

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

VERÔNICA MARIA DE SOUZA

Caracterização dos traços de promoção de crescimento vegetal e tolerância ao estresse abiótico de isolados bacterianos.

Jaboticabal – SP
10º Semestre/2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Caracterização dos traços de promoção de crescimento vegetal e tolerância ao estresse
abiótico de isolados bacterianos.

VERÔNICA MARIA DE SOUZA

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Eliana Gertrudes
Macedo Lemos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita
Filho” - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP
10^o Semestre/2024

S729c	Souza, Verônica Maira Caracterização de traços de promoção de crescimento vegetal e tolerância ao estresse abiótico de isolados bacterianos. / Verônica Maira Souza. -- Jaboticabal, 2024 56 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Eliana Gertrudes Macedo Lemos Coorientadora: Natália Sarmanho Monteiro Lima 1. Biotecnologia. 2. Biotecnologia microbiana. 3. Agricultura sustentável. 4. Microbiologia agrícola. I. Título.
-------	--

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Seção Técnica de Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal/SP - Brasil
Tel (16) 3209 7106 e-mail: graduacao.fcav@unesp.br - www.fcav.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus Jaboticabal



Chefe do Departamento

Dedico este trabalho ao meu querido irmão,
James Fernando de Souza, *in memoriam*.
Esteve comigo não apenas nos bons
momentos, mas também me apoiou ao longo
de toda a minha vida. Que a sua história viva
em mim para sempre, que você me guie e me
fortaleça por todos os caminhos em que eu
percorrer. Esse trabalho reflete a sua vontade
de viver e força de sempre seguir em frente,
que sempre será uma inspiração para mim.

SUMÁRIO

1. Introdução	10
1.1. Objetivos	11
1.1.1. Objetivo geral	11
1.1.2. Objetivos específicos	12
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1. Agricultura Sustentável	12
2.2. Diversidade Microbiana do Solo	13
2.3. Bactérias Promotoras de Crescimento vegetal e Tolerância a fatores abióticos	15
2.3.1. Gênero <i>Bacillus</i>	18
2.3.2. Gênero <i>Pseudomonas</i>	19
2.3.3. Gênero <i>Klebsiella</i>	21
3. Metodologia	22
3.1. Identificação molecular (16s)	22
3.2. Caracterização da Dinâmica de Crescimento	22
3.3. Origem e Recuperação dos isolados	23
3.4. Pré-inóculo	23
3.5. Atividade Enzimática	23
3.6. Estresse salino e pH	24
3.7. Estresse osmótico	25
3.8. Produção de Exopolissacarídeo (EPS)	25
3.9. Produção de Biofilme	26
3.9.1. Protocolo 1- Lima et al. (2017)	26
3.9.2. Protocolo 2- O'toole (2001)	27
3.10. Teste de susceptibilidade de bactérias e antibióticos (AST)	27
3.11. Produção de Ácido 3- Indol acético (AIA)	28
3.12. Teste de Solubilização de Fosfato	29
3.13. Ranking dos Isolados	29
4. Resultados	30
4.1. Identificação molecular e Caracterização da dinâmica de crescimento	30
4.2. Capacidade de crescimento das bactérias sob diferentes condições de estresse	33
4.3. Caracterização dos traços de promoção de crescimento pelas bactérias	45
5. Discussão	49
6. Conclusões	52
7. Referências bibliográficas	53

RESUMO

O Brasil, como um dos maiores produtores agrícolas do mundo, enfrenta desafios devido às mudanças climáticas, como aumento da temperatura, sazonalidade das chuvas e superaquecimento, que afetam diretamente o zoneamento agrícola, as técnicas de manejo e a produtividade. Para promover a sustentabilidade na agricultura, é fundamental adotar tecnologias inovadoras, como o uso de microrganismos multifuncionais. Esses organismos atuam como biofertilizantes e biopesticidas, fornecendo alternativas ao uso de produtos químicos, reduzindo impactos ambientais e promovendo a eficiência produtiva. Os microrganismos presentes na rizosfera, como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) têm papel crucial no fornecimento de nutrientes, controle de pragas e estímulo ao crescimento vegetal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular dos isolados bacterianos, determinar sua tolerância a estresse abióticos e identificar possíveis traços de promoção de crescimento. A metodologia utilizada incluiu a identificação molecular; teste específicos como atividade enzimática, estresse osmótico e salino, produção de biofilme e exopolissacarídeo, além de testes de produção de ácido 3- indol acético e solubilização de fosfato. O isolado 01 (*Bacillus sp.*) apresentou maior tolerância a estresses abióticos, conseguindo desenvolver em altas concentrações de NaCl, Polietilenoglicol e Glicerol; apresentando capacidade de produzir biofilme e exopolissacarídeos e traços de promoção de crescimento vegetal produzindo ácido 3- indol acético e possuindo a capacidade de solubilizar fosfato. O isolado 43 (*Pseudomonas sp.*) também apresentou característica de promoção de crescimento, produzindo ácido 3- indol acético. Portanto, a utilização de microrganismos multifuncionais na agricultura é considerada uma alternativa às práticas convencionais de agricultura, auxiliando para o desenvolvimento sustentável dos sistemas agrícolas, visando o rendimento das culturas e contribuindo para superar desafios relacionados com a segurança alimentar e a preservação dos solos e do meio ambiente.

Palavras chaves: Sustentabilidade agrícola, Microrganismos benéficos, Degradação do solo, Biofertilizantes.

ABSTRACT

Brazil, as one of the world's largest agricultural producers, faces challenges due to climate change, such as rising temperatures, seasonal rainfall and overheating, which directly affect agricultural zoning, management techniques and productivity. To promote sustainability in agriculture, it is essential to adopt innovative technologies, such as the use of multifunctional microorganisms. These organisms act as biofertilizers and biopesticides, providing alternatives to the use of chemicals, reducing environmental impacts and promoting production efficiency. Microorganisms present in the rhizosphere, such as plant growth promoting bacteria (PGPR), play a crucial role in providing nutrients, controlling pests and stimulating plant growth. Therefore, the objective of this study was to perform the molecular characterization of bacterial isolates, determine their tolerance to abiotic stress and identify possible growth promoting traits. The methodology used included molecular identification; specific tests such as enzymatic activity, osmotic and saline stress, biofilm and exopolysaccharide production, in addition to tests for 3-indole acetic acid production and phosphate solubilization. Isolate 01 (*Bacillus sp.*) showed greater tolerance to abiotic stresses, being able to develop in high concentrations of NaCl, Polyethylene glycol and Glycerol; showing the ability to produce biofilm and exopolysaccharides and plant growth promotion traits by producing 3-indole acetic acid and having the ability to solubilize phosphate. Isolate 43 (*Pseudomonas sp.*) also showed growth promotion characteristics, producing 3-indole acetic acid. Therefore, the use of multifunctional microorganisms in agriculture is considered an alternative to conventional agricultural practices, helping the sustainable development of agricultural systems, aiming at crop yield and contributing to overcoming challenges related to food security and the preservation of soils and the environment.

Keywords: Agricultural sustainability, Beneficial microorganisms, Soil degradation, Biofertilizers.

1. Introdução

O Brasil está entre os maiores produtores agrícolas do mundo. Portanto, como aumento da temperatura do ar, sazonalidade nos índices de precipitação pluviométrica e superaquecimento, tem causado distúrbios nos sistemas de produção agrícola. Dada a importância das condições climáticas para a agricultura, estima-se que qualquer mudança no clima possa afetar o zoneamento agrícola, as técnicas de manejo e sua produtividade (MORAES *et al.*, 2011). Os insumos utilizados na agricultura brasileira têm ocasionado alterações nos ambientes, devido ao seu uso excessivo ou em superdosagem, ocasionando perda por processos de volatilização, percolação, escoamento, imobilização e outras interações geoquímicas, o que reduz o aproveitamento eficaz dos produtos aplicados e traz danos ao meio ambiente (GOMES *et al.*, 2021).

Assim, o uso desses químicos desencadeou a degradação das terras agrícolas, causada pelo manejo inadequado do solo e das culturas, impactando de maneira irreversível vastas áreas cultivadas e contribuindo para a diminuição do rendimento das culturas. Esse modelo de produção, considerado insustentável, gera problemas ambientais, como a poluição dos recursos hídricos, do solo e do ar, além de riscos econômicos, como o aumento dos custos de produção (REZENDE *et al.*, 2021).

É fundamental a adoção de tecnologias inovadoras e sustentáveis que promovam o desenvolvimento de sistemas agrícolas produtivos, que economizem energia, respeitem o meio ambiente e garantam a segurança e a qualidade dos alimentos. Nas últimas décadas, o uso de microrganismos multifuncionais tem aumentado nas práticas agrícolas em todo o mundo, atuando como tecnologias complementares a fertilizantes (biofertilizantes) e agrotóxicos (biopesticidas), com o objetivo de promover a sustentabilidade da agricultura (SILVA *et al.*, 2022).

Para a produção agrícola sustentável, as interações existentes entre o solo e os microrganismos presentes na rizosfera, desempenham um papel essencial, uma vez que vários microrganismos beneficiam as plantas, e conseqüentemente, a agricultura, colaborando com a transformação, mobilização e solubilização de nutrientes essenciais para as plantas, além de

auxiliar na absorção desses nutrientes a fim de melhorar a expressão do potencial genético e estimular o crescimento vegetal (BARRIUSO *et al.*, 2008; AMORIM, 2023).

As bactérias que vivem na rizosfera, associadas às raízes das plantas, são chamadas de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR). Elas estimulam o crescimento das plantas por meio secreção de várias moléculas reguladoras. Essas bactérias podem também estar associadas às folhas ou estarem dentro da planta, sendo denominadas endófitas. Os endófitos, por se encontrarem nos tecidos vegetais, não estão em contato direto com o ambiente externo, o que os torna menos sujeitos às alterações bióticas e abióticas do solo, e possuem a capacidade de se comunicar mais eficientemente com a planta. As bactérias endófitas são encontradas inicialmente na rizosfera e, através das fissuras naturais, conseguem penetrar a raiz. As plantas conseguem selecionar e atrair as bactérias benéficas por meio da produção de exsudatos e metabólicos radicais (VOCCIANTE *et al.*, 2022).

Essa interação proporciona melhor crescimento e desenvolvimento, suprimindo microrganismos causadores de doenças e aumentando a assimilação de nutrientes (HARMAN *et al.*, 2010). Os microrganismos benéficos para as plantas podem ser divididos em três categorias, relacionados com a sua principal função: microrganismos que realizam a nutrição das plantas aumentam a disponibilidade de nutrientes selecionados do solo por meio da solubilização aprimorada dos nutrientes, permitindo assim que as plantas absorvam os nutrientes de forma mais eficiente, como bactérias fixadoras de nitrogênio; Microrganismos com capacidade de biocontrole, que produzem compostos bioativos, como alcaloides e enzimas que podem atuar como agentes de controle biológico contra pragas, alguns desses compostos que os microrganismos produzem tem ação inseticida, degradando a cutícula de insetos e, conseqüentemente, inibindo seu desenvolvimento; Microrganismos que atuam diretamente no crescimento das plantas produzindo fitohormônios, aumentando na disponibilidade de nitrato, solubilizando fosfato, oxidando enxofre e aumentando a permeabilidade das raízes (NIHORIMBERE *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2024; CANDIDO, 2023; CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014). Vários desses microrganismos, além de beneficiarem as plantas, são essenciais também para o ecossistema e à produção agrícola, fornecendo alternativas sustentáveis ao uso de pesticidas e fertilizantes químicos (BEATTIE, 2006).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é realizar a identificação e caracterização de três isolados bacterianos (01, 13, 43), retirados de amostras de solo, com foco na análise de características associadas à promoção de crescimento vegetal e tolerância ao estresse abiótico.

1.2.2. Objetivos específicos

Realizar a identificação molecular dos isolados 01, 13, 43 por meio do sequenciamento do gene 16s.

Caracterizar a dinâmica de crescimento dos isolados bacterianos (01, 13, 43) por meio da construção de curvas de crescimento utilizando o método de microdiluição, correlacionando os resultados com os traços de promoção de crescimento vegetal e tolerância ao estresse abiótico.

Determinar a capacidade de crescimento dos isolados bacterianos 01, 13, 43 sob condições de salinidade, seca e variações de pH.

Identificar a expressão de enzimas dos isolados 01, 13 e 43.

Caracterizar os traços de promoção de crescimento dos isolados bacterianos 01, 13, 43.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Agricultura Sustentável

O uso de agrotóxicos intensificou-se na década de 1960 com a chamada Revolução Verde, um movimento de modernização agrícola que incorporou máquinas, defensivos químicos e sementes geneticamente modificadas com o objetivo de aumentar a produtividade. A partir disso, grande parte dos agricultores brasileiros, inclusive os pequenos produtores, passaram a adotar esses insumos. No entanto, o uso massivo de agrotóxicos desencadeou uma degradação das terras agrícolas devido ao manejo inadequado do solo e das culturas, afetando de forma irreversível extensas áreas cultivadas e contribuindo para a queda na produtividade e no rendimento das safras (REZENDE *et al.*, 2021).

O Brasil destaca-se como um dos principais consumidores de fertilizantes e defensivos químicos, embora não seja um grande produtor desses insumos, permanecendo, assim, dependente do mercado internacional de fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos. A utilização desses produtos é acompanhada de perdas significativas por volatilização,

imobilização ou outros processos geoquímicos, o que reduz sua eficiência. Além disso, a produção de alguns desses insumos exige alto consumo energético, bem como o uso de combustíveis fósseis (GOMES *et al.*, 2021).

A sociedade pressiona a indústria de alimentos e o agronegócio a adotar uma produção mais sustentável, com foco na segurança alimentar e nutricional. Esse movimento é impulsionado, principalmente, pelas mudanças climáticas e pelo crescimento populacional acelerado. Com as projeções de aumento populacional, estima-se que será necessário dobrar a produção atual de alimentos, o que representa um grande desafio para uma agricultura mais sustentável (GOMES *et al.*, 2021).

Uma alternativa concreta para reduzir a dependência da agricultura brasileira de fertilizantes minerais e agroquímicos é ampliar a oferta de insumos biológicos de alta eficiência como a tecnologia de inoculação com microrganismos multifuncionais, especialmente rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, sendo um caminho para reduzir ou até substituir o uso de fertilizantes nos cultivos (MAGALHÃES *et al.*, 2023; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A função desses microrganismos é de aumentar a eficiência na utilização da matéria orgânica disponível para as plantas, elevar a atividade microbiana e contribuir para melhorar a estrutura, qualidade e sanidade de solos deficientes, criando melhores condições para o desenvolvimento das plantas e promovendo o equilíbrio microbiológico do solo e da planta (GOMES *et al.*, 2021). Esses microrganismos podem ser considerados insumos tecnológicos no contexto da economia verde, contribuindo para a redução do uso de insumos sintéticos na produção agrícola (REZENDE *et al.*, 2021).

2.2. Diversidade Microbiana do Solo

O solo é um recurso natural essencial para a produção agrícola, cuja qualidade é determinada por fatores químicos, físicos, biológicos e ecológicos. Esses fatores podem ser modificados para promover melhorias na qualidade do solo; essa qualidade está diretamente relacionada à sustentabilidade das culturas, influenciando a saúde das plantas, dos animais e, consequentemente, dos seres humanos (DE ARAÚJO *et al.*, 2021).

A maior parte da atividade biológica do solo está concentrada nas camadas superficiais, entre 0 e 30 cm de profundidade. Nessas camadas, o componente biológico representa menos de 0,5% do volume total do solo e menos de 10% da matéria orgânica. Esse componente

biológico é composto, em grande parte, por microrganismos que desempenham funções essenciais para o funcionamento do solo, como a decomposição da matéria orgânica, a liberação de nutrientes em formas disponíveis para as plantas e a degradação de substâncias tóxicas. Além disso, esses microrganismos formam associações simbióticas com as raízes das plantas, contribuem para o controle biológico de patógenos, influenciam a solubilização de minerais e desempenham um papel fundamental na estruturação e agregação do solo (PEDROSA *et al.*, 2015).

O solo é um ambiente com elevada diversidade genética de microrganismos, e cada um dos membros desta comunidade desempenha funções específicas e ocupa nichos ecológicos diferentes, contribuindo para diversas atividades bióticas no ambiente. Os principais grupos de organismos presentes incluem vírus, bactérias, fungos, algas, protozoários e macrofauna, como artrópodes. Esses organismos, principalmente bactérias e fungos, formam ecossistemas diversificados e são capazes de mediar uma ampla gama de reações bioquímicas, demonstrando sua importância ecológica e reforçando seu papel essencial no funcionamento e equilíbrio do ecossistema terrestre (MATTOS, 2015).

