



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
ÁREA DE FITOSSANIDADE  
BACHARELADO EM AGRONOMIA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO – ESO**

**COLEÇÃO DE CULTURAS BACTERIANAS DE RIZOSFERA DE *Brachypodium* spp.**

Aline Pinheiro Mesquita

Rishon LeTzion, Outubro de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

ÁREA DE FITOTECNIA

COLEÇÃO DE CULTURAS BACTERIANAS DE RIZOSFERA DE *Brachypodium* spp.

ALINE PINHEIRO MESQUITA

Trabalho de Graduação apresentado à  
Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
como requisito parcial para conclusão do curso  
de Agronomia sob a orientação do Prof. Dr.  
Frederico Inácio Costa de Oliveira.

Rishon LeTzion, Outubro 2022

## AGRADECIMENTOS

À D'us, meu Criador.

Ao meu esposo Lev Meir, pelo apoio, incentivo e paciência durante toda a jornada.

À minha família;

À Dra. Elisa Korenblum, por ter me recebido queridamente.

À equipe do Laboratório Dra. Elisa Korenblum –EK, cita-se Dra. Daniela Gat e Dr. Peter Reuven, que me deram todo o suporte para o desenvolvimento do estágio.

Ao Prof. Dr. Frederico Inácio Costa de Oliveira por ter aceitado o desafio de me orientar.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco por transferir conhecimento de qualidade.

Não há nada material que não possua centelhas espirituais.

- *Rabi Elimelech de Lizensk*

## **RESUMO**

Os microorganismos de solo possuem a capacidade de sustentar a vida tanto das plantas como dos animais e outras formas de vida presentes no solo. A comunidade microbiana na rizosfera é representada por populações diversificadas e numerosas em estado de equilíbrio dinâmico, refletindo o ambiente físico, químico, biológico e suas relações. Bactérias que crescem próximo ou associadas às raízes, sendo estimuladas pelos exsudados radiculares, denominadas rizobactérias, tem a capacidade de promover o crescimento de plantas. Os benefícios dessa interação são conhecidas e é atribuído à produção de substâncias reguladoras de crescimento, à produção de antibióticos, mineralização e solubilização de nutrientes como o fósforo e fixação de nitrogênio. Neste trabalho, foi iniciado a implementação de uma coleção de culturas bacterianas, que futuramente serão utilizadas em estudos que irão focar nos mecanismos de interação química entre raízes de plantas e rizobactérias.

## APRESENTAÇÃO

Relatório das atividades realizadas no Laboratório da Dra. Elisa Korenblum do Instituto Volcani – A.R.O em Israel, em ocasião da realização do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), sob a orientação do Prof Dr. Frederico Inácio Costa de Oliveira, no período de 08/08/2022 a 29/09/2022. Com base no Plano de Atividades elaborado, foram realizadas: isolamento de colônias bacterianas e manutenção de colônias bacterianas oriundas da planta modelo *Brachypodium* spp.

<b>Figura 1.</b> Rizosfera/interações bacterianas .....	10
<b>Figura 2.</b> <i>Brachypodium sylvaticum</i> (Huds.) .....	12
<b>Figura 3.</b> Mapa do Ministério da Agricultura de Israel, Instituto Volcani .....	13
<b>Figura 4.</b> Ilustrações de técnica de esgotamento por estrias; Cultura bacteriana .....	14
<b>Figura 5.</b> Cultura bacteriana; Isolamento de colônias bacterianas pela técnica de esgotamento de estrias .....	16
<b>Tabela 1.</b> Tabela exemplificando a obtenção de dados de colônias bacterianas por meio de isolamento.....	17

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1 Implementação de uma coleção de culturas bacterianas de rizosfera.....	8
1.2 Interações bacterianas.....	9
1.3 <i>Brachypodium</i> spp .....	11
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1. Local de estudo.....	13
3.2. Coleta das amostras .....	13
3.3. Processamento das amostras .....	13
3.4. Isolamento bacteriano.....	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA FUTURA.....</b>	<b>18</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>19</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Implementação de uma coleção de culturas bacterianas de rizosfera

A rizosfera pode ser definida como a região do solo onde os processos mediados por microrganismos são especificamente influenciados pelo sistema radicular (Figura 1). Esta área inclui o solo ligado às raízes das plantas e muitas vezes se estende alguns milímetros da superfície da raiz, sendo um ambiente importante para as interações planta-microrganismo, onde as propriedades físico-químicas da rizosfera têm elevada estabilidade, que, associadas ao fornecimento constante de substratos orgânicos e fatores de crescimento, favorecem intensa atividade metabólica das populações, influenciando diretamente e positivamente o tempo de geração microbiano (LYNCH, 1990; FAGOTTI *et al.*, 2012 SOUZA, 2015; MOREIRA *et al.*, 2010).

