

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA VARIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS DA ESPÉCIE *BACILLUS SUBTILIS***

Bianca de Melo Silveira dos Santos

Tecnóloga em Biocombustíveis

Bióloga

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA VARIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS DA ESPÉCIE *BACILLUS SUBTILIS***

Bianca de Melo Silveira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2021

S237e Santos, Bianca de Melo Silveira dos
Estudo da Variabilidade de Bactérias Promotora de
Crescimento de Plantas da Espécie *Bacillus subtilis* / Bianca de
Melo Silveira dos Santos. —, 2021
101 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal,
Orientador: Everlon Cid Rigobelo

1. Sideróforos. 2. Antagonismo. 3. Metais pesados. 4. Ecoplate.
5. *Zea mays*. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DA VARIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
DE PLANTAS DA ESPÉCIE *Bacillus subtilis*

AUTORA: BIANCA DE MELO SILVEIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV - UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. FABIANA FANTINATTI GARBOGGINI (Participação Virtual)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas-UNICAMP / Campinas/SP



Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER (Participação Virtual)
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agrônomo de Campinas - Cordeirópolis/SP



Prof. Dr. FELIPE BATISTELLA FILHO (Participação Virtual)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo / Campus Matão/SP



Jaboticabal, 01 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BIANCA DE MELO SILVEIRA DOS SANTOS – Nascida em 18 de Junho de 1992 em Matão, SP. Iniciou sua graduação em Tecnologia em Biocombustíveis em Fevereiro de 2010 na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal - FATEC JB na cidade de Jaboticabal, SP, concluindo seu curso em dezembro de 2012. Durante a graduação, foi integrante do projeto INTRALAB – Gerenciamento e descarte de resíduos do campus Unesp Jaboticabal, parceria da FATEC/ UNESP/ FUNEP, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Henrique Armoa e Profa. Dra. Luciana Maria Saran. Estagiou no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos. Em agosto de 2013 ingressou no curso mestrado - Pós - graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, também sob a orientação da Profa. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, como bolsista Capes, concluindo seu mestrado em 2015. Em fevereiro de 2016, iniciou a segunda graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES/EAD concluindo seu curso em dezembro de 2018. Em março de 2017 ingressou no curso de doutorado - Pós - graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação do Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo, como Bolsista Capes.

Epígrafe

*Eis que coloquei diante de você uma porta aberta
que ninguém pode fechar.” (Apocalipse 3:8)*

Dedicatória

Dedico, ao meu esposo **Wellington Araujo**, aos meus pais **Lenice** e **Airton**, e minha irmã **Gabriele** por seu amor, apoio e incentivo nesta longa caminhada. Aos meus queridos amigos que me ajudaram com palavras de estímulo nos momentos de desespero e preocupações, acreditando em meu potencial, compartilhando grandes alegrias e superações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que me concedeu o fôlego de vida, me proporcionou saúde, iluminou meus caminhos e me deu forças para a realização deste trabalho;

À minha família, aos meus pais **Airton** e **Lenice**, e minha irmã **Gabriele**, e em especial ao meu esposo **Wellington Araujo**, que me ajudaram nos momentos mais difíceis e desesperadores, estando sempre ao meu lado, encorajando-me a vencer e conquistar os objetivos para um sucesso brilhante. Amo vocês!

Ao **Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária** e à **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – FCAV-UNESP** Jaboticabal pela estrutura, incentivo e suporte, tornando possível meu mestrado e doutorado;

Ao **Departamento de Tecnologia e Departamento de Ciências da Produção Agrícola** pela infraestrutura na execução deste projeto;

A **CAPES** pela bolsa concedida;

Ao Dr. Everlon Rigobelo pela orientação e oportunidade;

Aos meus amigos de trabalho que me concederam informações, e opiniões para a realização deste trabalho: **Maura Santos, Gabriela Fernandes, Milena Tavares, Géssica Silveira** em especial a **Maura** pelos conselhos, troca de experiência e conhecimentos, além das longas conversas nos momentos de desespero e dificuldades.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto, que fizeram parte desta trajetória, que me alegraram, apoiaram, ensinaram, aconselharam, incentivaram, acreditaram, deixo aqui o meu **MUITO OBRIGADA!**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

2.5 Análise Estatística.....	29
3. Resultados	30
3.1 Análise de Bioinformática e BOX-PCR	30
3.2 Perfil Metabólico dos Isolados.....	33
3.3 Promoção de Crescimento de Plantas.....	35
3.4 Correlação do Perfil Metabólico e Promoção de Crescimento de Plantas.....	38
3.5 Análise de Componentes Principais (PCA) da Correlação	39
4. Discussão.....	42
5. Conclusão	46
6. Referência Bibliográfica	46
CAPÍTULO 3 – Caracterização <i>in vitro</i> de isolados de <i>Bacillus subtilis</i>	53
1. Introdução	55
2. Material e Métodos.....	56
2.1 Capacidade de Síntese Enzimática	56
2.1.1 Fosfatase	57
2.1.2 Amilase	57
2.1.3 Celulase	58
2.2 Tolerância dos Isolados de <i>Bacillus subtilis</i> a Metais Pesados.....	59
2.2.1 Análise Estatística da Capacidade de Tolerância a Metais Pesados.....	59
2.3 Antagonismo <i>in vitro</i> Contra Fungos Fitopatogênicos.....	60
2.4 Produção de Sideróforos.....	61
3. Resultados	61
3.1 Capacidade de Síntese Enzimática	61
3.2 Tolerância dos isolados de <i>Bacillus subtilis</i> a metais pesados	64
3.2.1 Análise de correspondência da tolerância a metais.....	67
3.3 Antagonismo <i>in vitro</i> contra fungos fitopatogênicos	68

3.4 Produção de Sideróforos.....	72
4. Discussão.....	73
5. Conclusão	78
6. Referência Bibliográfica	79
CAPÍTULO 4 - Considerações finais	88

ESTUDO DA VARIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DA ESPÉCIE *BACILLUS SUBTILIS*

RESUMO – A utilização contínua de fertilizantes minerais na agricultura promove o excesso de nutrientes no solo, tais como nitrogênio, potássio e fósforo, podendo causar alterações na microbiota do solo, promovendo danos. Em geral, as plantas possuem baixa eficiência em absorver tais nutrientes, o que leva a uma baixa eficiência na utilização da adubação mineral. A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas tem sido uma promissora alternativa na busca de melhorar a eficiência na utilização de insumos agrícolas, podendo trazer inúmeros benefícios para a agricultura. Porém, bactérias da mesma espécie podem promover diferentes níveis de crescimento. O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação de oito isolados de *Bacillus subtilis* quanto à promoção do crescimento de plantas na cultura do milho em condições de casa de vegetação, assim como sua atividade metabólica, capacidade de degradação enzimática, produção de sideróforos, tolerância aos íons Cd(II), Cr(III), Ni(II), Zn(II), Cu(II) e Cr(VI) e antagonismo de agentes fitopatogênicos. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, constituído por nove tratamentos – oito isolados de *B. subtilis* e um controle, em delineamento utilizado foi o casualizado com cinco repetições. A atividade metabólica foi avaliada pelo consumo de diferentes fontes de carbono utilizando placas EcoPlate. A capacidade de degradação enzimática, produção de sideróforos, tolerância a Cd(II), Cr(III), Ni(II), Zn(II), Cu(II) e Cr(VI) e antagonismo foi verificada utilizando meio de cultura (caldo nutriente) em placas. O isolado 290 promoveu maior crescimento de plantas, e foi o único capaz de consumir ácido glicil – L – glutâmico. Todos os isolados foram capazes de produzir amilase, celulase, e solubilizar fosfato orgânico. Os isolados foram mais resistentes ao Zn(II) e Cr(III). O antagonismo contra agentes fitopatogênicos foi verificado para os fungos: *Alternaria alternata*, apenas 290 apresentou ausência de antagonismo; *Colletotrichum gloeosporioides* apenas os isolados 248, 291, e 287 foram antagônicos; *Phyllosticta citricarpa* todos os isolados foram antagônicos, e apenas 290 apresentou um fraco antagonismo; e para o *Geotrichum citri-aurantii* apenas os isolados 309 e 287 foram antagônicos. Seis isolados foram capazes de produzir sideróforos, exceto o isolado 290 e 291. O presente estudo avaliou o comportamento de oito isolados de *Bacillus subtilis* perante a promoção de crescimento de plantas relacionando com suas características genéticas e fisiológicas. Estes resultados abrem caminho para novos estudos na tentativa de esclarecer quais são os mecanismos de ação de cada isolado, e quais fatores genéticos podem interferir em suas atividades a fim de promover o crescimento vegetal de maneira mais efetiva. Os resultados também mostram a possibilidade da utilização desses isolados para produção de enzimas de interesse biotecnológico, biorremediação áreas contaminadas e promoção de ações antagônicas contra agentes fitopatogênicos.

Palavras Chaves: Sideróforos. Antagonismo. Metais pesados. Ecoplate. *Zea mays*.

STUDY OF THE VARIABILITY OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA OF THE *BACILLUS SUBTILIS* SPECIES

ABSTRACT – The continuous use of mineral fertilizers in agriculture promotes the excess of nutrients in the soil, such as nitrogen, potassium and phosphorus, which can cause changes in the soil's microbiota, promoting damage. In general, plants have low efficiency in absorbing such nutrients, which leads to low efficiency to utilize the mineral fertilization. The use of plant growth-promoting bacteria has been a promising alternative to improve the efficiency in the use of agricultural inputs, and can be an effective strategy for agriculture. However, bacteria of the same species can promote plant growth differently. The present study aimed to evaluate the action of eight isolates of *B. subtilis* regarding the promotion of plant growth in maize culture in a greenhouse conditions, as well as their metabolic activity, enzymatic degradation capacity, production of siderophores, tolerance ions Cd (II), Cr (III), Ni (II), Zn (II), Cu (II) and Cr (VI) and antagonism of phytopathogenic agents. The experiment was conducted in a greenhouse, consisting of nine treatments - eight isolates of *B. subtilis* and one control, in a randomized design with five replications. Metabolic activity was assessed by consuming carbon sources using EcoPlate plates. The capacity of enzymatic degradation, production of siderophores, tolerance to Cd (II), Cr (III), Ni (II), Zn (II), Cu (II) and Cr (VI) and antagonism was verified using culture medium (nutrient broth) in plates. Isolate 290 promoted greater plant growth, and was the only one capable of consuming glycyl - L - glutamic acid. All isolates were able to produce amylase, cellulase, and solubilize organic phosphate. The isolates were more resistant to Zn (II) and Cr (III). Antagonism against phytopathogenic agents was found for fungi: *Alternaria alternata*, only 290 showed no antagonism; to *Colletotrichum gloeosporioides* only isolates 248, 291, and 287 were antagonistic; *Phyllosticta citricarpa*, all isolates were antagonistic, and only 290 showed weak antagonism; and *Geotrichum citri-aurantii*, only isolates 309 and 287 were antagonistic. Six isolates were able to produce siderophores, except isolate 290 and 291. The present study evaluated the behavior of eight isolates of *Bacillus subtilis* towards the promotion of plant growth relating to their genetic and physiological skills. These results open the way for further studies in an attempt to clarify which are the mechanisms of action of each isolate, and which genetic factors can interfere in its activities in order to promote plant growth in a more effective way. These results also have shown the possibility to use these isolates to enzymes production of biotechnological interest, bioremediation of contaminated areas and promote antagonistic actions against phytopathogenic agents.

Keywords: Siderophores. Antagonism. Heavy metals. Ecoplate. Zea mays.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

Os microrganismos são considerados componentes essenciais nas cadeias alimentares e nos ciclos biogeoquímicos, devido a sua imensa diversidade genética, e habilidade de realizar funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas (MYERS, 1996). Os benefícios de sua utilização para o desenvolvimento de culturas agrícolas e para o controle biológico são conhecidos há muito tempo, sendo, os microrganismos importantes para a melhoria da produtividade (VESSEY, 2003, ALOO et al., 2019).

Inúmeros trabalhos, têm apresentado a utilização destes microrganismos na forma de inoculantes biológicos – biofertilizantes, que promovem o desenvolvimento da planta (CARAVACA *et al.*, 2002) e aumentam a tolerância a doenças (GREEN *et al.*, 1999), uma vez que, induzem resistência sistêmica em plantas, produzem antibióticos e sideróforos inibindo o crescimento de vários patógenos (RAMAMOORTHY *et al.*, 2001), sendo uma tecnologia estratégica para a redução da dependência de fertilizantes minerais e inseticidas sintético (GUIMARÃES *et al.*, 2007, ALOO et al., 2019).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas estão presentes entre estes microrganismos, pois além de representarem uma grande diversidade no solo, colonizam a rizosfera das plantas promovendo desenvolvimento radicular, aumentando a eficiência na absorção de água e fornecimento de macro e micronutrientes, o que favorece de maneira direta ou indireta a promoção do crescimento do vegetal (MARIANO *et al.*, 2004).

Muitas bactérias promotoras de crescimento de plantas que promovem o desenvolvimento vegetal de forma direta realizam a fixação do nitrogênio, produção de hormônios de crescimento, e podem ser capazes de solubilizar nutrientes (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; DONATE-CORREA *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2005; PÉREZ – MONTAÑO et al., 2013; NAIK et al., 2019). Essas bactérias

também podem agir de forma indireta prejudicando o desenvolvimento de fungos patogênicos, com produção de sideróforos, quitinase, β -1,3 glucanase, antibióticos e cianetos (RENWICK *et al.*, 1991, BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Embora sejam reconhecidos inúmeros benefícios promovidos pelas bactérias promotoras de crescimento de plantas e seu importante papel na agricultura, pouco se sabe sobre os diversos modos de ação dessas bactérias. Algumas bactérias mesmo sendo portadoras de diversas habilidades de promoção de crescimento apresentam resultados negativos ou inconsistentes, tornando-se necessário a realização de mais estudos para uma melhor compreensão de suas genética e fisiologia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Elucidar o motivo pelo qual bactérias da mesma espécie, *Bacillus subtilis* identificadas através do sequenciamento parcial – região 16S com habilidades na promoção de crescimento de plantas, promovem diferentes efeitos na mesma cultura mediante às mesmas condições de cultivo; e alguns casos diminuindo o desenvolvimento da planta.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a habilidade de produção de metabólitos de interesse biotecnológico.
- Identificar a produção de sideróforos.

- Avaliar a propriedade antagônica *in vitro* de oito bactérias da espécie *Bacillus subtilis* frente a agentes fitopatogênicos selecionados aleatoriamente.
- Avaliar a atividade metabólica dos isolados de *Bacillus subtilis*.
- Avaliar a promoção do crescimento de plantas utilizando os isolados de *Bacillus subtilis* na cultura do milho, em casa de vegetação.

3. Revisão de Literatura

3.1 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

Considerado um microssistema complexo, as plantas possuem habitats diferentes utilizados por bactérias simbióticas, e por bactérias fitopatogênicas. Há trabalhos relatando que as bactérias endofíticas e epifíticas podem ser isoladas a partir de tecidos vegetais, não demonstrando de forma precisa às interações simbióticas ou patogênicas que exercem sobre as plantas (ANDREWS & HARRIS, 2000; BALDOTTO & OLIVARES, 2008).

Através de diversos estudos, foi verificado que essas bactérias podem promover nas plantas diversos benefícios relacionados à promoção de crescimento, tais como, resistência a condições de estresse biótico e abiótico, promoção de crescimento e proteção vegetal, além de apresentarem amplo potencial biotecnológico, e ao mesmo tempo mostrando ser uma alternativa para um cultivo com menor uso de insumos agrícolas (SCHROTH *et al.*, 1982; LAVIE e STOTZKY, 1986; STURZ *et al.*, 2000; WHIPPS, 2001; ANDREWS & HARRIS, 2000; ZAHIR *et al.*, 2003, HUNGRIA *et al.*, 2010, YU *et al.*, 2019).

A partir de mecanismos diretos e indiretos, as bactérias promotoras de crescimento de plantas constituem um grupo heterogêneo de bactérias que pode ser encontrado na rizosfera, a região do solo sob influência da raiz, podendo

apresentar efeitos positivos, negativos ou até mesmo neutros em relação a promoção do crescimento (NEHL *et al.*, 1996; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008). Essas bactérias podem ser empregadas para o tratamento de raízes ou tubérculos, sementes, mudas micropropagadas, incorporadas ao solo, e pulverizadas nas folhas e frutos (MARIANO *et al.*, 2004), podendo assim, aumentar o crescimento radicular melhorando o desenvolvimento da parte aérea, aumento a taxa fotossintética e consequentemente resultando em uma maior produtividade das culturas.