A biomassa microbiana constitui o componente vivo da matéria orgânica do solo e desempenha um papel essencial no controle de funções-chave, como a decomposição e o acúmulo de matéria orgânica, além das transformações de nutrientes minerais. Solos com alto conteúdo de biomassa microbiana possuem maior capacidade de estocar e ciclar nutrientes, contribuindo para a sustentabilidade do sistema. Além disso, a biomassa microbiana, em conjunto com o conteúdo de matéria orgânica do solo, pode ser utilizada como um indicador da qualidade do solo sob diferentes manejos (PEDROSA *et al.*, 2015).

Os microrganismos multifuncionais disponibilizam nutrientes essenciais para as culturas agrícolas, produzem fitormônios e promovem o crescimento e a produtividade das plantas, com baixo custo e sem causar danos ao meio ambiente. Existem diversos produtos comerciais à base de microrganismos, conhecidos como inoculantes ou biofertilizantes. Os inoculantes são formulações contendo microrganismos multifuncionais vivos, adicionados a um veículo inerte e recomendados para aplicação sobre sementes, superfície das plantas ou diretamente no solo. O objetivo desses produtos é promover a colonização da planta (raiz e parte aérea) pelo microrganismo inoculado, para que os mecanismos microbianos de promoção do crescimento vegetal sejam ativados, beneficiando a planta (SILVA *et al.*, 2022). Assim, a biomassa microbiana do solo funciona como um importante reservatório de nutrientes para as

plantas e desempenha um papel direto na sustentabilidade dos ecossistemas (PEDROSA et al., 2015).

2.3. Bactérias Promotoras de Crescimento vegetal e Tolerância a fatores abióticos

As diversas estruturas e componentes das plantas podem fornecer um meio adequado para o desenvolvimento de microrganismos. Esses microrganismos podem habitar várias zonas dentro e ao redor das plantas: a espermosfera, área do solo que circunda uma semente em germinação e contém nutrientes que aumentam o crescimento microbiano; a filosfera, que inclui as partes da planta acima do solo e cuja dinâmica flutua de acordo com fatores externos, como chuva, temperatura e radiação; e a rizosfera, uma região que consiste nas raízes das plantas e no solo ou substrato circundante. Estas zonas abrigam uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias promotoras de crescimento vegetal (Plant growth promoters - PGPR), que desempenham um papel crucial na promoção da saúde das plantas e na tolerância a fatores abióticos, como seca, salinidade e temperatura (ELNAHAL *et al.*, 2022).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal são microrganismos do solo que vivem geralmente na rizosfera e, por meio da secreção de várias moléculas reguladoras, estão envolvidas na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas. Elas podem ser encontradas associadas às raízes (rizosfera), às folhas (filosfera) ou dentro da planta (endosfera). Os endófitos são particularmente eficazes no suporte ao crescimento, pois, por estar dentro dos tecidos vegetais, conseguem se comunicar com a planta hospedeira e exercer seu efeito benéfico de forma mais eficiente. Além disso, os endófitos, por estarem protegidos do ambiente externo, são menos afetados pelas variações dos fatores abióticos, como alterações químicas e físicas e fatores abióticos do solo. As bactérias endofíticas geralmente se originam do ecossistema da rizosfera que circunda as raízes e penetram nos tecidos vegetais principalmente por meio de fissuras naturais formadas durante o crescimento das raízes. Os exsudatos e metabólitos radicais produzidos pelas plantas atuam como recursos essenciais que atraem e selecionam as bactérias mais benéficas (VOCCIANTE *et al.*, 2022).

Para compreender as interações entre microrganismos benéficos e plantas, foram estabelecidas três categorias principais. A primeira inclui os microrganismos que auxiliam na nutrição das plantas, como as bactérias fixadoras de nitrogênio, que interagem direta ou indiretamente com as plantas. A segunda categoria envolve agentes de biocontrole, que estimulam o crescimento vegetal de maneira indireta ao suprimir patógenos vegetais. A terceira

categoria é composta por microrganismos que agem diretamente sobre o crescimento das plantas, seja através da produção de hormônios vegetais, solubilização de fosfatos, aumento da absorção de ferro ou produção de substâncias voláteis. Essas interações complexas e diversas destacam a importância das bactérias promotoras do crescimento vegetal na adaptação e resiliência das plantas a fatores abióticos, como seca, salinidade e temperaturas extremas, contribuindo para a sustentabilidade agrícola e o desenvolvimento de práticas agrícolas mais eficientes (ELNAHAL *et al.*, 2022).

Os benefícios da colonização radicular por PGPR são definidos por três características intrínsecas: (i) a capacidade de colonizar a raiz; (ii) a sobrevivência e multiplicação em microhabitats associados à superfície da raiz, competindo com outros microbiomas pelo menos pelo tempo necessário para expressar suas atividades de promoção de crescimento, incluindo a produção de fitohormônios; e (iii) a promoção efetiva do crescimento da planta. Diversos gêneros de microrganismos são reconhecidos como promotores de crescimento em plantas, incluindo *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia*. Esses microrganismos não são simbióticos, destacando-se pela sua capacidade de interagir com as plantas sem formar relações simbióticas formais (NOSOLINE, 2016).

Em geral, as PGPR compreendem um grupo diversificado de gêneros, incluindo *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*, que habitam a rizosfera e interagem benéficamente com as plantas. Além disso, os endófitos, como *Azoarcus* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* desempenham um papel importante na promoção do crescimento vegetal (ELNAHAL *et al.*, 2022).

A ação benéfica das PGPR se expressa principalmente pela promoção direta da absorção de nutrientes por meio da modulação dos níveis de hormônios vegetais. Entre os mecanismos diretos mais relevantes e amplamente estudados estão a fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfato inorgânico, a produção de auxinas (particularmente o ácido 3-indol acético, AIA), citocininas e giberelinas, além da atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC) e a produção de sideróforos, que facilitam a absorção de ferro pelas plantas. Por outro lado, os mecanismos indiretos incluem atividades inibitórias, nas quais as PGPR reduzem o impacto de organismos patogênicos, proporcionando um controle natural contra estresses bióticos. Alguns dos mecanismos indiretos mais comuns incluem a produção de compostos como cianeto de hidrogênio, antibióticos e enzimas capazes de degradar a parede

celular de patógenos (VOCCIANTE *et al.*, 2022). Essas bactérias também podem fixar nitrogênio de forma associativa e controlar patógenos de origem do solo ou de sementes através da produção de sideróforos, quitinases e antibióticos. Complementarmente, elas podem exercer um efeito sinérgico com a fixação biológica de nitrogênio (FBN), particularmente em leguminosas. A atuação das PGPR resulta em um aumento substancial da área radicular, incluindo o comprimento das raízes e o número de pelos radiculares, o que melhora a eficiência da planta na absorção de água e nutrientes. O efeito antagônico das PGPR sobre diversos microrganismos patogênicos reforça seu papel como agentes de controle biológico, tornando-as uma alternativa eficiente e ecológica para a proteção de culturas agrícolas (NOSOLINE, 2016).

O principal mecanismo de biocontrole exercido por bactérias antagonistas é a antibiose, que envolve a produção de compostos voláteis e não voláteis com ação antibiótica e antifúngica, como os metabolitos. Antibióticos são produzidos por microrganismos que, mesmo em baixas concentrações, podem ter efeitos bactericidas e bacteriostáticos em outros microrganismos. As bactérias antagonistas também produzem metabólitos que inibem o crescimento e as atividades dos patógenos, como enzimas líticas, que decompõem polímeros como quitina, proteínas, DNA, hemiceluloses e celulose; compostos voláteis como o cianeto de hidrogênio; e metabólitos antifúngicos, incluindo lipopeptídeos cíclicos (NOSOLINE, 2016).

Além dos mecanismos gerais de promoção do crescimento, as PGPR possuem estratégias específicas para situações de estresse abiótico, como excesso ou deficiência de água e nutrientes, salinidade, metais pesados e contaminantes orgânicos. Sob essas condições, as plantas enfrentam limitações no crescimento que resultam na formação de especificações reativas de oxigênio, comprometendo a integridade das membranas celulares, facilitando a taxa de fotossíntese líquida e encurtando o ciclo vegetativo. As PGPR atuam minimizando esses efeitos adversos, promovendo a adaptação das plantas e melhorando sua resiliência (DIAS *et al.*, 2011).

Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por algumas rizobactérias desempenham um papel crucial na proteção das plantas em condições de estresse abiótico, como seca e salinidade. Esses compostos ajudam a reduzir a perda evaporativa de água, mantendo as células vegetais hidratadas e assegurando condições metabólicas adequadas mesmo em períodos de déficit hídrico. Além disso, as rizobactérias produtoras de EPS apresentam outro benefício significativo: a capacidade de restringir o influxo de íons de sódio (Na⁺) nas raízes, permitindo que plantas, que normalmente seriam sensíveis ao sal, possam sobreviver e prosperar em

ambientes com alta salinidade. Os resultados de estudos recentes reforçam a importância das bactérias produtoras de EPS no suporte à resiliência das plantas em condições adversas, melhorando não apenas a capacidade de retenção de água, mas também modulando a absorção de minerais de forma que reduza os efeitos tóxicos do sal, tornando as rizobactérias produtoras de EPS uma ferramenta promissora para a biotecnologia agrícola, especialmente em regiões propensas a estresses hídricos e salinos (NOSOLINE, 2016).

2.3.1. Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* pertence à família Bacillaceae e inclui bactérias Gram-positivas, correspondendo a um grupo altamente heterogêneo de espécies. Essas bactérias são geralmente aeróbias, têm células em forma de bastonetes, com tamanhos variando de 0,5 x 1,2 µm até 2,5 x 10 µm, possuem motilidade variável, algumas espécies possuem a capacidade de produzir biofilme e habitam diversos nichos, como solo, alimentos e água. Podem ser aeróbias, facultativas e anaeróbias, com a característica marcante de produzirem endósporos em resposta a estímulos ambientais, como calor ou exposição a certos produtos químicos. Além disso, desempenham diversas funções biológicas, como regulação biológica, reciclagem de matéria orgânica, promoção do crescimento em vegetais e controle biológico de fitopatógenos (FERREIRA; BETTIOL, 2019).

As espécies do gênero *Bacillus* possuem grande capacidade de alterar sua fisiologia e morfologia de acordo com as condições ambientais, apresentando crescimento em temperaturas entre 15 °C e 60 °C e formando endósporos que lhes permitem sobreviver além desses limites de temperatura e em situações de escassez de nutrientes ou água (DORIGHELLO, 2017).

As espécies desse gênero apresentam crescimento rápido em diversas fontes de carbono, característica que se deve à sua grande capacidade de produzir enzimas extracelulares. Essas enzimas são responsáveis pela oxidação de polímeros, como ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios, que podem ser prontamente utilizados como fonte de energia para a célula. Outro aspecto importante do metabolismo do gênero *Bacillus* é sua capacidade de produzir antibióticos, como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina, que são gerados durante e após o processo de esporulação. Por essa razão, essas bactérias são amplamente utilizadas em diversos setores da indústria (DORIGHELLO, 2017).

Existem mais de 191 espécies e 4 subespécies descritas no gênero *Bacillus*. A maioria dos bacilos são saprófitos e não patogênicos para animais, e no contexto da agricultura, já

existem vários produtos com espécies de *Bacillus* como ingrediente ativo. Alguns exemplos incluem *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis*; esses produtos têm sido amplamente utilizados em diversos países para fins de controle biológico. No controle de doenças de plantas, a espécie *Bacillus subtilis* é um antagonista eficiente e a mais utilizada para o manejo de fungos patogênicos de solo (ANTUNES DE CARVALHO, 2018).

Dentre as principais espécies de *Bacillus* reconhecidas como agentes promotores de crescimento e biocontrole, destacam-se *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. firmus*. Esses microrganismos são eficazes no controle de diversos gêneros patogênicos em diferentes culturas agrícolas. Exemplos de patógenos que podem ser controlados pelo uso de *Bacillus* incluem *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (FERREIRA; BETTIOL, 2019).

O gênero *Bacillus* é amplamente utilizado no controle de doenças de plantas causadas por fungos fitopatogênicos, funcionando como um importante agente de antagonismo. Um exemplo relevante é a podridão de raiz e haste causada pelo patógeno *Phytophthora sojae*, uma doença devastadora na cultura da soja e apesar das graves perdas associadas a esse oomiceto, métodos eficazes para seu controle ainda são limitados. Estudos mostraram que *B. altitudinis* pode reduzir significativamente a infectividade de *P. sojae* por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e deposição de calose em plantas de soja (DORIGHELLO, 2017).

2.3.2. Gênero *Pseudomonas*

Pseudomonas é um gênero de bactérias gram-negativas com mais de 120 espécies distintas, comumente encontradas no solo e na água. Algumas espécies de *Pseudomonas* são conhecidas por sua capacidade de promover o crescimento das plantas e protegê-las contra doenças, além de facilitar a solubilização de nutrientes e metais pesados no solo, tornando-os mais acessíveis para as plantas e outros microrganismos não patogênicos. As espécies como *P. putida*, *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* produzem moléculas como ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos e sideróforos, que estimulam o desenvolvimento das plantas. Com base nessas propriedades metabólicas, bioinoculantes à base de *Pseudomonas* foram desenvolvidos para aplicação na agricultura sustentável. A presença dessas bactérias em solos agrícolas tem despertado crescente interesse devido aos benefícios que oferecem em várias etapas do desenvolvimento das plantas, contribuindo também para a recuperação de solos

contaminados por herbicidas, fertilizantes, metais pesados e hidrocarbonetos. Esse efeito resulta em redução do tempo de crescimento e aumento do desenvolvimento radicular das plantas (RUIZ-HERNANDEZ; MADRIGAL-PEREZ; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2024).

O gênero *Pseudomonas* pertence à subclasse Gammaproteobacteria (g) das Proteobacteria e inclui principalmente espécies fluorescentes, além de algumas não fluorescentes. O grupo das *Pseudomonas* fluorescentes pode ser dividido em: 1. Espécies fitopatogênicas com citocromo oxidase-positiva, como *P. cichorii*, *P. marginalis* e *P. tolaasii*; 2. Cepas não fitopatogênicas e não necrogênicas, como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* e outras do tipo *P. aeruginosa*; 3. Espécies fluorescentes necrogênicas fitopatogênicas sem citocromo oxidase, como *P. syringae* e *P. viridiflava*; O grupo das *Pseudomonas* não fluorescentes inclui *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* e *P. pseudoalcaligenes* (BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006).

Pseudomonas se caracteriza por apresentar algumas espécies que são classificadas como bactérias benéficas que podem melhorar a qualidade do solo e estimular o crescimento das plantas, especialmente em ambientes poluídos. Essa bactéria produz várias substâncias, como sideróforos, ramnolipídios, antibióticos, fungicidas e ácidos orgânicos, que ajudam as plantas a lidar com o estresse causado por metais pesados e patógenos, resultando em maior produtividade agrícola. Por exemplo, o ácido glucônico (GA), gerado por uma reação enzimática entre glicose e glicose desidrogenase (GDH), pode, em combinação com ramnolipídios, se ligar a metais pesados e reduzir sua toxicidade. A maioria das espécies de *Pseudomonas* também apresenta capacidade de degradar hidrocarbonetos, compostos nitrogenados e herbicidas que contribuem para reduzir o ritmo de crescimento das plantas. A espécie *P. protegens* (anteriormente conhecida como *P. fluorescens*), é capaz de degradar até 80% de compostos como glifosato, glufosinato e fosfina, na presença ou ausência de ferro. Essa capacidade não só ajuda a desintoxicar o ambiente, como também diminui significativamente o tempo necessário para o crescimento ideal das plantas (RUIZ-HERNANDEZ; MADRIGAL-PEREZ; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2024).

O processo de desnitrificação e a produção de pioverdina também parecem contribuir para a capacidade competitiva das *Pseudomonas* na rizosfera. Cepas com redutase de nitrato e produção de pioverdina apresentam maior sucesso nesse ambiente, enquanto mutantes deficientes nesses genes são menos competitivos. Cepas de *Pseudomonas* que possuem genes para o processo de desnitrificação, como *narG* e *nosZ* tendem a sobreviver melhor no solo. As *Pseudomonas* fluorescentes, em particular, destacam-se por promover o crescimento das

plantas através de mecanismos como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácidos orgânicos e de ácido indol-acético (IAA), que favorecem o desenvolvimento radicular e a absorção de nutrientes (BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006).