Bactérias que crescem próximo ou associadas às raízes, sendo estimuladas pelos exudados radiculares, são chamadas rizobactérias. Diversas rizobactérias tem a capacidade de promover o crescimento de plantas. Tal efeito é atribuído à produção de substâncias reguladoras de crescimento, à produção de antibióticos e sideróforos, mineralização e solubilização de nutrientes como o fósforo e fixação de nitrogênio. Estas bactérias apresentam grande versatilidade metabólica, sendo capazes de armazenar substâncias como estratégia de aumento da sobrevivência bacteriana, a exemplo de polihidroxicanoatos (PHAs) e ação antibiótica na rizosfera de plantas. Como exemplo podem ser citados, *Bacillus colistinus*, produtor da colistina; *B. brevis* (tirotricina); *B. licheniformis* (gramicidinas); *B. polymyxa* (polimixina). *Bacillus subtilis*, além de ação antibiótica relacionada com a secreção de compostos do grupo iturin, também pode sintetizar fitohormônios e antifúngicos; bactérias são capazes de apresentar versatilidade metabólica que permitam superar flutuações das condições químicas ambientais, sendo as inclusões de armazenamento de substâncias outra estratégia que aumenta a sobrevivência bacteriana (MUELLER *et al.*, 1999; ARAUJO *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2009; BAHIA, 2014).

A compreensão do papel de microrganismos no meio ambiente fornece subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, de projetos em agricultura sustentável e de programas de desenvolvimento industrial. A maneira mais eficiente de conservar microrganismos de



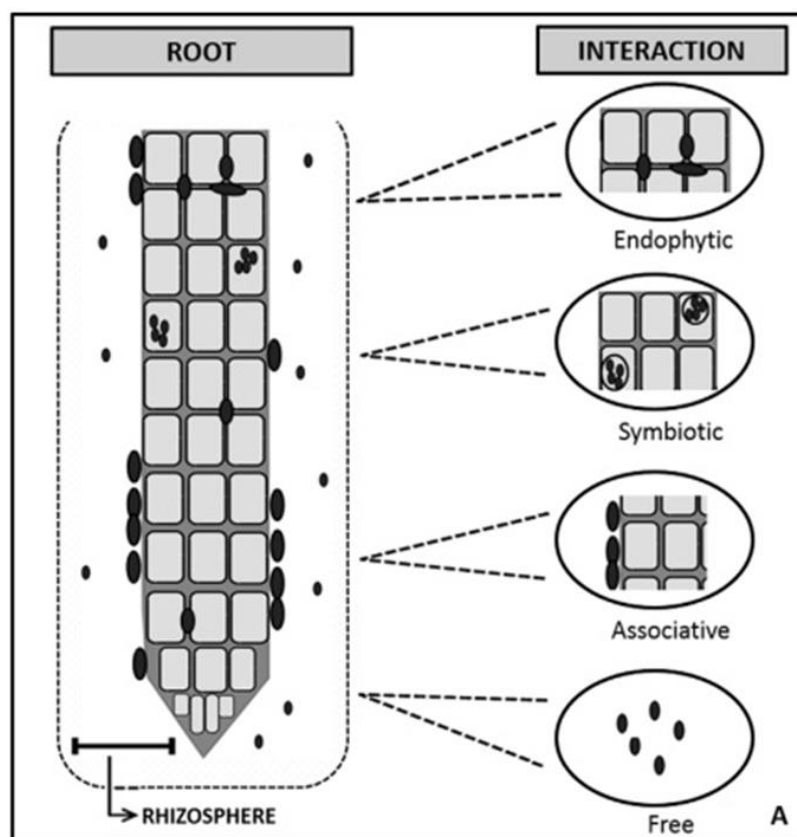
importância econômica é a preservação em coleções. Assim como da necessidade de se poder dispor do microrganismo a qualquer momento, quer para fins experimentais, quer para trabalhos de rotina ou para atendimento a solicitações de outros pesquisadores, para fins didáticos, para estudos comparativos, etc. Desta forma, a preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfo/fisiológicas. Entre as várias formas de armazenar o patrimônio genético é possível descrever duas categorias: a preservação *in situ* (no local de origem) e a preservação *ex situ* (fora do local de origem). A importância da conservação ex-situ de recursos genéticos microbianos, vegetais e animais já é reconhecida como sendo uma prática indispensável ao desenvolvimento da ciência e tecnologia em diversos setores de importância sócio-econômica. Várias coleções de culturas encontram-se estocadas em bacteriotecas distribuídas pelo mundo, com a função primordial de preservar as características genéticas e morfofisiológicas de coleções microbianas (CANHOS, 1994; GERHARDT, 1994; ABREU & TUTUNJI, 2004; ANJOS *et al.*, 2012).

