

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Predição metagenômica, isolamento e caracterização de bactérias
diazotróficas do solo de café arábica**

Cleidiana Vieira Guimarães
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

CLEIDIANA VIEIRA GUIMARÃES

**Predição metagenômica, isolamento e caracterização de bactérias
diazotróficas do solo de café arábica**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Marliane de C. S. da Silva

Coorientadores: Mateus Ferreira Santana
Lucas Louzada Pereira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G963p
2025
Guimarães, Cleidiana Vieira, 1999-
Predição metagenômica, isolamento e caracterização de
bactérias diazotróficas do solo de café arábica / Cleidiana Vieira
Guimarães. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (34 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marliane de Cássia Soares da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2025.
Referências bibliográficas: f. 26-34.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.326>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nitrogênio - Fixação - Efeito das bactérias. 2. Biologia
do solo. 3. Café - Efeito do nitrogênio. 4. Café - Efeito das
bactérias. 5. Marcadores genéticos. I. Silva, Marliane de Cássia
Soares da, 1982-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 572.545

CLEIDIANA VIEIRA GUIMARÃES

Predição metagenômica, isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas do solo de café arábica

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Cleidiana Vieira Guimarães
Autora

Marliane de Cassia Soares da Silva
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 22/05/2025 às 13:40:11 e pela orientadora em 23/05/2025 às 12:51:54. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **FC9A.OVVK.K1AP** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por nunca soltar minha mão.

A Universidade Federal de Viçosa.

A minha família, em especial aos meus pais Joelson Guimarães Lauriano e Lourdes Canal Vieira Lauriano, por sempre demonstrarem que a dor da saudade e da distância não seriam maiores que a felicidade em me ver realizando esse sonho. A minha orientadora, professora Marliane de Cássia Soares Silva, por ser tão compreensiva e paciente em todos os momentos, não medindo esforços para me explicar como tudo funcionava no universo da pós-graduação e pelos ensinamentos que levarei para a vida.

Aos meus amigos de longa data, em especial Bruna, Ana Claudia, Isabelli e Michel, por fazerem questão de me lembrarem sempre que eu seria capaz e aos amigos que foram anjos durante o mestrado, Bárbara, Tomás e Monalisa, que fizeram minha jornada ser mais leve e feliz.

Ao Laboratório de Associações Micorrízicas (LAMIC), pelos momentos inesquecíveis e pela oportunidade de conviver com excelentes profissionais e estudantes dedicados a ciência.

Ao querido produtor Sr. Paulo e a fazenda Casa Nova, pela oportunidade de parceria, contribuindo para minha formação acadêmica.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

GUIMARÃES, Cleidiana Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Predição metagenômica, isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas do solo de café arábica**. Orientadora: Marliane de Cassia Soares da Silva. Coorientadores: Mateus Ferreira Santana e Lucas Louzada Pereira.

Microrganismos diazotróficos ou promotores de crescimento de plantas (PGPR) contribuem para o fornecimento de nitrogênio assimilável (NH_4^+) as plantas. Investigações sobre esses grupos microbianos em culturas não leguminosas, como o café, oferecem insights promissores alinhados às demandas da agricultura de baixo impacto ambiental. Neste estudo, investigamos comunidades bacterianas associadas ao solo de duas fazendas produtoras de *Coffea arabica*. Realizou-se uma predição metagenômica de potenciais bactérias fixadoras de nitrogênio, com base nos genes estruturais *nifHDK*, *vnfHDK* e *anfHDK*, que codificam as isoformas Fe-Mo, Fe-V e Fe-Fe da nitrogenase. Paralelamente, foram realizados o isolamento, identificação molecular e testes *in vitro* com microrganismos cultiváveis dessas áreas. A análise metagenômica revelou a presença de táxons com genes de isoformas alternativas da nitrogenase no solo da Fazenda 2. Entre os gêneros isolados, destacaram-se *Priestia*, *Dyella*, *Streptomyces* e *Luteibacter*, com capacidade para fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios e solubilização de fosfato inorgânico. Os resultados indicam que a comunidade de bactérias diazotróficas do solo é dinâmica e que abordagens metagenômicas combinadas com o isolamento microbiano se complementam, permitindo não apenas a identificação de diversidade genética funcional latente, mas também a possibilidade de validação do potencial biotecnológico de diazótrofos de vida livre em cafeeiros.

Palavras-chave: Fixação Biológica de Nitrogênio; Predição funcional; Microbiota do Solo

ABSTRACT

GUIMARÃES, Cleidiana Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Metagenomic prediction, isolation and characterization of diazotrophic bacteria from Arabica coffee soil.** Adviser: Marliane de Cassia Soares da Silva. Co-advisers: Mateus Ferreira Santana and Lucas Louzada Pereira.

Diazotrophic or plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) contribute to the supply of assimilable nitrogen (NH_4^+) in plants. Studies on these microbial groups in non-leguminous crops, such as coffee, offer promising insights aligned with the demands of low-impact agriculture. In this study, we investigated bacterial communities associated with the soil of two *Coffea arabica*-producing farms. A metagenomic prediction of potential nitrogen-fixing bacteria was conducted based on the structural genes *nifHDK*, *vnfHDK*, and *anfHDK*, which encode the Fe-Mo, Fe-V, and Fe-Fe isoforms of nitrogenase, respectively. In parallel, cultivable microorganisms from these areas were isolated, identified molecularly, and subjected to in vitro tests. Metagenomic analysis revealed the presence of taxa harboring genes for alternative nitrogenase isoforms in the soil of Farm 2. Among the isolated genera, *Priestia*, *Dyella*, *Streptomyces*, and *Luteibacter* stood out for their abilities in biological nitrogen fixation, phytohormone production, and inorganic phosphate solubilization. The results indicate that the soil diazotrophic bacterial community is dynamic and that metagenomic approaches combined with microbial isolation are complementary, enabling not only the identification of latent functional genetic diversity but also the validation of the biotechnological potential of free-living diazotrophs in coffee cultivation.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation; Functional Prediction; Soil Microbiota

Sumário

Introdução	7
2. Materiais e Métodos	9
2.1 Local e amostragem	9
2.2 Extração de DNA total do solo, sequenciamento e análise de potenciais fixadoras de nitrogênio	10
2.3 Isolamento de bactérias diazotróficas	11
2.3.1 Extração de DNA, PCR e identificação de isolados	11
2.4 Caracterização fisiológica.....	12
2.4.1 Fixação biológica de Nitrogênio	12
2.4.2 Solubilização de Fosfato Inorgânico	12
2.4.3 Produção de Ácido Indol Acético (AIA).....	13
2.5 Análises estatísticas	13
3. Resultados	13
3.1 Predição metagenômica de potenciais bactérias fixadoras de nitrogênio	13
3.2 Identificação molecular e análise filogenética dos isolados bacterianos	16
3.3 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	19
3.4 Solubilização de Fosfato Inorgânico.....	19
3.5 Produção de Ácido Indol Acético	20
4. Discussão	21
4.1 Análise preditiva e isolamento microbiano	21
4.2 Testes fisiológicos dos isolados	24
5. Conclusão	25
Referências bibliográficas.....	26

Introdução

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de café (*Coffea* spp.), com uma área total de 2,25 Mha⁻¹ destinados a cultura (CONAB, 2025). Essa alta produtividade é decorrente do uso de fertilizantes minerais capazes de suprir as demandas fisiológicas da planta por nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) (MARTINEZ et al., 2014). O N é um constituinte crítico para a síntese de biomoléculas essenciais ao metabolismo do cafeeiro, como ATP, NADH, NADPH, ácidos nucleicos, proteínas, clorofila e outros compostos (SOUMARE et al., 2020), seguido pelo P, associado ao desenvolvimento do sistema radicular (SARDINHA et al., 2023; VINENT et al., 2023) e pelo K, vinculado a qualidade e quantidade dos grãos, sendo seu principal constituinte (OLECHNO et al., 2021).

Tradicionalmente, o café é cultivado como uma monocultura a pleno sol (KOUTOULEAS et al., 2022) apresentando ciclos fenológicos bianuais compostos por fases vegetativas e reprodutivas, com destaque a floração, enchimento dos grãos, frutificação e colheita (SALAMANCA-JIMENEZ; DOANE; HORWATH, 2017). Essas fases envolvem diferentes demandas por macro e micronutrientes (NETO et al., 2011), sendo altamente influenciadas por fatores ambientais e climáticos (KATH et al., 2023). Além disso, modulam a microbiota associada a planta a depender da composição química dos exsudatos radiculares liberados em cada estágio fenológico (MCLAUGHLIN et al., 2023).

Além dos desafios edafoclimáticos e econômicos que acometem a cafeicultura (BILEN et al., 2022; SIMMER et al., 2022), as exigências de ampliação das fronteiras agrícolas face a sustentabilidade fortalecem o crescente corpo da ciência voltado a compreensão, otimização e aplicação de microrganismos eficientes com foco no alinhamento da produtividade com as demandas globais pautadas no cuidado com o meio ambiente (DUONG et al., 2020; SANTOS; RIBEIRO; RODRIGUES, 2022).

Os cafeeiros são reservatórios de uma rede heterogênea de microrganismos (DOS SANTOS et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2013; VELOSO et al., 2023). Estima-se que, a endosfera da planta do café, assistida por microrganismos endofíticos desempenhando importantes funções, (OLIVEIRA et al., 2013), inclui microrganismos dos três domínios da vida, que se distribuem nos frutos (Sérgio et al., 2013; Vega et al., 2005), folhas (BONGIORNO et al., 2016; LI et al., 2022; SANTAMARÍA; BAYMAN, 2005) raízes ((FULTHORPE; MARTIN; ISAAC, 2020) e caule (VEGA et al., 2005). Essas diferentes

comunidades microbianas podem mitigar os efeitos das alterações climáticas (VELOSO et al., 2023), contribuindo para o crescimento (GAYATHRI et al., 2023), saúde e aptidão destas plantas (BEZ et al., 2023).