As *Pseudomonas* sp. desenvolveram diversos mecanismos antipredadores, como a produção de metabólitos secundários que interagem de forma complexa com os predadores, afetando sua fisiologia e comportamento. Dependendo do tipo de metabólito produzido, ele pode agir como repelente, estressor ou toxina. A produção desses metabólitos por essas bactérias, desempenha múltiplas funções, incluindo a proteção de plantas contra patógenos e o aumento da resistência bacteriana. Algumas cepas de *Pseudomonas* também possuem a capacidade de aumentar a tolerância à seca e melhorar a produção agrícola, pois além de induzirem diferentes expressões gênicas associadas à tolerância à seca, certas *Pseudomonas* demonstraram promover o crescimento vegetal de forma eficaz e oferecer atividade antifúngica em condições de estresse hídrico (RUIZ-HERNANDEZ; MADRIGAL-PEREZ; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2024).

2.3.3. Gênero *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella* pertence à família Enterobacteriaceae, constituída por um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram-negativas, comumente isoladas de amostras biológicas e amplamente distribuídas na natureza. Essas bactérias podem ser encontradas na água, no solo, em plantas e no trato gastrointestinal de seres humanos e animais. As enterobactérias destacam-se como importantes agentes Gram-negativos causadores de infecções hospitalares, especialmente infecções de corrente sanguínea. As espécies de *Klebsiella* têm emergido como patógenos oportunistas, sendo também capazes de causar infecções adquiridas na comunidade (PEREIRA, 2019).

Em plantas, cepas de *Klebsiella pneumoniae* capazes de viver como endófitos têm despertado interesse, pois podem aumentar o crescimento vegetal em condições agrícolas e fornecer nitrogênio a determinadas gramíneas. As bactérias do gênero *Klebsiella* são fixadoras de nitrogênio de vida livre e vivem associadas à rizosfera, caulosfera e filosfera de plantas de interesse agrícola. Estudos demonstraram que essas bactérias promovem o desenvolvimento vegetal, aumentando até mesmo o rendimento de cultivos em diferentes tipos de solos e condições edafoclimáticas. Adicionalmente, verificou-se que essas cepas conseguem colonizar

o interior de uma ampla variedade de plantas hospedeiras, mesmo com uma dose muito pequena de inóculo (FOUTS *et al.*, 2008).

3. Metodologia

3.1. Identificação molecular (16s rDNA)

A identificação molecular dos isolados bacterianos 01, 13 e 43 foi sequenciamento molecular do gene 16s rDNA. A extração total de DNA foi realizada utilizando o kit Insta Gene Matrix Bio-Rad de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a amplificação do DNA foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com primers específicos para o gene 16S rRNA, fD1 (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3') e rD1 (5'- 111 CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3') (Weisburg *et al.*, 1991), e os produtos amplificados foram sequenciados utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 *Cycle Sequencing* no sequenciador capilar modelo ABI 3130 - Perkin Elmer. As sequências obtidas foram submetidas a uma consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados GenBank acessado através do site do NCBI (“*National Center for Biotechnology Information*”), através da ferramenta local BLAST – “Basic Local Alignment Search Tools” (WEISBURG *et al.*, 1991).

3.2. Caracterização da Dinâmica de Crescimento

Para caracterizar a dinâmica de crescimento dos isolados bacterianos, foi construída uma curva de crescimento para cada um dos isolados, utilizando o método de microdiluição. Nesse método, foi preparada uma série de diluições com alíquotas do isolado, cultivadas em meio de cultura específico, em diferentes tempos. As diluições foram plaqueadas em meio de cultura específico e depois observado a formação de colônias, para assim montar um gráfico de linhas característico da curva de crescimento bacteriano.

Para esse processo, foram preparadas uma série de diluições em microtubos, com 900 microlitros de solução salina e 100 microlitros do meio contendo o isolado. Para o isolado 01 foram determinados 6 intervalos de tempo (T0, T6, T12, T18, T24, T30) e para os isolados 13 e 43 foram preparados 9 intervalos de tempo (T0, T6, T12, T18, T24, T30, T36, T42, T48), onde após cada tempo foi realizada uma diluição seriada, e as diluições de 10^{-2} a 10^{-7} foram

plaqueadas. As placas foram colocadas na BOD a 30°C por 24 h. Após o crescimento, as colônias foram contadas.

3.3. Origem e Recuperação dos isolados

Os isolados utilizados fazem parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas- LBMP da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV). Para recuperação dos isolados foi depositado 50 microlitros (μL) de cada isolado na parte mais externa da placa e estriado com ajuda da alça de inoculação. As placas foram colocadas na BOD a 30°C por 1 dia, ou até observar a formação de colônias isoladas.

Para os estoques, foram utilizados criotubos previamente autoclavados com 200 μL de glicerol, e 800 μL de meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido em cada tubo, esse meio foi preparado com 10 gramas/litro (g/L) de Triptona de soja, 10 g/L de NaCl e 5 g/L de Extrato de Levedura. Foi retirado, com auxílio de palitos de dentes, 3 colônias de cada isolado e transferidas para os criotubos já preenchidos com o meio de cultura. Os criotubos foram marcados com o nome do isolado e o número de colônias e foram congelados por nitrogênio líquido (congelamento rápido) e armazenados no ultrafreezer -80°C.

3.4. Pré-inóculo

Com os estoques prontos, foi realizado o pré-inóculo dos isolados em meio de cultura LB líquido. Foi ressuspendido e retirado 50 μL de cada estoque de isolado (#1 colônia 1; #13 colônia 2; #43 colônia 2) e colocados em 50 mililitros (mL) do meio de cultura. Os erlenmeyer foram levados para o incubadora microbiana com agitação orbital a 30°C, 150 rpm por 24 horas (h). Isolado 01 com densidade óptica de 0,475 nm; isolado 13 com densidade óptica de 1,994 nm; e isolado 43 com densidade óptica de 1,596 nm. Essa metodologia foi utilizada para preparar todos os inóculos utilizados durante o projeto.

3.5. Atividade Enzimática

Com o intuito de avaliar a atividade enzimática dos isolados bacterianos foram preparados 5 meios de culturas específicos para cada enzima. Para identificar atividade de

protease, foi utilizado o meio Difco™ Skim Milk (BD Life Sciences, New Jersey, U). A metodologia descrita por Pretscher *et al.* (2018) foi utilizada para avaliar a atividade de celulase dos isolados, e a para identificar atividade de amilase a metodologia seguida foi a estabelecida por Hossain *et al.* (2020). A atividade de lipase e esterase foram observadas através da metodologia descrita por Ramnath *et al.* (2017). Em cada placa foi inoculado 10 µL de cada isolado preparado no pré inóculo, e as placas foram incubadas na BOD por 48h a 30°C.

A atividade enzimática dos isolados bacterianos foi analisada observando se houve consumo do meio de cultura específico ou não, analisado pela formação de um halo em volta da colônia.

3.6. Estresse salino e pH

A fim de observar o crescimento dos isolados em condições de estresse, foi realizado um ensaio de estresse salino e variações de pH.

No ensaio para estresse salino foram feitos 6 tratamentos com concentrações variadas de NaCl (feito em meio de cultura sólido LB); T1- 0% (0 g de NaCl), T2- 0,5% (0,4 g), T3- 2,5% (2 g), T4- 5,5% (4,4 g), T5- 7,5% (6 g), T6- 10,5% (8 g), para 80 mL de meio em cada tratamento. Foi inoculado 10 µL de cada isolado no centro da placa em todos os tratamentos. As placas foram armazenadas na BOD por 24 h a 30°C, e posteriormente foi analisado o crescimento dos isolados.

Para verificar o crescimento dos isolados em diferentes faixas de pH, foi preparado meios de cultura LB normalmente apenas variando o pH do meio. Foram feitos 8 tratamentos para cada isolado; T1 - pH 3, T2 - pH 4, T3 - pH 5, T4 - pH 6, T5 - pH 7, T6 - pH 8, T7 - pH 10. Os meios que tiveram o pH acertado para 3 e 4 foram feitos em meio LB líquido, pois o pH ácido desabilitou o ágar, fazendo com que os meios não solidificassem; os demais tratamentos foram realizados em meio LB sólido. Um tratamento controle (pH 7) foi preparado para posteriormente medir a densidade óptica dos ensaios feitos em meio líquido. No ensaio com meio sólido, e também no líquido, foram inoculados 10µL de cada isolado. No meio sólido, o isolado foi colocado no centro da placa. As placas do ensaio foram mantidas na BOD 30°C por 24 h. Em meio líquido, os tubos com o meio e os isolados foram levados ao incubadora microbiana com agitação orbital 30°C e 150 rpm por 24h. A densidade óptica dos meios líquidos foi medida no espectrofotômetro a 600 nanômetros (nm), e foi colocado 1000 µL de cada tratamento nas cubetas.

3.7. Estresse osmótico

Para observar o crescimento dos isolados bacterianos em concentrações variadas de soluto foi montado um primeiro ensaio de estresse osmótico com diferentes concentrações de Polietilenoglicol 600 (PEG 600) no meio de cultura, e um segundo ensaio com concentrações variadas de glicerol. Esses ensaios foram realizados em meio de cultura LB líquido e o crescimento dos isolados foi quantificado no espectrofotômetro de massas por meio da densidade óptica.

O ensaio de estresse osmótico com PEG 600 foi realizado em 4 tratamentos, sendo um controle, variando a concentração de Polietilenoglicol (PEG 600) em meio de cultura LB líquido. Os valores de PEG para cada tratamento foram: T1 = 2,37 g; T2 = 3,58 g; T3 = 4,06 g; T4 = 0 g, para 15 mL de meio e cultura. Em cada tratamento foi inoculado 100 µL de cada isolado preparado no pré inóculo. Os tratamentos foram incubados no incubadora microbiana com agitação orbital por 48 h a 30°C e 150 rpm. Passados esses dias foi medido a densidade óptica dos tratamentos no espectrofotômetro a 600 nm e foi tirado foto dos tratamentos.

No ensaio com Glicerol foram feitos 3 tratamentos, variando a concentração de Glicerol em cada um deles: 5% (0,25 mL), 15% (0,75 mL) 25% (1,25 mL); essas concentrações foram colocadas em 45 mL de meio de cultura LB líquido. Foram inoculados 100µL de cada isolado nos tratamentos. Os tubos foram armazenados no incubadora microbiana com agitação orbital por 48 h a 30°C e 150 rpm, depois desse tempo foi tirada foto dos tratamentos e foi medida a densidade óptica no espectrofotômetro a 600 nm.

3.8. Produção de Exopolissacarídeo (EPS)

A produção de Exopolissacarídeos (EPS) pelos isolados bacterianos foi determinada seguindo o protocolo de Meneses e realizada em dois meios de cultura diferentes, no meio LB que é um meio de cultura nutritivamente rico o que favorece o crescimento das bactérias; e no meio de cultura Peptona de caseína e soja (TSB) que estimula a produção de EPS, dessa forma o protocolo foi realizado nos dois meios a fim de observar o desenvolvimento das bactérias. O meio TSB foi preparado com 30 g/L de triptona, 20 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl. Os isolados foram cultivados em meio adequado durante 72 h a 28°C. Foi coletada uma alíquota de 2 mL do meio de cultura contendo o isolado e colocado em microtubos de 2 mL, o tubo foi

centrifugado a 14000 rpm, 4°C durante 12 min. Logo após a centrifugação, uma alíquota de 50-100 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 150 µL de álcool etílico 70% congelado. O microtubo foi centrifugado novamente a 14000 rpm, 4°C durante 10 min, depois, o tubo foi levado a um concentrador de amostras a 45°C durante 1h ou até que a amostra estivesse totalmente seca. Após as amostras secarem, foi adicionado 200 µL de água Mili-Q estéril e homogeneizada no vórtex. Em seguida, foi incorporado 200 µL de ácido fênico 5% e 1 mL de H₂SO₄ concentrado e homogeneizado no agitador de tubo tipo vórtex, depois foi deixado em repouso durante 15 min à temperatura ambiente. Em uma placa de 96 poços de polipropileno de fundo chato foi colocado 150 µL de cada tratamento, e realizada a leitura no espectrofotômetro usando o comprimento de onda de 480 nm. Foi realizado o registro fotográfico da placa. Observação: os valores obtidos devem ser contrastados com uma curva de calibração baseada em glicose em diferentes concentrações (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 µL mL⁻¹).

3.9. Produção de Biofilme

A capacidade de produção de Biofilme pelos isolados bacterianos foi analisada por duas metodologias diferentes e posteriormente comparadas. A primeira metodologia utilizada foi a descrita por Lima *et al.* (2017), e a segunda utilizada foi a descrita por O'toole (2011). Para ambas as metodologias, os resultados foram obtidos através da leitura pelo espectrofotômetro UV-VIS em três diferentes comprimentos de onda. As metodologias utilizadas foram descritas abaixo.

3.9.1. Protocolo 1- Lima *et al.* (2017)

Foi preparado meio LB para o crescimento dos 3 isolados, em tubos de ensaio com 3 repetições, foi inoculado 50 µL de cada isolado preparado no pré inóculo, e os tubos foram deixados na BOD a 30°C por 96 h para crescimento estático. Após este período, os tubos foram fotografados e foi medida a densidade óptica (D.O) 600 nm. As células bacterianas e o sobrenadante foram descartados e os tubos de ensaio lavados três vezes com água Mili-Q. Nos tubos de ensaio se adicionou 1 mL de solução de Cristal Violeta (CV) 0,1%, a solução foi preparada adicionando 0,1 g do corante em 100 ml de água Mili-Q. Depois da adição da solução, os tubos foram deixados em repouso durante 15 min à temperatura ambiente. Novamente os

tubos foram lavados três vezes com água Mili-Q e foram fotografados. Logo após, adicionou-se em cada recipiente 1ml de álcool etílico 95% (o álcool solubiliza o corante que está retido no biofilme). Foi coletado 150 µL de cada solução e transferido para uma placa de 96 poços, logo em seguida realizada, por espectrofotômetro, a medição da densidade óptica nos comprimentos de onda de 595 nm, 560 nm e 550 nm. E foi realizado outro registro fotográfico. Controle positivo: CV 0,1%. Controle negativo: H₂O Mili-Q (branco 1), álcool etílico 95% (branco 2). Realizando a leitura usando cada um dos brancos separados.

3.9.2. Protocolo 2- O'toole (2001)

Inicialmente, os isolados 01, 13, 43 foram inoculados em meio de cultura LB líquido, durante 24h a 30°C e 120 rpm. Logo em seguida, o meio de cultura contendo os isolados foi centrifugado a 1000 rpm a 10°C por 20 min, depois o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o pellet foi lavado com PBS - tampão salino tamponado com fosfato - 1X (o volume de PBS a ser usado depende da quantidade de pellet obtido após a centrifugação). A amostra foi inoculada em meio TSB em proporção 1:100 (meio:inóculo), depois foi coletada uma alíquota de 100 µL e inoculado em uma placa de 96 poços de polipropileno de fundo chato, realizando de 6-8 repetições por tratamento. A placa foi incubada a 30°C por 48 h, e depois foram lavadas três vezes com água Mili-Q. Em cada poço da placa, foi adicionado 125 µL de solução de Cristal-Violeta 0,1% e deixada em repouso a temperatura ambiente por 15 min. após as placas foram lavadas quatro vezes com água Mili-Q e deixadas para secar *overnight* à temperatura ambiente e foi feito o registro fotográfico da placa. Em seguida, foi adicionado 125 µL de ácido acético 30% em cada poço, e deixado em repouso durante 15 min a temperatura ambiente (o ácido solubiliza o corante que estava retido no biofilme). Um volume de 152 µL da solução foi transferido para uma nova placa para realizar a leitura no espectrofotômetro com o comprimento de onda de 595 nm, 560 nm e 550 nm. E por fim, foi realizado mais um registro fotográfico da placa. Controle negativo: meio de cultura não inoculado. Controle branco: ácido acético 30%.

3.10. Teste de susceptibilidade de bactérias à antibióticos (AST)

A fim de identificar a sensibilidade dos isolados bacterianos aos antibióticos foi montado o AST, utilizando o Método de difusão de disco (Método de Kirby-Bauer) (Figura 1),

onde discos de antibióticos variados (Tetraciclina, Canamicina, Eritromicina, Amoxicilina, Estreptomicina, Novobiocina, Neomicina, Cloranfenicol e Rifampicina) foram colocados em uma placa com meio de cultura específico juntamente com os isolados estudados e armazenados na BOD a 30°C por 48 h, até que o isolado tenha crescido completamente pela placa. A zona de inibição que pode se formar ao redor de cada disco foi medida e comparada a critérios interpretativos.