## 1.2 Interações bacterianas

De acordo com Moreira *et al.* (2010) as bactérias podem realizar diferentes associações com raízes de plantas. Essas interações podem ser de forma simbiótica, endofítica, associativa ou livre. Na interação simbiótica com leguminosas, há na maioria das vezes a formação de nódulos, uma estrutura diferenciada no tecido da raiz que ocorre após a infecção da bactéria na espécie vegetal hospedeira. Já as bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno, entre outros; as bactérias de vida livre, quando no solo, utilizam o N<sub>2</sub> fixado em seu próprio benefício, ou seja, na manutenção de seu metabolismo; quando endofiticamente, auxiliam a espécie hospedeira em seu desenvolvimento não causando danos à mesma, estabelecendo uma relação positiva para ambas. (BALDANI *et al.*, 1996; MOREIRA, 2010; PINTO, 2017).

Bactérias que crescem próximo ou associadas às raízes, sendo estimuladas pelos exsudados radiculares, são chamadas rizobactérias. Dentre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), estão as do gênero *Pseudomonas* spp. são as mais bem

estudadas. Isto se deve, principalmente, à sua grande capacidade de suprimir patógenos de solo, à sua ocorrência de forma natural e em elevadas populações, ao fato de serem nutricionalmente versáteis e possuírem habilidade de crescer numa ampla faixa de condições ambientais, além de produzirem uma grande variedade de antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento vegetal. As rizobactérias do grupo fluorescente (*P. fluorescens-putida*) possuem um versátil metabolismo, podendo utilizar vários substratos liberados pelas raízes e também moléculas xenobióticas que atingem a rizosfera (DANTAS *et al.*, 2009; FAGOTTI *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Rizosfera/interações bacterianas. Diferentes tipos de associação entre raízes de plantas e bactérias benéficas do solo. Modificado. Fonte: Souza *et al.* 2015.

### 1.3 *Brachypodium* spp.

Braquipódio (*Brachypodium* spp.) é uma planta herbácea, perene, monocotiledônia da família das gramíneas (Poaceae) de aproximadamente 70 cm de altura, de crescimento erecto, formando tufos dos quais despontam inflorescências dispostas em panícula de ramificações alternas (uma folha por nó) e glabras, que se enroscam em torno da ráquis quando secas. Seu pedicelo é curto. Nativo das regiões temperadas da Eurásia, África e América Latina sua distribuição ocorre no mundo todo, inclusive na Região Mediterrânea onde se encontra Israel, em locais como matagais e margens de estradas. São hemicriptófito (plantas bienais ou as perenes cuja parte aérea morre anualmente). Não possuem espinhos (ausência de espinhos) e não são suculentas. Trata-se de um gênero glicófito (tolerante ao sal). Este gênero é classificada como sinantropo, ou seja, seu crescimento e encontrado próximo onde houve colonização humana. Ausência de estípula e são hermafroditas. A floração ocorre no período de maio-julho (SCHOLTHOF *et al.*, 2018; FLORA OF ISRAEL, 2022).