A promoção do crescimento de plantas é resultado das habilidades de certas rizobactérias em fixar o nitrogênio, oxidar o enxofre, solubilizar e aumentar a absorção de fósforo, produzir sideróforos (moléculas que solubilizam e sequestram ferro), produzir compostos análogos e hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, citocininas e poliaminas (CARDOSO & FREITAS, 1992; CATTELAN, 1999; ZAGO *et al.* 2000; BASHAN; DE-BASHAN, 2005; MEHNAZ e LAZAROVITS, 2006; CATTELAN e GRASSANO, 2007; SOLANO *et al.*, 2008; TSAVKELOVA *et al.*, 2006; CASSÁN *et al.*, 2009b), além disso, algumas bactérias exercem ações indiretas, como o controle biológico (MAY *et al.*, 1997; KLOEPPER *et al.*, 1999; ALSTRÖM, 2001; SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003; SINGH *et al.*, 2004; ÖZAKTAN & BORA, 2004; HAN *et al.*, 2005; BYRNE *et al.*, 2005) e pela produção de quitinases nocinas aos nematóides (HALLMANN *et al.*, 1999).

Os principais gêneros de bactérias promotoras de crescimento de plantas são: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Staphylococcus* e *Azospirillum* (SPAEPEN *et al.*, 2009).

Dentre os gêneros citados os *Bacillus* possuem características interessantes para a formulação de inoculantes comerciais, apresentando maior período de viabilidade e por manter-se por mais tempo no solo. Os *Bacillus* sp gram-positivos, podendo ser anaeróbicos, aeróbicos ou facultativos, formam endósporos que proporcionam estabilidade e resistência a múltiplos fatores ambientais (KOKALIS-BURELLE; KLOEPPER; REDDY, 2006; SPAEPEN *et al.*, 2009).

3.2 Mecanismos Envolvidos na Promoção de Crescimento de Plantas

Os mecanismos de ação dos microrganismos promotores de crescimento de plantas e supressores de fitopatógenos ocorrem através de diferentes meios de ação, podendo ser diretos ou indiretos (CORRÊA e BETTIOL, 2009, NAIK et al., 2019).

Quando os microrganismos realizam a fixação biológica do nitrogênio, (BALDANI *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2000; KENNEDY *et al.*, 2004; KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004), a biossíntese de fitohormônios (LUCANGELI & BOTTINI, 1997; DOBBELAERE *et al.*, 1999; KOENIG *et al.*, 2002; PATTEN *et al.*, 2002; ARKHIPOVA, *et al.*, 2005; KARADENIZ *et al.*, 2006), e facilitam a captação de certos nutrientes do solo, como a solubilização de minerais como o fósforo (ROSAS *et al.*, 2006), a promoção de crescimento ocorre de forma direta (TABASSUM et al., 2017; NAIK et al., 2019).

A promoção de crescimento de forma indireta, ocorre através da produção de sideróforos (DE BELLIS & ERCOLANI, 2001; ONGENA *et al.*, 2002), controle de fitopatógenos, pela indução de resistência sistêmica do hospedeiro (KLOEPPER *et al.*, 1999; JETIYANON & KLOEPPER, 2002, NAIK et al., 2019), ou até mesmo pela produção de ácido cianídrico (HCN) – composto que promove a antibiose (OWEN & ZDOR, 2001). Contudo, segundo Botelho *et al.*, (2006), os principais mecanismos de biocontrole produzidos por bactérias promotoras de crescimento de plantas são as enzimas líticas, os sideróforos, antibióticos e ácido cianídrico.

Além de tais ações indiretas de promoção de crescimento de plantas exercidas pelos microrganismos na promoção de crescimento de plantas, a rizosfera promove a liberação de compostos orgânicos, ricos em açúcares e aminoácidos, ácidos orgânicos dentre outros elementos que favorecem intensamente a atividade microbiana na produção de enzimas como as quitinases e β -1,3-glucanases, que degradam as células da parede celular; as peroxidases – enzimas que agem provocando a indução de resistência como resposta a presença de um agente elicitor, e na produção de antibióticos (CORRÊA e BETTIOL, 2009, BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Diante do comportamento e mecanismos que os microrganismos apresentam para o desenvolvimento e crescimento da planta, a utilização da

biotecnologia pode contribuir para a transformação de microrganismos que expressem mais de um gene responsável pelas características desejáveis, combinando diversos mecanismos de ação (TIMMS-WILSON *et al.*, 2000). A partir de suas transformações metabólicas podem ser obtidos produtos de valor comercial como fármacos, corantes, enzimas, dentre outros.

3.3 Análise do Perfil Metabólico na Diversidade Microbiana - Biolog EcoPlate

A diversidade microbiana desempenha importante papel na saúde ambiental dos ecossistemas, colaborando ativamente em ciclos biogeoquímicos, promovendo o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas (DESAI *et al.*, 2009). Para desenvolver tais funções, os microrganismos que contêm esta diversidade genética, apresentam funções metabólicas que permitem adaptar-se a mudanças nas mais diversas condições ambientais, tais como pH, concentração osmótica, tipo de substrato e temperatura, entre outros. Deste modo, métodos de identificação foram desenvolvidos com objetivo de detectar tais microrganismos, buscando compreender seu metabolismo para melhor aplicabilidade biotecnológica (GUEDES, 2011).

Através de seu metabolismo heterotrófico que a maioria das bactérias apresentam, estes microrganismos dependem preferivelmente ou exclusivamente de fontes de carbono (TORTORA *et al.*, 2005). Diante disto, Garland e Mills inseriram a utilização comercial de microplacas EcoPlate Biolog™, baseadas na utilização de determinadas fontes de carbono, como um sistema para analisar e verificar a diversidade funcional de microrganismos dos mais variados ambientes (GARLAND e MILLS, 1991; WEBER *et al.*, 2007).

O sistema EcoPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA), é um método que mede a utilização de diferentes fontes de carbono através de sua intensidade de utilização pelos microrganismos, produzindo um padrão metabólico característico para cada comunidade e/ou isolado. Desenvolvido por Biolog EcoPlate™, o ensaio permite analisar números de substratos relevantes, num total de 96 poços, divididos em três réplicas, contendo 31 fontes de carbono e

um controle negativo, além de apresentar um meio de cultura mínimo e corante redox violeta tetrazólio (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014). As fontes de carbono são divididas em seis categorias: carboidratos, polímeros, aminoácidos, compostos fenólicos, ácidos carboxílicos e aminas (Tabela 1) (LIMA; GARCIA 2011). As amostras são inoculadas diretamente sobre as microplacas, incubadas em estufas, e a cada 24h, realiza-se a leitura de absorbância, o que a torna uma ferramenta de fácil manuseio, rápida e conveniente para comparar a diversidade metabólica das comunidades microbianas (GAVRILESCU *et al.*, 2010). Sendo assim, o perfil metabólico microbiano indicado pela utilização de tais fontes de carbono, apresenta uma ferramenta para separação das habilidades e das preferências nutricionais de cada isolado bacteriano e também da capacidade de cada isolado de se adaptar as mudanças ambientes. que cada (KIRK *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Fontes de carbono presentes no Biolog EcoPlate

SUBSTRATOS	FONTES DE CARBONO
CARBOIDRATOS	D-celobiose
	β -metil-D-glicosideo
	N-acetil-D-glicosamina
	i-Eritridol
	D-xilose
	Ácido-D-galacturônico
	D,L- α -glicerolfosfato
	Glicose-1-fosfato
	α -D-lactose
	D-manitol
POLÍMEROS	Glicogenio
	α -ciclodextrina
	Tween 40
	Tween 80
AMINOÁCIDOS	L-serina
	L-fenilalanina
	L-arginina
	L-treonina
	L-asparagina
	Ácido glicil-L-glutâmico
COMPOSTOS FENÓLICOS	Ácido-2-Hidroxibenzóico
	Ácido-4-Hidroxibenzóico
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	Ácido γ -hidroxibutírico
	Ácido D-glicosamínico
	Éster Metílico do ácido pirúvico
	Ácido Itacônico
	Ácido-D-galacturônico
	Ácido α -cetobutírico
	Ácido D-málico
AMINAS	Feniletlanina
	Putrescina

3.4 Bactérias Tolerantes a Metais Pesado

Os metais pesados ocorrem de forma natural nos solos, pois, são necessários para a manutenção do desenvolvimento e crescimento de plantas, sendo considerados micronutrientes importantes, tais como, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, e Ni, além de promoverem o crescimento microbiano (DECHEN & NACHTIGALL, 2006). Contudo, elevadas ou baixas concentrações destes elementos essenciais, podem limitar o desenvolvimento, tanto de plantas, quanto de microrganismos, por intervirem em processos metabólicos (ANJUM *et al.*, 2015).

A toxicidade microbiana está ligada a interação dos metais de forma indireta ou direta com as células, prejudicando seu crescimento e metabolismo, afetando na absorção de nutrientes, na metanogênese, processo de respiração, síntese enzimática, motilidade, ciclagem biogeoquímica de nitrogênio, carbono, fósforo, entre outros elementos, ou causando alteração do ambiente físico – químico da célula (GADD, 2009). Embora tais elementos sejam altamente tóxicos para muitos microrganismos, existem bactérias capazes de se desenvolver, conferindo uma resistência e tolerância. Essa resistência ocorre devido a vários mecanismos que estes microrganismos possuem, determinando a entrada e saída dos metais nas células, sendo capazes de modificar formas tóxicas do metal em produtos com menor toxicidade (SOTERO-MARTINS *et al.*, 2014).

A habilidade dos microrganismos transformar substâncias tóxicas em compostos menos nocivos, é o fundamento do processo denominado como biorremediação. A biorremediação consiste no emprego de agentes biológicos na eliminação de resíduos tóxicos ambientais, fundamentada na capacidade de organismos vivos tais como bactérias e fungos desintoxicar ou degradar áreas contaminadas mediante a alteração de substâncias poluentes em compostos não tóxicos (KUMAR *et al.*, 2011). A biorremediação realizada por microrganismos ocorre devido suas habilidades em imobilizar os metais, por simples adsorção em superfície celular, propiciando sua precipitação, ou pela formação de compostos intracelulares (BIONDO, 2007).

4. Referência Bibliográfica

ALSTROM, S. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, v.149; p. 57-64, 2001.

ALOO, B.N.; MAKUMBA, B.A.; MBEGA, E.R. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, v.219; p. 26-39, 2019.

ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38; p. 145-80, 2000.

ANJUM, N. A.; SINGH, H. P.; KHAN, M. I. R.; MASOOD, A.; PER, T. S.; NEGI, A.; BATISH, D. R.; KHAN, N. A.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I. Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. **Environmental Science Pollution Research**, Berlin, v. 22, p. 3361–3382, 2015.

AHMAD, F.; AHMAD, L.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.

ARKHIPOVA, T. N., VESELOV, S. U., MELENTIEV A. I., MARTYNENKO E. V., KUDROYAROVA, G. R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**, v.272, p. 201–209, 2005.

BHATTACHARYYA, P.N., JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1327-1350, 2012.

BALDANI, J. I., CARUSO, L., BALDANI, V. L., GOE, S. R., DOBEREINEE, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, V.29, p. 911-922, 1997.

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A; OLIVARES, F.L & BRESSA-SMITH, R. Solubilização de fosfatos por bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas. In: Fertbio, Londrina. **Fertbio: desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental**, 2008.

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E. Plant Growth-Promoting In: HILLEL, D. In **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford. v. 1, Ed 1. p. 103-115, 2005.

BIONDO, R. Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para biorremediação de efluentes contendo metais pesados. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BYRNE, J.M.; DIANESE, A.C.; JI, P.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; LOUWS, F.J.; MILLER, S.A.; JONES, J.B. & WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. **Biol. Control**, V.32, p. 408–418, 2005.

CARAVACA, F.; BAREA, J. M.; FIGUEROA, D.& ROLDAN, A. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subs *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. **Applied Soil Ecology**, v.20; p.107-118, 2002.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A Rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds). **Microbiologia do Solos**, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 41-57, 1992.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v.45, n.1, p.28–35, 2009b.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growthpromoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 63, p. 1670-1680, 1999.

CATTELAN, A.J.; GRASSANO, A. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculante, estirpes e outras tecnologias relacionadas a bactérias promotoras do crescimento vegetal. In.: CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE)**. Londrina, PR: EMBRAPA-CNPSo (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 290), p.154-173, 2007.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In: Bettiol, W., Morandi, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 224-237, 2009.

DE BELLIS, P.; ERCOLANI, G. L. Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1945-1948, 2001.

DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Elementos essenciais e benéficos às plantas superiores. In: Fernandes, M.S. (ed.) **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.1-5.

DESAI, C.; PARIKH, R.Y.; VAISHNAV, T.; SHOUCHE, Y.S.; MADAMWAR, D. Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial Community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes. **Research in Microbiology**, Paris, v.160, p.1–9, 2009.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V. & VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, v. 212, p.155-164, 1999.

DONATECORREA, J.; LEONBARRIOS, M.; PEREZGALDONA, R. Screening for plant growthpromoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage treeshrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, n. 12, p. 261 -272, 2004.

GADD, G. M. Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. **Applied Microbiology**, p. 321 – 334, 2009.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 8, p. 2351-2359, 1991.

GAVRILESCU, M. Environmental biotechnology : achievements , opportunities and challenges. *Dynamic Biochemistry*, **Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 4, p. 1–36, 2010.

GUEDES, K. A. Prospecção de bactérias com potencial de aplicação na biorremediação de efluentes industriais contendo arsênio. 2011. 102 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

GREEN, H.; LARSEN, J.; OLSSON, P. A.; JENSEN, D. F. & JACOBSEN, I. Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in toot-free soil. **Applied Environmental Microbiology**, v.65; p. 1428-1434, 1999.

GUIMARÃES, S.L., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa. agropecuária. brasileira.**, v.42, n.3; p. 393-398, 2007.

HALLMANN, J.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; , J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.31, n.2, p.551-560, 1999.

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Characterization of a novel plant growthpromoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 66-76, 2005.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil, Dordrecht**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

JETIYANON, K. & KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biol. Control**, v.24; p. 285-291, 2002.

KARADENIZ, A., TOPCUOGLU, S. F., INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.1061-1064, 2006.

KENNEDY, I. R., CHOUDHURY, A. T. M. A., KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, p. 1-16, 2004.
KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169- 188, 2004.

KLOPPER, J. W., RODRIGUEZ-UBANA, R., ZEHNDER, G. W., MURPHY, J. F., SIKORA, E., FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, v.28: p. 21-26, 1999.

KOENIG, R. L., MORRIS, R. O., POLACCO, J. C. tRNA is the source of low-level trans zeatin production in *Methylobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 184, p. 1832-1842, 2002.

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J. W.; REDDY, M. S. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 91-100, 2006.

KUKLINSKY-SOBRAL, J., ARAÚJO, W. L., MENDES, R., GERALDI, I. O., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6; p. 1244–1251, 2004.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International Journal of Environmental Sciences*, Jaipur, v.1, n.6, p. 1079-1093, 2011

LAVIE, S.; STOTZKY, G. Interactions between clay minerals and siderophores affect the respiration of *Histoplasma capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 74-79, 1986.

LIMA, A.; GARCIA, E. Gestão de águas subterrâneas em ambientes insulares: caso de estudo da ilha do Maio (Cabo Verde). **VI Congresso Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras**, 2011.

LUCANGELI, C., BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. **Symbiosis**, v. 23, p. 63-72, 1997.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.

MAY, R.; VÖLKSCH, B. & KAMPMANN, G. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. glycinea in vitro and in planta. **Microbial Ecol.**, v. 34, p.118-124, 1997.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v.51, n.3, p.326-335, 2006.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NAIK, K., MISHRA, S., SRICHANDAN, H., SINGH, P.K, SARANGI, P.K. Plant growth promoting microbes: potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.21; p.101326, 2019.

NEHL, D.B.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 1-20, 1996.

ONGENA, M.; JACQUES, P.; DELFOSSE, P.; THONART, P. Unusual traits of the pyoverdine-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. **BioMetals**, v. 15, p. 1-13, 2002.

OWEN. A.; ZDOR, R. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplement glycine. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 801-809, 2001.