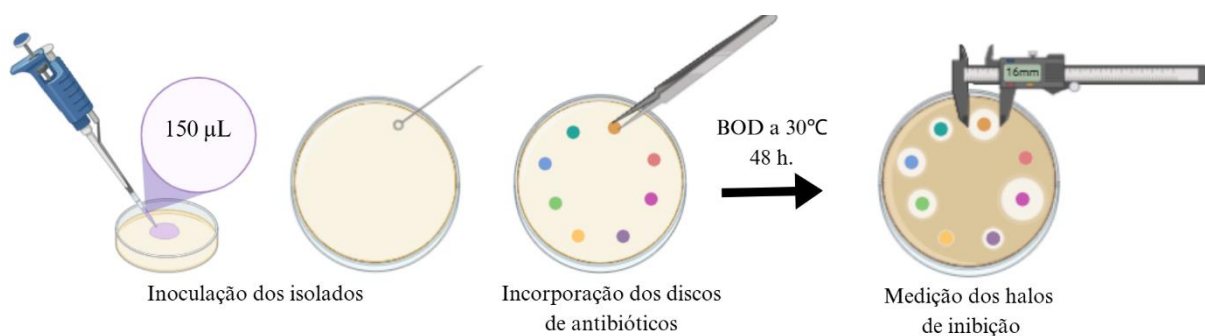


Figura 1. Representação gráfica do Método de difusão de disco (Método de Kirby-Bauer).

3.11. Produção de Ácido 3- Indol acético (AIA)

Para caracterizar a produção de Ácido 3- Indol acético (AIA) pelos isolados bacterianos, primeiramente foi realizado um teste qualitativo a fim de identificar se os isolados produzem AIA, e posteriormente realizado um teste quantitativo. Para a quantificação dos teores equivalentes de AIA, foi montada uma curva padrão com AIA sintético em diferentes concentrações.

Para o teste qualitativo, 200 µL de cada isolado (isolado 01, 13 e 43) foram inoculados em uma placa de petri contendo meio YMA (10 g/L de Manitol; 0,5 g/L de K_2HPO_4 ; 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/L de NaCl; 0,4 g/L de Extrato de Levedura e 12 g/L de Ágar) e deixados na BOD a 30°C por 5 dias a fim de crescer os isolados. As colônias formadas foram transferidas, com a ajuda de uma alça de inoculação, para um erlenmeyer com 10 mL de meio YML (10 g/L de Manitol; 0,5 g/L de K_2HPO_4 ; 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/L de NaCl; 0,4 g/L de Extrato de Levedura) e 0,1 mg de triptofano. Os erlenmeyers foram deixados no incubadora microbiana com agitação orbital a 30°C e 150 rpm por 3 dias. Em seguida, uma alíquota de 1000 µL do meio contendo o isolado foi transferido para um microtubo e a amostra foi centrifugada por 2 min. Após a centrifugação, 100 µL do sobrenadante foi colocado em uma placa de 96 poços juntamente com 100 µL do reagente de Salkowski (10 mL de $FeCl_3$ 0,5 M, 500 mL de ácido perclórico 70%, completar até 1 L com água destilada), e foi incubado por aproximadamente

30 minutos para observar se houve mudança na coloração (quanto mais rosado a amostra ficar, mais AIA o isolado produz). Para o teste quantitativo a concentração de AIA foi determinada a pela densidade óptica em 530 nm no espectrofotômetro de massas e, posteriormente, comparadas com uma curva padrão de AIA (10 - 100 µg/ml).

3.12. Teste de Solubilização de Fosfato

O teste de solubilização de Fosfato foi realizado para determinar se os isolados bacterianos possuem a capacidade de solubilizar este elemento. Para esse teste foi preparado o meio de cultura NBRIP seguindo a metodologia descrita por NaV'y *et al.* (1999), e observada a formação de halo de solubilização no meio feita pelos isolados. Para um volume de 100 mL de meio foi adicionado 2,0 g de glicose; 4 mL de Hidroxiapatita de cálcio - $\text{Ca}_2(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$; 5,0 g de Cloreto de Magnésio - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de Sulfato de Magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de Cloreto de Cálcio - CaCl_2 ; 0,1 g de Sulfato de Amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e 12 g de Ágar o pH do meio foi corrigido para 7,0. O meio foi autoclavado por 20 min a 120°C e vertido em placas de petri previamente refrigeradas por 60 minutos à 40°C (para o reagente não precipitar). Nas placas foram inoculados 10 µL de cada isolado (isolado 01 e 43) separadamente, e deixadas para crescer na BOD a 30°C por 5 dias. A capacidade de solubilização foi definida pela observação da formação do halo de solubilização formado no meio de cultura específico em que as bactérias foram inoculadas.

3.13. Ranking dos Isolados

As propriedades de promoção de crescimento e tolerância ao estresse dos isolados bacterianos foram avaliadas através de uma análise quantitativa baseada em Z-score, o que permitiu a construção de um ranking objetivo. As características avaliadas nessa estatística incluíram estresse osmótico (PEG e glicerol); extremos de pH e tolerância ao estresse salino (NaCl); atividades enzimáticas (celulase, protease, amilase, lipase e esterase); produção de exopolissacarídeos (EPS) e biofilme; produção de ácido 3-indol acético (IAA); e solubilização de fósforo. Os dados experimentais foram padronizados através da fórmula, garantindo uma escala uniforme para todas as características. Uma pontuação total foi calculada para cada isolado como a soma de seus z-score individuais, ajustados com pesos, se necessário. A classificação final foi validada por meio de análises estatísticas de normalidade, utilizando as

funções shapiro.test e ks.test do pacote stats, e detecção de outliers com boxplots gerados com o pacote ggplot2

4. Resultados

4.1. Identificação molecular e Caracterização da dinâmica de crescimento

A partir do sequenciamento do gene 16s foi possível identificar a nível de gênero os isolados estudados. O isolado previamente chamado de 01 foi identificado como *Bacillus sp.* (Figura 2); o isolado 13 foi caracterizado como do gênero *Klebsiella sp.* (Figura 3); e o isolado 43 é pertencente ao gênero *Pseudomonas sp.* (Figura 4).

De acordo com o dendograma filogenético, o isolado 01 agrupou-se com *Bacillus sanguinis*, já o isolado 13 como *Klebsiella pneumoniae* e por fim o isolado 43 com *Pseudomonas glycinae*, indicando que possivelmente esses isolados podem ser dessas respectivas espécies.

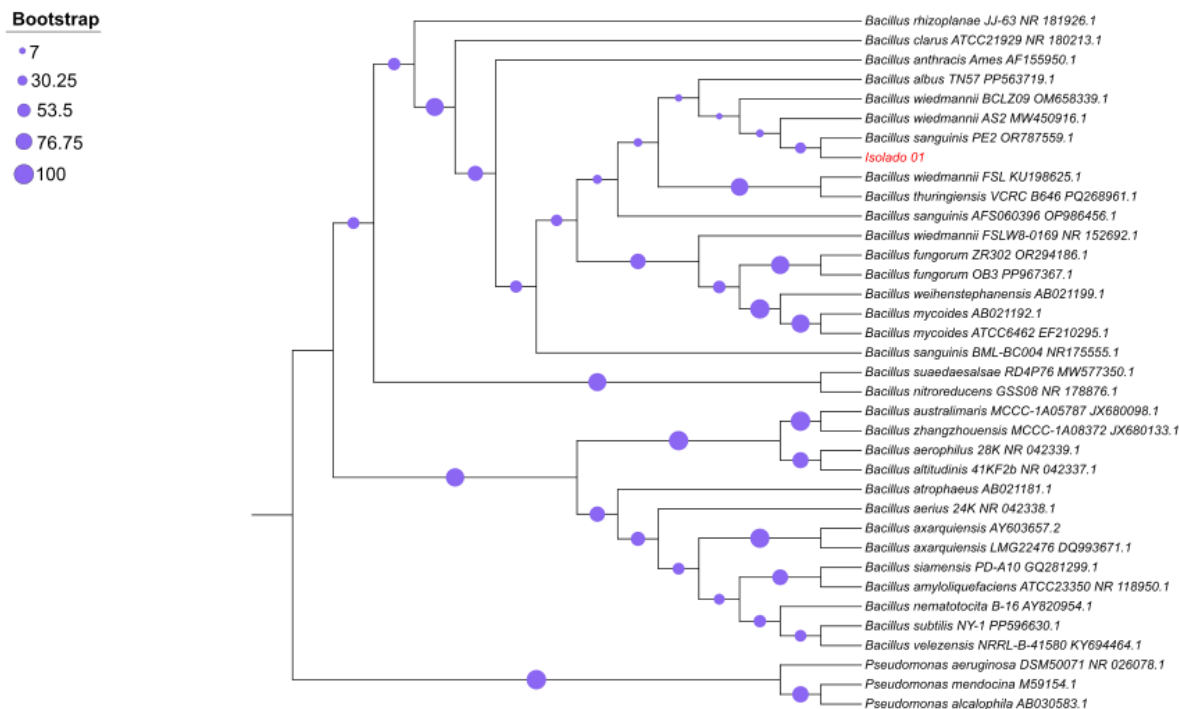


Figura 2. Árvore filogenética do *Bacillus sp.*

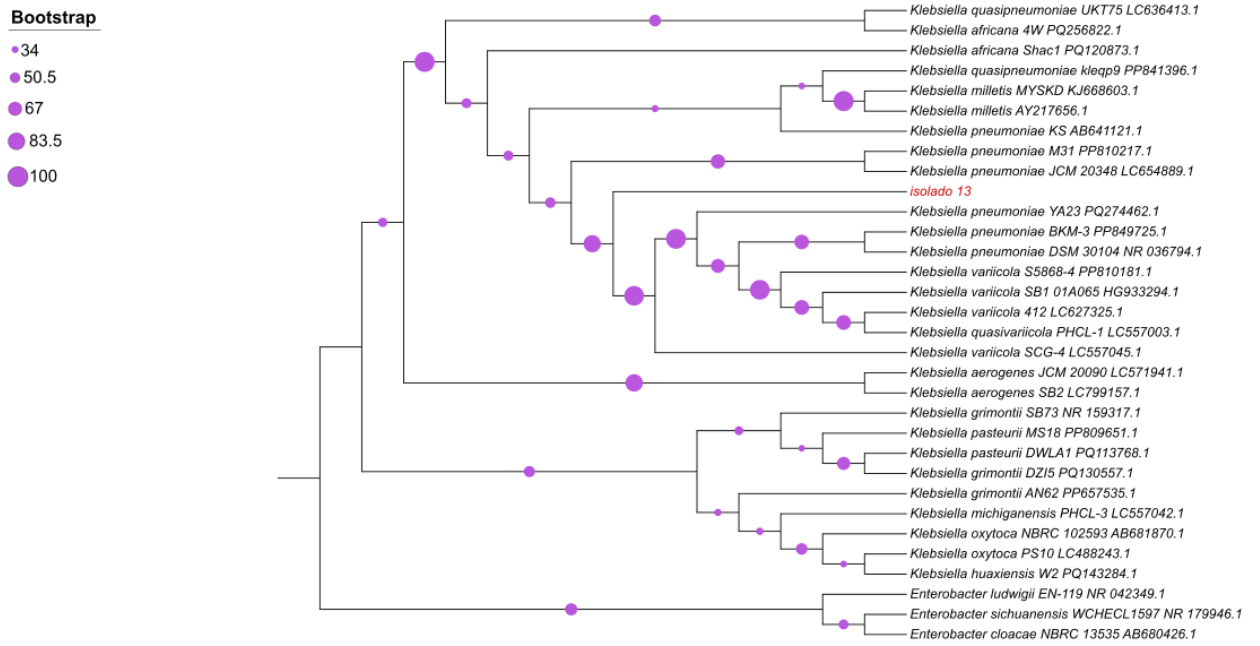


Figura 3. Árvore filogenética do *Klebsiella* sp.

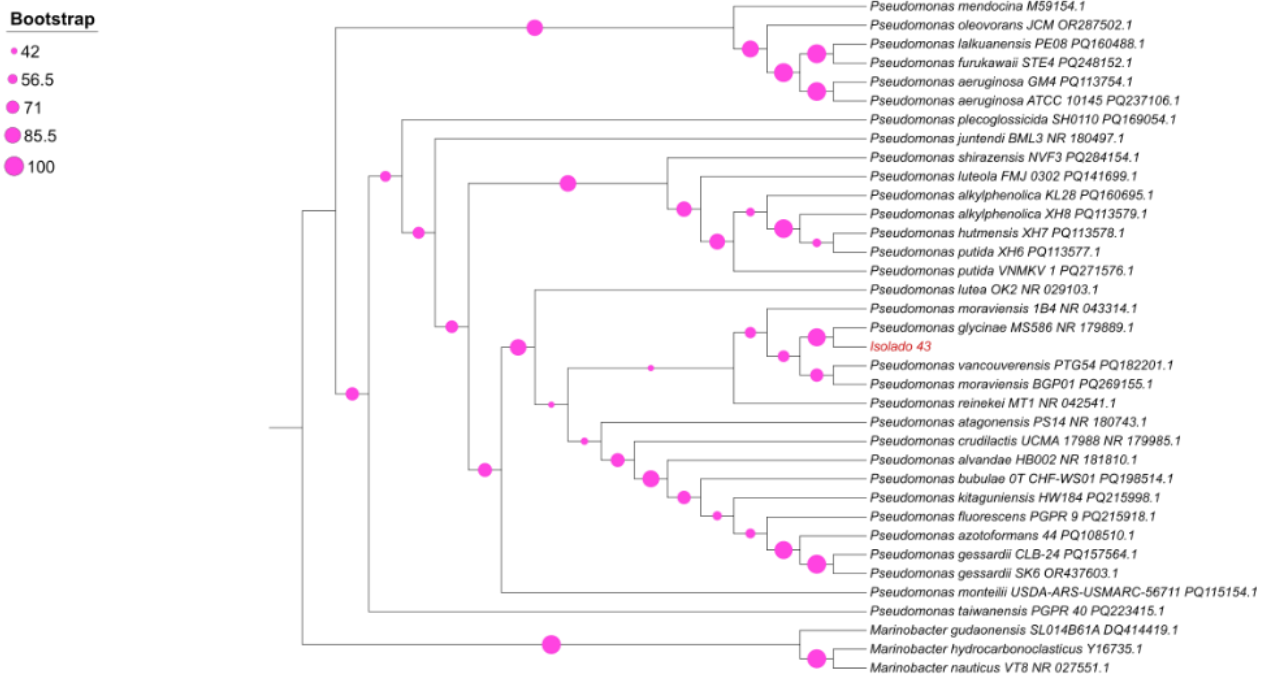


Figura 4. Árvore filogenética do *Pseudomonas* sp.

Com a observação das colônias formadas em cada diluição nos tempos determinados (Figura 5-7), foi feita a contagem das colônias onde foi possível caracterizar a dinâmica de crescimento dos isolados. Todos os isolados atingem a fase exponencial de crescimento após 12 horas (h) de cultivo; o isolado 01 tem uma fase estacionária de aproximadamente 6-8 h e em decaimento em 18 h, enquanto o isolado 13 começa a apresentar uma fase estacionária maior, de 18-20h e entra em decaimento em 30 h e o isolado 43 também apresenta uma fase estacionária mais curta, de aproximadamente 3-4 h, e decai após 16 h.