O gênero *Brachypodium* representa um sistema modelo utilizado na busca do conhecimento da biologia de gramíneas como o trigo (*Triticum aestivum*) e a cevada (*Hordeum vulgare*) - que são culturas de pequenos grãos cruciais usadas em todo o mundo para a produção de alimentos, forragem e ração, devido as suas características como: ser diploide, anual, auto-fértil, ciclo de vida curto da semente (~8 semanas), facilidade de cruzamento para experimentos genéticos, facilidade de crescimento em condições de laboratório, amplamente suscetível a micróbios vegetais, possuir taxonomia evolutiva de espécies, tamanho pequeno do genoma, sintenia (conservação de blocos de ordem dentro de dois conjuntos de cromossomos que estão sendo comparados entre si) com grãos grandes/ pequenos (trigo, milho, milho, arroz, cevada), genoma completo, transcriptoma, linhas puras, mutantes (marcadores, polimorfismo de nucleotídeo único, inserções de T-DNA, suscetível a CRISPR), recursos da comunidade (sementes, ferramentas, bancos de dados genômicos). Um exemplo é a espécie *Brachypodium distachyon*, uma planta C3 que está distribuída em todo o mundo. *B. distachyon* tem um genoma pequeno, ciclo de vida curto e pequena estatura e é passível de transformação genética. Além disso, as espécies de *Brachypodium* mantiveram sua natureza selvagem, fornecendo um tesouro de recursos para pesquisadores de ecologia de plantas estudarem as plantas *in situ* (SCHOLTHOF *et al.*, 2018).



**Figura 2.** *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P.Beauv. Fonte: Flora of Israel.

## **2. OBJETIVO**

Isolar colônias bacterianas associadas a raízes de plantas do gênero *Brachypodium* amostradas em diferentes regiões de Israel para identificá-las visando a obtenção de coleção de cultura bacteriana e, depois usá-las como comunidades sintéticas para modular o crescimento das raízes. Braquipódio (*Brachypodium*) é considerada uma planta modelo e é adaptada a regiões com diferentes condições climáticas, aumentando as chances da diversidade microbiana e intensificando o estudo da relação raiz-microorganismo em sistema controlado.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de estudo

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório da Dra. Elisa Korenblum, localizada no Ministério da Agricultura de Israel – Instituto Volcani, em Rishom Letzion, Israel (Figura 3).

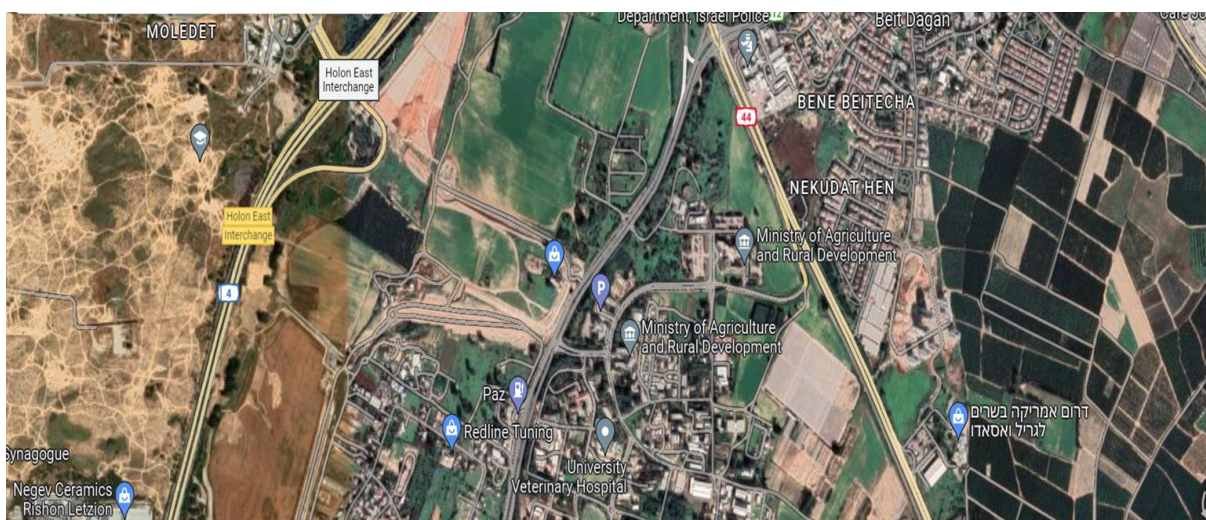


Figura 3. Mapa do Ministério da Agricultura de Israel, Instituto Volcani. Fonte: Google Maps.