ÖZAKTAN, H., BORA, T. Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain EH 24. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35; p. 224-229, 2004.

PATTEN, C. L., GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.3795-3801, 2002.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; SÁNCHEZ-MATAMOROS, R.C., LÓPEZ-BAENA, F.J., OLLERO, F.J., RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M.A., BELLOGÍNA, R.A., ROSARIO, ESPUNYA, M. Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria **Research in Microbiology**,v.164; p. 749–760, 2013.

PIERCE, M. L.; WARD, J. E.; DOBBS, F. C. False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium. **Journal of microbiological methods**, v. 97, p. 20–4, fev. 2014.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **CropProtection**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

REIS, V. M., BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D., DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and plam trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v.19, p. 227-247, 2000.

RENWICK, A. R.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 524-532, 1991.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v. 216, p. 1376-1381, 1982.

SIDDIQUI, I. A., SHAUKAT, S. S. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on the diversity of culturable microfungi and nematodes associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35; p. 1359-1368, 2003.

SINGH, P., PIOTROWSKI, M., KLOPPSTECH, K., GAU, A. E. Investigations on epiphytic living *Pseudomonas* species from *Mallus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 1149-1158, 2004

SOLANO, B.R., BARRIUSO, J. GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions** - strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., p.41-54, 2008.

SOTERO-MARTINS, A.; VIANA, M. O.; CARVAJAL, E. Bioprospecção de bactérias com potencial tecnológico para biorremediação de ecossistemas impactados por mercúrio e cromo. **Geochimica Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 36-42, 2014.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, j.; OKON, O. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. **Advances in Botanical Research**, v. 51, p. 283-320, 2009.

STURZ, A.V.; NOWAK; J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 183-190, 2000.

TABASSUM, B., KHAN, A., TARIQ, M., RAMZAN, M., KHAN, M.S.I., SHAHID, N., AALIYAA, K. Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. **Applied Soil Ecology**, v.121, p.102-117, 2017.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.42, n.2, p.117-126, 2006.

TIMMS-WILSON, T.M., ELLIS R.J., RENWICK, A.; RHODES D.J.; MAVRODI, D;V.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S.; BAILEY, M.J. Chromosomal insertion of phenazine-1- carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1293-1300, 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8.ed. Trad. atual. Por Roberta Marchiori Martins. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

WEBER, K.P.; GROVE, J.A.; GEHDER, M.; ANDERSON, W.A.; LEGGE, R.L. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 461– 469, 2007.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

YU, H., LING, N., WANG, T., ZHU, C., WANG, Y., WANG, S., GAO, Q. Responses of soil biological traits and bacterial communities to nitrogen fertilization mediate maize yields across three soil types. **Soil & Tillage Research**, v.185, p.61–69, 2019.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Embrapa Agrobiologia. Seropédica**. p. 127, 2000.

ZAHIR, Z. A., ARSHAD, M., FRANKENBERGER Jr, W. T. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. **Advances in Agronomy**, v. 81, p. 97-168, 2003.

CAPÍTULO 2 – Diversidade genética e nutricional de isolados de *Bacillus subtilis* demonstrando diferentes aspectos relacionados à promoção de crescimento de plantas

Resumo - Atualmente, as práticas agrícolas vêm passando por intensas transformações, impondo grandes desafios como a manutenção da produtividade com menores custos de produção e impactos ambientais. Uma das alternativas para atender a esses requisitos é o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, incluindo o *Bacillus subtilis*. No entanto, diferentes isolados podem expressar diferentes aspectos e níveis de promoção do crescimento da planta. O presente estudo teve como objetivo verificar a diversidade genética e nutricional de oito isolados de *B. subtilis*, demonstrando diferentes aspectos e níveis de promoção do crescimento vegetal. Oito isolados de *B. subtilis* foram analisados quanto à diversidade nutricional pelo kit BiologEcoPlate™, diversidade genética por Box-PCR e ensaio em casa de vegetação. O delineamento experimental em casa de vegetação foi inteiramente casualizado com 9 tratamentos e cinco repetições, resultando em 45 vasos. Os tratamentos foram oito cepas de *Bacillus subtilis* e um tratamento controle utilizando plantas sem inoculação bacteriana. Os isolados 290 e 287 são geneticamente semelhantes, enquanto os isolados 248 e 263 também mostraram semelhanças. Análises genéticas e de consumo de substrato (carbono) mostraram diferenças e semelhanças entre os isolados, permitindo a distribuição dos isolados em diferentes grupos. Observou-se que o isolado com maior capacidade de promover o crescimento das plantas foi o único isolado (290) que consumiu ácido glicil-L-glutâmico. Esses resultados abrem caminho para novas investigações na tentativa de esclarecer quais são as condições e/ou características requeridas pelos isolados para que a promoção do crescimento vegetal seja mais efetiva.

Palavra-chave: *Bacillus subtilis*; promotor de crescimento de plantas; milho.

Genetic and nutritional diversity of *Bacillus subtilis* concession demonstrating different aspects related to the promotion of plant growth

Abstract - Currently, agricultural practices have been undergoing intense transformations, imposing major challenges such as maintaining productivity with lower production costs and environmental impacts. One of the alternatives to meet these requirements is the use of plant growth promoting bacteria, including *Bacillus subtilis*. However, different isolates may express different aspects and levels of plant growth promotion. The present study aimed to verify the genetic and nutritional diversity of eight *B. subtilis* isolates, demonstrating different aspects and levels of plant growth promotion. Eight *B. subtilis* isolates were analyzed as to their nutritional diversity by BiologEcoPlate™ kit, genetic diversity by Box-PCR, and a trial in greenhouse conditions. The experimental design in greenhouse trial was completely randomized with 9 treatments and five replicates, resulting in 45 pots. Treatments were eight *Bacillus subtilis* strains, and a control treatment using plants without bacterial inoculation. Isolates 290 and 287 are genetically similar, while isolates 248 and 263 also showed similarity. Genetic and substrate consumption (carbon) analyses showed differences and similarities among isolates, allowing the distribution of isolates into different groups. It was observed that the isolate with the highest ability to promote plant growth was the only isolate (290) that consumed glycyl-L- glutamic acid. These results open the way for further investigations in an attempt to clarify what are the conditions and / or characteristics required by isolates for the plant growth promotion to be more effective.

Abbreviations: Colony forming unit – CFU; PCA – principal component analyzes;

Keywords: *Bacillus subtilis*; plant growth-promoting; maize.

1. Introdução

A prática da agricultura convencional frequentemente utiliza uma grande quantidade de fertilizantes sintéticos e inseticidas que promovem intensos efeitos adversos nos humanos, nos animais e no meio ambiente. Para diminuir esses efeitos, pesquisadores em todo o mundo estão engajados na procura de alternativas abordadas na produção de culturas agrícolas que sejam menos dependentes da utilização desses insumos. Uma dessas alternativas é o uso de bactérias rizosféricas como componentes vitais da fertilidade do solo e da promoção de crescimento de plantas através dos seus processos diretos e indiretos na rizosfera das plantas (ALOO et al., 2019).

As rizosferas das plantas são ambientes especiais com complexas interações entre raízes – solo – microrganismos (JHA et al., 2013). Essas complexas interações são fortemente dirigidas pela exudação das raízes que servem para atrair bactérias benéficas do solo para as raízes (BHATTACHARYYA et al., 2016; ZHANG et al., 2017) e como resultado as rizosferas das plantas suportam uma grande quantidade de bactérias que são comumente denominadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) ou rizobactérias benéficas (RAZA et al., 2016). Evidências sugerem que as rizobactérias são capazes de melhorar o crescimento das plantas de forma direta ou indireta através de várias maneiras (PATEL e MINOCHEHERHOMJI, 2018), incluindo a fixação biológica do nitrogênio, a solubilização de nutrientes, a biossíntese de fitohormônios, antibióticos, enzimas hidrolíticas e indução de resistências para seus patógenos (BENEDUZI et al., 2012; GARCÍA-FRAILE et al., 2015; GUPTA et al., 2015).

Rizobactérias que contribuem para a melhora da disponibilidade de nutrientes e fixação do nitrogênio, solubilização de fósforo ou aquisição de ferro são comumente denominados como biofertilizantes (KUAN et al., 2016; SHARMA et al., 2013).

Existem grandes evidências mostrando que algumas bactérias são muito úteis na mobilização e solubilização de nutrientes do solo comparadas com bactérias não rizosféricas (HAYA et al., 2010) e por isso estão fortemente relacionadas com a fertilidade do solo (CLICK, 2012).

As rizobactérias que contribuem para a supressão de patógenos de plantas pelo antagonismo e competição são denominadas como agentes de biocontrole ou bioinseticidas (BENEDUZI et al., 2012; CHOWDHURY et al., 2013) enquanto que, outras podem contribuir para a degradação de poluentes orgânicos e a redução da toxicidade de metais em solos contaminados que são chamados de bioremediadores (GOSWAMI et al., 2016).

Entre as rizobactérias mais estudadas, por estarem presentes em maior número na rizosfera perfazendo 95% das populações de bactérias Gram positiva, serem capazes de melhorar o crescimento das plantas através da produção de diversas substâncias antibacterianas e antifúngicas (GOSWAMI et al., 2016), pela capacidade de produção de sideróforos (COMPANT et al., 2005), enzimas líticas (NELSON, 2004), por produzirem esporos e serem de fácil formulação (MENDES et al., 2018) são os *Bacillus subtilis* (ALOO et al., 2019).

Entretanto, as características de promoção de crescimento de plantas citadas cima são isolados dependentes e possuem uma grande variação de isolado para isolado entre os *B. subtilis*. O presente estudo teve como objetivo identificar as diferenças genéticas e nutricionais que pudessem explicar os diferentes efeitos de promoção de crescimento de plantas demonstrado por oito isolados de *B. subtilis*.

2. Material e Métodos

As cepas de *Bacillus subtilis* utilizadas neste trabalho, foram obtidas por MILANI et al., (2019) e pertencem a coleção de microrganismos do laboratório de Microbiologia do Solo, departamento de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP.

Tabela 1 - Identificação dos Isolados

Código do Isolado	Identificação
248	<i>Bacillus subtilis</i>
263	<i>Bacillus subtilis</i>
274	<i>Bacillus subtilis</i>
287	<i>Bacillus subtilis</i>
290	<i>Bacillus subtilis</i>
291	<i>Bacillus subtilis</i>
309	<i>Bacillus subtilis</i>
320	<i>Bacillus subtilis</i>

2.1 Obtenção da Sequência e Análise de Bioinformática

A extração do DNA genômico dos isolados, foi realizada utilizando o método MARMUR (1961) com adaptações. Os isolados foram cultivados em caldo nutriente durante dois dias, sob agitação de 100 rpm a 28°C, sendo posteriormente submetidos a centrifugação na qual o precipitado foi utilizado para extrair o DNA. A extração de DNA foi realizada em tubo de microcentrífuga de 2,0 mL. O precipitado foi suspenso em 400 µL de NaCl (0,85%), adicionando-se 40µL de lisozima (20 mg/mL), sendo agitado, e em seguida, adicionado 13 µL de RNase (10 mg/mL), após isso, o tubo de microcentrífuga permaneceu no banho-maria a 37°C durante duas horas. Foi adicionado 35 µL de SDS 25% e agitado manualmente por cinco minutos. Posteriormente, foi adicionado 158 µL de solução acetato de sódio (3M, pH 5) gelada e novamente agitado manualmente durante cinco minutos. Adicionou-se 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e agitou-se manualmente durante cinco minutos. Os tubos foram submetidos a centrifugação a 12000 rpm durante quinze minutos a 4°C. A fase superior foi coletada e transferida para outro tubo, ao qual foi adicionado dois volumes de etanol absoluto gelado e misturado por inversão. Os tubos foram submetidos 24 horas a -20°C. Após esse período o tubo foi centrifugado a 12000 rpm, durante trinta minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se ao pellet 1 mL de etanol 70%. Novamente os tubos foram centrifugados a

12000 rpm durante cinco minutos a 4°C. O álcool foi descartado, o tubo foi invertido sobre papel para secar e, posteriormente foi suspenso novamente em 200 µL de solução TE (10mM TrisHCl, 1 mM EDTA- pH 7,4).

Os DNAs extraídos foram amplificados pela reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA bacteriano pela reação contendo tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], 1,5 mM de MgCl₂, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, Taq DNA polimerase (Fermentas) e água ultra pura para completar um volume final de 20 µL. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados por (WEISBURG et al., 1991) fD1 "forward" (5'-CCG AAT TCG TCG 33 ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G – 3') e o rD1 "reverse" (5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC -3'). As amostras foram amplificadas em um termociclador de acordo com o programa: 95°C, por 5 minuto; 30 ciclos de 94°C por 1 minutos, 53°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72°C.

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 100ng de DNA de produto de PCR purificado, 3,0 mL de tampão de sequenciamento (Save money 2,5X), 1,0 mL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador e quantidade de água bi-destilada estéril que complete 10 mL. Ao término da reação de sequenciamento, que consisti em uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min e de 30 ciclos compostos por uma etapa a 94°C por 1 minuto, uma etapa a 53°C por 1 minuto e uma etapa de polimerização a 72°C por 5 minutos, as amostras são mantidas a 4°C. Em seguida, 80 mL de isopropanol 75% são adicionados a cada reação. Após 15 minutos a temperatura ambiente, as reações são centrifugadas a 3040g, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich) com rotor para microplacas, por 30 min. a 20°C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante é descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 mL de etanol 70% seguido de centrifugação a 3040g por 10 min. a 20°C, na mesma centrífuga Rotanta 46R. As amostras foram secas a vácuo, ressuspensas em 10mL de formamida, desnaturadas por 5 min a 95°C e submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)) conforme recomendações sugeridas pelo fabricante.

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa “Sequencing Analysis 3.4” e “Phred/Phrap” (GORDON, 1998) com nível de exigência mínima de 400 bases com qualidade Phred acima de 20. As sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências do banco de dados do ‘Ribosomal Database Project’ (RDP) pela ferramenta ‘Classifier’; do GenBank (National Center for Biotechnology Information), usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tools, ALTSCHUL et al, 1997). As análises de agrupamento foram feitas pelos softwares CLUSTALW2 (LARKIN et al., 2007) e MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) usando o método de “Maximum Likelihood” e boodstrap de 1000 réplicas para a construção dos dendrogramas.

2.2 Amplificação da Sequência Repetitiva BOX-PCR

Regiões dos DNAs cromossômicos dos isolados foram amplificados usando-se o oligonucleotídeo BOX-PCR 1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G - 3') (MARTIN et al., 1992).

As condições da PCR foram 80 ng de DNA molde, 10 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, tampão 10X, 5 pmoles μL^{-1} de primer BOX-A 1R 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas®) e água milli-Q estéril para completar o volume final de 20 μL .

A amplificação foi realizada no termociclador de acordo com o seguinte programa: 1 ciclo a 95°C por 5 min.; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min; pareamento a 53°C por 1 min.; e extensão a 65°C por 8 min.; extensão final a 65°C por 16 min. e um ciclo final de 4°C.

2.3 Comparação dos Isolados Através do Perfil Metabólico

Os isolados foram comparados através da capacidade de metabolização de fontes de carbono em kit Biolog EcoPlate™ (GARLAND; MILLS, 1991). Cada placa contém 31 fontes de carbono dividido em cinco categorias: carboidratos, amina, polímero, ácido carboxílico e aminoácidos. Essas 31 fontes de carbono

possuem 3 réplicas de cada substrato, e o controle sem fonte de carbono. A utilização do substrato é medida espectrofotometricamente por meio de uma reação, onde o corante indicador tetrazólio proporciona a alteração da coloração do meio para violeta, pela atividade metabólica das células.