As bactérias diazotróficas, também conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR), desempenham múltiplos papéis no desenvolvimento das plantas de café, podendo atuar na biofertilização, através do aumento da disponibilidade de nutrientes essenciais como nitrogênio (N) e fósforo (P) (ANZUETO-HERÓN et al., 2023); no biocontrole, ao inibir patógenos transmitidos pelo solo (NUGUSE; KEJELA, 2024); e na fitoestimulação, através da produção de hormônios como auxinas e giberelinas (ASAD et al., 2023). Esse grupo específico de microrganismos é capaz de reduzir o dinitrogênio (N₂) em sua forma gasosa e convertê-lo em amônia (NH₄⁺) através do complexo multienzimático da enzima nitrogenase (KIM; REES, 1994) em um processo mundialmente conhecido como fixação biológica de nitrogênio (DIXON; KAHN, 2004; HOWIE et al., 2016); e estão presentes na cultura do café na forma de bactérias fixadoras de N de vida livre, presentes no solo, ou como bactérias associativas que habitam o interior dos tecidos vegetais, como a espécie *Acetobacter diazotrophicus* isolada das folhas (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997).

Apesar do reconhecimento das funções das bactérias diazotróficas e da explosão de dados metagenômicos associados ao café nos últimos anos (DE SOUSA; GUERREIRO-FILHO; MONDEGO, 2022; DUONG et al., 2020; PINO; ESPINOSA; CABRERA, 2023; VELOSO et al., 2020) estudos sobre esses táxons em plantações de café ainda são limitados, ressaltando a importância de nossa pesquisa para o avanço do conhecimento sobre essas interações, proporcionando importantes insights sobre a possibilidade de aplicação prática desses dados para a cafeicultura (BEZ et al., 2023).

As ferramentas atualmente utilizadas em análises *in silico* para identificação de potenciais diazotróficos geralmente se baseiam na detecção de um conjunto mínimo de genes associados à nitrogenase, incluindo os genes estruturais *nifHDK* e os genes biossintéticos *nifENB* (DOS SANTOS et al., 2012), ou na inferência funcional a partir do Amplicon de Sequências Únicas (ASVs) obtidas por meio da amplificação do gene 16S rRNA (BULLERGAHN et al., 2024)

Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar potenciais bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico de vida livre em solos de *Coffea arabica*, integrando análises preditivas baseadas em metagenômica, com métodos convencionais de isolamento microbiano. Trata-se de uma abordagem abrangente que combina estratégias dependentes

e independentes de cultivo de microrganismos (CALDWELL et al., 2015; KUTOS et al., 2024; ZHAO et al., 2018) et al., 2018). Para isso, empregamos o sequenciamento metagenômico *shotgun* em amostras de solo provenientes de duas fazendas produtoras de café arábica e a partir dessa predição funcional foram conduzidas as etapas de isolamento, identificação molecular e testes *in vitro* com a fração cultivável dessas bactérias.

2. Materiais e Métodos

2.1 Local e amostragem

Foram realizadas duas amostragens de solo em duas propriedades produtoras de *Coffea arabica* localizadas no estado de Minas Gerais, Brasil (20°45'48.1"S; 42°33'59.5"W). As fazendas adotavam diferentes regimes de adubação (Figura 1), definidos com base em análises químicas de solo. A Fazenda 1 utilizava composto orgânico oriundo da compostagem de cama de galinha, associado à aplicação suplementar de ureia, dado que os teores dos demais macro e micronutrientes encontravam-se em níveis adequados. Por sua vez, a Fazenda 2 adotava um regime de adubação mineral formulado na proporção 25-05-20 (N:P:K) e realizava a aplicação de calcário para a correção da acidez do solo.

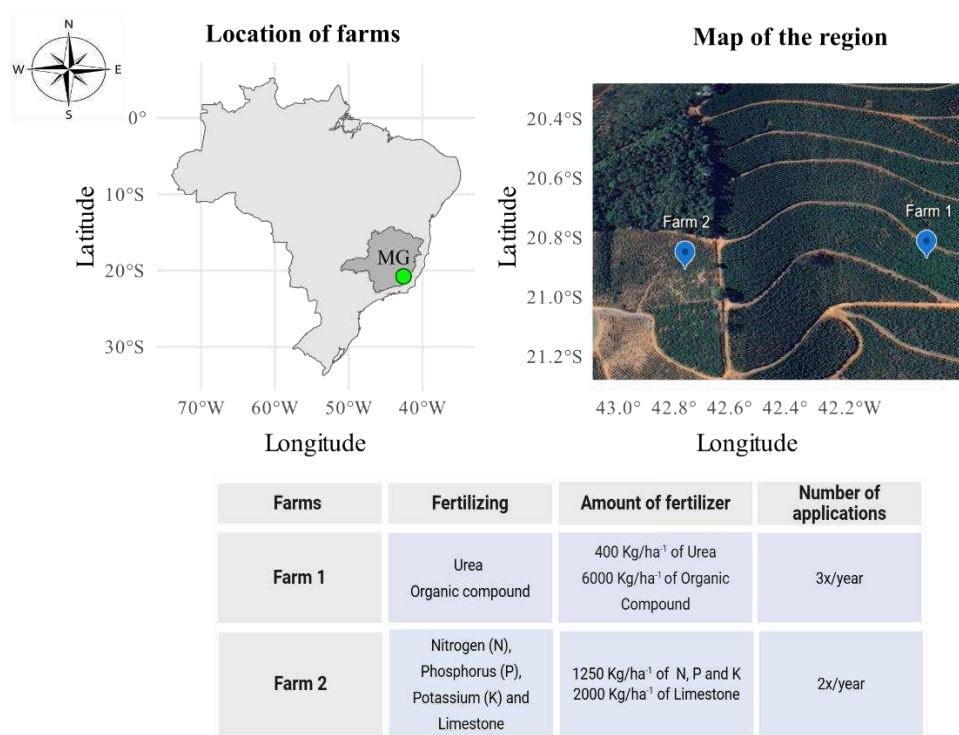


Figura 1 – Localização geográfica das duas fazendas produtoras de café arábica e seus respectivos regimes de adubação anuais.

A primeira coleta de solo, destinada à extração de DNA, sequenciamento da região 16S rDNA e análises preditivas, foi conduzida no período de safra, no mês maio de 2023?). Foram obtidas 10 amostras compostas por propriedade (n = 20 no total). Cada amostra composta foi coletada a partir de 10 pontos com 5 plantas e em cada planta foram amostrados 3 pontos ao redor da barra do café (40 cm do tronco das plantas) na profundidade de 0–10 cm e a, conforme metodologia descrita por (VELOSO et al., 2020).

Para o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio, foi realizada uma segunda coleta de solo durante a fase de floração, em novembro de 2023, adotando os mesmos parâmetros de amostragem, no entanto, foi obtida uma única amostra composta por propriedade, a partir da junção das amostragem dos 10 pontos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, armazenadas em gelo durante o transporte e, ao chegarem ao laboratório, seguiram para o isolamento.

2.2 Extração de DNA total do solo, sequenciamento e análise de potenciais fixadoras de nitrogênio

O DNA total das 10 amostras de solo foi extraído utilizando 250 mg de solo, provenientes de cada fazenda, com o auxílio do Nucleo Spin Soil Kit (Macherey Nagel, GmbH & Co. KG, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi empregado em uma PCR (polimerase chain reaction) para amplificação do gene 16S do rDNA utilizando os primers 341F (5'CCTAYGGGRBGCASCAG-3')/806R(5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') (CALLAHAN et al., 2016). Para confirmar a presença e qualidade do DNA extraído e dos produtos de PCR, foram aplicadas as técnicas de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio sob luz UV. Uma câmera digital foi utilizada para avaliar as bandas. O preparo das bibliotecas e sequenciamento foram realizados pela empresa Novo Gene utilizando a plataforma Illumina NovaSeq6000 com leituras pareadas de 250 pb.

Para a predição funcional de potenciais bactérias fixadoras de nitrogênio (PNFB), as leituras obtidas do sequenciamento (reads) foram submetidas a anotação taxonômica usando a ferramenta Kraken2 (Wood et al., 2019) e o banco de dados PlusPF (versão 04/09/2024). Do total de 2387 espécies procarióticas anotadas, 314 potenciais fixadoras foram selecionadas com base nos grupos taxonômicos presentes no banco de dados de bactérias fixadoras NFixDB (BELLANGER et al., 2024).

Para estas espécies selecionadas, o proteoma anotado de cada uma das potenciais fixadoras foi baixado do banco de dados RefSeq do NCBI. Inicialmente as sequências foram alinhadas usando o algoritmo Clustal Omega e o arquivo alinhado usado para construir o perfil baseado em modelos ocultos de Markov (HMMs) usando o algoritmo hmm build. Por fim, o perfil HMM criado foi utilizado para busca no banco de dados NFixDB usando a ferramenta hmmsearch para avaliar quais dos três tipos de nitrogenase cada espécie apresenta em seu genoma, i.e: (1) nitrogenase de ferro-molibdênio (genes *nifH*, *nifD* e *nifK*), (2) nitrogenase de ferro-vanádio (genes *vnfH*, *vnfD* e *nifK*) e (3) nitrogenase de ferro-ferro (genes *anfH*, *anfD* e *anfK*). Os arquivos de saída foram inspecionados manualmente para eliminar qualquer resultado falso-positivo.