#### 3.2. Coleta das amostras

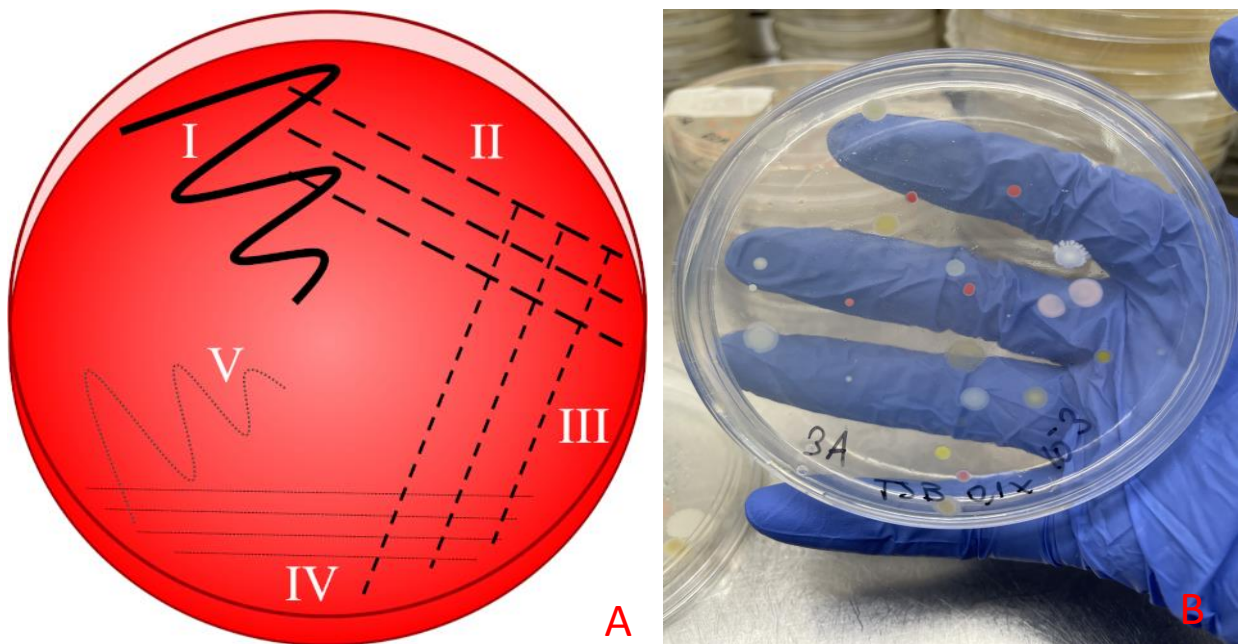
As amostras foram coletadas em sete diferentes regiões distribuídas no território israelense. São elas: Modiin (Distrito Central), Beit Shemesh (Jerusalem), Ofer forest (Haifa), Kochav Ha'Yarden (Galileia), Hamat Gader (Tiberias), Neve Yaar (Jerusalém) and Kiyriat Ata (Haifa) com três amostras por local de coleta, ou seja, ao todo foram 7 locais x 3 plantas =21 plantas no total.

#### 3.3. Processamento das amostras

Amostras de raízes de *Brachypodium* spp. foram retiradas diretamente do solo e dentro de 24-48h foram ressuspensas em tampão e sonicadas para coleta de bactérias da raiz.

### 3.4. Isolamento bacteriano

Isolamentos sucessivos foram realizados para obtenção de colônias puras. Utilizou-se da técnica de esgotamento por meio de estrias múltiplas (Figura 4A) em meio sólido com auxílio de alça bacteriológica. Esta técnica permite isolar colônias separadamente, de forma a identificá-las. As colônias bacterianas foram cultivadas em três meios, são eles: R2A ÁGAR, TSB - Trypticase Soy broth e East Extract Agar (YEM), com diferentes diluições, podendo ter tratamento sonicado ou não sonicado para a verificação do comportamento de crescimento. Os isolados receberam um código de identificação de acordo com a descrição seguinte: número de 1 a 7; letra de A a E; tipo de meio de cultura R2A, TSB ou YEM; diluição  $10^{-2}$ ,  $10^3$ ,  $10^{-4}$ ; sonicado ou não sonicado e, o número da colônia correspondente. Por exemplo: 3A TSB  $10^{-3}$  01 (Figura 4B).