Os isolados foram cultivados em caldo nutriente (extrato de carne: 1,0 g/L, extrato de levedura: 2,0 g/L, peptona: 5,0 g/L, NaCl: 5,0 g/L, pH: $6,8 \pm 0,2$) durante dois dias, sob agitação de 100 rpm, 28°C para formar o pré-inóculo, após este período, 25 mL da cultura foi centrifugada a 15 °C por 20 minutos a 12000rpm. As células precipitadas foram suspensas em caldo nutriente dando origem a uma suspensão celular com absorvância a OD₍₅₆₀₎ de 0,1. Esta suspensão foi então cultivada por 3 horas sob a mesma condição anterior, para formar uma suspensão celular com OD₍₅₆₀₎ igual a 0,2. Em seguida, 150 µL dessa suspensão bacteriana foram distribuídas em cada poço das microplacas Biolog EcoPlate™ sob fluxo laminar, que permaneceu a 27°C em uma incubadora de demanda biológica de oxigênio (incubadora B.O.D.) por 5 dias. O consumo da fonte de carbono foi medido em um espectrômetro de placas MultiScan Go (Thermo Scientific), a 590 nm. As leituras foram realizadas imediatamente após a adição da suspensão de cada isolado na placa (T0) e a cada 24 horas, por 5 dias consecutivos. As leituras de controle (sem o substrato, apenas água) foram subtraídas de cada leitura do substrato. Os dados gerados possibilitaram a comparação do perfil metabólico de cada isolado em relação ao número de substratos utilizados, desenvolvimento médio da cor do poço após 120 h de incubação.

2.4 Delineamento Experimental – Casa de Vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, câmpus Jaboticabal, SP.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com nove tratamentos e cinco repetições, resultando em quarenta e cinco vasos. Os

tratamentos foram oito linhagens de *B. subtilis*, e um tratamento controle utilizando plantas sem inoculação bacteriana.

Cinco sementes de milho comercial 2B58PW (Dow Agro Sciences) foram semeadas em vasos de cinco litros contendo solo previamente peneirado. A adubação do solo foi realizada conforme análise química do solo e o recomendado para a cultura, seguindo indicações de RAJJ e CANTARELLA, (1997) para produtividade esperada de 8 a 10 t.ha⁻¹, aplicando 100 Kg ha⁻¹ de nitrogênio na forma de ureia convencional, 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 50 kg ha⁻¹ de K₂O (cloreto de potássio), com suas quantidades devidamente calculadas para o volume do vaso. Uma semana após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por vaso. O experimento foi conduzido pelo período de 60 dias, realizando 4 inoculações a cada 8 dias, com o volume de 10 mL da suspensão bacteriana por vaso diretamente no solo.

Para produção do inóculo, cada isolado bacteriano foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 60 mL de caldo nutriente (extrato de carne: 1,0 g/L, extrato de levedura: 2,0 g/L, peptona: 5,0 g/L, NaCl: 5,0 g/L, pH: 6,8 ± 0,2) e as culturas incubadas em BOD a 28°C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram padronizadas através de leitura em espectrofotômetro a 630nm (KLOEPPER et al., 1989). Ajustando-se a concentração de células a 1,5x10⁸ unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹).

2.4.1 Avaliação na Planta - Massa Seca de Parte Aérea e Raiz

As plantas foram devidamente coletadas dos vasos separando raiz da parte aérea e secas em estufa sob ventilação forçada a 65°C por aproximadamente 72 horas até massa constante. Foi aferida a massa do material vegetal seco em balança analítica para determinação da massa seca em gramas de parte aérea e raízes.

2.4.2 Análise do Solo

Todas as análises foram realizadas em quintuplicata. A atividade respiratória microbiana foi determinada em frascos de 2,5 L com 100 g de solo, contendo um béquer com 20 ml de hidróxido de sódio 0,5 M. Após incubação por 5 dias a 28°C no escuro, o hidróxido de sódio foi titulado com ácido clorídrico 0,5 M (REZENDE et al., 2004; BARBOSA et al., 2015).

O carbono da biomassa microbiana foi medido de acordo com os métodos de irradiação (FERREIRA et al., 1999). O tempo de irradiação ao qual as amostras de solo foram submetidas foi determinado de acordo com Islam e Weil (1998). A extração de carbono foi realizada com sulfato de potássio 0,5M, e o extrato foi oxidado com dicromato de potássio 0,066 M em meio ácido. A quantificação foi realizada por titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,33M.

A umidade do solo foi verificada após a secagem de cada amostra em estufa a 100°C por 24 horas. Em seguida utilizou-se uma balança de precisão afim de comparar o peso final do inicial. Para a determinação da umidade do solo utilizou-se a Equação 1.

$$U = \frac{Mu - Ms}{Ms} \cdot 100$$

Onde U= Umidade do solo a base de massa (%); Mu= massa do solo úmido (g); Ms= massa de solo seco (g).

2.4.3 Atividade Enzimática – Desidrogenase

A atividade da desidrogenase foi determinada de acordo com Casilda et al. (1964). Utilizou-se três gramas de solo seco (<2 mm) que foram pesados em tubos de 18×80 mm contendo 0,03 g de carbonato de cálcio, 0,5 mL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e 2 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e os tubos foram selados com filme plástico de PVC e submetidos em banho-maria a 37°C por 24 h. Após a incubação, 10 mL de metanol foram adicionados aos tubos. O conteúdo foi agitado e filtrado com

papel Whatman 42. Em seguida, o material foi transferido para recipientes de 125 mL de Erlenmeyer, e a intensidade da cor vermelha formada pela reação foi medida em um espectrofotômetro com absorvância de 485 nm. Concentrações de trifenilformazan (TFF) formadas pela reação do TCC foram calculadas com o auxílio de uma curva padrão com 0, 5, 10, 20, 30, 40 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TPF. A unidade foi expressa em $\mu\text{g TPF g}^{-1}$ de solo seco em 24h.

2.5 Análise Estatística

Os resultados das variáveis do perfil metabólico através do consumo de substratos são apresentados em heatmap. Para obter informações sobre o perfil metabólico microbiano, especialmente por apresentar cinco tempos de leitura de absorvância, foi realizado um cálculo matemático para cada substrato utilizando a fórmula proposta por Hackett e Griffiths (1997), que sugere o uso de uma equação usando dados de todos os tempos, definindo o metabolismo e o consumo de substrato durante todo o período de incubação. Em seguida, os dados foram submetidos à normalização proposta por Weber et al. (2007). Posteriormente, os heatmaps hierárquicos de agrupamento foram gerados usando o software "R" (The R Project for Statistical Computing, 2014) através do método de ligação de Ward's Method e da distância euclidiana entre o consumo das fontes de carbono. Todas as análises foram realizadas em quintuplicatas e os resultados foram expressos usando média $\pm$ desvio padrão. A análise unidirecional foi usada (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, em um nível significativo de 5%. A análise de componentes principais (PCA) foi usada para descrever a relação entre o consumo das fontes de carbono, e a promoção de crescimento da planta de acordo com cada isolado utilizado. A PCA foi realizada usando uma matriz de correlação com base nos coeficientes de correlação de Pearson após a padronização dos dados para evitar a influência de diferentes ordens de magnitude ou unidades nos resultados. Um gráfico de pontuação da PCA foi utilizado para a distribuição das amostras e um gráfico de correlação para observar a importância e as interações das variáveis. Para avaliar a correlação, foi utilizado o padrão descrito por Teles et al. (2018), na qual utilizou valores de r entre -0,3 e 0,3 caracterizou correlação desprezível; de 0,3

a 0,5 (ou -0,3 a -0,5) representa baixa correlação; valores r de 0,5 a 0,7 (ou -0,5 a -0,7) indica uma correlação moderada; r valores de 0,7 a 0,9 (ou -0,7 a -0,9) significa uma correlação forte ou alta relação e finalmente valores de r entre 0,9 e 1,0 (ou -0,9 a -1,0) implica uma correlação muito forte ou alta (MUKAKA, 2012). As análises estatísticas foram realizadas com o software R language version 3.2.4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Australia) e a Fac-pacote toMineR versão 1.32, pacote Factoextra versão 1.0.5 e Pacote de análise de desempenho versão 1.4.3541.

3. Resultados

3.1 Análise de Bioinformática e BOX-PCR

Por meio do sequenciamento da região 16S rRNA, a árvore filogenética (Figura 1) foi gerada a fim de observar a similaridade entre os isolados. Todos foram identificados como *Bacillus subtilis*.

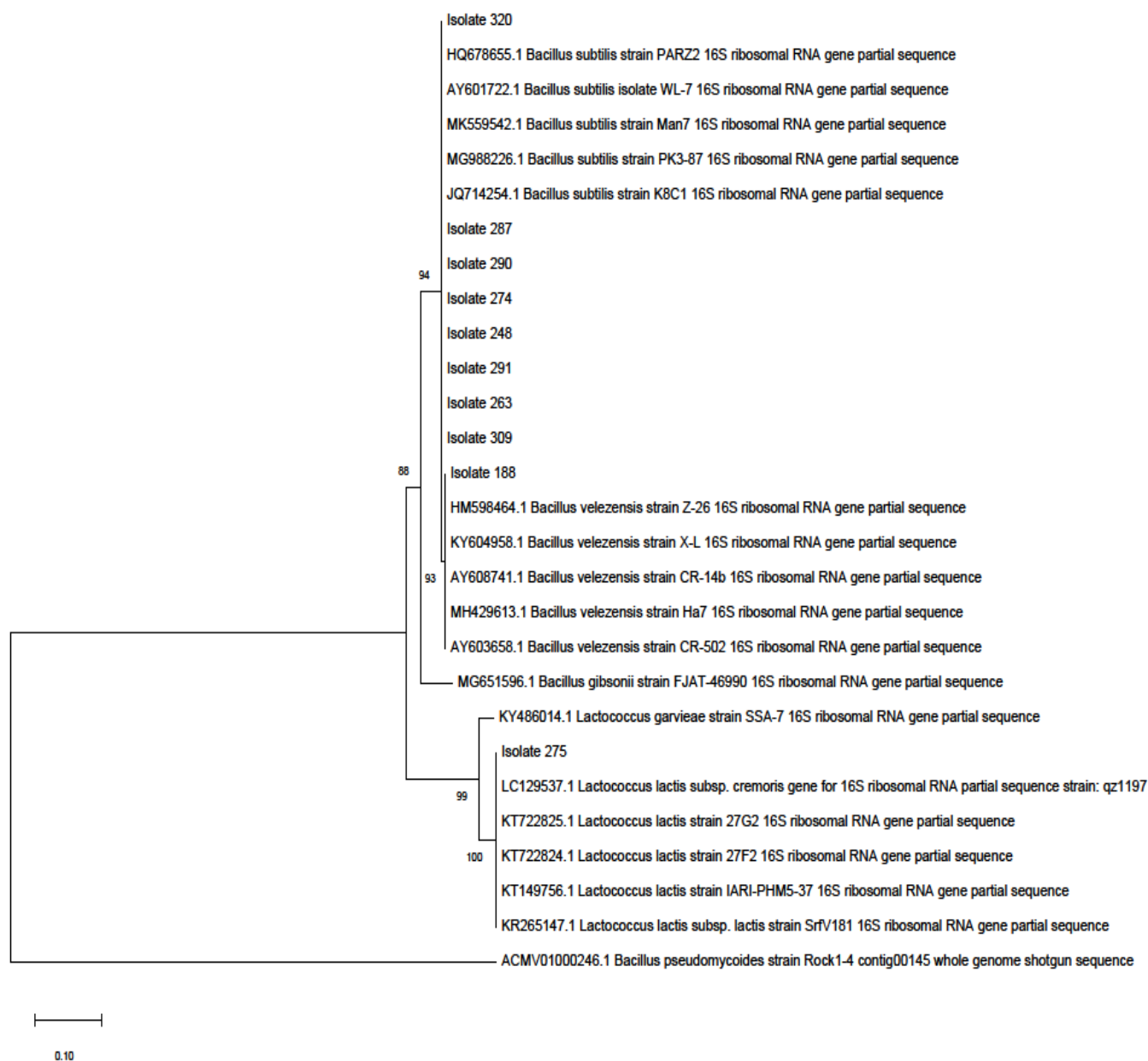


Figura 1 - Árvore Filogenética baseada na sequência de nucleotídeos dos microrganismos obtidos a partir do banco de dados NCBI (números de acesso indicados), apresentando a relação filogenética com os isolados 320, 287, 290, 274, 248, 291, 263 e 309.

A partir da classificação dos isolados pertencentes ao mesmo gênero e espécie, foi realizado a análise BOX-PCR, que consiste no emprego de *primers* complementares a sequência de DNA altamente conservada e repetitiva, que está abundantemente na maioria dos genomas bacterianos. Através desta técnica, foi possível identificar o perfil de bandas amplificadas (Figura 2), que caracterizou a diferença gênica entre os isolados, e a obtenção dos clusters de acordo com suas similaridades.

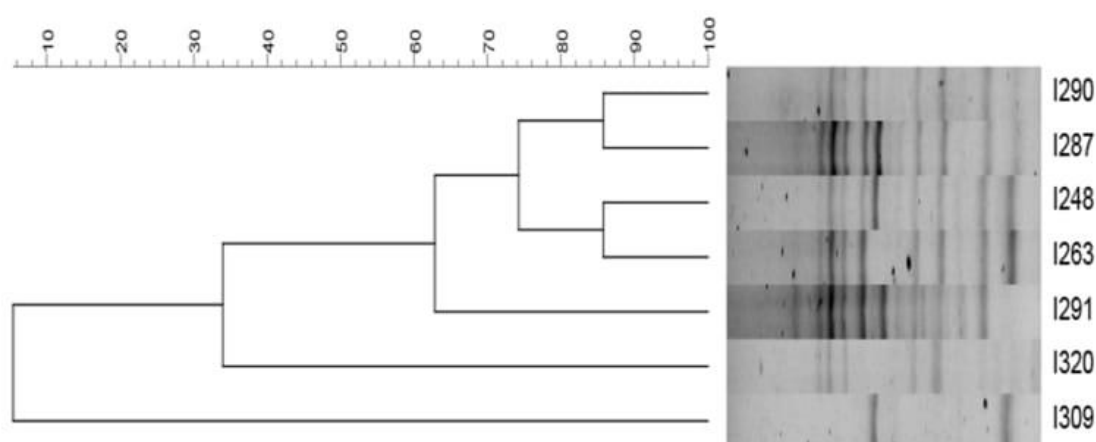


Figura 2 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% BOX-PCR dos isolados. 1 - Isolado 290; 2 – Isolado 287. 3 – Isolado 248; 4 - Isolado 263; 5 - Isolado 291; 6 - Isolado 320; 7 – Isolado 309.

Podemos observar a formação de dois clusters, um representado pelo isolado 290 e 287, e o outro pelos isolados 248 e 263, que apresentaram grandes similaridades no padrão de genes amplificados. Os isolados 291, 320 e 309 exibiu um perfil de genes diferentes dos demais, que permite afirmar que são distintos dos outros isolados. Para o isolado 274, não houve amplificação para a região BOX, sugerindo que o mesmo apresenta um padrão gênico completamente diferente dos demais.

3.2 Perfil Metabólico dos Isolados

A fim de avaliar o perfil metabólico dos isolados para verificar o consumo das mais variadas fontes de carbono, os isolados foram submetidos a análise em placa de EcoPlate. Cada placa contém 31 fontes de carbonos, sendo estas divididas em 10 fontes de carboidratos, 9 fontes de ácido carboxílico, 6 fontes de aminoácidos, 4 fontes de polímeros, e 2 fontes de amina.

Os resultados foram expressos em um HeatMap (Figura 3), no qual é possível observar a formação de dois grupos hierárquicos, sendo um deles compostos pelos agrupamentos dos isolados, e o outro pelo consumo dos substratos.

No agrupamento entre os isolados, podemos identificar a formação de dois clusters, um formado pelo isolado 274 e 291, e o outro pelos isolados 287, 263, 290, 320, 309 e 248. Pode-se perceber que alguns isolados possuem semelhanças no consumo dos substratos, deste modo, o emprego de ferramentas estatísticas foram utilizadas para analisar o consumo de diferentes substratos e comprovar que existem correlações entre elas (Figura 5).

Para o agrupamento dos substratos, obtiveram-se dois principais clusters, apresentados visualmente pela expressividade de coloração do heatmap (vermelho, maior consumo de substrato; preto, consumo intermediário, e o amarelo, menor consumo).

Os substratos que tiveram maior consumo foram os ácidos carboxílicos: Ácido D-glicosamínico, D-galactônico ácido- γ -lactona, ácido D-galacturônico, ácido γ -hidroxibutírico; carboidratos: ácido pirúvico metil éster, β -metil-D-glicosídeo; aminoácido: L-treonina e L-arginina; e polímero: Glicogênio. Os substratos que tiveram menor consumo foram os ácidos carboxílicos: ácido itacônico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido D-málico, ácido 2-hidroxibenzóico, ácido α -cetobutírico; carboidratos: glicose-1-fosfato, D,L- α -glicerol-fosfato, i-eritritol, D-celobiose, D-xilose, α -D-lactose, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina; aminoácido: L-fenilalanina, L-serina, ácido glicil-L-glutâmico, L-asparagina; polímero: tween 80, tween 40, α -ciclodextrina; e amina: feniletilamina, putrescina.