2.3 Isolamento de bactérias diazotróficas

Para obtenção de bactérias fixadoras de Nitrogênio, 10g de cada amostra composta de solo foi suspensa em 90 mL de NaCl 0,85% e agitada a 140 rpm, por 40 min. Diluições decimais seriadas de 10^{-1} à 10^{-4} foram realizadas em triplicata, a partir de 1mL da suspensão inicial. Alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram inoculadas por plaqueamento em superfície nos meios LGI e JMV (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1996), isentos de Nitrogênio. As placas foram incubadas a 28 °C por 5 dias e as colônias que apresentaram diferenças morfológicas foram isoladas por meio de estrias compostas em seus respectivos meios, até que estivessem totalmente purificadas.

2.3.1 Extração de DNA, PCR e identificação de isolados

As culturas isoladas foram inoculadas em meios LGI e JMV (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1996) e incubadas em câmara de crescimento a 28 °C por 5 dias. Três colônias foram transferidas para tubos contendo beads de cerâmica (0.4 mm de diâmetro) e o DNA extraído usando o Kit Nucleospin Soil MN®.

Uma PCR foi realizada utilizando 5 μ L de tampão, 2 μ L de magnésio 25 mM, 1 μ L dNTP 10 mM, 1 uL dos primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') a 5 mM, 0.15 μ L de Taq polimerase e 1 μ L contendo 1 ng/ μ L de DNA genômico. O programa utilizado foi: desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min, seguida por 35 ciclos de uma desnaturação a 95 °C (30 s), anelamento 55 °C (30 s), extensão 72 °C (30 s), e extensão final a 72 °C durante 5 min. Os produtos da amplificação foram sequenciados em sequenciador automático utilizando

eletroforese capilar. As sequências das fitas senso e antisenso foram montadas utilizando o programa Geneious[®] e identificadas por filogenia com sequências de referência do banco de dados RefSeq do NCBI.

2.4 Caracterização fisiológica

Para cada isolado bacteriano obtido de ambos os solos, foram realizados ensaios fisiológicos *in vitro* para avaliação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indolacético (AIA). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por isolado.

2.4.1 Fixação biológica de Nitrogênio

A avaliação da fixação biológica de nitrogênio foi realizada em tubos de cultura contendo 10 mL de meio semi-sólido NFb, isento de nitrogênio. As culturas foram incubadas a 28 °C por 72 horas. Após o período de incubação, a formação de uma película superficial e a alteração da coloração do meio foram consideradas indicativos positivos da capacidade de fixação de nitrogênio, conforme descrito por (BODDEY et al., 1995).

2.4.2 Solubilização de Fosfato Inorgânico

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico pelos isolados bacterianos foi avaliada por meio da inoculação das culturas em placas contendo meio NBRIP suplementado com fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], conforme metodologia descrita por (NAUTIYAL, 1999). As culturas foram incubadas por 8 dias, e, ao término do período, o índice de solubilização (IS) foi determinado pela razão entre o diâmetro total (colônia + halo de solubilização, em mm) e o diâmetro da colônia (mm). A classificação da capacidade de solubilização foi realizada de acordo com a escala sugerida por (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), considerando baixa capacidade ($\text{IS} = 2$), capacidade média ($2 < \text{IS} \leq 3$) e alta capacidade ($\text{IS} > 3$). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por isolado.

2.4.3 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

A produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados bacterianos foi quantificada a partir do cultivo em meio líquido Tryptic Soy Broth (TSB) diluído a 10%, suplementado com L-triptofano (5 mM). As culturas foram incubadas no escuro, a 28 °C, sob agitação constante a 120 rpm, por 144 horas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 6 minutos. Em seguida, 900 µL do sobrenadante foram transferidos para cubetas, aos quais se adicionaram 400 µL do reagente de Salkowski, conforme descrito por (BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, 1991). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, e posteriormente as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 520 nm. A quantificação do AIA foi realizada com base em uma curva padrão construída a partir de diferentes concentrações de AIA comercial.

2.5 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao índice de solubilização de fosfato inorgânico e à produção de ácido indolacético ($\mu\text{g mL}^{-1}$) foi realizada considerando o delineamento inteiramente casualizado (DIC), para todos os isolados. Para a comparação das médias, aplicou-se o teste de agrupamento de Scott-Knott, a um nível de significância de 5%, visando à identificação de diferenças estatisticamente significativas entre os isolados.

3. Resultados

3.1 Predição metagenômica de potenciais bactérias fixadoras de nitrogênio

Os reads foram identificados pela ferramenta Kraken2 (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019) a partir do banco de dados Core_nt do NCBI. A pesquisa inicial incluiu 314 espécies de bactérias e arqueas, consideradas potenciais fixadoras de nitrogênio, com base em suas assinaturas taxonômicas. Em seguida, foi realizada uma busca no proteoma completo de todas as linhagens selecionadas, utilizando perfis de HMM (Hidden Markov Models) pré-construídos para as proteínas estruturais dos três tipos de isoformas de nitrogenase: Fe-Mo, Fe-V e Fe-Fe, codificadas pelos genes *nifHDK*, *vnfHDK* e *anfHDK*, respectivamente. Após essa análise, 40 espécies apresentaram sequências semelhantes a esses genes estruturais. As 10 espécies

potencialmente fixadoras em maior abundância em cada solo, são apresentadas na figura 2.

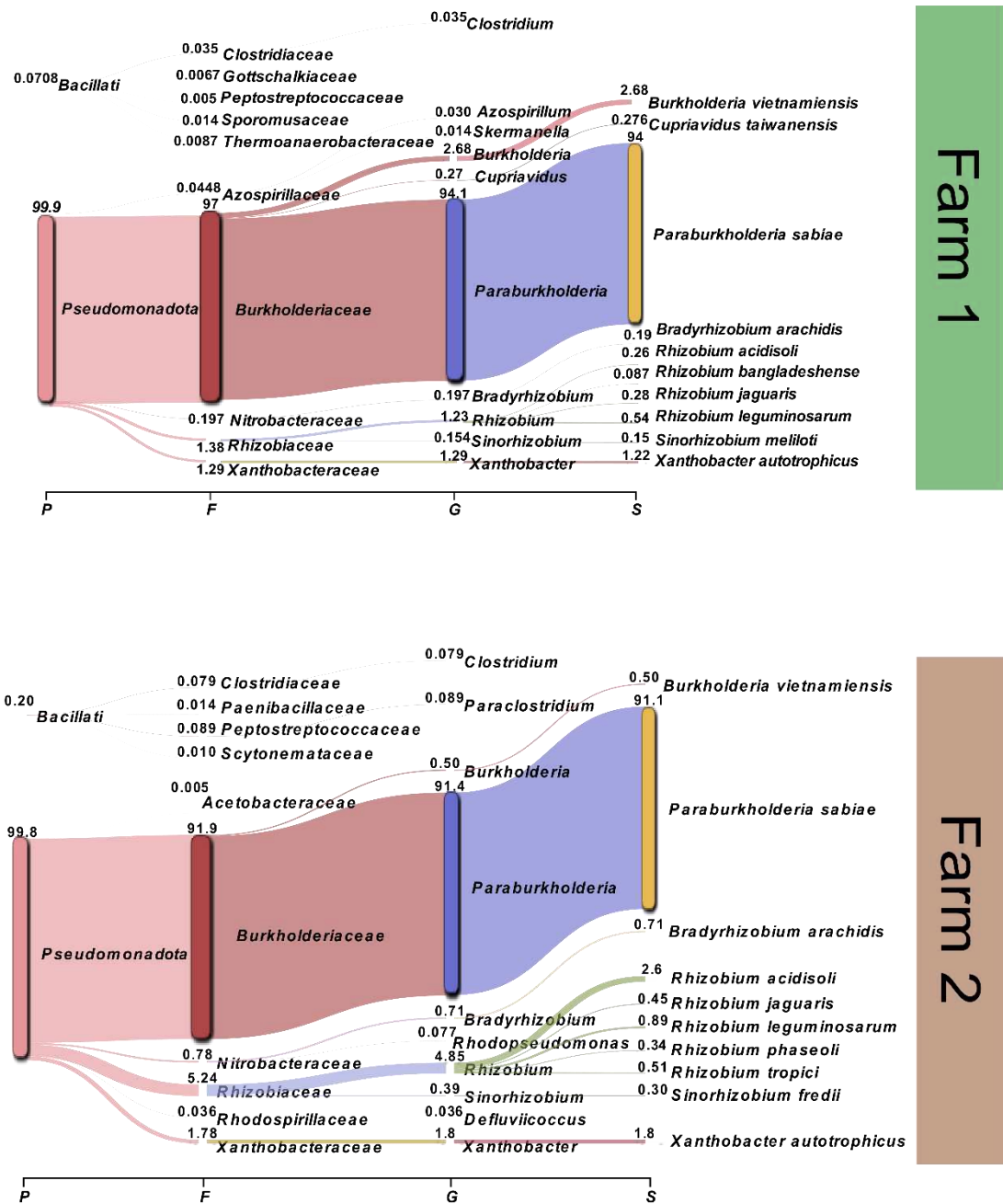


Figura 2. Diagrama de Sankey gerado pelo software Pavian, representando os táxons microbianos de potenciais bactérias fixadoras de nitrogênio com maior abundância relativa nos dois solos, conforme estimativas obtidas por meio da classificação taxonômica realizada pelo Kraken2. As categorias taxonômicas estão representadas como: P – Filo, F – Família, G – Gênero e S – Espécie.

Foram identificados quarenta táxons de potenciais bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) mais abundantes em ambos os solos (Figura 2). Dentre esses, dezessete espécies foram comuns aos dois tipos de adubação, enquanto quatorze espécies foram exclusivas do solo da fazenda 2 (TO) e nove do solo da fazenda 1 (TC) (Figura 3).