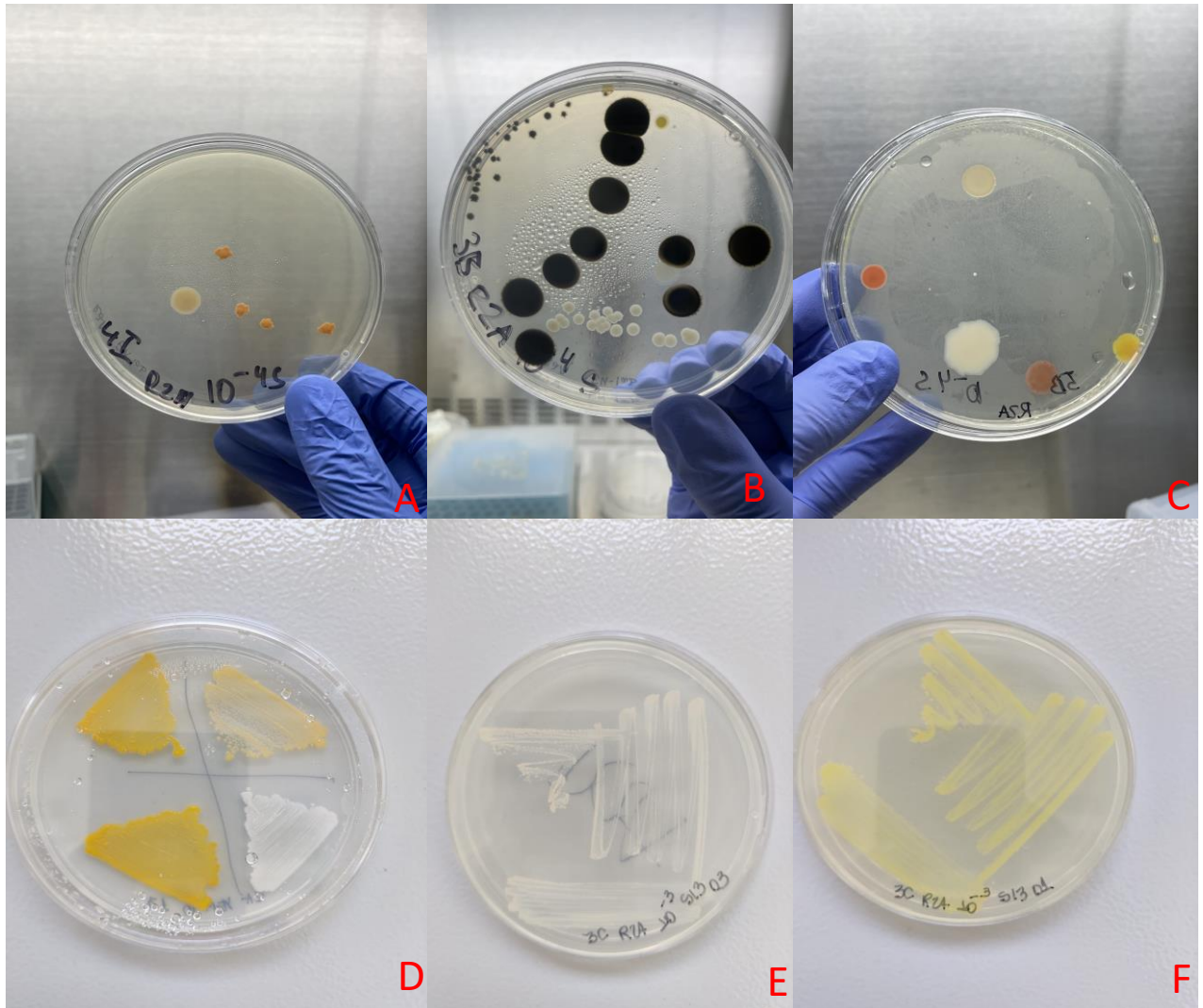


**Figura 4.** Ilustrações de técnica de esgotamento por estrias (A); Cultura bacteriana (B). Fonte: Google; Autora.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colônias de bactérias isoladas no primeiro estria foi de 2.344 (dois mil trezentos e quarenta e quatro) e no segundo estria foi de 2.778 (dois mil setecentos e setenta e oito). No total, foram contabilizadas 5.122 colônias (Tabela 1). Os dados foram obtidos a partir do preenchimento diário a medida que as bactérias foram isoladas. A identificação dessas colônias será realizada na próxima etapa que não faz parte deste relatório, com isso espera-se obter uma coleção de isolados bacterianos que serão utilizados como comunidades bacterianas sintéticas representando a comunidade natural de rizosfera de *Brachypodium*. Estas comunidades sintéticas serão utilizadas para estudar interação planta-microbioma visando modular o crescimento e metabolismo de plantas.