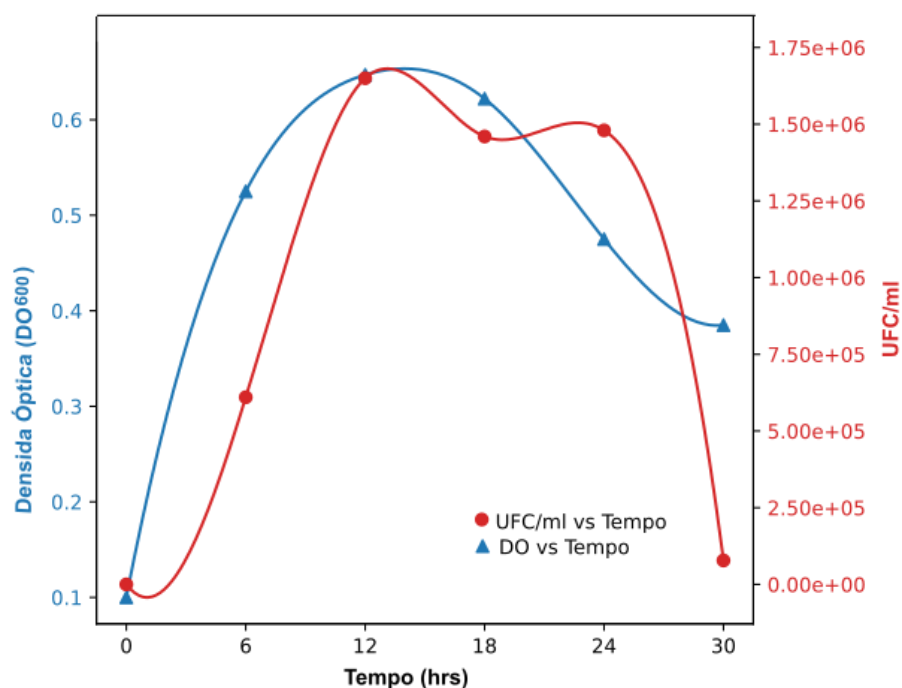


Figura 5. Dinâmica de crescimento do *Bacillus sp.*

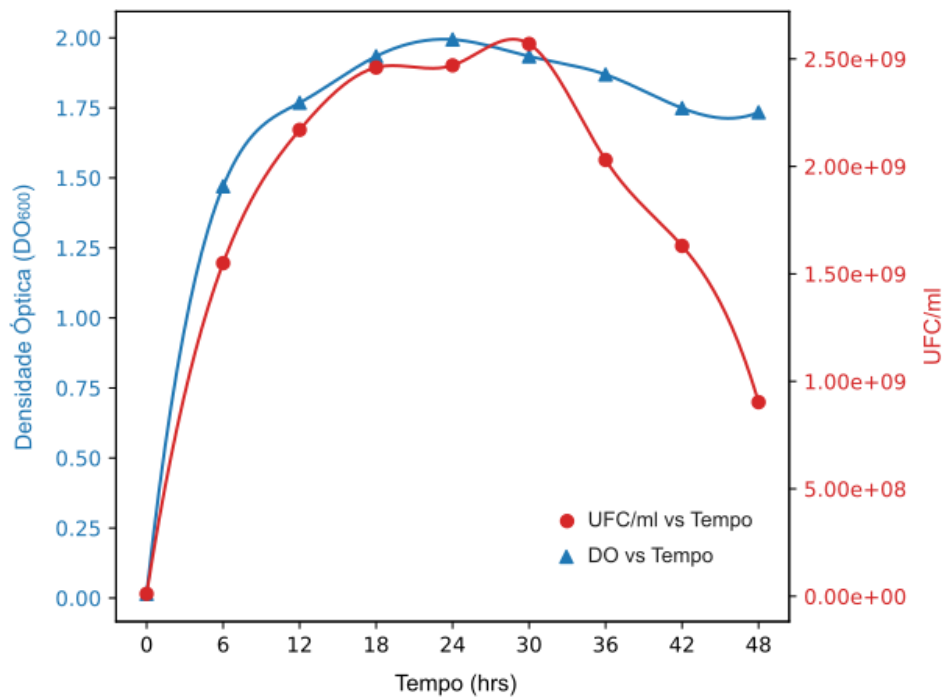


Figura 6. Dinâmica de crescimento do *Klebsiella sp.*

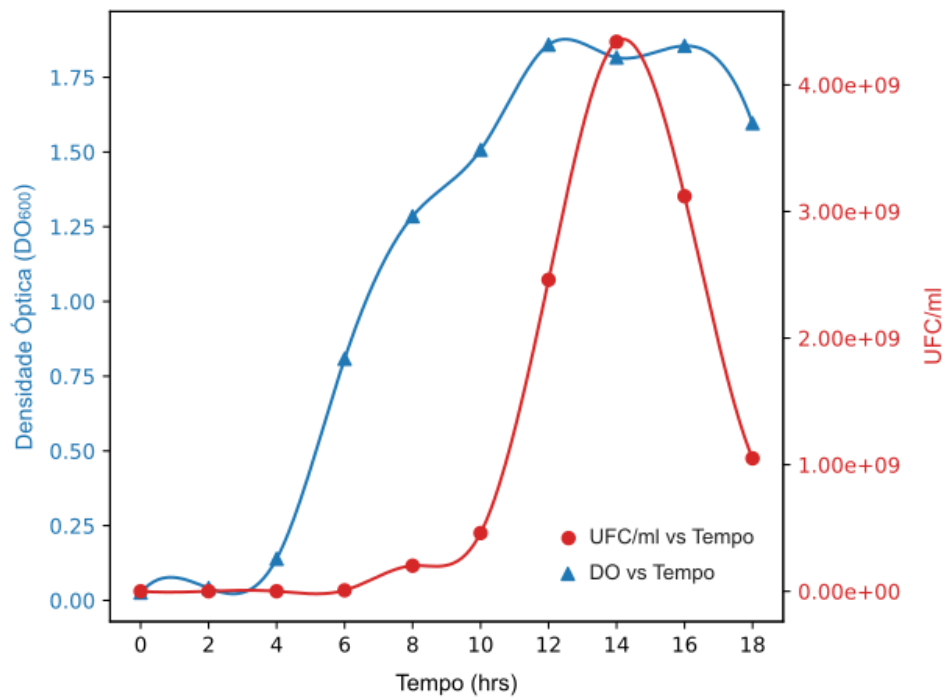


Figura 7. Dinâmica de crescimento do *Pseudomonas sp.*

4.2. Capacidade de crescimento das bactérias sob diferentes condições de estresse

Para a protease, apenas o *Bacillus sp.* apresentou halo no meio (Figura 6). Para celulase, apenas *Bacillus* e *Pseudomonas* apresentam atividade positiva (Figura 7); no meio com amilase, *Bacillus* e *Klebsiella* conseguiram degradar o meio e, portanto, produzem a enzima (Figura 8). No teste com lipase foi observada a produção da enzima por todas as bactérias analisadas (Figura 9); e para a atividade da esterase, apenas *Klebsiella* e *Pseudomonas* apresentaram atividade positiva (Figura 10) (Tabela 1).



Figura 6. Formação do halo em meio protease por *Bacillus sp.*



Figura 7. Formação do halo em meio celulase por *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.*, respectivamente.



Figura 8. Formação do halo em meio amilase por *Bacillus sp.* e *Klebsiella sp.*, respectivamente.

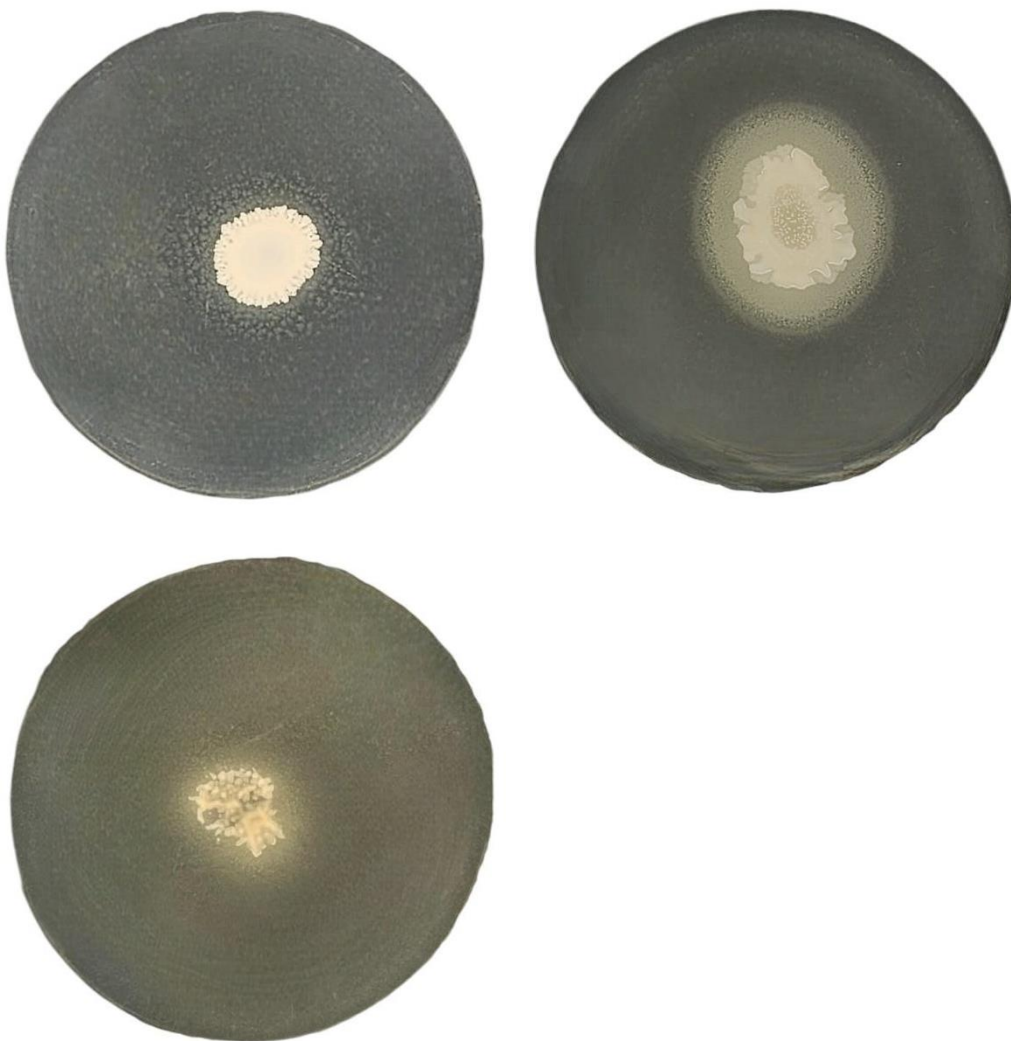


Figura 9. Formação do halo em meio lipase por *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas sp.*, respectivamente.

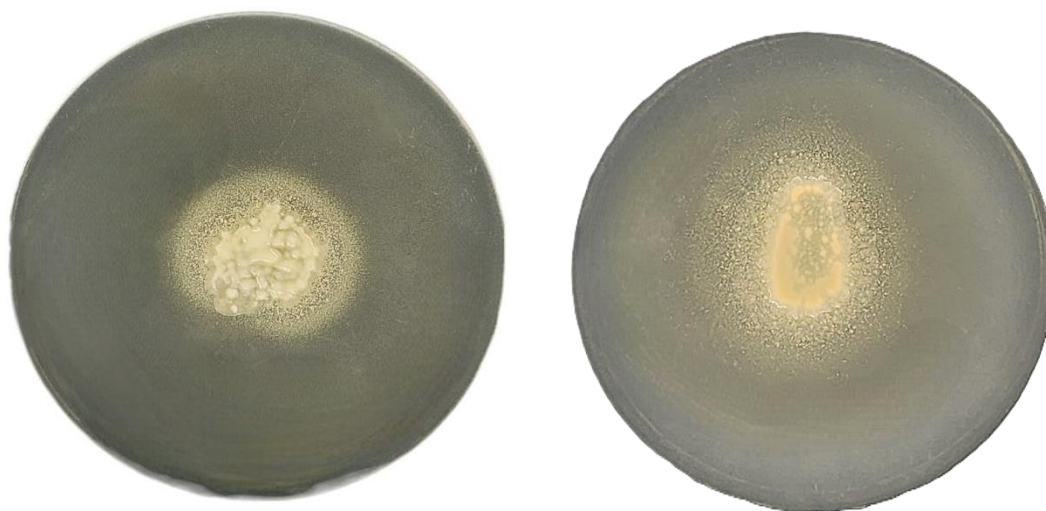


Figura 10. Formação do halo em meio esterase por *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas sp.*, respectivamente.

Tabela 1. Atividade Enzimática das Bactérias.

Bactérias	Protease	Celulase	Amilase	Lipase	Esterase
<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella</i>	-	-	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	+	+

Legenda: + Atividade positiva/ - Atividade negativa

No ensaio com meio suplementado com NaCl em diferentes concentrações foi observado que a cepa de *Bacillus sp.* foi a única que conseguiu se desenvolver em todas as concentrações de NaCl utilizadas (Figura 11); a cepa de *Klebsiella sp.* não conseguiu se desenvolver no tratamento com maior concentração de NaCl (10,5% de NaCl) (Figura 12); a cepa de *Pseudomonas sp.* foi a que menos se adaptou a condição analisada, não conseguindo se desenvolver nos tratamentos com concentrações superiores à 2,5% (Figura 13).

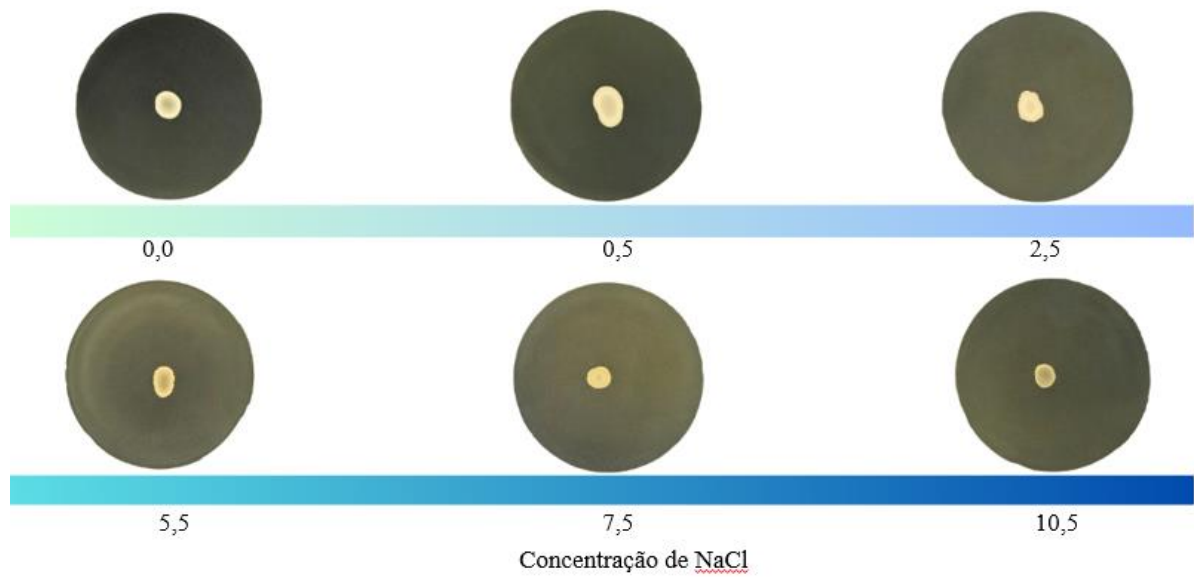


Figura 11. Crescimento de *Bacillus sp.* em concentrações variadas de NaCl.

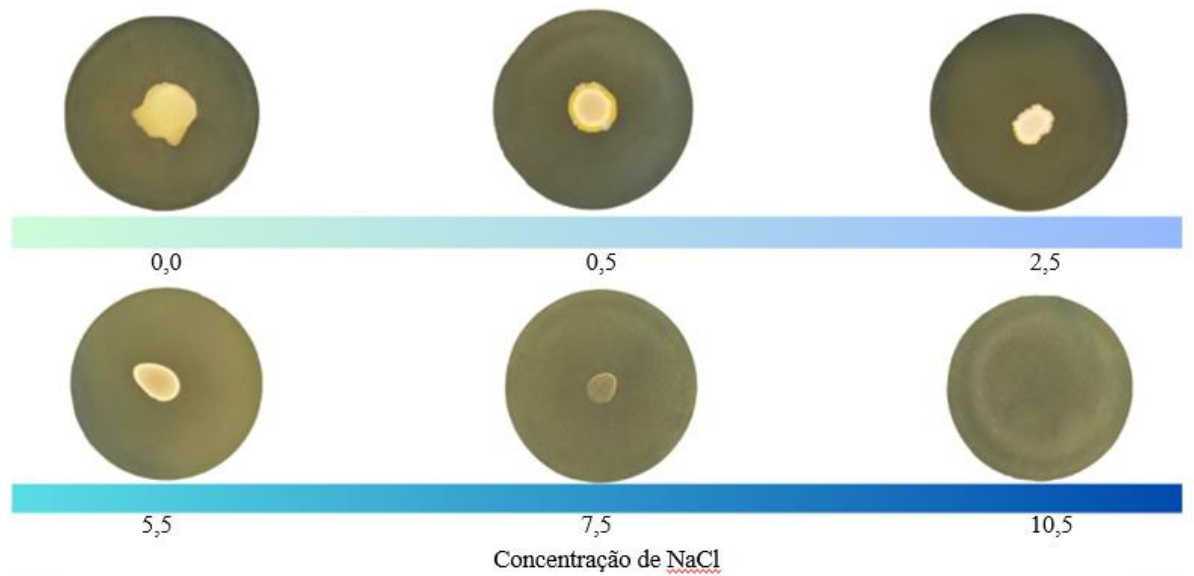


Figura 12. Crescimento de *Klebsiella sp.* em concentrações variadas de NaCl.