Ambos os solos apresentaram elevada abundância da família Burkholderiaceae (Filo: *Pseudomonadota*), com destaque para o gênero *Paraburkholderia* (94,1%) e a espécie *Paraburkholderia sabiae* (94%). No solo da Fazenda 1, além de *Paraburkholderia*, os principais gêneros identificados foram *Burkholderia* (2,68%), *Rhizobium* (1,23%), *Cupriavidus* (0,27%), *Bradyrhizobium* (0,197%), *Sinorhizobium* (0,154%) e *Xanthobacter* (1,29%) (Figura 2). De maneira similar, na Fazenda 2, destacaram-se *Rhizobium* (4,85%), *Bradyrhizobium* (0,71%), *Xanthobacter* (1,8%), *Burkholderia* (0,50%) e *Sinorhizobium* (0,39%) (Figura 2).

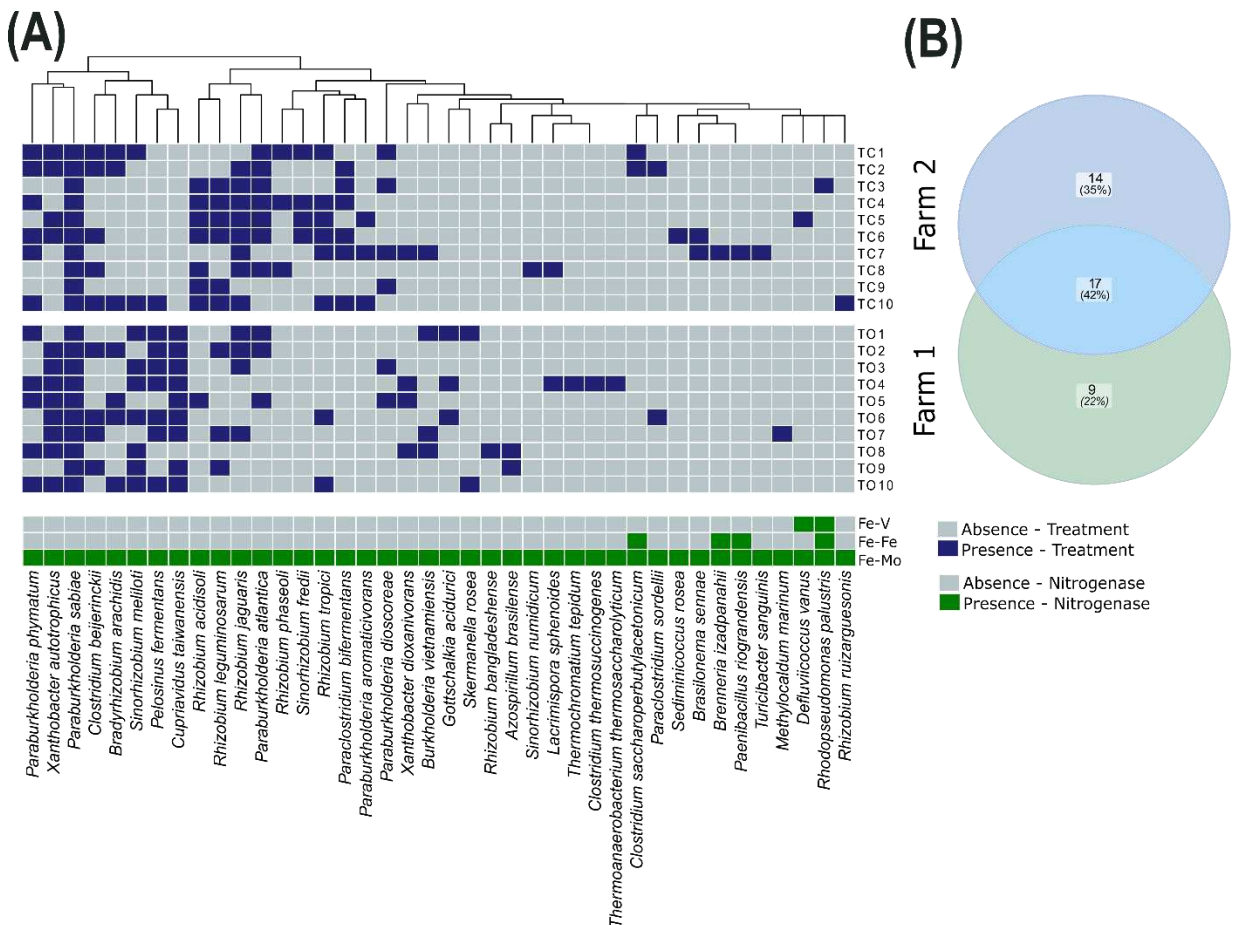


Figura 3. (A) Heatmap representando as 40 espécies potencialmente fixadoras de nitrogênio identificadas nas duas fazendas, indicando a presença ou ausência dos genes estruturais *nifHDK*, *vnfHDK* e *anfHDK*, que codificam, respectivamente, as isoformas

Fe-Mo, Fe-V e Fe-Fe da enzima nitrogenase. (B) Diagrama de Venn ilustrando o número de táxons compartilhados e exclusivos de cada propriedade.

3.2 Identificação molecular e análise filogenética dos isolados bacterianos

Foram obtidas 38 culturas puras de organismos diazotróficos, as quais foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido indolacético (AIA) e capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. A caracterização taxonômica dos isolados foi realizada por meio do sequenciamento da região 16S rDNA. Dentre os 38 isolados, 34 foram identificados com base na análise de similaridade com espécies depositadas no banco de dados NCBI GenBank.

Uma árvore filogenética foi construída utilizando o método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood) com o modelo evolutivo de Tamura-Nei, empregando 1000 repetições de bootstrap, no software MEGA versão 11.0.03. As sequências do gene 16S rRNA foram alinhadas, resultando em 1593 posições para a análise de 38 sequências de nucleotídeos para os isolados do solo da fazenda 1 (Figura 5). O alinhamento dos isolados da fazenda 2 compreendeu 27 sequências de nucleotídeos, totalizando 1599 posições inequívocas (Figura 4). A sequência de *Lactococcus garvieae*^T foi utilizada como táxon externo para o enraizamento das árvores.

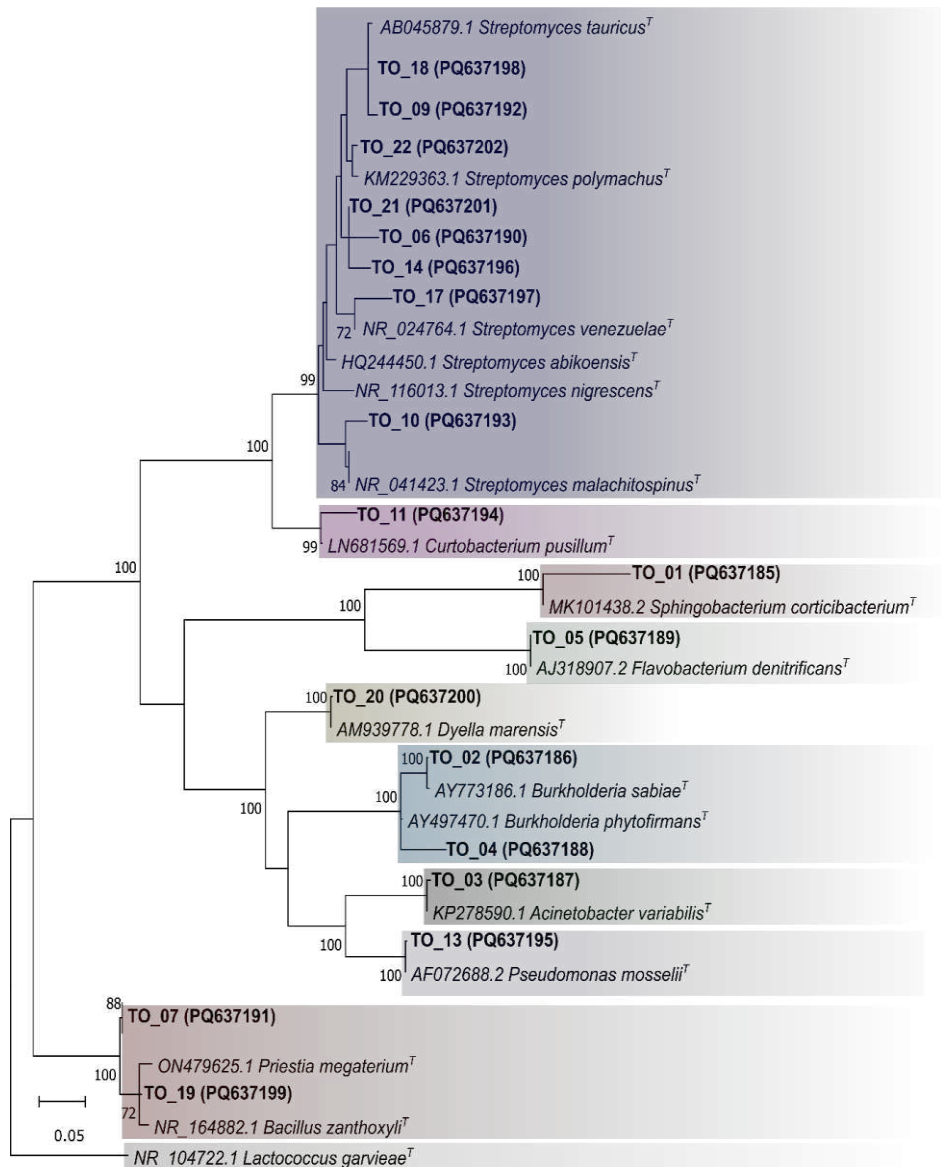


Figura 4. Árvore filogenética dos isolados de bactérias diazotróficas provenientes do solo da fazenda 1. Os isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito. A primeira parte do texto corresponde ao código do isolado bacteriano, enquanto a segunda parte indica o código de acesso da sequência no GenBank. As espécies anotadas com o sufixo sobrescrito "T" indicam que se tratam de sequências de isolados tipo para cada espécie.

