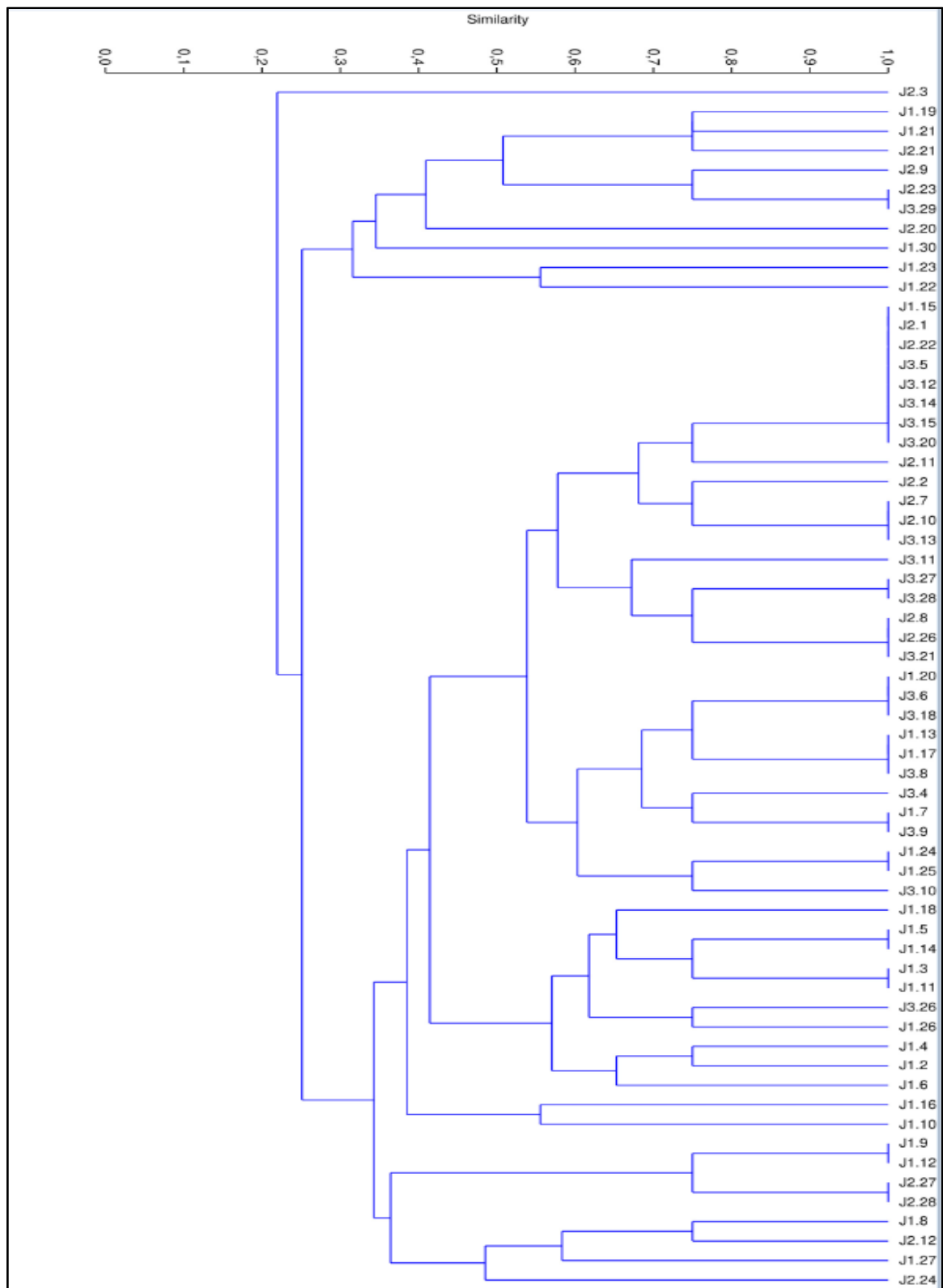
Clorofórmio24mL

Álcool isoamílico.....1mL

APÊNDICE J - Dendrograma de similaridade de isolados do Solo Adjacente de Niquelândia.



APÊNDICE K - Dendrograma de similaridade dos isolados do solo rizosférico de *J. lanstykii*.



APÊNDICE L - Dendrograma de similaridade dos isolados do solo rizosférico de *L. lupulina*.