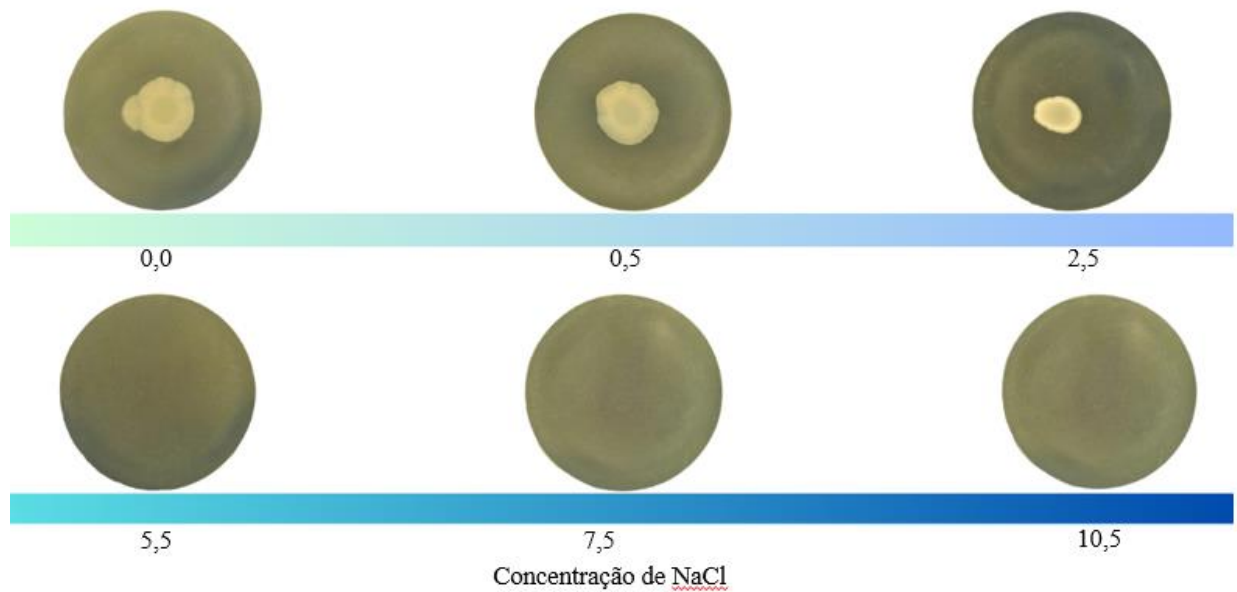


Figura 13. Crescimento de *Pseudomonas sp.* em concentrações variadas de NaCl.

Avaliando a capacidade de crescimento das bactérias em diferentes concentrações de pH foi observado que todas as três conseguiram se desenvolver em todos os tratamentos, evidenciando uma alta capacidade de adaptação a condições adversas de pH do solo pelas mesmas (Figura14, Figura 15, Figura 16).

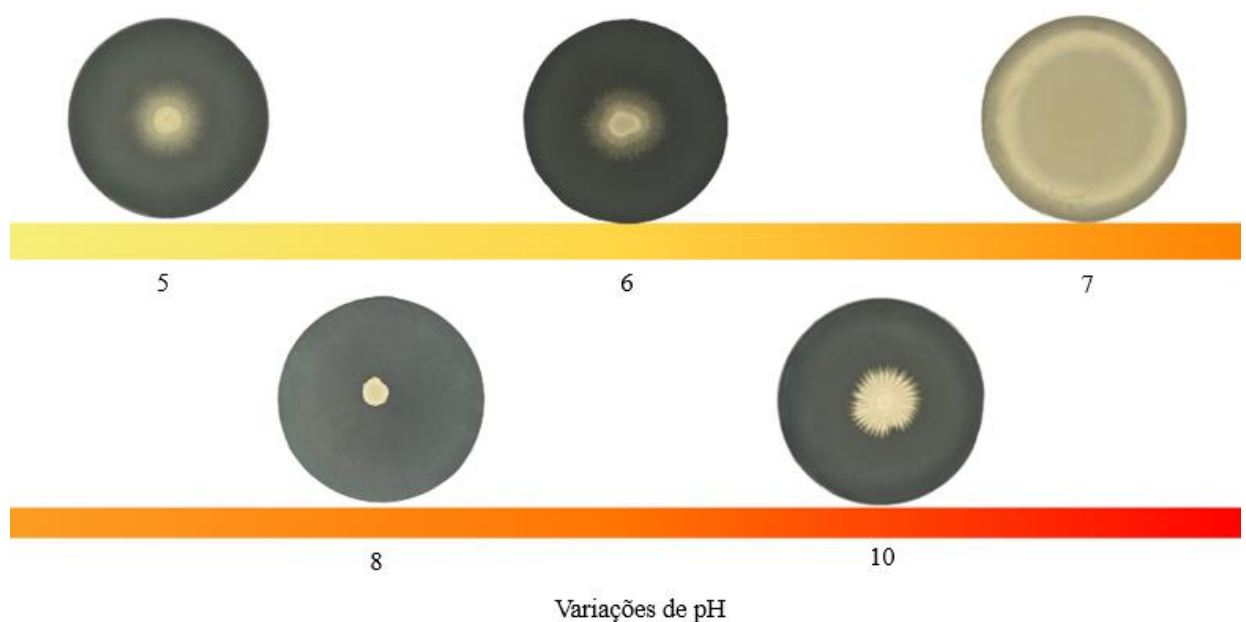


Figura 14. Crescimento de *Bacillus sp.* em variações de pH.

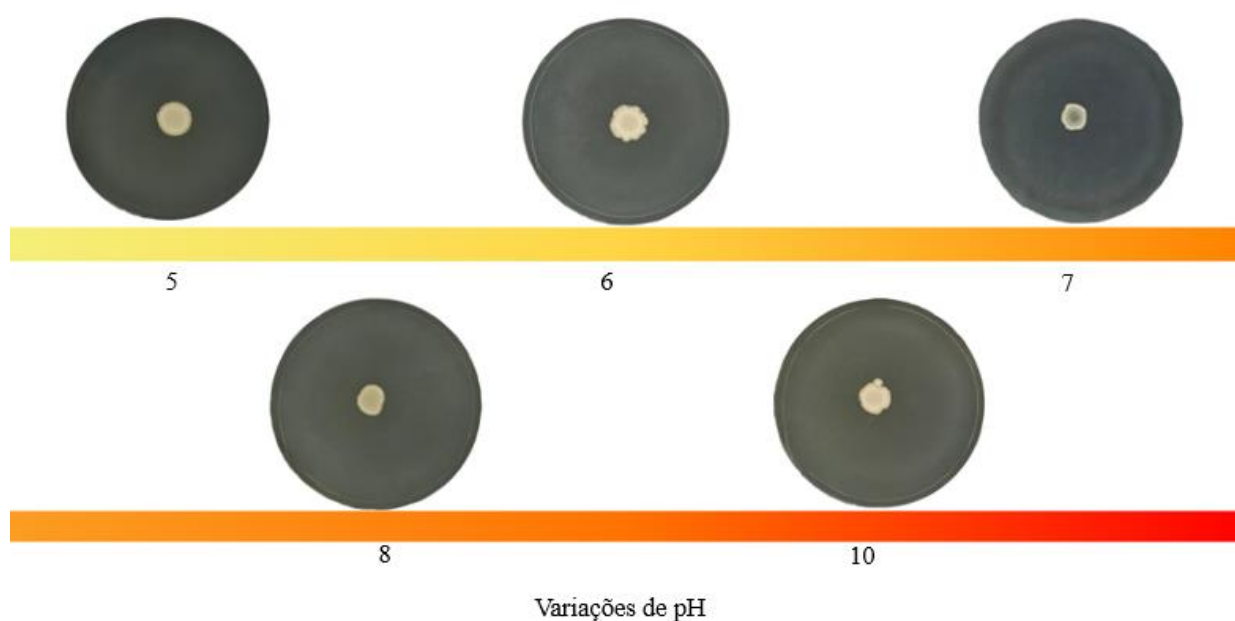


Figura 15. Crescimento de *Klebsiella sp.* em variações de pH.

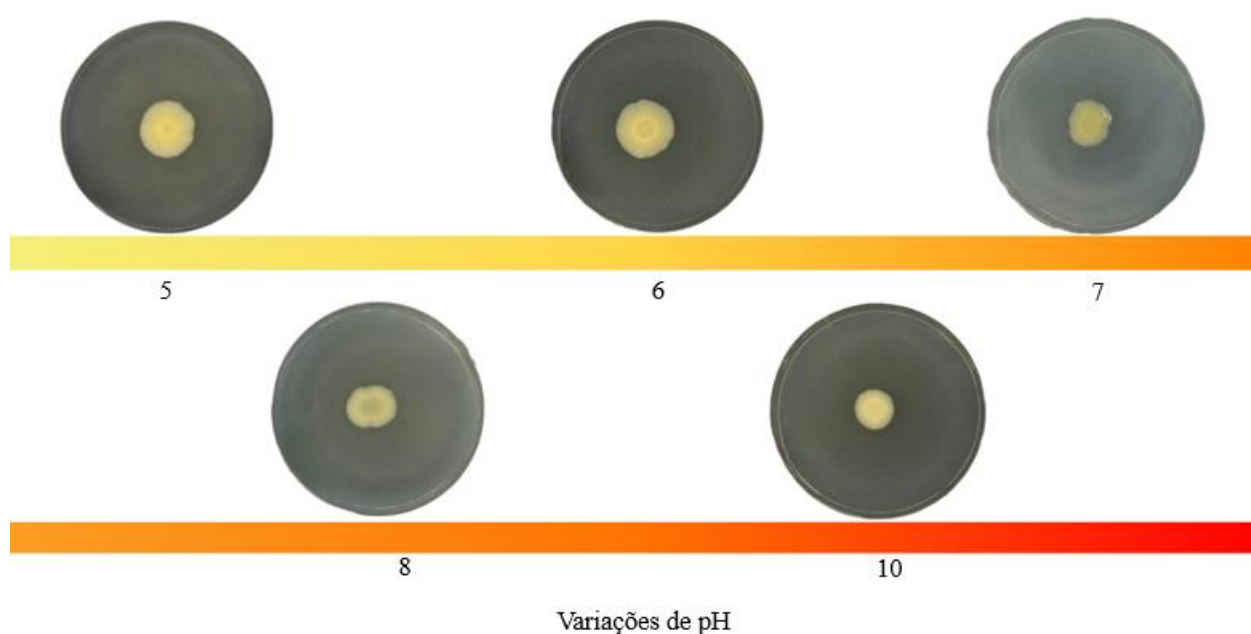


Figura 16. Crescimento de *Pseudomonas sp.* em variações de pH.

No ensaio de estresse osmótico realizado com PEG 600 todas as cepas tiveram um maior crescimento no tratamento de menor concentração de soluto (2,37 g de PEG 600/15 mL de meio), e o menor crescimento foi observado no tratamento com maior concentração de soluto

(4,06 g de PEG 600/15 mL de meio). O crescimento das bactérias, na menor concentração de PEG 600, foi menor em comparação com o tratamento controle, onde não foi adicionado PEG 600 no meio, evidenciando que esse soluto limita o crescimento das bactérias analisadas (Figura 17).

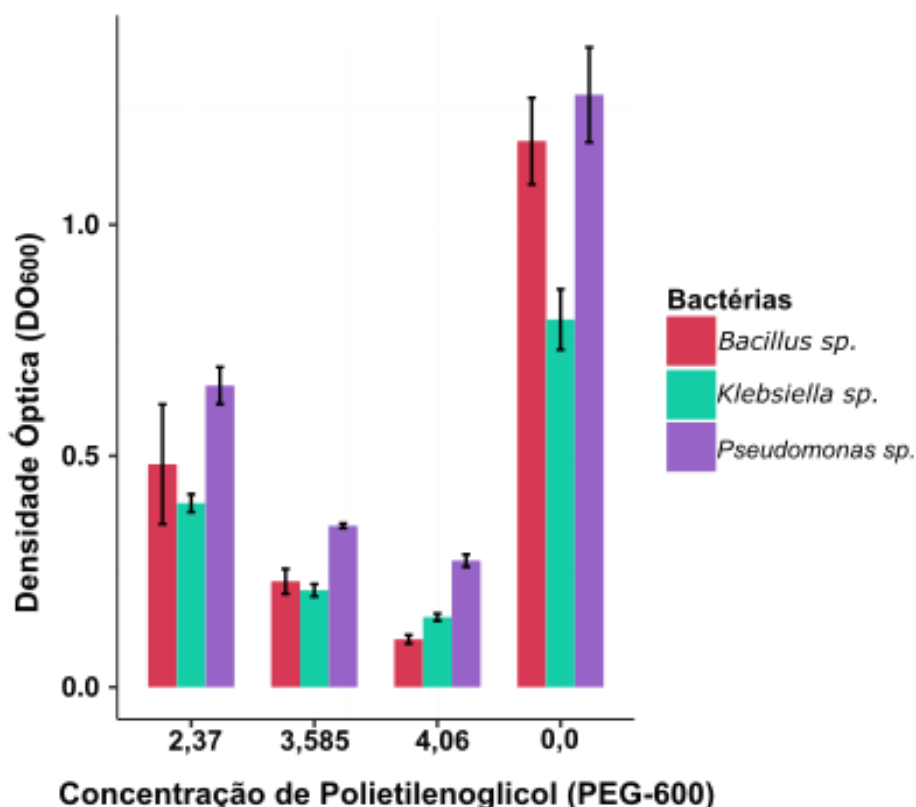


Figura 17. Gráfico da concentração das bactérias nos diferentes tratamentos com PEG 600.

Para o segundo ensaio, realizado com Glicerol, *Bacillus* e *Pseudomonas* apresentaram crescimento semelhante, desenvolvendo-se mais no tratamento com menor concentração de soluto (5% de Glicerol no meio) e tiveram seu crescimento limitado no tratamento com maior concentração de soluto (25% de Glicerol no meio). A *Pseudomonas* também se desenvolveu menos no tratamento com maior concentração de soluto (25% de Glicerol no meio), mas nos outros dois tratamentos analisados (5% e 15% de Glicerol no meio) o crescimento foi aproximado ao do controle (Figura 18).

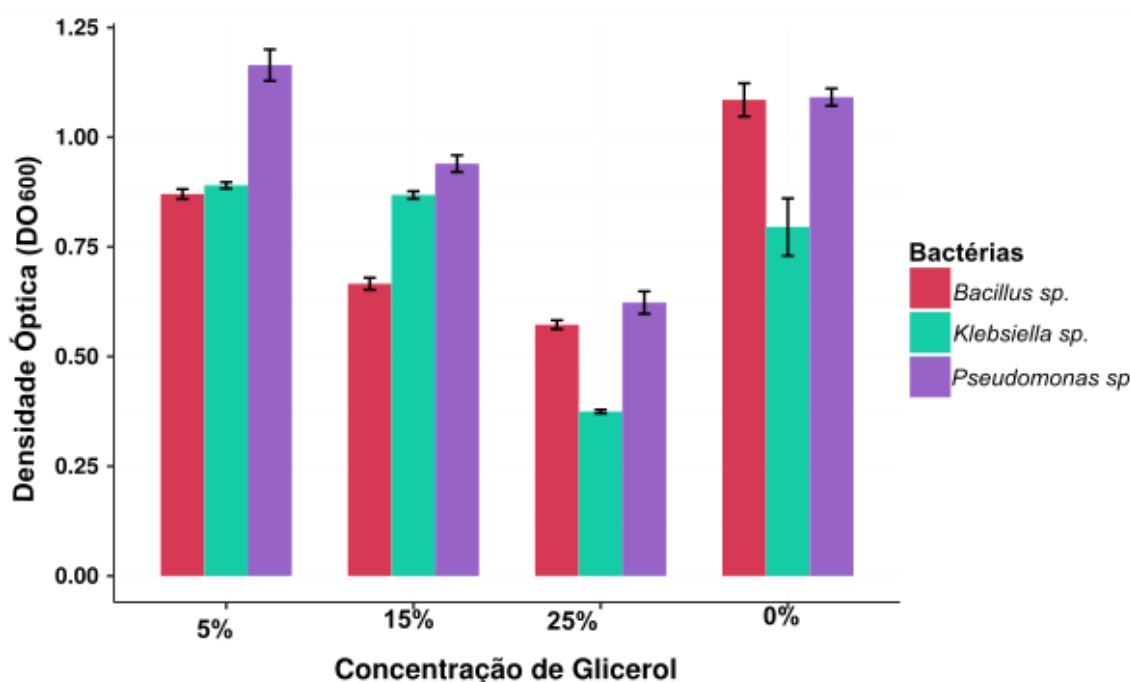


Figura 18. Gráfico da concentração das bactérias nos diferentes tratamentos com Glicerol.

A produção de EPS pelos isolados foi analisada baseando-se na curva de calibração de glicose (Figura 19).