Segundo Riva *et al.* (2022) gêneros bacterianos cultiváveis comuns (Figura 5) a todos os diferentes compartimentos vegetais representaram 66% do total de registros na categoria raiz, 87% na categoria semente e 75% nas categorias folha e broto porcentagem de registros (0,50%) representa os gêneros bacterianos compartilhados entre todas as categorias e que também promovem o crescimento e biocontrole de doenças de plantas. Em suma, é sabido que ao longo das décadas houve o aumento nas estratégias de cultura desenvolvidas e a configuração de meios baseados em materiais vegetais podem ser fundamentais para enriquecer e isolar bactérias ainda não cultivadas espécies do microbioma vegetal.



**Figura 5.** Cultura bacteriana (A, B, C e D); Isolamento de colônias bacterianas pela técnica de esgotamento de estrias (E, F). Fonte Autora.



Localização	Planta	Média	Diluição	Tratamento	# Placa	# Colônias	Estágio
1	A	R2A	10exp-2		13	52	2 <sup>nd</sup> streak
1	A	TSB 0.1	10exp-2		13	52	2 <sup>nd</sup> streak
1	A	YEM	10exp-2		2	4	2 <sup>nd</sup> streak
1	A	R2A	10exp-2	sonicated	20	80	2 <sup>nd</sup> streak
1	A	TSB 0.1	10exp-2	sonicated	24	96	2 <sup>nd</sup> streak
1	A	YEM	10exp-2	sonicated	17	68	2 <sup>nd</sup> streak
						<b>352 total</b>	
1	B	R2A	10exp-2		3	12	2 <sup>nd</sup> streak
1	B	TSB 0.1	10exp-2		13	52	2 <sup>nd</sup> streak
1	B	YEM	10exp-2		3	12	2 <sup>nd</sup> streak
1	B	R2A	10exp-2	sonicated	19	76	2 <sup>nd</sup> streak
1	B	TSB 0.1	10exp-2	sonicated	23	92	2 <sup>nd</sup> streak
1	B	YEM	10exp-2	sonicated	17	68	2 <sup>nd</sup> streak
						<b>312 total</b>	
1	E	R2A	10exp-2		7	28	2 <sup>nd</sup> streak
1	E	TSB 0.1	10exp-2		7	28	2 <sup>nd</sup> streak
1	E	YEM	10exp-2		6	24	2 <sup>nd</sup> streak
1	E	R2A	10exp-2	sonicated	13	52	2 <sup>nd</sup> streak
1	E	TSB 0.1	10exp-2	sonicated	38	152	2 <sup>nd</sup> streak
1	E	YEM	10exp-2	sonicated	15	60	2 <sup>nd</sup> streak
						<b>344 total</b>	
2	B	R2A	10exp-2		7	28	2 <sup>nd</sup> streak
2	B	TSB 0.1	10exp-2		8	32	2 <sup>nd</sup> streak
2	B	YEM	10exp-2		10	40	2 <sup>nd</sup> streak
2	B	R2A	10exp-2	sonicated	20	80	2 <sup>nd</sup> streak
2	B	TSB 0.1	10exp-2	sonicated	18	72	2 <sup>nd</sup> streak
2	B	YEM	10exp-2	sonicated	20	80	2 <sup>nd</sup> streak
						<b>322 total</b>	
2	C	R2A	10exp-2		6	24	2 <sup>nd</sup> streak
2	C	TSB 0.1	10exp-2		15	60	2 <sup>nd</sup> streak
2	C	YEM	10exp-2		6	24	2 <sup>nd</sup> streak
2	C	R2A	10exp-2	sonicated	17	68	2 <sup>nd</sup> streak
2	C	TSB 0.1	10exp-2	sonicated	18	72	2 <sup>nd</sup> streak
2	C	YEM	10exp-2	sonicated	26	104	2 <sup>nd</sup> streak
						<b>352 total</b>	
2	E	R2A	10exp-2		6	24	2 <sup>nd</sup> streak
2	E	TSB 0.1	10exp-2		5	20	2 <sup>nd</sup> streak
2	E	YEM	10exp-2		6	24	2 <sup>nd</sup> streak
2	E	R2A	10exp-2	sonicated	26	104	2 <sup>nd</sup> streak
2	E	TSB 0.1	10exp-2	sonicated	8	32	2 <sup>nd</sup> streak
2	E	YEM	10exp-2	sonicated	39	156	2 <sup>nd</sup> streak
						<b>360 total</b>	

**Tabela 1.** Tabela exemplificando a obtenção de dados de colônias bacterianas por meio de isolamento. Fonte: Autora; Reuven.

