

University of São Paulo
“Luiz de Queiroz” College of Agriculture

Ecological implications of the use of *Azospirillum brasilense* on the microbiome
of the soil and rhizosphere of maize

Alexandre Pedrinho

Thesis presented to obtain the degree of Doctor in
Science. Area: Soil and Plant Nutrition

Piracicaba
2024

Alexandre Pedrinho
Agronomist

Ecological implications of the use of *Azospirillum brasilense* on the microbiome of the soil and rhizosphere of maize

Advisor:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Thesis presented to obtain the degree of Doctor in Science. Area: Soil and Plant Nutrition

Piracicaba
2024

RESUMO

Implicações ecológicas do uso de *Azospirillum brasilense* no microbioma do solo e da rizosfera de milho

Azospirillum brasilense é uma bactéria promotora de crescimento de plantas (BPCP) utilizada como bioinoculante na agricultura. *A. brasilense* pode estabelecer associações benéficas com as raízes das plantas, modificando o metabolismo e a morfologia das raízes, melhorando a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, aumentando o crescimento e a produtividade das plantas. No entanto, a capacidade do *A. brasilense* de se estabelecer no solo e na rizosfera de diferentes plantas (incluindo o milho), bem como suas interações com a comunidade bacteriana nativa do solo, não é completamente compreendida. Esta lacuna de conhecimento pode ser atribuída à quantidade inconsistente de inoculante aplicada (quantidade da população de *A. brasilense*) e a vários fatores abióticos (pH do solo, nutrientes) e bióticos (competição, predação, e antagonismo) que afetam o seu desempenho. Neste estudo, nosso objetivo foi compreender melhor como populações de diferentes tamanhos (sub-dose, dose recomendada e super-dose) de *Azospirillum brasilense* afetam e interagem com a estrutura, diversidade e composição da comunidade bacteriana nativa em ambos solo e rizosfera de plantas de milho em diferentes estágios (15 e 30 dias após a inoculação – DAI). Além disso, tivemos como objetivo avaliar a eficácia dessas populações de diferentes tamanhos de *A. brasilense* na promoção do crescimento de plantas de milho. Nossos resultados demonstram que a introdução de uma grande população (dose recomendada e super-dose) de *A. brasilense* melhora significativamente os parâmetros de crescimento do milho (massa seca da parte aérea, raiz e total), enquanto que uma pequena população (sub-dose) não. No solo, observamos que grandes populações (dose recomendada e super-dose) de *A. brasilense* foram capazes de alterar inicialmente a comunidade bacteriana nativa do solo. Contudo, a população de *A. brasilense* diminuiu rapidamente, permitindo que a comunidade bacteriana nativa se recuperasse e retornasse ao seu estado inicial. Na rizosfera das plantas de milho, grandes populações de *A. brasilense* exerceram um impacto tardio sobre a comunidade bacteriana nativa, possivelmente devido a mudanças permanentes nas características das plantas, como morfologia e exsudação radicular. Além disso, a análise de *network* (interação entre microrganismos) revelou mudanças nos táxons-chave na rizosfera das plantas de milho. *A. brasilense* apresentou um papel fundamental na fase inicial (até 15 DAI), mas foi posteriormente substituída por Rhizobiales, uma bactéria nativa do solo. Este estudo apresenta novas evidências de como populações de diferentes tamanhos de *Azospirillum brasilense* podem influenciar as interações microrganismo-microrganismo e planta-microrganismo, afetando a comunidade bacteriana nativa do solo, bem como o crescimento de plantas de milho.

Palavras-chave: 16S rRNA, Ecologia microbiana, Invasão microbiana, Bactérias promotoras de crescimento de plantas

ABSTRACT

Ecological implications of the use of *Azospirillum brasilense* on the microbiome of the soil and rhizosphere of maize

Azospirillum brasilense is a plant growth-promoting bacterium (PGPB) used as a bioinoculant in agriculture. *A. brasilense* can establish beneficial associations with plant roots, modifying root metabolism and morphology, improving water and nutrient uptake, and consequently, increasing plant growth and productivity. However, the ability of *A. brasilense* to establish itself in the bulk soil and rhizosphere of different plants (including maize), as well as its interactions with the native soil bacterial community, is not fully understood. This knowledge gap can be attributed to inconsistencies in the quantity of the inoculant delivered (population size) and different abiotic (*e.g.*, soil pH and nutrient content) and biotic (*e.g.*, competition, predation, and antagonism) factors that modulate its performance. In this study, our objective was to gain a better understanding of how different-sized populations (sub-dose, recommended dose and super-dose) of *A. brasilense* affect and interact with the structure, diversity, and composition of the native bacterial community in both bulk soil and rhizosphere of maize plants at different growth stages (15 and 30 days after inoculation – DAI). Furthermore, we aimed to assess the effectiveness of these populations of these different-sized populations of *A. brasilense* in promoting the growth of maize plants. Our results demonstrate that the introduction of a large population (recommended dose and super-dose) of *A. brasilense* significantly improved maize growth parameters (shoot, root and total dry mass), while a small population (sub-dose) did not. In the bulk soil, we observed that large populations (recommended dose and super-dose) of *A. brasilense* were capable of initially disrupt the native bacterial community in the soil. However, the *A. brasilense* population rapidly declined, allowing the native bacterial community to recover and return to its initial state. In the rhizosphere of maize plants, large populations of *A. brasilense* exerted a delayed impact on the native bacterial community, possibly due to permanent changes in plant characteristics such as morphology and root exudation. Furthermore, co-occurrence network analysis (interaction between microorganisms) revealed changes in keystone taxa in the rhizosphere of maize plants. *A. brasilense* played a fundamental role in the early stages (up to 15 DAI), but was later replaced by Rhizobiales, a native soil bacterium. This study presents novel evidence of how populations of different sizes of *A. brasilense* can influence microbe-microbe and plant-microbe interactions, affecting the native soil bacterial community as well as the growth of maize plants.

Keywords: 16s RNA, Microbial ecology, Microbial invasion, Plant growth-promoting bacterium