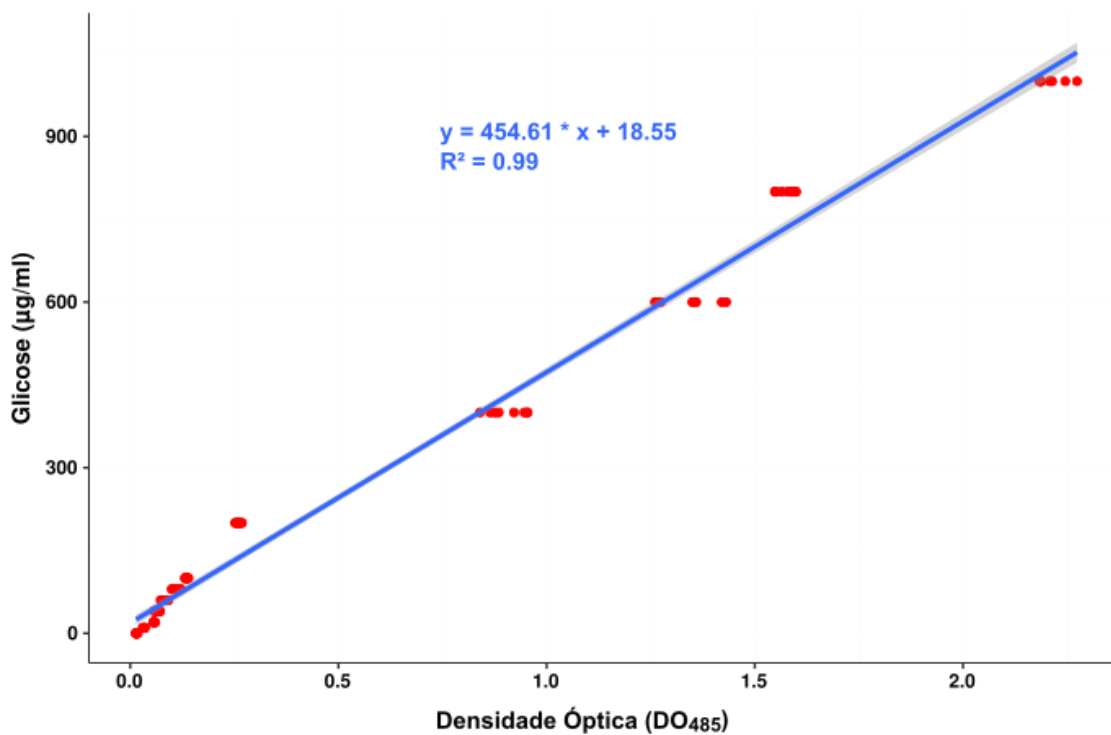


Figura 19. Curva de calibração baseada em glicose.

Em LB, a *Pseudomonas* apresentou maior produção de EPS em comparação com as outras cepas analisadas (diferença de 430,3 com *Bacillus sp.* e 575,06 com *Klebsiella sp.*); a bactéria *Klebsiella* foi a que apresentou menor produção. No meio TSB, a produção foi similar entre *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* apresentou a menor produção (Figura 20).

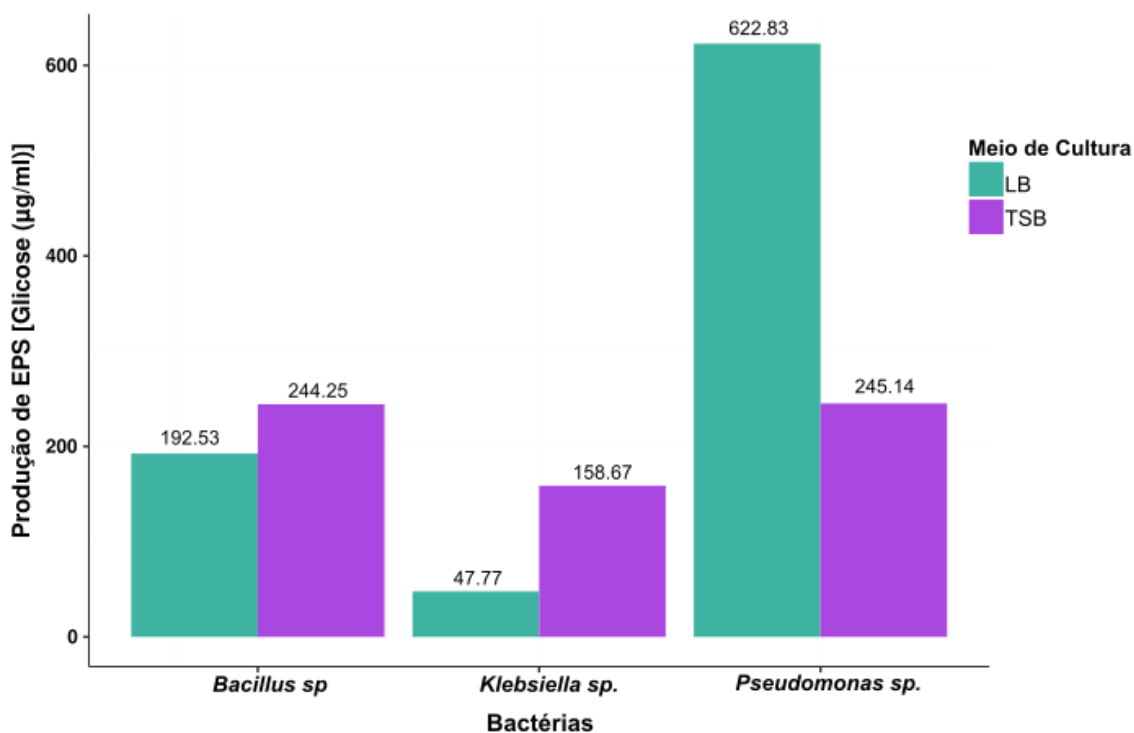


Figura 20. Gráfico da produção de EPS pelas bactérias.

Os resultados obtidos para a produção de biofilme pelas bactérias apresentaram discrepâncias significativas entre as duas metodologias utilizadas. O protocolo descrito por Lima *et al.* (2017) mostrou maior sensibilidade, com as cepas produzindo maior quantidade de biofilme em comparação ao protocolo de O'Toole (2011). Utilizando o método de Lima *et al.* (2017), *Bacillus* destacou-se como o maior produtor de biofilme, enquanto *Klebsiella* apresentou a menor produção. Por outro lado, seguindo o protocolo de O'Toole (2011), *Klebsiella* foi a bactéria que produziu mais biofilme, enquanto *Pseudomonas* mostrou a menor produção. Essas diferenças destacam a influência do protocolo experimental nos resultados obtidos e reforçam a importância de considerar a metodologia empregada na análise de biofilme (Figura 21).

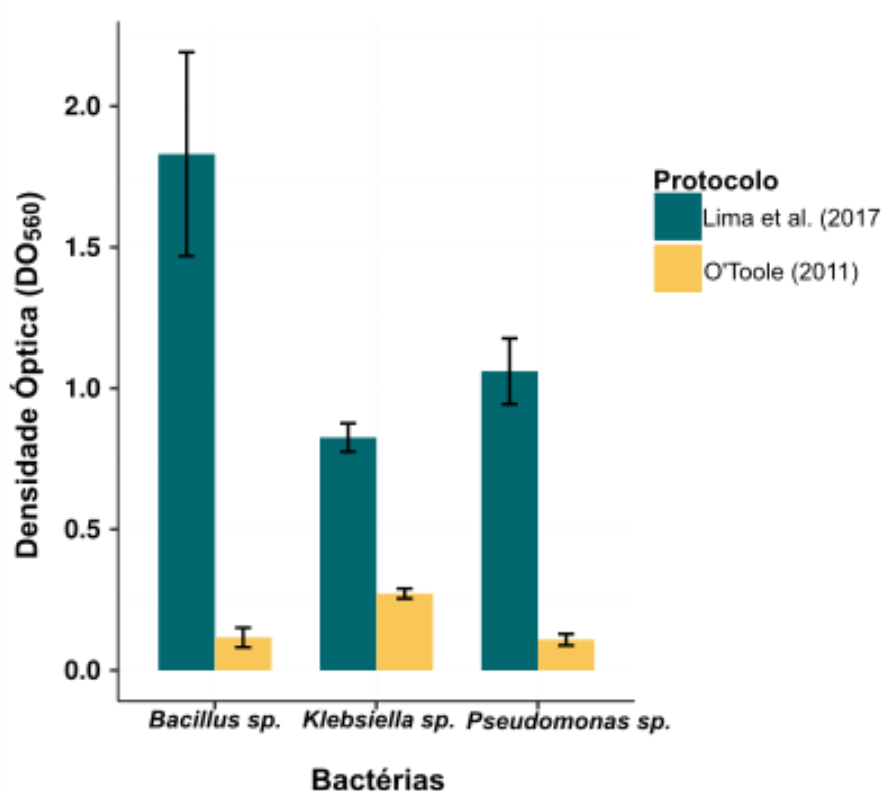


Figura 21. Gráfico da produção de Biofilme pelas bactérias nos dois protocolos utilizados.

Observando a formação dos halos e se baseando nos pontos de corte para cada um dos antibióticos testados (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de corte de cada um dos antibióticos utilizados para definir susceptibilidade e resistência das bactérias.

Antibióticos	Concentração (µg)	Resistente (R)	Intermediário (I)	Susceptível (S)
Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥ 19
Canamicina	30	≤13	14-17	≥18
Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23
Amoxilina	10	≤13	14-16	≥17
Estreptomicina	5	≤11	12-14	≥15
Novobiocina	30	≤17	18-21	≥22
Neomicina	30	≤12	13-16	≥17
Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18
Rifampicina	30	≤16	17-19	≥20

A bactéria *Bacillus sp.* apresenta uma maior susceptibilidade aos antibióticos utilizados, sendo resistente apenas para Eritromicina (Figura 22). Já *Pseudomonas sp.* é mais resistente aos

antibióticos, apresentando resistência a cinco dos nove antibióticos analisados (Tetraciclina, Eritromicina, Amoxicilina, Novobiocina e Cloranfenicol) (Figura 23). (Tabela 3).



Figura 22. Antibiograma do *Bacillus* sp.



Figura 23. Antibiograma do *Pseudomonas* sp.

Tabela 3. Resistência e Susceptibilidade das bactérias à antibióticos.

Antibióticos	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
Tetraciclina	Susceptível	Resistente
Canamicina	Susceptível	Susceptível
Eritromicina	Resistente	Resistente
Amoxilina	Susceptível	Resistente
Estreptomicina	Intermediário	Intermediário
Novobiocina	Intermediário	Resistente
Neomicina	Susceptível	Susceptível
Cloranfenicol	Intermediário	Resistente
Rifampicina	Intermediário	Intermediário

Após a caracterização molecular dos isolados foi determinado que o isolado 13 caracteriza-se como do gênero *Klebsiella*, dessa forma, por esse gênero apresentar espécies que podem ser patógenos de humanos, normalmente sendo as responsáveis por infecções hospitalares, sendo assim o Teste de Susceptibilidade a Antibióticos e os testes subsequentes não contemplaram essa bactéria.

4.3. Caracterização dos traços de promoção de crescimento pelas bactérias

Para o teste de solubilização de fosfato, apenas *Bacillus sp.* formou o halo (Figura 24), evidenciando sua capacidade de solubilização deste componente (Tabela 3).



Figura 24. Formação do halo de solubilização de Fosfato por *Bacillus sp.*

Ao avaliar a capacidade de produção de AIA pelas bactérias, o teste qualitativo demonstrou que as duas bactérias possuem a capacidade de produzir AIA; o teste quantitativo, baseado na curva de calibração em AIA sintético (Figura 25), demonstrou que entre duas bactérias analisadas, *Bacillus* e *Pseudomonas*, as duas produzem esse fitohormônio, mas que *Pseudomonas sp.* apresenta capacidade de produzir em maior quantidade.

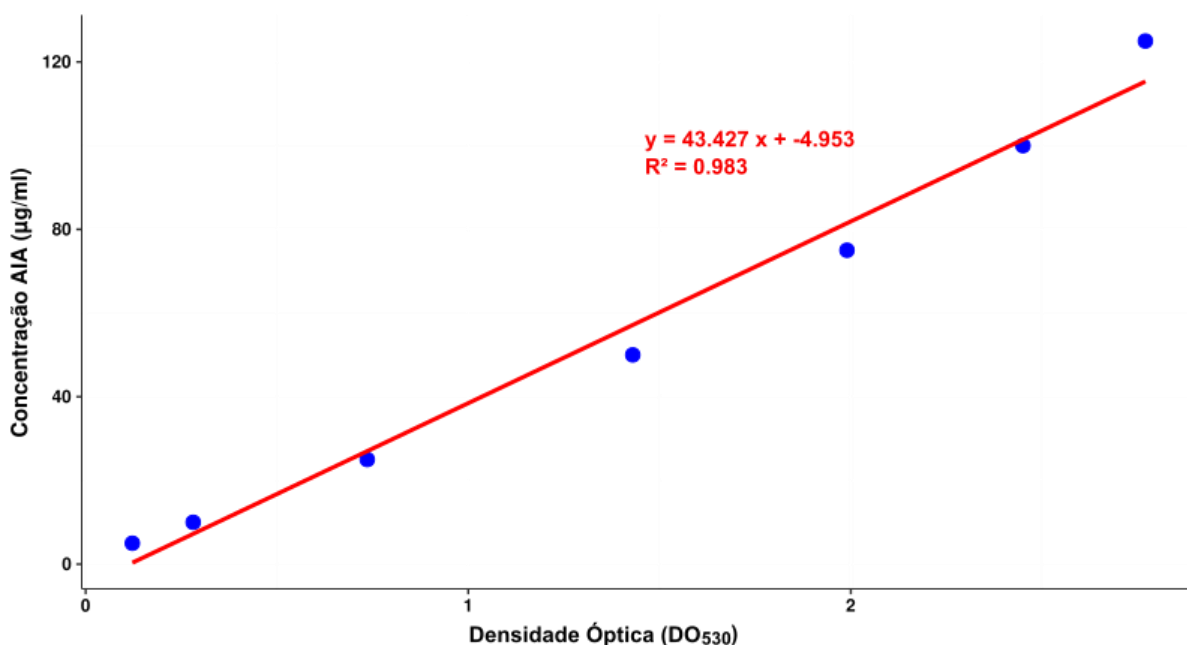


Figura 25. Curva de calibração baseada em AIA sintético.

Observando o ranking formado pelas bactérias nos testes de caracterização realizados (Figura 26), *Bacillus sp.* apresentou um melhor desenvolvimento nos ensaios de concentração de soluto no meio (PEG 600 e Glicerol), e no ensaio realizado para avaliar a atividade

enzimática das bactérias e foi o único que apresentou a capacidade de solubilizar fosfato. *Klebsiella sp.* se desenvolveu melhor apenas no ensaio com variações de pH, enquanto *Pseudomonas sp.* foi a única que apresentou a capacidade de produzir AIA (Tabela 4).

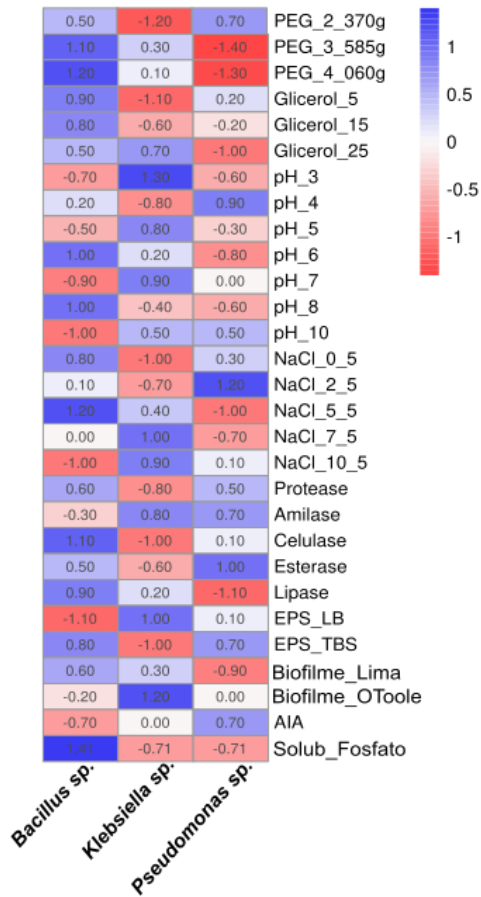


Figura 26. Ranking baseado na estatística Z-score das bactérias nos testes de caracterização realizados.

Tabela 4. Estatística realizada com o desempenho das bactérias nos testes realizados.