Através dos estudos da diversidade metabólica dos microrganismos, Sala et al. (2006) relatou que os ecossistemas podem se adaptar a constantes

mudanças de nutrientes, e se adaptarem a diversas fontes de carbonos, podendo utilizá-las para seu crescimento, visto que alguns componentes podem estar presentes em sua estrutura celular. Desta maneira estes microrganismos expressam uma grande capacidade de se desenvolver em função de várias vias metabólicas.

Nota-se ainda que o isolado 291 está relacionado ao maior consumo de D-celobiose, D-xilose e α -D-lactose. O isolado 274 foi o único que consumiu a fonte de carbono do ácido itacônico, glicose-1-fosfato, ácido D-málico, e D,L- α -glicerol-fosfato. O isolado 263 foi o único que consumiu a fonte tween 40, o isolado 290, o único que consumiu o ácido glicil-L-glutâmico e o isolado 248 o único que consumiu L-fenilalanina. O isolado 287 caracteriza-se diferente dos demais de acordo com seu consumo na fonte de carbono, utilizando apenas 9 das 31 fontes disponíveis (Figura 3).

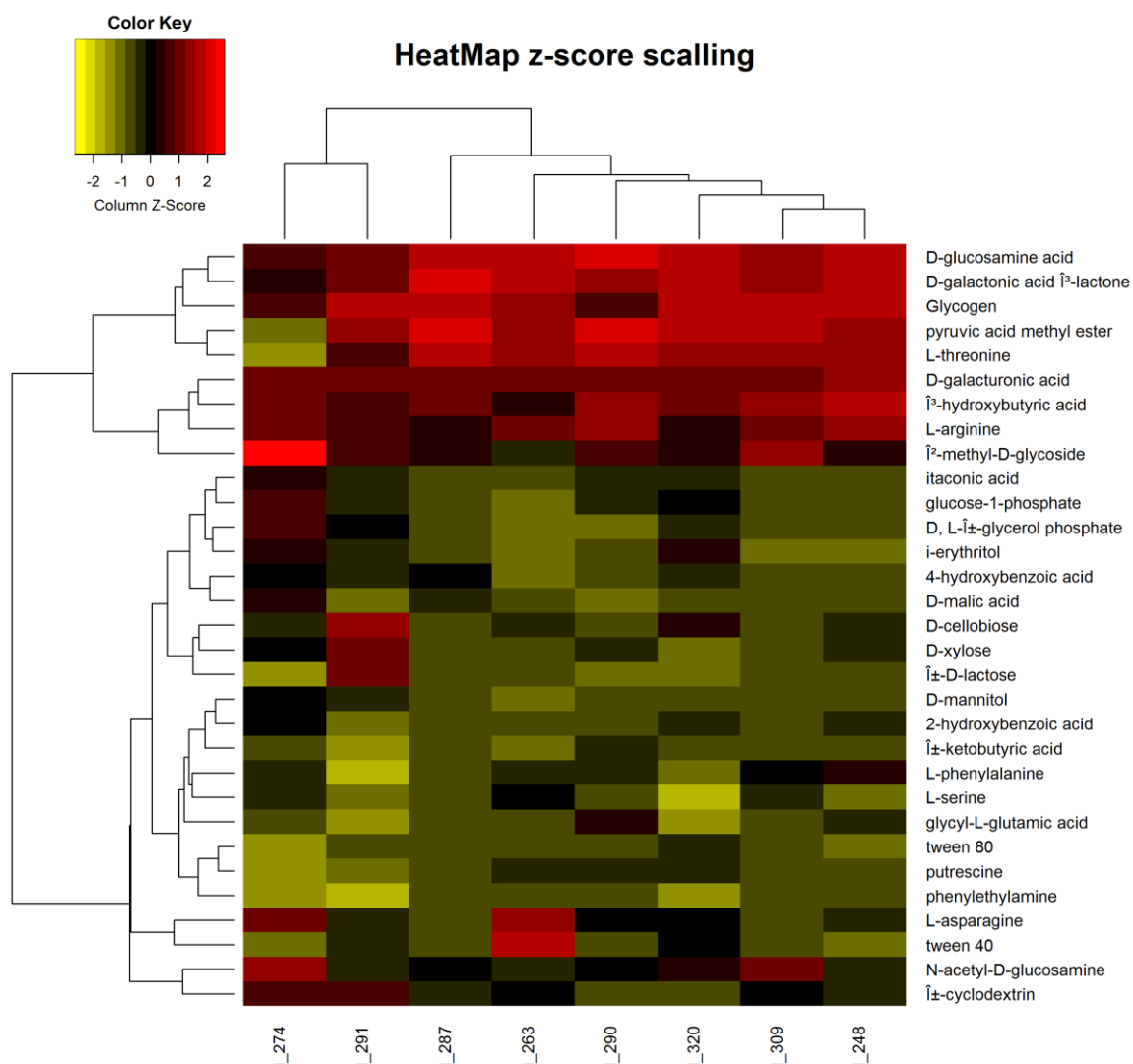


Figura 3 - Heatmap e agrupamento hierárquico dos isolados e das 31 fontes de carbono por Biolog Ecoplate, utilizando todos os tempos de incubação.

3.3 Promoção de Crescimento de Plantas

A fim de avaliar a promoção de crescimento de plantas empregando os isolados classificados como *Bacillus subtilis*, um experimento em casa de vegetação foi conduzido, utilizando a cultura do milho. O experimento ocorreu durante sessenta dias, sendo realizadas quatro inoculações para cada estirpe.

Neste experimento foram avaliados a umidade do solo, a atividade respiratória, o carbono da biomassa, a produção de desidrogenase, a matéria seca de raiz e parte aérea (Figura 4).

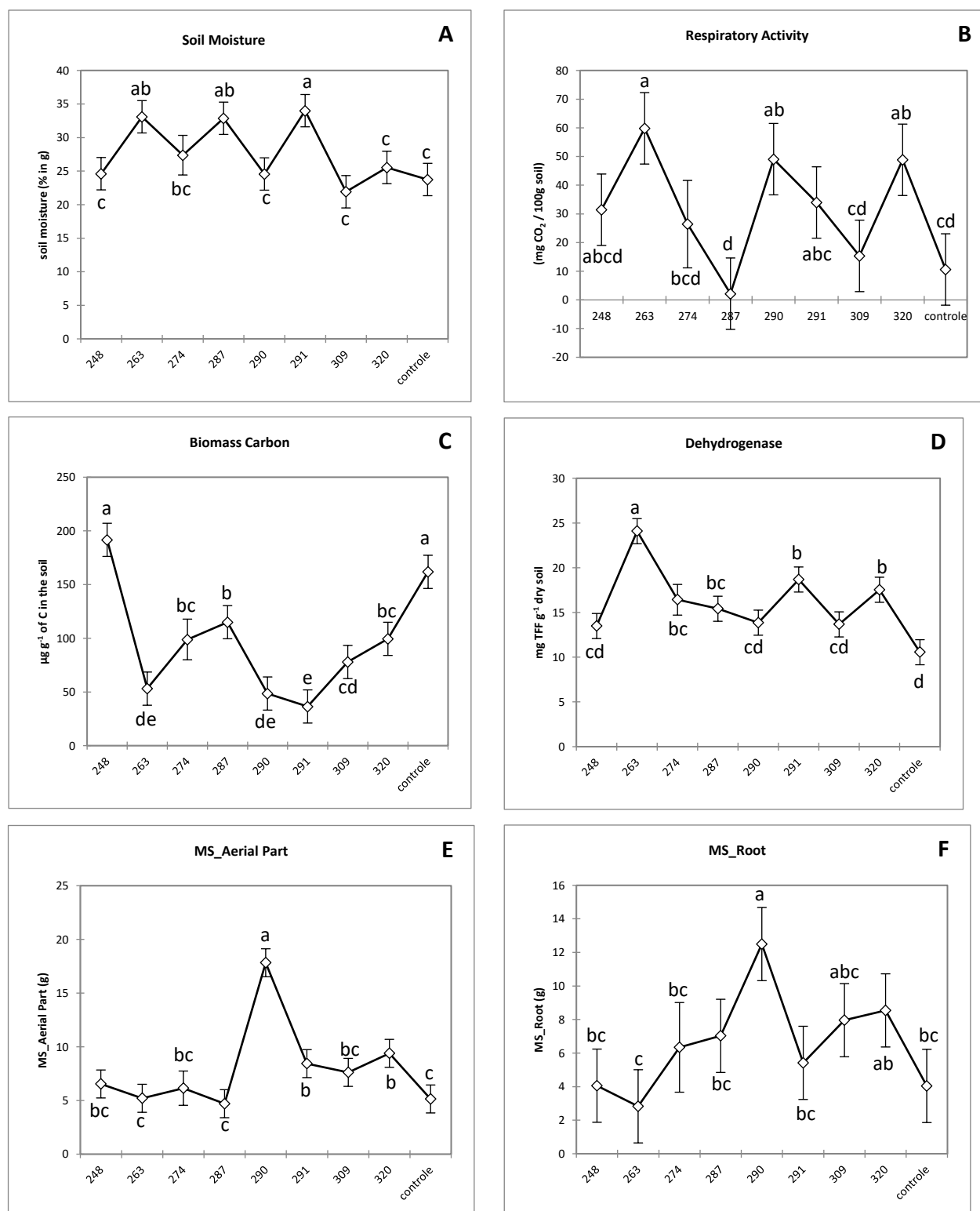


Figura 4 – Umidade do Solo (A), Atividade respiratória (B), Carbono da biomassa (C), Desidrogenase (D), Matéria seca de parte aérea (E) e Matéria seca de raiz (F) de plantas de milho inoculadas com oito isolados de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus subtilis* e um controle sem inoculação aos 60 dias. As médias com diferentes letras indicam diferença significativa de 5% de acordo com o teste de Tukey.

A partir dos resultados da Figura 4, podemos observar o comportamento dos isolados em interação com a atividade microbiana do solo. Para a umidade do solo, os isolados que se destacaram foram o 291, 263 e 287 com valores acima de 30%, já o isolado 309 obteve o menor valor sendo de 22,79% sendo este inferior ao controle.

Na atividade respiratória, os isolados que mais produziram CO₂ foram os 263, 290 e 320, e o que menos produziu foi o 287, seguido do controle.

Para a produção de C no solo, o isolado 248 se destaca, produzindo 191,65 µg g⁻¹ de C, seguido do isolado controle e do isolado 287, e o que menos produziu foi o isolado 291 e 290.

Na produção de desidrogenase, os isolados 263, 291, e 320 se destacaram, e os demais tiveram seus valores equivalentes, sendo o controle o que menos produziu.

Na promoção de crescimento de planta, perante os dados de matéria seca de parte aérea e raiz, o isolado que se destaca é o 290 apresentando os maiores valores. Em contrapartida, o controle e os isolados 263 e 287 apresentou os menores resultados na matéria seca de parte aérea; já na matéria seca de raiz, o isolado 263, 248 e também o controle apresentaram os menores resultados.

3.4 Correlação do Perfil Metabólico e Promoção de Crescimento de Plantas

Com a finalidade de avaliar a correlação entre o consumo das mais diversas fontes de carbono (Figura 3) e a promoção de crescimento de plantas (Figura 4), seus respectivos resultados foram cruzados, sendo observados sua forte interação de acordo com os coeficientes de correlação de Pearson segundo Teles et al. (2018), sendo expressos na Figura 5.

Pode-se observar que todos os valores de correlação se encontram acima de 0,7 seja esta positiva ou negativa, representando correlações forte (0,7 a 0,9 ou -0,7 a -0,9) e muito forte (0,9 a 1,0 ou -0,9 a -1,0). A correlação significa o grau de associação de duas variáveis resposta. Quando uma correlação é negativa, uma variável aumenta e a outra diminui; quando é positiva, as duas

variáveis aumentam. Nota-se ainda que não há valores para todas as variáveis, ou seja, para o valor de $p > 0,05$ indica que mesmo o não apresentou significância estatística.

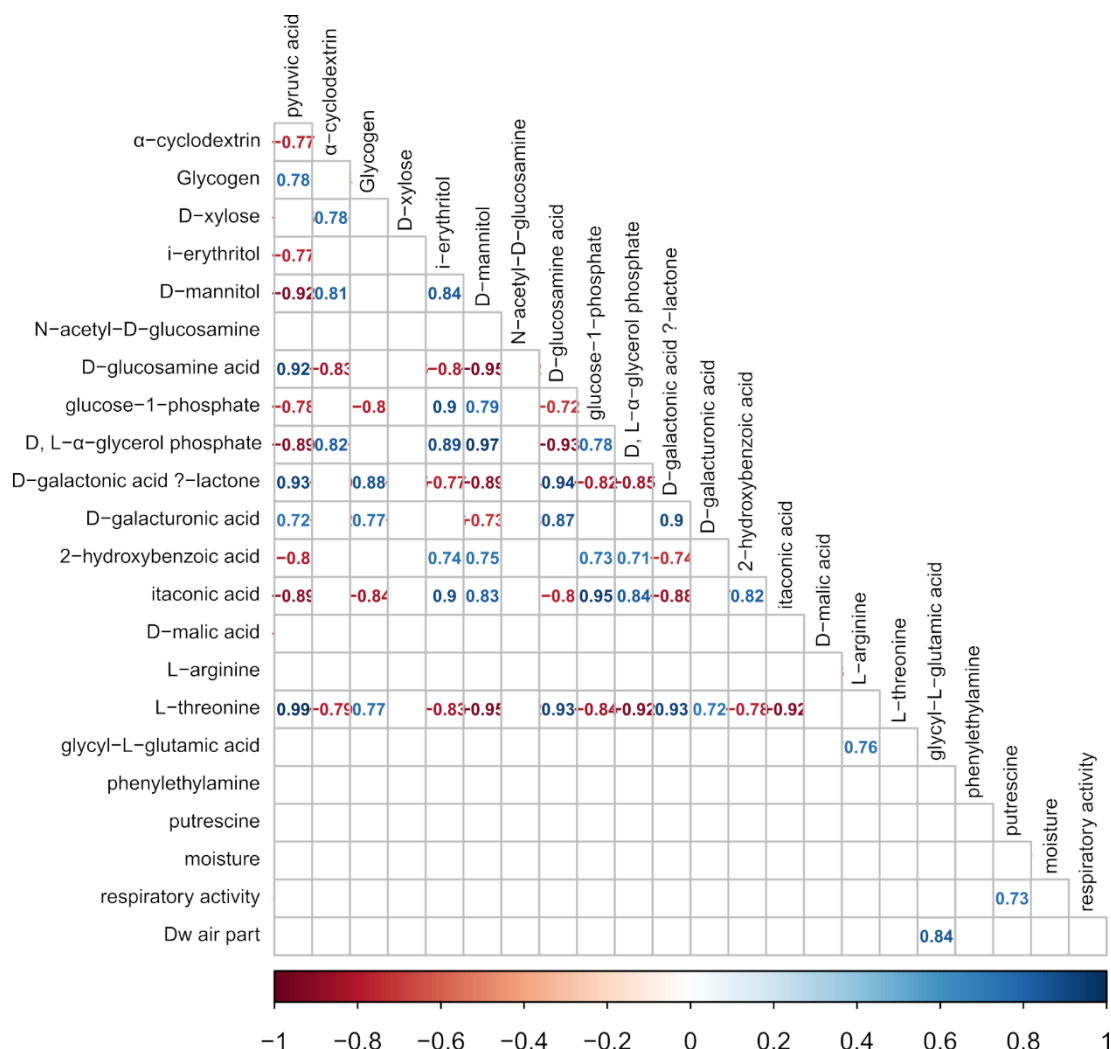


Figura 5 – Coeficientes de Correlação de Perarson do consumo das fontes de carbono Biolog EcoPlate™, e promoção de crescimento de plantas pelos isolados *Bacillus subtilis*

3.5 Análise de Componentes Principais (PCA) da Correlação

A figura 6, corresponde ao biplot formado pelos dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) e certifica-se que a soma da variabilidade retida nestes componentes é de 71,5% da variabilidade original, do qual o CP1

e CP2 apresentam cada um, 51,4% e 20,1%, respectivamente. A projeção em um plano bidimensional, o biplot, procura especificar o comportamento das variáveis e contemplar as associações entre os isolados, bem como apontar quais isolados estão estreitamente relacionados com o consumo de substratos e a promoção de crescimento de plantas. Os isolados que se encontram na direção do sentido das variáveis, indicam maiores consumos de uma determinada fonte de carbono, e no sentido contrário, menores. Os isolados que se localizam nas extremidades do plano, exibem características específicas, sendo distinto dos demais, e os isolados que estão mais próximos, são mais semelhantes.