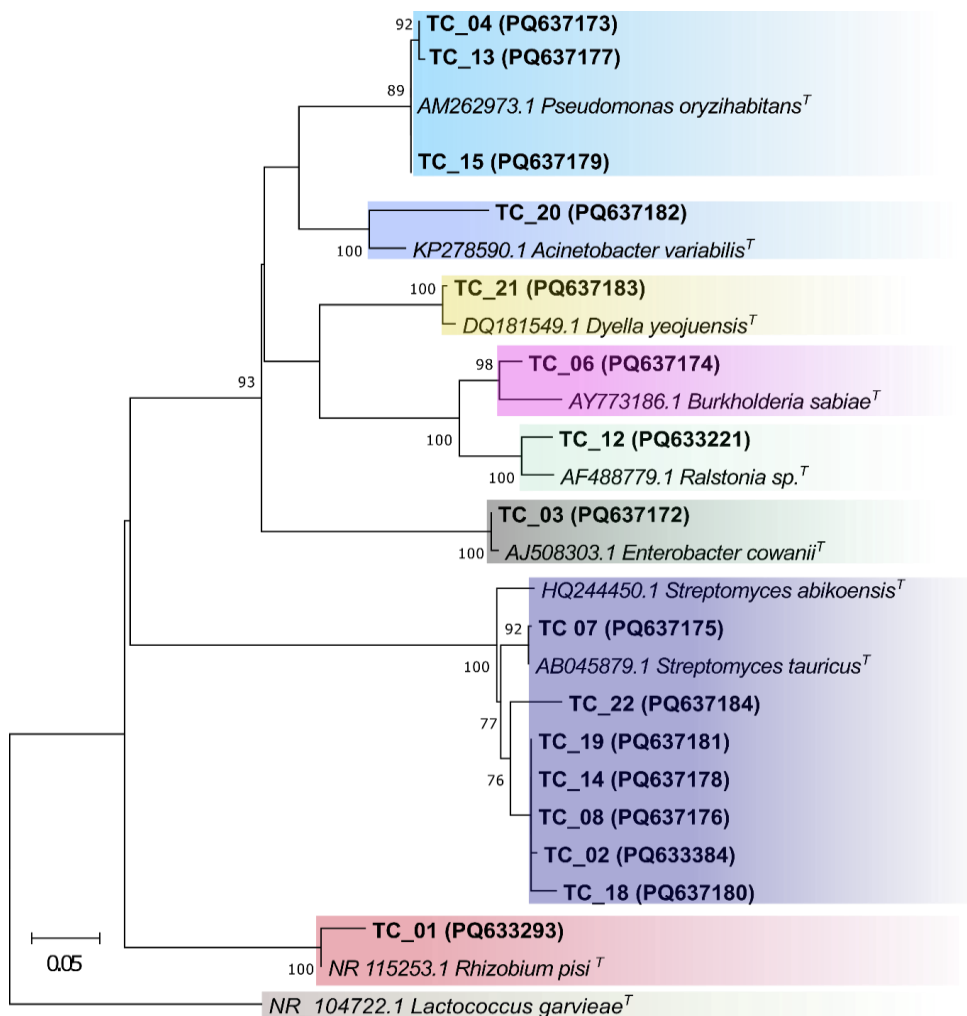


Figura 5. Árvore filogenética dos isolados de bactérias diazotróficas provenientes do solo da fazenda 2. Os isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito. A primeira parte do texto corresponde ao código do isolado bacteriano, enquanto a segunda parte indica o código de acesso da sequência no GenBank. As espécies anotadas com o sufixo sobrescrito "T" indicam que se tratam de sequências de isolados tipo para cada espécie.

O filo mais abundante em ambos os solos foi *Pseudomonadota*, seguido por *Actinomycetota*, enquanto os filós *Bacillota* e *Bacteroidota* foram identificados apenas no solo da fazenda 1. Os gêneros identificados foram: *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., *Burkholderia* sp., *Priestia* sp., *Flavobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Curtobacterium* sp., e *Dyella* sp., no solo da fazenda 1, e: *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Ralstonia* sp., *Acinetobacter* sp., *Luteibacter* sp., *Kasakonia* sp., e *Rhizobium* sp., foram os táxons presentes no solo da Fazenda 2.

3.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Dos 19 isolados provenientes do solo que utilizada também a adubação orgânica (fazenda 1/TO), oito apresentaram resultados negativos para o teste de fixação biológica de nitrogênio, destacando-se isolados dos gêneros *Flavobacterium* sp., *Streptomyces* sp., *Curtobacterium* sp., *Bacillus* sp. e *Dyella* sp. Para o solo com adubação totalmente química (fazenda 2/TC), dez isolados dos gêneros *Streptomyces* sp., *Acinetobacter* sp. e *Ralstonia* sp. também apresentaram resultados negativos (Tabela 1).

Tabela 1. Teste de Fixação Biológica de Nitrogênio em meio Nfb dos microrganismos isolados do solo da fazenda 1 (TO) e do solo da fazenda 2 (TC). Resultados positivos e negativos são representados, respectivamente, pelos caracteres “+” e “-”.

Microrganismo (TO)	Película (NFB)	Microrganismo (TC)	Película (NFB)
<i>Sphingobacterium</i> sp.(TO_01)	+	<i>Rhizobium</i> sp.(TC_01)	+
<i>Burkholderia</i> sp.(TO_02)	+	<i>Streptomyces</i> sp.(TC_02)	+
<i>Acinetobacter</i> sp.(TO_03)	+	<i>Kosakonia</i> sp.(TC_03)	+
<i>Burkholderia</i> sp.(TO_04)	+	<i>Pseudomonas</i> sp.(TC_04)	+
<i>Flavobacterium</i> sp. (TO_05)	-	<i>unidentified</i> (TC_05)	-
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_06)	-	<i>Burkholderia</i> sp.(TC_06)	-
<i>Priestia</i> sp.(TO_07)	+	<i>Streptomyces</i> sp.(TC_07)	-
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_09)	+	<i>Streptomyces</i> sp.(TC_08)	-
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_10)	+	<i>unidentified</i> (TC_09)	+
<i>Curtobacterium</i> sp.(TO_11)	-	<i>unidentified</i> (TC_10)	-
<i>unidentified</i> (TO_12)	-	<i>Ralstonia</i> sp.(TC_12)	-
<i>Pseudomonas</i> sp.(TO_13)	+	<i>Pseudomonas</i> sp.(TC_13)	+
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_14)	-	<i>Streptomyces</i> sp.(TC_14)	-
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_17)	+	<i>Pseudomonas</i> sp.(TC_15)	+
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_18)	+	<i>Streptomyces</i> sp.(TC_18)	+
<i>Priestia</i> sp.(TO_19)	-	<i>Streptomyces</i> sp.(TC_19)	-
<i>Dyella</i> sp.(TO_20)	-	<i>Acinetobacter</i> sp.(TC_20)	-
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_21)	+	<i>Luteibacter</i> sp.(TC_21)	+
<i>Streptomyces</i> sp.(TO_22)	-	<i>Streptomyces</i> sp.(TC_22)	-

3.4 Solubilização de Fosfato Inorgânico

Todos os gêneros isolados do solo da fazenda 1 demonstraram capacidade de solubilizar fosfato tricálcio, com *Streptomyces* sp. (TO_06), *Priestia* sp. (TO_07), *Flavobacterium* sp. (TO_05) e *Acinetobacter* sp. (TO_03) apresentando maior eficiência.

Na fazenda 2, *Streptomyces* sp. (TC_22), *Acinetobacter* sp. (TC_20) e *Pseudomonas* sp. (TC_13) se destacaram como as mais promissoras.

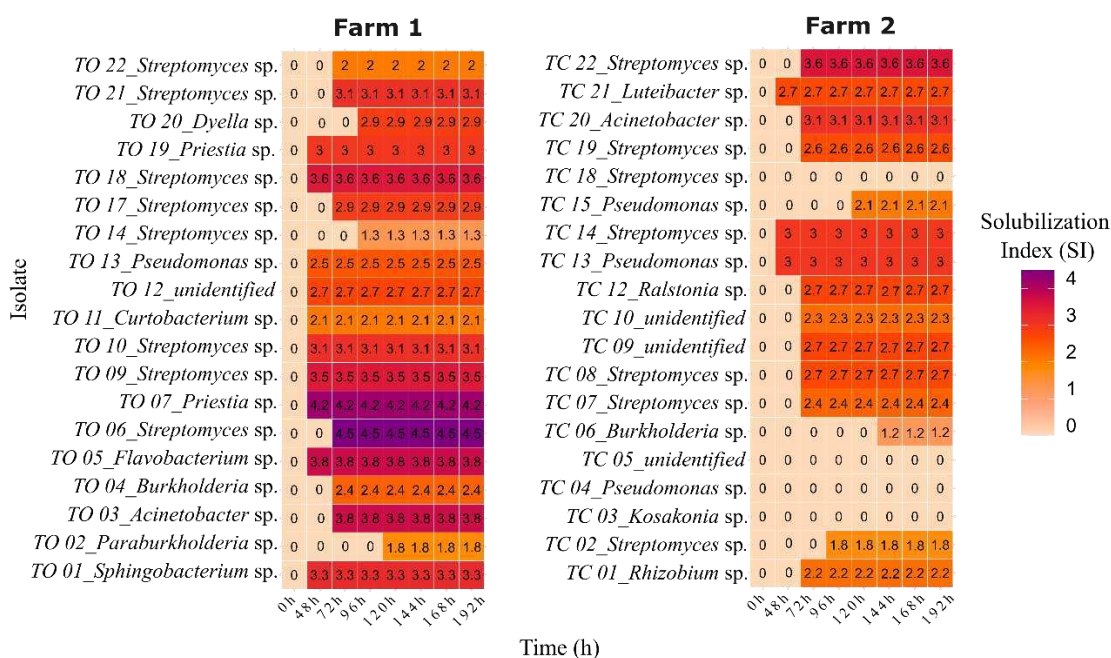


Figura 6 – Evolução do Índice de Solubilização de Fosfato (IS) dos isolados de bactérias diazotróficas do solo das Fazendas 1 (TO) e 2 (TC) ao longo de um período de oito dias.