Bactérias	PEG 2,370 g	PEG 3,585 g	PEG 4,060 g	Glicerol 5%	Glicerol 15%	Glicerol 25%	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH10	NaCl 0,5	NaCl 2,5	NaCl 5,5	NaCl 7,5	NaCl 10,5	Protease	Amilase	Celulase (CMC)	Esterase	Lipase	EPS LB	EPS TBS	Biofilme lima	Biofilme O'toole	Solub. fosfato	Prod. AIA	
<i>Bacillus sp.</i>	*	*	-	**	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	-	*	*	*	*	**	*	*	**
<i>Klebsella sp.</i>	*	*	*	**	**	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	*	-	*	*	-	*	*	*	-	-	
<i>Pseudomonas sp.</i>	**	*	*	***	**	**	*	-	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	*	*	*	*	*	***	*	**	-	-	***

PEG D.O. 600 nm ≥ 0,5 = ** ; 0,5 - 0,1 = * ; ≤ 0,1 = -

Glicerol D.O. 600 nm ≥ 1,0 = *** ; 1,0 - 0,5 = ** ; 0,5 - 0,1 = * ; ≤ 0,1 = -

EPS [Glucose (µg/ml)] ≥ 600 = *** ; 600 - 300 = ** ; 300 - 100 = * ; ≤ 100 = -

Biofilm D.O. 600 nm ≥ 1,0 = ** ; 1,0 - 0,1 = * ; ≤ 0,1 = -

Prod. AIA ≥ 1,0 = * ; 0,5 - 1,0 = ** ; ≤ 0,5 = ***

5. Discussão

A identificação molecular dos isolados (*Bacillus* sp, *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp.) apresenta que os mesmos podem ser utilizados na agricultura promovendo o crescimento vegetal das culturas e fazendo o biocontrole de pragas.

Apesar da ampla diversidade de PGPR, as bactérias dominantes deste grupo pertencem, principalmente, aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* e são considerados como agentes de biocontrole de doenças em plantas; o gênero *Bacillus* é reconhecido por sua capacidade de promover o crescimento das plantas e controlar doenças microbianas em uma grande variedade de espécies vegetais, em parte devido à produção de compostos voláteis com propriedades inibitórias. De forma semelhante, *Pseudomonas* sp. também demonstram efeitos benéficos no aumento do rendimento das plantas e no biocontrole de doenças, como a murcha de *Fusarium*, uma enfermidade fúngica comum transmitida pelo solo. De maneira geral, os PGPR abrangem diversos gêneros, incluindo *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (ELNAHAL *et al.*, 2022; NOSOLINE, 2016).

Todas as bactérias estudadas possuem a atividade positiva de degradar os substratos enzimáticos analisados. A microbiota do solo, microrganismos que estão presentes naturalmente no solo, desempenha um papel essencial na decomposição de resíduos orgânicos, na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia dentro do ecossistema edificado. Sua influência se estende desde a transformação da matéria orgânica até a estocagem de carbono e nutrientes minerais, contribuindo para a saúde e a fertilidade do solo. Os atributos microbianos, como a diversidade de microrganismos, a atividade enzimática, a taxa de respiração e a biomassa microbiana, são indicadores sensíveis e eficazes para o monitoramento de mudanças ambientais relacionadas ao uso agrícola. Esses indicadores não apenas auxiliam na detecção de alterações na qualidade do solo, mas também fornecem subsídios importantes para o planejamento e a avaliação de práticas de manejo, permitindo a implementação de estratégias mais sustentáveis e eficientes. A avaliação da qualidade biológica do solo pode ser feita por meio de parâmetros microbiológicos variados, sendo a atividade enzimática um dos mais promissores. As enzimas presentes no solo desempenham papéis-chave nos ciclos biogeoquímicos, como o ciclo do carbono, do nitrogênio e do fósforo, e suas atividades refletem diretamente o estado funcional do ecossistema (FERREIRA; STONE; MARTIN-DIDONET, 2017; REIS, 2014).

A atuação dos PGPR em situações de estresse abiótico, como a seca, salinidade, ou exposição a produtos químicos nocivos, é fundamental para o crescimento saudável das plantas. A alta concentração de sal no solo afeta negativamente diversos processos vegetais como o crescimento das plantas e a produtividade por meio da toxicidade de íons específicos e efeitos osmóticos que levam ao desequilíbrio nutricional, mudanças na morfologia e bioquímica e uma diminuição na fotossíntese. Em condições de elevada salinidade e escassez de água, as plantas enfrentam uma situação de estresse, o que resulta em inúmeros efeitos adversos, como a redução da atividade fotossintética, a assimilação limitada de nutrientes, a deterioração das membranas celulares e a desidratação, podendo levar à morte das plantas. Uma estratégia promissora para mitigar esses efeitos é a seleção e o uso de espécies de bactérias tolerantes ao estresse, que podem auxiliar na adaptação das plantas a ambientes adversos, promovendo seu crescimento e reduzindo os danos causados pela salinidade e pela seca (VOCCIANTE *et al.*, 2022; ANAND *et al.*, 2023).

As bactérias analisadas neste trabalho apresentam uma alta tolerância a concentrações de NaCl no meio, principalmente *Bacillus sp.*, que consegue se desenvolver em meio com até 10,5% de NaCl, evidenciando a ampla utilização que essas bactérias podem apresentar no contexto de promoção de crescimento vegetal. Todas as bactérias analisadas também apresentam uma capacidade de crescimento em meios com glicerol e PEG 600, evidenciando sua capacidade de tolerar a seca e se desenvolver nessas condições, podendo dar suporte às plantas em estações de estiagem; uma vez que a seca reduz o nível de água no solo e concentra os solutos, e os ensaios com glicerol e PEG 600 reproduzem *in vitro* essas condições.

Os solos tropicais, altamente intemperizados, apresentam predominantemente cargas positivas, o que resulta em um pH geralmente baixo, e essa acidez pode impor sérias limitações à produtividade agrícola, restringindo o crescimento radicular e a absorção de água e nutrientes essenciais pelas plantas, como cálcio (Ca), magnésio (Mg), nitrogênio (N), fósforo (P) e molibdênio (Mo). Além disso, a acidez aumenta a concentração de alumínio (Al) na solução do solo, o que é tóxico para as plantas. Nesse contexto, torna-se fundamental selecionar microrganismos que sejam tolerantes a faixas de pH mais baixas, de modo a garantir o suporte à saúde do solo e à produtividade agrícola (NOSOLINE, 2016).

Todas as bactérias analisadas apresentam uma alta tolerância a variações de pH no meio, *Klebsiella sp.*, e *Pseudomonas sp.* apresentam um crescimento uniforme em todos os pH analisados, enquanto *Bacillus sp.* se desenvolveu mais em pH 7.

O biofilme é formado por uma população de microrganismos aderida a uma superfície, seja de origem biótica ou abiótica, e envolvida por uma matriz polimérica extracelular. Essa matriz, composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), contém principalmente água, mas também polissacarídeos, proteínas, lipídeos, DNA extracelular e apêndices bacterianos (DE SANTANA, 2016). Os EPS desempenham um papel crucial ao aumentar as chances de estabelecimento de populações bacterianas quando inoculadas no solo ou nas sementes, principalmente por possuírem a capacidade de reter uma quantidade de água superior à sua própria massa, o que ajuda a reduzir a evaporação e mantém as células bem hidratadas, o que é essencial para garantir os ajustes metabólicos necessários à sobrevivência durante períodos de estresse hídrico ou salino (DIAS *et al.*, 2011).

A caracterização de produção de biofilme e EPS pelas bactérias estudadas, por *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.*, respectivamente, não se configura apenas como uma característica de grande relevância no contexto agrônomo e biotecnológico, mas também favorece o estabelecimento das bactérias no solo.

Alguns microrganismos promovem o crescimento das plantas ao facilitar a assimilação de nutrientes, tornando-os mais disponíveis para a absorção vegetal, e pela produção de fitohormônios, que desempenham papel crucial no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, seja de forma direta ou indireta. Um exemplo importante é a solubilização do fósforo, o segundo elemento mais essencial para as plantas. Apesar de sua relevância, o fósforo frequentemente se encontra em formas insolúveis e indisponíveis no solo, limitando sua absorção pelas plantas, no entanto, certos microrganismos têm a capacidade de liberar ácidos orgânicos que ajudam a solubilizar o fósforo, tornando-o acessível a partir da matéria orgânica ou mineral do solo. Dessa forma, esses microrganismos desempenham um papel fundamental no ciclo do fósforo, disponibilizando-o para as plantas em duas formas principais: monobásica (H_2PO_4^-) e dibásica (HPO_4^{2-}) (FERREIRA; BETTIOL, 2019).

Entre as bactérias estudadas, apenas *Pseudomonas sp.* demonstrou a capacidade de solubilizar fosfato, mostrando-se uma bactéria de grande importância para as plantas.

O fitohormônio ácido indolacético é a auxina mais comumente produzida por bactérias relacionadas às plantas e desempenha um papel central nas interações planta-bactérias. Seu principal efeito benéfico é a promoção do desenvolvimento radicular, especialmente pelo aumento dos radiculares e raízes secundárias. Esse efeito, por sua vez, intensifica a liberação de exsudatos radiculares, destacando a produção de AIA como um dos mecanismos mais relevantes no favorecimento do crescimento das plantas. Além das auxinas, bactérias

promotoras de crescimento vegetal também produzem outros fitohormônios, como citocininas e giberelinas, que contribuem para o desenvolvimento da planta, enquanto reduzem a expressão do ácido abscísico, um regulador associado ao estresse (VOCCIANTE *et al.*, 2022; GUIMARÃES *et al.*, 2017).

As duas bactérias, *Bacillus* e *Pseudomonas*, produzem o fitohormônio AIA analisado. Evidenciando que *Pseudomonas* apresenta uma produção maior, portanto é mais promissora para estudos.

O ranking e estatística Z-score feito com as bactérias se caracteriza como uma abordagem para identifica-las em função do seu melhor desempenho geral no teste realizados, fornecendo uma ferramenta objetiva para priorizar seu uso em estudos futuros (TEHERAN-SIERRA *et al.*, 2021). Dessa forma, *Bacillus sp.* apresenta bons índices, principalmente tolerando estresses abióticos, podendo ser um indicador que favoreça estudos futuros com essa bactéria.

6. Conclusões

O presente trabalho realizou a caracterização da dinâmica de crescimento e dos traços promotores de crescimento vegetal das bactérias estudadas, além de analisar seu comportamento sob diferentes condições de estresse biótico *in vitro*. As bactérias foram classificadas como *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas sp.*; e *Bacillus* apresentou maior tolerância a estresses abióticos, possuindo também traços de promoção de crescimento ao produzir AIA; *Pseudomonas sp.* apresentou traços de promoção de crescimento pois possui a capacidade de solubilizar fosfato. Os resultados demonstraram que essas bactérias apresentam características promissoras, incluindo a capacidade de tolerar variações ambientais no meio em que estão inseridas.

O estudo destacou a importância do uso de microrganismos na construção de uma agricultura sustentável, não apenas para aumentar a produtividade, mas também para promover práticas agrícolas mais ecológicas e eficientes. Essa abordagem reforça a integração do manejo biológico com práticas conscientes, contribuindo para enfrentar desafios relacionados à segurança alimentar, conservação ambiental e mitigação dos impactos das mudanças climáticas.

Como perspectiva futura, propõe-se um aprofundamento nos estudos dos mecanismos moleculares e bioquímicos que conferem a essas bactérias sua tolerância a condições adversas,

como salinidade, restrição hídrica e baixa disponibilidade de nutrientes e outros estresses ambientais. Além disso, busca-se entender as estratégias por meio das quais essas bactérias promovem o crescimento de cultivares, aumentando sua resiliência e produtividade. Essa pesquisa aponta para um potencial significativo na aplicação de microrganismos como aliados no desenvolvimento de sistemas agrícolas mais sustentáveis e eficientes.

7. Referências bibliográficas

AMORIM, Marineide Rodrigues do. **BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS EM NÓDULOS DE FEIJÃO CAUPI DAS MESORREGIÕES PERNAMBUCANAS**. 2023. Tese de Doutorado.

ANAND, Uttpal *et al.* Current scenario and future prospects of endophytic microbes: promising candidates for abiotic and biotic stress management for agricultural and environmental sustainability. **Microbial ecology**, v. 86, n. 3, p. 1455-1486, 2023.

ANTUNES DE CARVALHO, Under. **PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA (Glycine max) POR Bacillus sp. E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS**. 2018.

BARRIUSO, Jorge *et al.* Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). **Plant-bacteria interactions: Strategies and techniques to promote plant growth**, p. 1-17, 2008.

BEATTIE, Gwyn. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. **Plant-associated bacteria**, p. 1-56, 2006.

BOTELHO, Gloria R.; MENDONÇA-HAGLER, Leda Cristina. Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 401-416, 2006.

CALVO, Pamela; NELSON, Louise; KLOEPPER, Joseph W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and soil**, v. 383, p. 3-41, 2014.

CANDIDO, Ruan da Silva. **Bactérias promotoras de crescimento utilizadas no desempenho de plântulas de grão de bico**. 2023.

DE ARAÚJO LEAL, Maria Lorryne *et al.* Efeito dos sistemas de manejo e do uso do solo na população de microrganismos do solo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e21910917966-e21910917966, 2021.

DE OLIVEIRA, André Luiz Martinez *et al.* Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56-77, 2014.

DE SANTANA, Janete Firmina. **Biofilmes Bacterianos e sua Composição: Uma revisão de literatura**. 2016.

DIAS, Anelise *et al.* **Caracterização e seleção de bactérias fluorescentes promotoras do crescimento de couve**. Tese de Doutorado. 2011.

DORIGHELLO, Dalton Vinicio. **Versatilidade de Bacillus sp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja**. Tese de Doutorado. 2017.

ELNAHAL, A. S. M. *et al.* The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European journal of plant pathology**, v. 162, n. 4, p. 759–792, 2022.

ELNAHAL, Ahmed SM *et al.* The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, n. 4, p. 759-792, 2022.

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito; STONE, Luis Fernando; MARTIN-DIDONET, Claudia Cristina Garcia. População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, p. 22-31, 2017.

FERREIRA, Thiago Costa; BETTIOL, Wagner. Biocontrole de patógenos de solo e promoção de crescimento vegetal promovidos por Bacillus sp. em milho. **BIOFARM-Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, p. 337-356, 2019.

FOUTS, Derrick E. *et al.* Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS genetics**, v. 4, n. 7, p. e1000141, 2008.

GARCIA, Ana Paula Gramulha *et al.* Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole: Uma alternativa para o sistema de produção agrícola sustentável. **ARACÊ: DIREITOS HUMANOS EM REVISTA**, v. 6, n. 3, p. 4275-4288, 2024.

GHINI, Raquel; BETTIOL, Wagner. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 17, n. 1, p. 61-70, 2000.

GOMES, João Paulo Andrade *et al.* Uso de microrganismos eficientes como alternativa para agricultura sustentável: um referencial teórico. **Agroecologia: Métodos e Técnicas para uma Agricultura Sustentável**, v. 5, p. 340-355, 2021.

GUIMARÃES, Vandeir Francisco *et al.* Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. **Ciências Agrárias: Ética Do Cuidado, Legislação e Tecnologia Na Agropecuária. Centro de Ciências Agrárias/Unioeste, Marechal Candido Rondon**, p. 193-212, 2017.

HARMAN, Gary E. *et al.* Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, p. 928-939, 2010.

MAGALHÃES, Steffane Pereira de *et al.* **Bactéria Promotoras de Crescimento Vegetal na Atenuação do Estresse Salino e Déficit Hídrico na Agricultura**. 2023.

MATTOS, Maria Laura Turino. **Microbiologia do solo**. 2015.

MORAES, Wanderson Bucker *et al.* Potenciais impactos das mudanças climáticas globais sobre a agricultura. **Revista Trópica—Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 2, p. 3-14, 2011.

NIHORIMBERE, Venant *et al.* Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 15, n. 2, 2011.

Nosoline, Sumaya Mário. **PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DE FEIJÃO-CAUPI CULTIVADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**. 2016. Tese de Doutorado.

PEDROSA, Manoel Victor *et al.* Importância ecológica dos microrganismos do solo. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

PEREIRA, Sarah Lúcia Pantaleão *et al.* **Avaliação do desempenho das Lagartas Spodoptera frugiperda após contaminação por bactérias e leveduras**. 2019.

REIS, D. P. *et al.* **Atividade enzimática na rizosfera de milho sob diferentes métodos de inoculação com azospirillum**, 2014.

REZENDE, C. C. *et al.* Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50810212725, 2021.

RUIZ-HERNANDEZ, I. H.; MADRIGAL-PEREZ, L. A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. The potential use of *Pseudomonas* in terrestrial and space agriculture. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e282664, 2024.

SILVA, M. A. *et al.* Rizobactérias multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e3111426971, 2022.

TEHERAN-SIERRA, Luis Guillermo *et al.* Bacterial communities associated with sugarcane under different agricultural management exhibit a diversity of plant growth-promoting traits and evidence of synergistic effect. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126729, 2021.

VOCCIANTE, M. *et al.* The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. **Applied sciences** (Basel, Switzerland), v. 12, n. 3, p. 1231, 2022.

WEISBURG, William G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.