## **5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA FUTURA**

A utilização de vários meios de cultivo é fundamental para a obtenção de uma coleção de isolados bacterianos diversos, ou seja, colônia que apresentam características morfológicas diferentes. Este ESO relata a etapa inicial da implementação da coleção de culturas bacterianas de rizosfera de *Brachypodium* spp., que será utilizada para projetos de comunidades sintéticas visando a compreensão da comunicação química entre rizobactérias e raízes de plantas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.M.V.; TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de cultura de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciência da Saúde**, v.2, n.2, p. 236-251, 2004.

ANJOS, T. V.; TEBALDI, N. D; FAGIANI, C. C. Coleção e preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Universidade Federal de Uberlândia. **Ciências Agrárias**, vol 6, N°1, 2012.

ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639- 1645, 2005.

BAHIA, P. P. Estudo de características de promoção de crescimento vegetal de rizóbios da coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. **Monografia. SEROPÉDICA**, 2014. 256p.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam n<sub>2</sub> atmosférico. **Comunicado Técnico**. Embrapa, n12, junho/96, p. 1-4.

CANHOS, V.P. Views of a developing country. In: KIRSOP, B., HAWKSWORTH, D.L. (Eds.). The biodiversity of microorganisms and the role of microbial resource centers. **World Federation for Culture Collections**, 1994. p. 45-52.

DANTAS, J. S.; de SOUZA, A. P.; de FARIAS, M. F.; NOGUEIRA, V. d F. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera Jussara Silva. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v2 n2 Mai.- Ago. Print-ISSN 1983-6325. 2009.

FAGOTTI, D. S. L.; CEREZINI, P.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico. **FERTBIO** - Maceió (AL), 17 a 21 de setembro - Resumo Expandido – Embrapa. 2012.

FLORA OF ISRAEL AND ADJACENT AREAS. **Analytical Flora**. By Prof. Avinoam Danin and Dr. Ori Fragman-Sapir. Disponível em: [.https://flora.org.il/en/en/](https://flora.org.il/en/en/). Acesso em: 20 set 2022.

GERHARDT, P.E. Methods for general and molecular bacteriology. Washington: **American Society for Microbiology**, 1994. 791p.

LYNCH, J. M. The Rhizosphere. **John Wiley & Sons**, New York. (1990).

MOREIRA, F. M, de Souza.; SILVA, K da.; NOBREGA, R, S, A.; CARVALHO, F de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Solo e Água . Comunicata Scientiae** 1(2): 74-99, 2010.

MUELLER, S.; BLEY, T.; BABEL, W. Adaptative responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry. **J. Biotechnol**, n. 75, p.81-97, 1999.

NEHRA, V.; CHOUDHARY, M. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. **Journal of Applied and Natural Science** 7 (1): 540 – 556 (2015).

PINTO, J. V. E. Caracterização e identificação de bactérias diazotróficas associativas oriundas de área de mineração de ferro / Juliana Volpi Emrich Pinto. - 2017. 59 p:il. **Dissertação** (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

RIVA, A.; MAPELLI, F.; BAGNASCO, A.' NENGONI,A.; BORIN, S. Meta-Analysis Approach to Defining the Culturable Core of Plant Endophytic Bacterial Communities. Minireview. **American Society for Microbiology**. Applied and Environmental Microbiology. Volume 88, 2022.

SCHOLTHOF, Karen-Beth. G.; IRIGOYEN. S.; CATALAN. P.; MANDADI, K.K. Brachypodium: A Monocot Grass Model Genus for Plant Biology. **The Plant Cell**, Vol. 30: 1673–1694, August 2018.

SOUZA, R. AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Review Article. **Genetics and Molecular Biology**, 38, 4, 401-419 (2015).