A finalidade da utilização desta ferramenta é exibir as informações mais relevantes de uma tabela de dados para facilitar a apresentação dos dados como novas variáveis comuns chamadas de componentes principais (ABDI & WILLIAMS, 2010). O conjunto de dados foi disposto em uma matriz com nove linhas cor- respondendo às amostras e trinta e sete colunas correspondentes às trinta e uma fonte de carbono da placa Biolog EcoPlate™, e aos seis parâmetros analisados quanto a promoção de crescimento de plantas, sendo estes a umidade do solo, a atividade respiratória, o carbono da biomassa, a produção de desidrogenase, a matéria seca de raiz e parte aérea.

Na figura 6, é possível identificar uma forte correlação do isolado 290 com as variáveis ácido glicil – L- glutâmico, L-arginina e massa seca de parte aérea. Para o isolado 287, podemos visualizar sua forte correlação com glicogênio. Já o isolado 274, possui forte correlação com D – manitol, l-irritol, e D,L- α -glicerol-fosfato. Nota-se ainda que alguns isolados, 248 e 309, 320 e 291 encontram – se próximos, o que nos sugere uma similaridade no consumo das fontes de carbono e na promoção do crescimento de plantas (Figura 7). É possível considerar que os isolados estejam divididos em 4 grupos, o isolado 274 separado, um segundo grupo formado pelos isolados 320 e 291, o terceiro formado pelo isolado 287, e o quarto caracterizado pelos isolados 290, 263, 248 e 309.

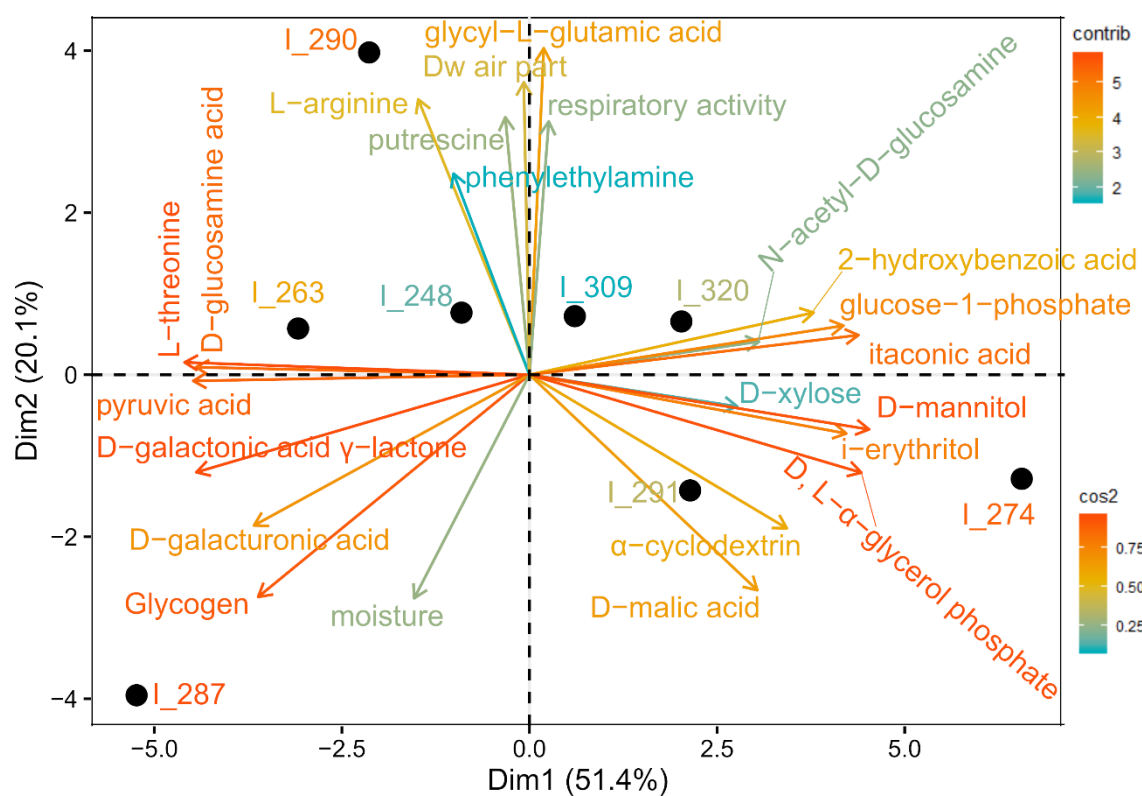


Figura 6 - Projeção espacial, com biplot, de componentes principais (PCA), referente ao consumo das fontes de carbono e a promoção do crescimento de plantas.

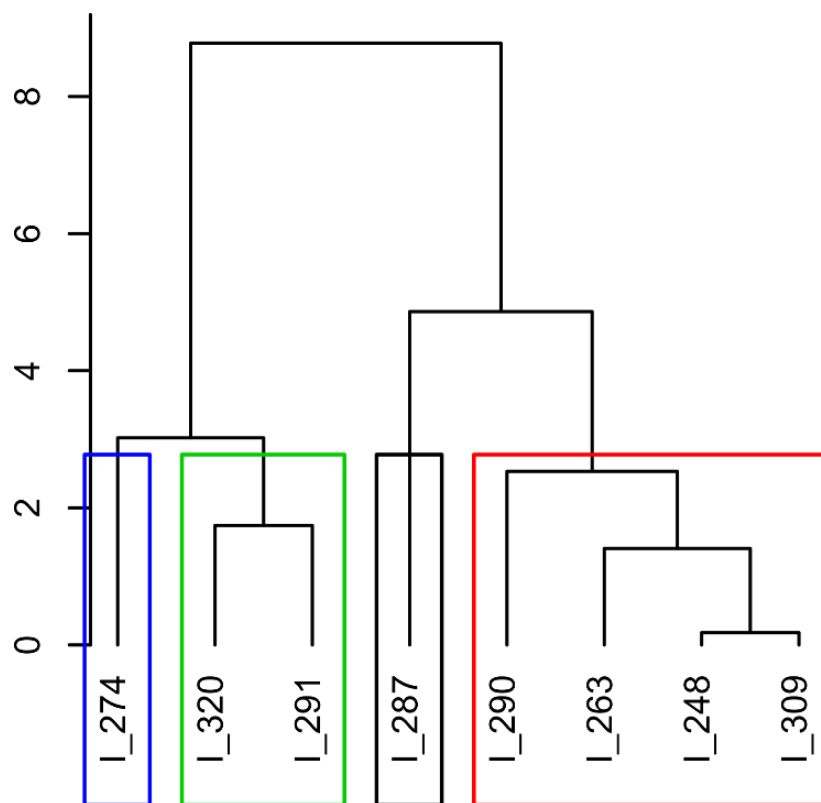


Figura 7 - Análise de agrupamento hierárquico dos isolados de acordo com PCA

4. Discussão

As diferenças de promoção de crescimento nas plantas que receberam os oito *B. subtilis* na casa de vegetação é resultado das diferenças genéticas, uma vez que, os isolados não tiveram 100% de similaridade, somado com as interações entre planta e microbiota rizosférica que promovem diferentes expressões gênicas.

Trabalhos anteriores realizados com os mesmos isolados de *B. subtilis*, mostraram diferenças significativas em relação a matéria seca de parte aérea e raiz, tanto para a cultura do milho, quanto para a cultura do algodão (LOBO, 2018; DIAZ 2018). O aumento da matéria seca normalmente é uma consequência da síntese de fitohormônios produzidos pelos microrganismos. Estes, aumentam a superfície de contato da raiz da planta possibilitando maior interação entre os microrganismos e a planta, no qual, o microrganismo é

favorecido na obtenção de nutrientes e carbono provenientes das raízes das plantas pela rizodeposição e a planta é favorecida com o aumento da eficiência de exploração de solo, aumentando assim, sua capacidade de absorção de nutrientes e água (^aWANG et al., 2009; WHITE et al., 2014).

Na atividade respiratória, os isolados 263, 290 e 320 apresentaram maiores valores significativos. A emissão de CO₂ no solo, ocorre através da respiração microbiana, respiração das raízes, decomposição dos resíduos vegetais, e oxidação da matéria orgânica do solo (LAL, 2009), contudo a umidade e temperatura do solo afetam diretamente em sua emissão ao longo do tempo (COSTA et al., 2008; ALMARAZ et al., 2009; CHAVEZ et al., 2009; USSIRI & LAL, 2009; ALMAGRO et al., 2009; PANOSSO et al., 2009; ^bWANG et al., 2009; SILVA-OLAYA et al., 2013). Para a produção de CO₂ há uma umidade ótima que potencializa a respiração. Em excesso a respiração microbiana do solo é delimitada pela redução da propagação do oxigênio essencial para a respiração aeróbia da célula (LINN & DORAN, 1984; LAL, 2009). Esses resultados sugerem que os isolados 263, 290 e 320 possuem uma grande habilidade de ciclagem de nutrientes e mineralização de nutrientes do solo.

Em reação ao carbono da biomassa microbiana, interessante, a inoculação com os isolados, exceto o isolado 248, diminuiu o carbono da biomassa microbiana, o que está relacionado com as populações microbianas da amostra de solo. Este resultado sugere que provavelmente as inoculações consecutivas de *B. subtilis* tenha diminuído outras populações microbianas e promovido um rearranjo populacional. Certamente, a inoculação dos *B. subtilis* diminuíram a diversidade microbiana da rizosfera, e provavelmente, isso refletiu na diminuição do carbono da biomassa, mas aumentou a especificidade se tornando um grande número populacional.

Para a atividade da desidrogenase os isolados que apresentaram valores significativos foram 263, 291 e 320. A desidrogenase é uma enzima que possui influência sob os fatores das atividades microbianas pois ela incide a atividade oxidativa total da microbiota do solo, sendo esta uma enzima óxido – redutase (GU; WAG; KONG, 2009). Seu processo ocorre em todas as células microbianas vivas intracelularmente, não acumulando extracelularmente no solo (SALAZAR et al., 2011).

Pode-se observar que o isolado 263 promoveu incrementos para os parâmetros, atividade respiratória, e produção de desidrogenase, contudo, em relação à promoção de crescimento de planta para os parâmetros de matéria seca de parte aérea e raiz, o mesmo não promoveu aumento significativo, sugerindo que a ação de alguns microrganismos promovendo incrementos de atividade microbiana do solo podem não refletir diretamente, ou a curto prazo, na promoção de crescimento de raízes e de parte aérea. O aumento da atividade microbiana do solo traz muitos benefícios para a produção vegetal, entretanto, esses resultados sugerem que a atividade microbiana do solo não substitui uma interação mais próxima entre microrganismos e plantas.

O isolado 290 se destacou por promover o maior crescimento da planta (Figura 4 – E, F), promoção de maior quantidade de matéria seca de raiz e parte aérea. LOBO, (2018) e DIAZ (2018) também verificou que *B. subtilis* 290 aumentou expressivamente a promoção do crescimento de plantas, bem como a concentração de nitrogênio na parte aérea e raiz. Bactérias promotoras de crescimento de plantas, apresentam a capacidade de promover a fixação biológica do nitrogênio, na qual pôde ser representada por Moreira et al (2013) destacando que estas bactérias – *B. subtilis* foram capazes de incrementar entre 20-30% nas concentrações de nitrogênio em plantas gramíneas, dentre estas, o milho.

Perante os resultados, o isolado 290 foi o único capaz de consumir o ácido glicil-L-glutâmico (Figura 3), que obteve correlação positiva com incremento de massa seca de parte aérea com $p > 0,84$ (Figura 5). Observando os resultados de componentes principais, esta correlação está fortemente evidenciada, sugerindo que este isolado possui efeito sobre o glutamato, e o incremento de massa seca de parte aérea e raiz sendo estes também fortemente relacionados pela análise.

Um aminoácido importante para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo das plantas, é o ácido glutâmico ou glutamato. Sua função, está diretamente ligada ao mecanismo de defesa da planta, devido sua participação na produção de glutathione que atua contra o estresse em plantas, agindo no sistema de defesa enzimático e não enzimático através da neutralização do comportamento de espécies reativas ao oxigênio, por meio de sua capacidade de doar elétrons. Além do mecanismo de defesa, o ácido glutâmico é um

aminoácido chave no funcionamento dos meristemas, na frutificação, no crescimento, na síntese de proteínas e açúcares nas plantas (GILL; TUTEJA, 2010).

O glutamato é sintetizado através da absorção do nitrogênio pela planta, que embora seja um aminoácido básico, possui um importante papel através de sua transformação em outros aminoácidos essenciais para o metabolismo da planta, originando a arginina, asparagina, prolina, aspartato e glutamina, através da atividade das aminotransferases (BUCHANAN et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013). O N absorvido pelas plantas (disponível em várias formas NH_4^+ , NO_3^-), pode ser alterado em função do seu ciclo de desenvolvimento (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000; WILLIAMS; MILLER, 2001). O NO_3^- pode ser assimilado na parte aérea, ou nas raízes, contudo este aminoácido precisa ser reduzido a NH_4^+ (LI et al., 2013). Uma vez reduzido, o NH_4^+ é assimilado pelas enzimas glutamina sintetase (GS), incorporando o NH_4^+ ao glutamato, obtendo assim a glutamina através da reação que requer ATP, que em seguida, o glutamato sintase ou glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) fornece um N amidico da glutamina ao 2-oxoglutarato para obter duas moléculas de glutamato (LEA; MIFLIN, 2011). Uma rota alternativa para a formação do glutamato, pode ainda ocorrer, onde a enzima glutamato desidrogenase (GDH) efetua a catalise reversível da aminação 2-oxoglutarato (TERCE-LAFORGUE et al., 2013).

Esses dados sugere uma simbiose direta com a planta, pois este isolado – 290 - possivelmente atuou como o maior fixador de nitrogênio, como mostrado por LOBO (2018), sendo este um elemento essencial na precursão do glutamato para a planta. Acreditamos que a planta utilizou o N advindo da fixação biológica através deste isolado, seguindo sua via metabólica na síntese de glutamato, possivelmente fornecendo ao microrganismo esta fonte de carbono, em que ambos são beneficiados, promovendo maior crescimento e desenvolvimento da planta, e maior estabilidade do isolado.

O objetivo do presente estudo foi tentar entender por que isolados de *B. subtilis* pertencentes a mesma e portadores de habilidades de promoção de crescimento de plantas espécie atuam em diferentes parâmetros relacionados à atividade microbiana do solo e à promoção de crescimento vegetal. As análises genéticas e de consumo de substrato (carbono) mostraram diferenças e similaridades entre os isolados, permitindo a separação dos isolados em

diferentes grupos. Infelizmente as análises realizadas não permitiram um melhor entendimento da atuação dos isolados na promoção de crescimento de plantas, mas pode-se notar que o isolado que possui a maior habilidade para a promoção de crescimento foi o único isolado que consumiu o ácido glicil-L-glutâmico. Esses resultados não são conclusivos, entretanto, abre uma via para novas investigações na tentativa de se elucidar quais são as condições e ou as características necessárias nos isolados para que a promoção de crescimento de plantas seja mais efetiva.

5. Conclusão

As análises realizadas não permitiram um melhor entendimento da ação dos isolados na promoção do crescimento das plantas, mas pode-se observar que o isolado com maior capacidade de promover o crescimento das plantas foi o isolado 290 - único isolado que consumiu glicil-L-glutâmico.

Esses resultados abrem caminho para novas investigações na tentativa de esclarecer quais são as condições e/ou características exigidas nos isolados para que a promoção do crescimento vegetal seja mais eficaz.

6. Referência Bibliográfica

ABDI, H., & WILLIAMS, L. J. (2010). Principal component analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Computational Statistics**, 2(4), 433–459.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

ALMAGRO, M.; LÓPEZ, J.; QUEREJETA, J.I.; MARTÍNEZ-MENA, M. Temperature dependence of soil CO₂ efflux is strongly modulated by seasonal patterns of moisture availability in a Mediterranean ecosystem. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.41, n.3 p.594-605, 2009.