É relevante destacar que o Índice de Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ variou de 1,0 a 3,5 para os táxons provenientes da Fazenda 2, indicando que a maioria dos isolados apresentou eficiência média, baixa ou ausência de capacidade de solubilização (Figura 6). Em contraste, a maioria dos isolados provenientes do solo da Fazenda 1 apresentou índices entre 2 e 4,5, com 10 isolados exibindo índices de solubilização iguais ou superiores a 3. Comparativamente, a Fazenda 2 apresentou apenas 4 isolados com desempenho semelhante, ou seja, dois isolados a menos.

3.5 Produção de Ácido Indol Acético

As amostras de solo coletadas nas duas fazendas de café representam importantes reservatórios de actinobactérias, com destaque para o gênero *Streptomyces*. Na Fazenda 2, *Streptomyces* sp. (TC_02) sintetizou 68,82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AIA, seguido por *Streptomyces* sp. (TC_14) com 63,84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e *Luteibacter* sp. (TC_21) com 58,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para o solo da Fazenda 1, os isolados *Priestia sp.* (TO_19), *Dyella sp.* (TO_20) e *Paraburkholderia sp.* (TO_02) se destacaram, com produções de 66,83 µg/mL, 60,40 µg/mL e 52,87 µg/mL de AIA, respectivamente (Figura 7).

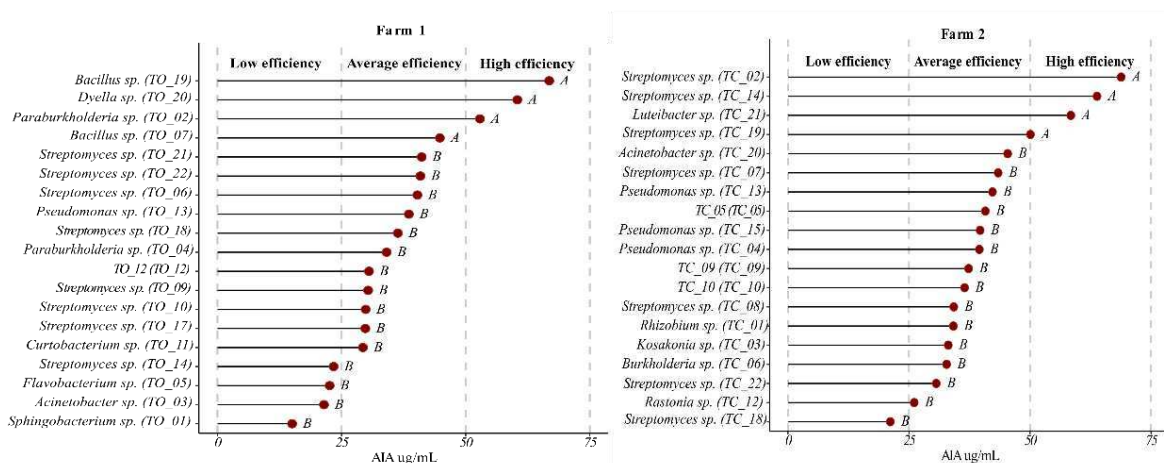


Figura 7 - Produção de ácido indol acético (ug/mL) pelos isolados de bactérias diazotróficas do solo da fazenda 1 (TO) e da fazenda 2 (TC). Isolados anotados com a mesma letra maiúscula (A ou B) ou com letras maiúsculas diferentes, apresentam respectivamente, médias idênticas e diferentes de produção de AIA.

4. Discussão

4.1 Análise preditiva e isolamento microbiano

Análises metagenômicas do solo revelam não apenas o potencial funcional latente e as capacidades metabólicas do microbioma local, mas também os genomas de táxons cultiváveis e não cultiváveis, constituindo uma abordagem molecular abrangente (WHITE et al., 2023). A investigação das sequências gênicas relacionadas às três isoformas da nitrogenase: Fe-Mo (*nif*), Fe-V (*vnf*) e Fe-Fe (*anf*), (ZHANG et al., 2023), permitiu a identificação de achados relevantes em nosso estudo.

Especificamente, as espécies *Brenneria izadpanahii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Paenibacillus riograndensis* e *Rhodopseudomonas palustris*, exclusivas da Fazenda 2, foram as únicas a apresentar genes codificadores da isoforma Fe-Fe da nitrogenase (Figura 3). Além disso, genes *vnfHDK*, associados ao uso de vanádio como cofator metálico na isoforma Fe-V, foram detectados em *Defluvicoccus vanus* e *R. palustris*, sugerindo um possível ajuste adaptativo a condições específicas. A

presença dessas múltiplas isoformas evidencia a plasticidade genômica e adaptativa dos microrganismos diazotróficos (SEPP et al., 2023).

Entretanto, apesar dessa diversidade funcional, as isoformas Fe-Fe e Fe-V são energeticamente menos eficientes: a primeira demanda cerca de 40 mols de ATP e a segunda 24 mols para a síntese de apenas 2 mols de amônia (ZHANG et al., 2023). Esse custo energético elevado pode limitar sua contribuição efetiva para a FBN em condições naturais. Além disso, a presença desses genes não garante redundância funcional, uma vez que a resiliência ecológica, essencial para a manutenção de funções sob estresse, pode não estar assegurada (GAO et al., 2024). Esta propriedade utiliza apenas adubação convencional em sua lavoura o que pode ser um dos motivos da presença dessas isoformas, já que práticas intensivas de adubação nitrogenada reduzem a abundância do gene *nifH* no solo, afetando negativamente as populações diazotróficas (WANG et al., 2017; ZHOU et al., 2021). Abordagens que se baseiam exclusivamente na detecção desse gene, no entanto, podem subestimar a diversidade funcional associada à FBN, ao ignorarem outros clusters como *vnf* e *anf*, conforme demonstrado neste estudo.

Quanto à estrutura taxonômica, os gêneros mais abundantes no diagrama de Sankey (Figura 2) incluem *Cupriavidus* e *Sinorhizobium*, ainda não descritos anteriormente na microbiota de plantas de café (BEZ et al., 2023). A família *Burkholderiaceae*, por outro lado, é amplamente relatada em *Coffea arabica*, por abrigar espécies versáteis, com potencial de fixação biológica de nitrogênio e promoção do crescimento vegetal (DE SOUSA; FILHO; MONDEGO, 2023; SILVA et al., 2020).

Embora a espécie *Burkholderia vietnamensis* (2,68%) - predominante na Fazenda 1 - e *Paraburkholderia sabiae*, abundante em ambas as propriedades, não tenham sido diretamente associadas ao café em estudos anteriores, apresentam características funcionais importantes. Ambas são diazotróficas, produzem compostos antimicrobianos e sideróforos, que aumentam a disponibilidade de ferro para as plantas, beneficiando o desempenho fisiológico do cafeeiro (DOS SANTOS et al., 2022; MENG et al., 2023; MORYA; SALVACHÚA; THAKUR, 2020).

Os resultados do isolamento bacteriano (Figuras 4 e 5) revelaram diferenças importantes em relação aos táxons previstos *in silico*. Ainda assim, foi observada certa correspondência entre ambas as abordagens: o gênero *Burkholderia* sp., anteriormente identificado como um dos mais abundantes na predição funcional, também foi isolado em amostras de solo de ambas as fazendas. Além disso, o gênero *Rhizobium* sp., isolado exclusivamente na Fazenda 2 (Figura 5), apresentou coerência com os dados preditivos,

reforçando a robustez da análise metagenômica em identificar táxons com potencial ecológico relevante.

Destaque maior deve ser atribuído ao isolamento de gêneros dos filos *Pseudomonadota* e *Actinomycetota*, documentados anteriormente em solos de café arábica da Colômbia e Peru (KUTOS et al., 2024). Ambos possuem táxons essenciais para a estrutura do solo e subsequente nutrição da planta do café, além de interagirem com comunidades fúngicas (CAO et al., 2023; NUGUSE; KEJELA, 2024; STOPNISEK et al., 2016). Os gêneros *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces sp.*, *Burkholderia sp.*, *Bacillus sp.*, e *Flavobacterium sp.*, estão relacionados a supressão de doenças em plantas (LUO; WANG; XU, 2023; WANG et al., 2013), além de constituírem o microbioma rizosférico do café arábica. Esses resultados fortalecem dados de estudos anteriores, uma vez que filo *Pseudomonadota*, cujo gênero *Pseudomonas sp.*, majoritariamente identificado em ambas as lavouras, também foi documentado por CALDWELL et al., (2015) como o gênero com maior número de unidades taxonômicas operacionais (OTU's), provenientes de sequenciamento de última geração de amostras de solo rizosférico de café. O gênero *Luteibacter*, previamente detectado em *Coffea canephora* (DUONG et al., 2021) e na filosfera de *C. arabica* (OGATA-GUTIÉRREZ et al., 2024), também foi isolado neste estudo, ampliando o conhecimento sobre sua funcionalidade no solo cafeeiro.