ALMARAZ, J.J.; ZHOU, X.; MABOOD, F.; MADRAMOOTOO, C.; ROCHETTED, P.; MA, B. L.; SMITH, D.L. Greenhouse gas fluxes associated with soybean production under two tillage systems in Southwestern Quebec. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v.104, n.1, p.134-139, 2009.

BARBOSA, M. A. **Atributos microbiológicos do solo em sistemas de manejo de longa duração**. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Maryland: American society of Plant physiologists, 2000.1367p.

CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v. 98, p. 371-376, 1964.

COSTA, F. S.; BAYER, C.; ZANATTA, J. Á.; MIELNICZUK, J. Estoque de carbono orgânico no solo e emissões de dióxido de carbono influenciadas por sistemas de manejo no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 323–332, 2008.

CHAVEZ, L.F.; AMADO, T.J.C.; BAYER, C.; LA SCALA, N.; ESCOBAR, L.F.; FIORIN, J.E.; CAMPOS, B.C. Carbon dioxide efflux in a Rhodic Hapludox as affected by tillage systems in southern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Viçosa, MG, v.33, n.2, p.325-334, 2009.

DIAZ, P.A.E. **Bacillus spp. Como promotores de crescimento na cultura do algodão**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2018.

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 6, p. 991-996, 1999.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 8, p. 2351-2359, 1991.

GILL, S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Dorchester, v.48, p.909-930, 2010.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v.8, p. 195-202, 1998.

GU, Y.; WAG, P.; KONG, C. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soils influenced by allelopathic rice variety. **European Journal of Soil Biology**, Issy les Moulineaux, 45, n. 5–6, p. 436–441, 2009.

HACKETT, C.A.; GRIFFITHS, B.S. Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 63–69, 1997.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 408-416, 1998.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. (Eds.) **Soil biochemistry**. v. 5. New York: Marcel Decker, 1981. p. 415–471.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ R, ZABLOTOWICZ, R.M.(1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology** 7: 39–44.

LAL, R. Challenges and opportunities in soil organic matter research. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 158–169, 2009.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Annual Plant Reviews**, Washington, v.42, p. 1-40, 2011.

LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWAR, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 118, p. 205–397, 2013.

LINN, D.M.; DORAN, J.W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and non-tilled soils. **Soil Science Society of America Journal**, Amsterdam, v.48, n.6, p. 1267-1272, 1984.

LOBO, L.L.B. **Potencial de bactérias endofíticas na promoção de crescimento em plantas de milho**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2018.

MARMUR, J. A. Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, London, v.3, p.208-218, 1961.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZIE.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D.A.; BOULNOIS G.J.; CLAVERYS J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479–3483, 1992.

MILANI, R., SANTOS, R. M., BENTES, L. L., KANDASAMY, S., LAZAROVITS, G., RIGOBELLO, E. C. *Bacillus subtilis* isolates with different abilities to promote plant growth in maize, cotton and soybean crops isolation and characterization of bacterial strains. **Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.** v.21, p.827-836, 2019.

MOREIRA, F.M.S.; CARES, J.E.; ZANETTI R; STUMER, S.L. (2013) Bactérias associativas fixadoras de nitrogênio atmosférico, in: **O Ecossistema Solo: Componentes, Relações Ecológicas e Efeitos Na Produção Vegetal**. Lavras.

MUKAKA, M. M. (2012). A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, 24(3), 69–71.

PANOSSO, A.R.; RIBEIRO, C.E.R.; ZANINI, J.R.; PAVANI, L.C.; PEREIRA, G.T.; LA SCALA, N. Variabilidade espacial da emissão de CO₂, da temperatura e umidade de um latossolo desprovido de vegetação sob diferentes lâminas de molhamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.4, p.1017-1034, 2009.

RAJJ, B.V.; CANTARELLA, H. (1997) Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo, in: **Boletim Técnico 100**. Campinas, p. 56–59.

REZENDE, L. A.; ASSIS, L. C.; NAHAS, E. Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization in two soils amended with distillery yeast. **Bioresource Technology**, v. 94, 159-167, 2004.

SALA, M.M.; ESTRADA, M.; GASOL, J.M. Seasonal changes in the functional diversity of bacterioplankton in contrasting coastal environments of the NW Mediterranean, **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorff, n. 44, p. 1-9, 2006.

SALAZAR, S.; SÁNCHEZ, L. E.; ALVAREZ, J.; VALVERDE, A.; GALINDO, P.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; SANTA-REGINA, I. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 37, n. 8, p. 1123–1131, 2011.

SILVA-OLAYA, A.M.; CERRI, C.E.P.; LA SCALA JR., N.; DIAS, C.T.S.; CERRI, C.C. Carbon dioxide emissions under different soil tillage systems in mechanically harvested sugarcane. **Environmental Research Letters**, Bristol, v.8, n.1, p.1-8, 2013.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p. 2013.

TELES, A.S.C.; CHÁVEZ, D.W.H.; OLIVEIRA, R.A.; BON, E.P.S.; TERZI, S.C.; SOUZA, E.F.; GOTTSCHALK, L.M.F.; TONON, R.V. Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds.(2018) **Food Research International**.

TERCÉ-LAFORGUE, T. et al. Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase: II. Physiological Characterization of Plants Overexpressing the Two Enzyme Subunits Individually or Simultaneously. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 54, n. 10, 2013.

USSIRI, D.A.N.; LAL, R. Long – term tillage effects on soil carbon storage and carbon dioxide emissions in continuous corn cropping system from an alfisol in Ohio. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 104, n.1, p.39-47, 2009.

^aWANG, H.; WEN, K.; ZHAO, X.; WANG, X.; LI, A.; HONG, H. (2009) The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. **Crop Protection**. 28: 634–639.

^bWANG, W.; FENG, J.; OIKAWA, T. Contribution of root and microbial respiration to soil CO₂ efflux and their environmental controls in a humid temperate grassland of Japan. **Pedosphere**, Beijing, v.19, n.1, p.31-39, 2009.

WEBER, K.P.; GROVE, J.A.; GEHDER, M.; ANDERSON, W.A.; LEGGE, R.L. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 461– 469, 2007.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A., LANE, D.J.16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991

WHITE, J.F.; TORRES, M.S.; SULLIVAN, R.F.; JABBOUR, R.E.; CHEN, Q.; TADYCH, M.; IRIZARRY, I.; BERGEN, M.S.; HAVKIN-FRENKEL, D., BELANGER, F.C. (2014) Occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids. **Microscopy Research and Technique** 77: 874–885.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.

CAPÍTULO 3 – Caracterização *in vitro* de isolados de *Bacillus subtilis*

RESUMO - A utilização de microrganismos na agricultura como promotores de crescimento e agentes de controle biológico, além de seu emprego em práticas biotecnológicas, tem sido cada vez mais explorada ao longo dos anos. Algumas bactérias, incluindo *Bacillus subtilis*, apresentam habilidades em promover crescimento de plantas, produzir enzimas, sideróforos, desenvolver ação antagonista contra fungos fitopatogênicos, e apresentam capacidade de tolerância a metais pesados. Contudo, diferentes cepas podem expressar diferentes aspectos quanto esta capacidade. O presente estudo teve como objetivo caracterizar *in vitro* oito isolados de *B. subtilis*, demonstrando sua capacidade de atividade enzimática, tolerância a metais pesados, antagonismo em fitopatógenos e produção de sideróforos. Os ensaios realizados mostraram que todos os isolados tinham capacidade de síntese enzimática para fosfatase, amilase e celulase. Nos testes de tolerância a metais pesados, o elemento Cd(II), 0,5 mmol L⁻¹ foi capaz de impedir o desenvolvimento das cepas 248, 263 e 320; para Cu(II) o isolado 263 obteve maior tolerância; para Zn(II), o isolado 320 foi inibido a 2,0 mmol L⁻¹. Com relação ao Cr(III) isolados 290 e 291 apresentaram maior tolerância a esta espécie química, já para o Cr(VI) os isolados apresentaram mesmo padrão de tolerância para Ni(II), os isolados apresentaram mesmo comportamento de tolerância. A inibição do crescimento *in vitro* ocorreu com todos os isolados, porém, em intensidades diferentes, exceto para o isolado 291. A produção de sideróforos foi identificada apenas para os isolados – 287, 320, 309, 274, 263 e 248. Esses resultados abrem caminho para novas investigações na tentativa de esclarecer quais são as condições e / ou características exigidas pelos isolados para um desempenho mais eficaz, observando rotas metabólicas, bem como mecanismos genéticos.

Palavras – chaves: Biorremediação. *Bacillus subtilis*. Biotecnologia. Sideróforos. Antagonismo.

***In vitro* characterization of *Bacillus subtilis* isolates**

ABSTRACT - The use of microorganisms in agriculture as growth promoters and biological control agents, in addition to their use in biotechnological practices, has been increasingly explored over the years. Some bacteria, including *Bacillus subtilis*, have abilities to promote plant growth, produce enzymes, siderophores, develop antagonistic action against phytopathogenic fungi, and have the ability to tolerate heavy metals. However, different strains can express different aspects regarding this ability. The present study aimed to characterize eight *in vitro* isolates of *B. subtilis*, demonstrating their capacity for enzymatic activity, tolerance to heavy metals, antagonism in phytopathogens and production of siderophores. The tests carried out showed that all isolates presented enzymatic synthesis to phosphatase, amylase and cellulase. In the capacity of tolerance to heavy metals, for the element Cd(II), 0.5 mmol L⁻¹ was sufficient to prevent the development of strains 248, 263 and 320; for Cu(II) isolate 263 obtained greater tolerance; for Zn(II), isolate 320 was inhibited at 2.0 mmol L⁻¹. Regarding Cr(III) isolates 290 and 291 showed greater tolerance to this chemical species, whereas for Cr(VI) the isolates showed the same tolerance pattern for Ni(II), the isolates showed the same tolerance behavior. *In vitro* growth inhibition occurred to all isolates, however, at different intensities, except for isolate 291. The production of siderophores was identified only for the isolates - 287, 320, 309, 274, 263 and 248. These results open the way for new investigations in an attempt to clarify what are the conditions and / or characteristics required by the isolates for a more effective performance, observing metabolic routes, as well as genetic mechanisms.

Keywords: Bioremediation. *Bacillus subtilis*. Biotechnology. Siderophores. Antagonism.

1. Introdução

Os microrganismos promotores de crescimento de plantas têm sido utilizados há muito tempo de forma consciente ou intuitiva (Romeiro, 2007).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas, através de seus efeitos bioestimulantes e biofertilizantes, promovem o crescimento vegetal, conferindo-lhe a habilidade de resistir ao estresse, além de aumentar sua resistência a doenças, através da produção de antibióticos e sideróforos que inibem o crescimento de vários patógenos (STURZ e NOWAK, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001).

Além de promover o crescimento vegetal, e promover inúmeros benefícios para as plantas, os microrganismos dispõem de uma diversidade genética e metabólica que têm sido estudadas desde os primórdios da humanidade, por apresentarem grande potencial e capacidade em gerar produtos de interesse biotecnológico. A produção de enzimas, biofertilizantes, antibióticos, combustível, bebidas, queijos, iogurtes, dentre outros, são exemplos da utilização biotecnológica desses microrganismos (BORÉM, 2005).

Um outro aspecto em que os microrganismos têm sido utilizados é no processo de biorremediação de áreas contaminadas. A utilização de grandes quantidades de insumos agrícolas pode promover o acúmulo de metais potencialmente tóxicos nos solos agrícolas. O acúmulo desses metais no solo promovem mudanças nas diversas comunidades microbianas interferindo nas relações solo- planta – ambiente e também selecionando microrganismos tolerantes a viverem nessas condições (MORTVEDT, 1996; EMBRAPA, 2006; RIBERIRO, 2013; CAMPOS et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar e identificar a capacidade de atividade enzimática, tolerância a diversas concentrações de metais, antagonismo contra fungos fitopatogênicos selecionados aleatoriamente, e produção de sideróforos demonstrados por oito cepas de *B. subtilis*.

2. Material e Métodos

As cepas de *B. subtilis* (Tabela 1), utilizadas neste trabalho, foram obtidas por MILANI et al., (2019) e pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Solo, departamento de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP.

Tabela 1 - Identificação dos Isolados

Código do Isolado	Identificação
248	<i>Bacillus subtilis</i>
263	<i>Bacillus subtilis</i>
274	<i>Bacillus subtilis</i>
287	<i>Bacillus subtilis</i>
290	<i>Bacillus subtilis</i>
291	<i>Bacillus subtilis</i>
309	<i>Bacillus subtilis</i>
320	<i>Bacillus subtilis</i>

2.1 Capacidade de Síntese Enzimática

A capacidade de degradação enzimática foi avaliada com objetivo de identificar o potencial biotecnológico que os isolados de *B. subtilis* apresentam para a produção de fosfatase, amilase e celulase.

2.1.1 Fosfatase

Com os isolados *B. subtilis* foi realizado um teste bioquímico para identificar a produção de fosfatase, utilizando o meio de cultura NBRIP sólido (NAUTIYAL et al., 1999): 20 g de glicose; 5g de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$; 5g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5% de ágar e pH 7,0 para volume total igual a 1L.

Os isolados foram previamente cultivados em caldo nutriente (extrato de carne: 1,0 g/L, extrato de levedura: 2,0 g/L, peptona: 5,0 g/L, NaCl: 5,0 g/L, pH: $6,8 \pm 0,2$) durante dois dias, sob agitação de 100 rpm, 28°C para formar o pré-inoculo, após este período, 25 mL da cultura foi centrifugada a 15°C por 20 minutos a 12000 rpm. As células precipitadas foram suspensas em caldo nutriente dando origem a uma suspensão celular com absorvância a $\text{OD}_{(560)}$ de 0,1. Esta suspensão foi então cultivada por 3 horas sob a mesma condição anterior, para formar uma suspensão celular com $\text{OD}_{(560)}$ igual a 0,2. Em seguida, 150 μL dessa suspensão bacteriana foram distribuídas no centro da placa com meio de cultura NBRIP. As culturas foram submetidas à incubação por 72 horas em estufa B.O.D. A detecção da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio pelas bactérias, foi observada pelo aparecimento de halo claro ao redor da colônia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.1.2 Amilase

A síntese de amilase foi avaliada utilizando-se meio amido-ágar: K_2HPO_4 (0,3 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L); NaCl (0,5 g/L); NaNO_3 (1,0 g/L); Amido (10 g/L); pH 6,9.

Os isolados foram previamente cultivados em caldo nutriente (extrato de carne: 1,0 g/L, extrato de levedura: 2,0 g/L, peptona: 5,0 g/L, NaCl: 5,0 g/L, pH: $6,8 \pm 0,2$) durante dois dias, sob agitação de 100 rpm, 28°C para formar o pré-inoculo, após este período, 25 mL da cultura foi centrifugada a 15°C por 20 minutos a 12000 rpm. As células precipitadas foram suspensas em caldo nutriente dando origem a uma suspensão celular com absorvância a $\text{OD}_{(560)}$ de

0,1. Esta suspensão foi então cultivada por 3 horas sob a mesma condição anterior, para formar uma suspensão celular com OD (₅₆₀) igual a 0,2. Em seguida, 150 µL dessa suspensão bacteriana foram distribuídas no centro da placa com meio de cultura amido – ágar.

As culturas foram incubadas em B.O.D. à 30°C por cinco dias. Após o cultivo, as culturas foram coradas com Lugol (1% I₂: 2% KI – iodeto de potássio) por 15 minutos, em seguida, o mesmo foi descartado, e lavado com solução salina - NaCl 0,85%(m/v) por 10 minutos, seguindo do descarte. O aparecimento de halo claro em volta da cultura demonstrou a presença de amilase (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.1.3 Celulase

A avaliação da produção de celulase foi realizada utilizando meio BHB: K₂HPO₄ (0,3 g/L); MgSO₄.7H₂O (1,0 g/L); CaCl₂.2H₂O (0,02 g/L); (NH₄)₂HPO₄ (1,0 g/L); KNO₃ (1,0 g/L); FeCl₃ (0,05 g/L), suplementado com 0,5%(m/v) de carboximetilcelulose (CMC).