Estudos anteriores revelam que grupos de actinobactérias (filo *Actinomycetota*), concentram-se na rizosfera das plantas (EDISON; ANU; PRADEEP, 2022; OYEDOH et al., 2023), definida como a região com maior influência das raízes (NUGUSE; KEJELA, 2024). Portanto, nossos achados expandem esses resultados ao evidenciar que esse importante grupo de bactérias também estão presentes em solos não rizosféricos do café.

Dessa forma, esses resultados propõem considerações valiosas: 1) As divergências entre a predição metagenômica e o isolamento da fração cultivável das bactérias pode ser justificada pelas diferentes épocas de amostragem: frutificação/colheita e floração, respectivamente, uma vez que maturação dos frutos exige uma intensa imobilização de nutrientes do solo, com destaque primordial ao nitrogênio (SALAMANCA-JIMENEZ; DOANE; HORWATH, 2017), modulando a comunidade diazotrófica latente e proporcionando uma maior pressão seletiva por táxons mais especializados em condições de escassez nutricional e com diferentes isoformas de nitrogenase, como apresentado em nosso estudo; 2) A abundância de microrganismos classificados como PGPR durante o isolamento pode estar relacionada ao crescimento vegetativo e reprodutivo, durante a fase de floração do cafeeiro, uma vez que a dinâmica de exsudatos radiculares liberados pela

planta é capaz de regular a composição da comunidade diazotrófica, conforme descrito por WANG et al., (2023) e ELHAISSOUFI et al., 2022). Assim, observa-se a sensibilidade das comunidades microbianas do solo em resposta a diferentes condições e ciclos fenológicos da planta.

4.2 Testes fisiológicos dos isolados

Para os testes realizados *in vitro* com os isolados bacterianos, *Pseudomonas* novamente se destacou quanto a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Tabela 1). Além disso, a presença de *Rhizobium* sp. no solo da Fazenda 2 é de extrema relevância, não apenas por ser um gênero fortemente documentado em abordagens nesse sentido, mas também por promover a absorção de nutrientes como fósforo (P), potássio (K) e magnésio (Mg) (Nyoki & Ndakidemi, 2018).

Vários isolados demonstraram capacidade de solubilizar fósforo inorgânico (P_i), uma capacidade altamente desejável em solos agrícolas. Gêneros como *Streptomyces*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* são reconhecidos como PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), capazes de sintetizar ácidos orgânicos como o fórmico, acético, propiônico, láctico e succínico, que tornam o P mais disponível para as plantas (ELHAISSOUFI et al., 2022; SARMAH; SARMA, 2023). Além disso, *Bacillus* e *Acinetobacter* são citados como PSB altamente eficientes (ANDREATA et al., 2024).

No presente estudo, valores constatados superam o índice máximo de solubilização de 3,8 relatado por (ARIAS et al., 2023), obtido com fungos. *Priestia* sp. (TO_07) encontrada na fazenda 1 que realizada a adição de composto orgânico, se destacou tanto pela eficiência na solubilização de fosfato (Figura 6) quanto por apresentar potencial de solubilização de potássio (WU et al., 2023), elemento essencial na composição dos grãos e determinante para a qualidade da bebida (CLEMENTE et al., 2015). A literatura sugere que a aplicação excessiva de fertilizantes fosfatados pode reduzir a atividade de PSBs (PAN; CAI, 2023), mas aplicações equilibradas, especialmente associadas a compostos orgânicos e pH ajustado, favorecem a abundância e atividade dessas comunidades (DJUUNA; PRABAWARDANI; MASSORA, 2022; LUO et al., 2024).

Entre as actinobactérias, *Streptomyces* sp. é particularmente notável na produção de ácido indol acético (AIA), o que favorece o desenvolvimento vegetal (MYO et al., 2019). A produção de ácido indolacético (AIA) foi observada com destaque nas actinobactérias

isoladas, principalmente *Streptomyces* sp. (TC ou TO), cuja capacidade é amplificada na presença de L-triptofano (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006). Os valores registrados neste estudo (até 68,82 µg/mL) superam os relatados na literatura, como os de *Streptomyces fradiae* (56,28 µg/mL) e *Streptomyces* sp. VSMGT1014 (15,96 µg/mL), sugerindo alta eficiência das linhagens testadas (HARIKRISHNAN; SHANMUGAIAH; BALASUBRAMANIAN, 2014; MYO et al., 2019).

Além disso, *Priestia* sp. (TO_09), isolada do solo com adição de adubo orgânico, produziu 66,83 µg/mL de AIA, reforçando seu potencial como bioinoculante multifuncional. Este gênero, anteriormente classificado como *Bacillus* (HWANG et al., 2022), apresenta propriedades adicionais como biocontrole, indução de resistência sistêmica e promoção de crescimento (LI et al., 2022; LUO; WANG; XU, 2023). *Dyella*, também isolado do solo com adição de adubo orgânico, é conhecido pela produção de compostos voláteis benéficos e resistência contra patógenos (ASAD et al., 2023; URGILES-GÓMEZ et al., 2021).

Luteibacter sp., além de sua capacidade de FBN e produção de AIA, mostrou potencial como agente de biocontrole contra *Hemileia vastatrix* (OGATA-GUTIÉRREZ et al., 2024), além de atuar na solubilização de fósforo e mobilização de ferro via produção de sideróforos.

Diante disso, os resultados *in vitro* revelam a presença de gêneros potenciais e com funcionalidades complementares em ambas as fazendas de *Coffea arabica*, com destaque a *Priestia*, *Dyella*, *Streptomyces* e *Luteibacter*.

5. Conclusão

A integração entre a predição metagenômica e o isolamento microbiano demonstrou ser uma ferramenta que possibilita a identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio em ambos os solos, incluindo isoformas alternativas da enzima nitrogenase.

Nem todos os táxons detectados *in silico* são recuperados por métodos convencionais de cultivo.

As comunidades diazotróficas no solo parecem ser moduladas pelo estágio fenológico da planta de café, exigindo estudos adicionais.

Ensaio *in vitro* revelaram a presença de gêneros potenciais e com funcionalidades complementares em ambas as fazendas de *Coffea arabica*, com destaque a *Priestia*, *Dyella*, *Streptomyces* e *Luteibacter*, com potencial promissor para futuras aplicações em sistemas sustentáveis para a cafeicultura.

Referências bibliográficas

ANDREATA, M. F. L. et al. Microbial Fertilizers: A Study on the Current Scenario of Brazilian Inoculants and Future Perspectives. **Plants**, v. 13, n. 16, p. 2246, 13 ago. 2024.

ANZUETO-HERÓN, Z. C. et al. Growth of Four Varieties of *Coffea arabica* L. Biofertilized with *Rhizophagus intraradices* and *Azospirillum brasilense* in Nursery. **American Journal of Plant Sciences**, v. 14, n. 05, p. 552–568, 2023.

ARIAS, R. M. et al. Selection and Characterization of Phosphate-Solubilizing Fungi and Their Effects on Coffee Plantations. **Plants**, v. 12, n. 19, p. 3395, 26 set. 2023.

ASAD, S. et al. Coffee-Associated Endophytes: Plant Growth Promotion and Crop Protection. **Biology**, v. 12, n. 7, p. 911, 25 jun. 2023.

BELLANGER, M. et al. *NFix* DB (Nitrogen Fixation DataBase)—a comprehensive integrated database for robust ‘omics analysis of diazotrophs. **NAR Genomics and Bioinformatics**, v. 6, n. 2, 4 abr. 2024.

BEZ, C. et al. Comparative study of the rhizosphere microbiome of *Coffea arabica* grown in different countries reveals a small set of prevalent and keystone taxa. **Rhizosphere**, v. 25, p. 100652, mar. 2023.

BILEN, C. et al. A Systematic Review on the Impacts of Climate Change on Coffee Agrosystems. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 102, 25 dez. 2022.

BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1–2, p. 195–209, jul. 1995.

BONGIORNO, V. A. et al. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 855–865, 28 jun. 2016.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 535–538, fev. 1991.

BULLERGAHN, V. B. et al. Diversity of potential nitrogen-fixing bacteria from rhizosphere of the *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* L. **3 Biotech**, v. 14, n. 1, p. 27, 2 jan. 2024.

CALDWELL, A. C. et al. Prokaryotic Diversity in the Rhizosphere of Organic, Intensive, and Transitional Coffee Farms in Brazil. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0106355, 17 jun. 2015.

CAO, J. et al. Effects of a Nanonetwork-Structured Soil Conditioner on Microbial Community Structure. **Biology**, v. 12, n. 5, p. 668, 28 abr. 2023.

CLEMENTE, J. M. et al. Effects of nitrogen and potassium on the chemical composition of coffee beans and on beverage quality. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 297, 3 ago. 2015.

DE SOUSA, L. P.; FILHO, O. G.; MONDEGO, J. M. C. Age-Related Rhizosphere Analysis of *Coffea arabica* Plants. **Current Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 130, 8 abr. 2023.

DE SOUSA, L. P.; GUERREIRO-FILHO, O.; MONDEGO, J. M. C. The Rhizosphere Microbiomes of Five Species of Coffee Trees. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 27 abr. 2022.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, ago. 2004.

DJUUNA, I. A. F.; PRABAWARDANI, S.; MASSORA, M. Population Distribution of Phosphate-solubilizing Microorganisms in Agricultural Soil. **Microbes and Environments**, v. 37, n. 1, p. ME21041, 2022.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bacterias diazotrificas de plantas nao-leguminosas.** [s.l.] EMBRAPA-SPI, 1996.

DOS SANTOS, I. B. et al. Selection and Characterization of Burkholderia spp. for Their Plant-Growth Promoting Effects and Influence on Maize Seed Germination. **Frontiers in Soil Science**, v. 1, 12 jan. 2022.

DOS SANTOS, P. C. et al. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 162, 3 dez. 2012.

DUONG, B. et al. Coffee Microbiota and Its Potential Use in Sustainable Crop Management. A Review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 3 dez. 2020.

DUONG, B. et al. Identification and characterization of Vietnamese coffee bacterial endophytes displaying in vitro antifungal and nematicidal activities. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126613, jan. 2021.

EDISON, L. K.; ANU, S.; PRADEEP, N. S. Exploitation of Actinobacteria for Beta-Glucanolytic Enzymes—Screening and Characterization. Em: [s.l: s.n.]. p. 117–134.

ELHAISSOUFI, W. et al. Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. **Journal of Advanced Research**, v. 38, p. 13–28, maio 2022.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1505–1520, jul. 2006.

FULTHORPE, R.; MARTIN, A. R.; ISAAC, M. E. Root Endophytes of Coffee (*Coffea arabica*): Variation Across Climatic Gradients and Relationships with Functional Traits. **Phytophomes Journal**, v. 4, n. 1, p. 27–39, jan. 2020.

GAO, C. et al. Trade-offs in soil microbial functions and soil health in agroecosystems. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 39, n. 10, p. 895–903, out. 2024.

GAYATHRI, G. et al. Improvement of soil fertility through plant microbial interaction. Em: **Plant-Microbe Interaction - Recent Advances in Molecular and Biochemical Approaches**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 281–301.

HARIKRISHNAN, H.; SHANMUGAIAH, V.; BALASUBRAMANIAN, N. **Optimization for production of Indole acetic acid (IAA) by plant growth promoting Streptomyces sp VSMGT1014 isolated from rice rhizosphere**Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ijcmas.com>>.

HOWIE, R. T. et al. Formation of xenon-nitrogen compounds at high pressure. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34896, 17 out. 2016.

HWANG, H.-H. et al. A Plant Endophytic Bacterium Priestia megaterium StrainBP-R2 Isolated from the Halophyte Bolboschoenus planiculmis Enhances Plant Growth under Salt and Drought Stresses. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2047, 17 out. 2022.

JIMENEZ-SALGADO, T. et al. Coffea arabica L., a new host plant for Acetobacter diazotrophicus, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3676–3683, set. 1997.

KATH, J. et al. Early flowering changes robusta coffee yield responses to climate stress and management. **Science of The Total Environment**, v. 856, p. 158836, jan. 2023.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389–397, 18 jan. 1994.

KOUTOULEAS, A. et al. Shaded-Coffee: A Nature-Based Strategy for Coffee Production Under Climate Change? A Review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 28 abr. 2022.

KUTOS, S. et al. Farm management and shade tree species influence coffee soil microbiomes in Central and South America. **Applied Soil Ecology**, v. 202, p. 105571, out. 2024.

LI, Q. et al. A plant growth-promoting bacteria *Priestia megaterium* JR48 induces plant resistance to the crucifer black rot via a salicylic acid-dependent signaling pathway. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 10 nov. 2022.

LUO, D. et al. Consortium of Phosphorus-Solubilizing Bacteria Promotes Maize Growth and Changes the Microbial Community Composition of Rhizosphere Soil. **Agronomy**, v. 14, n. 7, p. 1535, 15 jul. 2024.

LUO, S.; WANG, Z.; XU, W. *Bacillus velezensis* WB invokes soil suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by inducing particular taxa. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 68, n. 2, p. 159–170, dez. 2023.

MARTINEZ, H. E. P. et al. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista Ceres**, v. 61, n. suppl, p. 838–848, dez. 2014.

MCLAUGHLIN, S. et al. The core metabolome and root exudation dynamics of three phylogenetically distinct plant species. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1649, 24 mar. 2023.

MENG, X.-J. et al. Isolation, identification, and biocontrol mechanisms of endophytic *Burkholderia vietnamiensis* C12 from *Ficus tikoua* Bur against *Rhizoctonia solani*. **Biological Control**, v. 178, p. 105132, mar. 2023.

MORYA, R.; SALVACHÚA, D.; THAKUR, I. S. *Burkholderia*: An Untapped but Promising Bacterial Genus for the Conversion of Aromatic Compounds. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 963–975, set. 2020.

MYO, E. M. et al. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 155, 8 dez. 2019.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, jan. 1999.

NETO, A. P. et al. Changes of Nutritional Status during a Phenological Cycle of Coffee under High Nitrogen Supply by Fertigation. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 42, n. 19, p. 2414–2425, 15 out. 2011.

NUGUSE, M.; KEJELA, T. Actinomycetes isolated from rhizosphere of wild *Coffea arabica* L. showed strong biocontrol activities against coffee wilt disease. **PLOS ONE**, v. 19, n. 8, p. e0306837, 1 ago. 2024.

OGATA-GUTIÉRREZ, K. et al. Antifungal Activity of Phyllospheric Bacteria Isolated from *Coffea arabica* against *Hemileia vastatrix*. **Microorganisms**, v. 12, n. 3, p. 582, 14 mar. 2024.

OLECHNO, E. et al. Coffee Brews: Are They a Source of Macroelements in Human Nutrition? **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1328, 9 jun. 2021.

OLIVEIRA, M. N. V. et al. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 221–230, abr. 2013.

OYEDOH, O. P. et al. Rare rhizo-Actinomycetes: A new source of agroactive metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 67, p. 108205, out. 2023.

PAN, L.; CAI, B. Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2904, 1 dez. 2023.

PINO, A. F. S.; ESPINOSA, Z. Y. D.; CABRERA, E. V. R. Characterization of the Rhizosphere Bacterial Microbiome and Coffee Bean Fermentation in the Castillo-Tambo

and Bourbon Varieties in the Popayán-Colombia Plateau. **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, p. 217, 25 abr. 2023.

SALAMANCA-JIMENEZ, A.; DOANE, T. A.; HORWATH, W. R. Nitrogen Use Efficiency of Coffee at the Vegetative Stage as Influenced by Fertilizer Application Method. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2 mar. 2017.

SALOJÄRVI, J. et al. The genome and population genomics of allopolyploid *Coffea arabica* reveal the diversification history of modern coffee cultivars. **Nature Genetics**, v. 56, n. 4, p. 721–731, 15 abr. 2024.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v. 50, n. 1, p. 1–8, 18 jul. 2005.

SANTOS, V. P.; RIBEIRO, P. C. C.; RODRIGUES, L. B. Sustainability assessment of coffee production in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 4, p. 11099–11118, 12 set. 2022.

SARDINHA, L. T. et al. PHOSPHORUS SOURCES IN THE GROWTH AND QUALITY OF ARABICA COFFEE SEEDLINGS PRODUCED IN TUBES. **COLLOQUIUM AGRARIAE**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 28 fev. 2023.

SARMAH, R.; SARMA, A. K. Phosphate Solubilizing Microorganisms: A Review. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 54, n. 10, p. 1306–1315, 31 maio 2023.

SEPP, S.-K. et al. Global diversity and distribution of nitrogen-fixing bacteria in the soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 20 jan. 2023.

SÉRGIO BALBINO MIGUEL, P. et al. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 7, p. 586–594, 12 fev. 2013.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311–319, jun. 2000.

SILVA, M. DE C. S. et al. DIVERSITY OF NITROGEN-FIXING BACTERIA IN COFFEE CROPS (*Coffea arabica* L.). **Revista Ifes Ciência**, v. 6, n. 3, p. 12–21, 23 dez. 2020.

SIMMER, M. M. B. et al. Edaphoclimatic conditions and the soil and fruit microbiota influence on the chemical and sensory quality of the coffee beverage. **European Food Research and Technology**, v. 248, n. 12, p. 2941–2953, 20 dez. 2022.

SOUMARE, A. et al. Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1011, 11 ago. 2020.

STOPNISEK, N. et al. Molecular mechanisms underlying the close association between soil *Burkholderia* and fungi. **The ISME Journal**, v. 10, n. 1, p. 253–264, 1 jan. 2016.

URGILES-GÓMEZ, N. et al. Plant Growth-Promoting Microorganisms in Coffee Production: From Isolation to Field Application. **Agronomy**, v. 11, n. 8, p. 1531, 30 jul. 2021.

VEGA, F. E. et al. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 371–380, out. 2005.

VELOSO, T. G. R. et al. Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of *Coffea arabica* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14692, 7 set. 2020.

VELOSO, T. G. R. et al. Microbiomes associated with *Coffea arabica* and *Coffea canephora* in four different floristic domains of Brazil. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 18477, 28 out. 2023.

VINENT, S. N. et al. Rhizobium Grants the Reduction of Phosphate Fertilization during the Production of Coffee Seedlings. **Sustainability**, v. 15, n. 8, p. 6559, 12 abr. 2023.

WANG, B. et al. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 4, p. 435–446, 28 maio 2013.

WANG, C. et al. Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in southern China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 113, p. 240–249, out. 2017.

WANG, H. et al. Alterations in substrate stoichiometry control the responses of soil diazotrophs to nutrient enrichment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 179, p. 108975, abr. 2023.

WHITE, R. A. et al. Genome-Resolved Metagenomics of Nitrogen Transformations in the Switchgrass Rhizosphere Microbiome on Marginal Lands. **Agronomy**, v. 13, n. 5, p. 1294, 3 maio 2023.

WU, X. et al. Analysis of the Potassium-Solubilizing *Priestia megaterium* Strain NK851 and Its Potassium Feldspar-Binding Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14226, 18 set. 2023.

ZHANG, W. et al. Molecular Mechanism and Agricultural Application of the NifA–NifL System for Nitrogen Fixation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 907, 4 jan. 2023.

ZHAO, Q. et al. Long-Term Coffee Monoculture Alters Soil Chemical Properties and Microbial Communities. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

ZHOU, J. et al. Nitrogen has a greater influence than phosphorus on the diazotrophic community in two successive crop seasons in Northeast China. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6303, 18 mar. 2021.