Os isolados foram previamente cultivados em caldo nutriente (extrato de carne: 1,0 g/L, extrato de levedura: 2,0 g/L, peptona: 5,0 g/L, NaCl: 5,0 g/L, pH: 6,8 ± 0,2) durante dois dias, sob agitação de 100 rpm, 28°C para formar o pré-inoculo, após este período, 25 mL da cultura foi centrifugada a 15°C por 20 minutos a 12000 rpm. As células precipitadas foram suspensas em caldo nutriente dando origem a uma suspensão celular com absorbância a OD(₅₆₀) de 0,1. Esta suspensão foi então cultivada por 3 horas sob a mesma condição anterior, para formar uma suspensão celular com OD (₅₆₀) igual a 0,2. Em seguida, 150 µL dessa suspensão bacteriana foram distribuídas no centro da placa com meio de cultura BHB, suplementado com carboximetilcelulase.

As culturas foram submetidas a B.O.D. a 30°C por cinco dias. Após o cultivo a detecção da enzima celulase foi avaliada pelo aparecimento de halo claro e amarelado ao redor do cultivo após coloração das placas com vermelho congo a 0,1%(m/v) em água (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2 Tolerância dos Isolados de *Bacillus subtilis* a Metais Pesados

A capacidade de tolerância aos metais pesados, foram verificadas perante o desenvolvimento do crescimento celular em meio sólido, contendo diferentes concentrações de Cd(II), Cr(III), Ni (II), Zn(II), Cu(II) e Cr(VI). Para isso, os isolados foram previamente cultivados em caldo nutriente (3 g de extrato de carne; 5 g de peptona de carne; 1 g de NaCl; para 1L; pH 7,0), e incubados em estufa para B.O.D. a 28°C por 24h. Após esse período os isolados foram repicados para placas de petri contendo meio Nutriente Ágar (5 g de Peptona; 3 g de extrato de levedura; 1 g de NaCl; 9 g de ágar; para 1L, pH 7,0) (RODRIGUES NETO et al., 1986) com íons de cádmio, crômio, níquel, zinco, cobre, nas seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L⁻¹, obtidas a partir de soluções preparadas pela dissolução de CdCl₂.H₂O, CrCl₃.6H₂O, NiCl₂.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O em água deionizada e, um composto iônico da solução de dicromato de potássio - K₂Cr₂O₇ fornecendo, respectivamente 0,2; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mmol/L de Cr(VI). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.1 Análise Estatística da Capacidade de Tolerância a Metais Pesados

Os resultados das variáveis da capacidade de tolerância aos metais pesados, foram submetidos ao *survival analyses*, de resistência ou sobrevivência, e ajustados com a distribuição de Weibull para descrever o efeito da sobrevivência em diferentes concentrações de metais pesado, através da equação 1.

$$F_{(t)} = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\beta}\right)^{\alpha}} \quad (1)$$

Onde β é o parâmetro de escala e α é o parâmetro de forma.

Foram calculados os valores de IC₅₀, que representam a concentração de cada metal necessário para inibir 50% da presença dos microrganismos.

Também foi realizada a análise de correspondência com os valores de presença e ausência dos microrganismos nas diferentes concentrações para todos os metais pesado testados. O conjunto de dados foi disposto em uma matriz com nove linhas correspondendo às amostras e trinta e nove colunas correspondentes aos metais e suas diferentes concentrações.

Através destes dados, eles foram analisados com o uso do software R para computação estatística, versão 3.2.4 (CORE_TEAM, 2017).

2.3 Antagonismo *in vitro* Contra Fungos Fitopatogênicos

Os isolados de *B. subtilis*, foram avaliados aleatoriamente quanto ao potencial de controle da *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em variedades da citricultura, *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da podridão floral de citrus, *Phyllosticta citricarpa* agente causal da mancha preta em citrus, e *Geotrichum citri-aurantii* agente causal da podridão azeda. As culturas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Kátia Cristina Kupper, e pertencem a Coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros “Sylvio Moreira” /IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil.

Um disco de 7 mm de diâmetro com micélio do fitopatógeno, foi transferido para o centro das placas de Petri contendo meio B de King e em meio BDA (estéreis) em duplicata. As culturas foram submetidas a 30°C por 48 horas. As bactérias foram mantidas em crescimento por 24 h em meio B de King a 30°C e, em seguida, foram transferidas em 4 pontos equidistantes entre si e do centro das placas. Posteriormente, as placas contendo cada um dos fitopatógenos foram colocadas em incubadora, nas mesmas condições, por 24 e 48 h. O antagonismo pôde ser observado pela formação de halos de inibição do fungo pela bactéria. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4 Produção de Sideróforos

A produção de sideróforos foi verificada para os 8 isolados descritos na Tabela 1. A análise de cromoazurol S (CAS) ágar foi realizada conforme a seguir (SCHWIN; NEILANDS, 1987): 60,5 mg de CAS foram dissolvidos em 50 ml de água destilada e misturada com 10 ml de ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM em HCl 10 mM). Sob agitação, esta solução foi vagarosamente adicionada a 72,9 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylammonium) dissolvido em 40 ml de água. Estas soluções foram autoclavadas separadamente. Separadamente também foi autoclavado um meio de cultura deficiente em ferro (MM9) de acordo com PAYNE (1994), modificado por SILVA-STENICO et al. (2005). O meio era composto de (1 L): KH_2PO_4 0,3 g L^{-1} , NaCl 0,5 g L^{-1} , NH_4Cl 1,0 g L^{-1} . Em 100 ml desta solução foram adicionados 1,2 g de Tris e 18 g de agar, pH 5.6, completado para 1 L e autoclavada. Esta solução foi suplementada com 30 ml de casaminoácido desferrado 10% (m/v) (o ferro contaminante foi removido com 3% de 8-hidroxiquinolina em clorofórmio), manitol 2 g/L, 1 ml de MgCl_2 1 M e 1 ml de CaCl_2 100 mM. Estas soluções foram preparadas e filtradas em filtro Millipore 0,22 μ . A solução de CAS foi adicionada ao meio MM9 e as placas foram inoculadas com isolados de *Bacillus subtilis* de culturas estoques e incubadas a 28°C. A mudança de cor de azul para amarelo do meio CAS foi anotada. Toda a vidraria utilizada foi lavada com HCl 6 N para retirada de ferro contaminante. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3. Resultados

3.1 Capacidade de Síntese Enzimática

Os resultados para a detecção de diferentes enzimas sintetizadas pelos isolados *B. subtilis*, podem ser observados na Figura 1. Nas condições determinadas, todos os isolados foram capazes de produzir fosfatase (Figura 1-a), amilase (Figura 1-b), e celulase (Figura 1-c).

O teste para identificação da solubilização de fosfato inorgânico (Figura 1-a), foi positivo para todos os isolados. Os *Bacillus* foram capazes de solubilizar o fosfato apresentando halo ao redor de sua colônia.

Para o teste da produção de amilase (Figura 1-b) nota-se que o meio BHB enriquecido com o amido é ligeiramente opaco, sendo possível visualizar o halo sem a coloração, pois há a formação de uma área translúcida próxima a cultura, porém para a melhor definição e visualização do halo realizou-se a coloração com Lugol. Todos os isolados foram capazes de produzir amilase.

No ensaio para a produção de celulase, todos os isolados foram capazes de hidrolisar o substrato CMC, apresentando atividade celulolítica através da presença de halos ao redor da colônia (Figura 1-c).

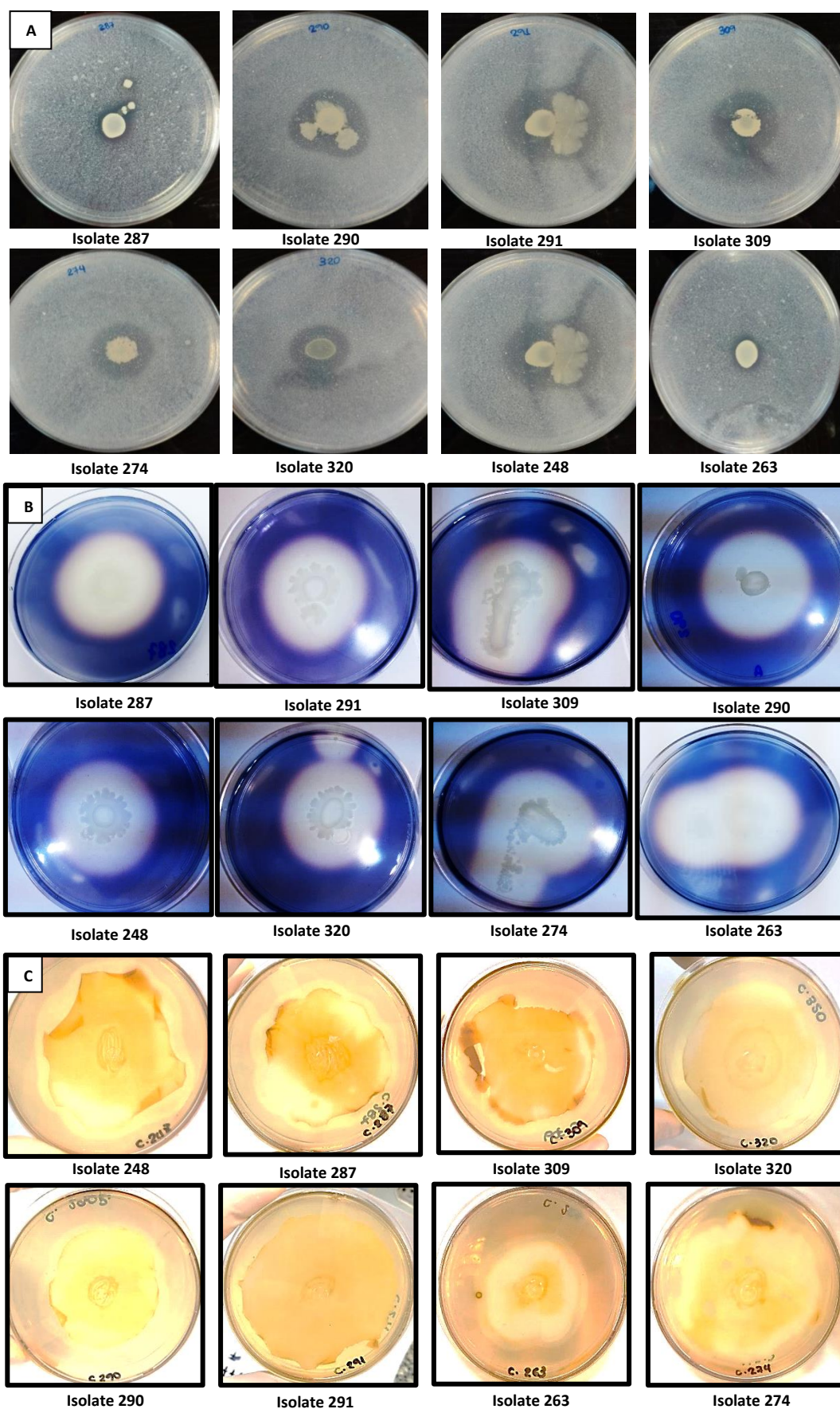


Figura 1 - Halo indicativo da produção de enzimas A – produção de Fosfatase; B – produção de Amilase; C – produção de Celulase por isolados de *B. subtilis*.

3.2 Tolerância dos isolados de *Bacillus subtilis* a metais pesados

A existência de microrganismos em locais contaminados ou com acúmulo de metais pesados está relacionado ao mecanismo de tolerância que apresentam, o que demonstram adaptação a tais condições locais. Ao apresentarem tolerâncias, esses microrganismos multiplicam-se, e se tornam a maioria, pois utilizam os elementos poluentes como fonte de nutrientes para sua própria sobrevivência (KUIPER et al., 2004). Deste modo, os 8 isolados identificados como *Bacillus subtilis* (MILANI, 2019) foram avaliados quanto a resistência ao Cd(II), Cr(III), Ni (II), Zn(II), Cu(II) e Cr(VI) (Figura 2).

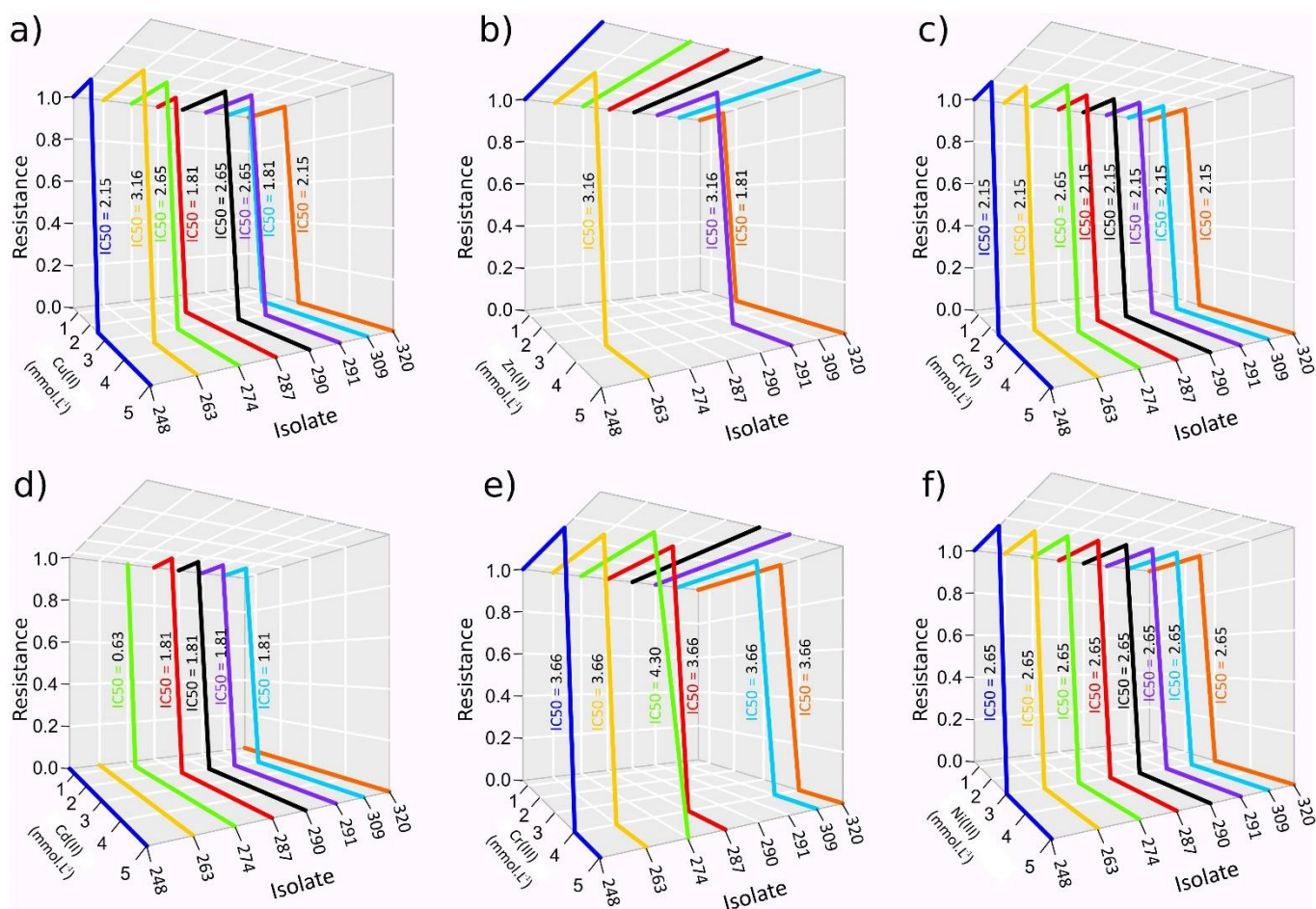


Figura 2 - Isolados *Bacillus subtilis* tolerantes às diferentes concentrações de metais pesados (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0 mmol L⁻¹) de Cd(II), Cr(III), Ni (II), Zn(II), Cu(II) e (0,2; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mmol L⁻¹) de Cr(VI). Valores de IC₅₀ indicam a concentração mínima inibitória de 50%.

Na Figura 2, é possível identificar que os isolados apresentaram diferentes tipos de tolerância frente aos seis metais estudados. Baixa concentração de cádmio ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) (Fig 2-d) foi suficiente para impedir o desenvolvimento de 3 isolados – 37,5% das cepas analisadas (248, 263, e 320). Por outro lado, para as concentrações de zinco e crômio, os isolados apresentaram maiores tolerância com valores de IC₅₀ entre 1,81 – 4,30 (Fig 2 – b/e). Quanto menor os valores de IC₅₀, menor tolerância ao metal o microrganismo apresenta. Nas concentrações superiores a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para os íons de níquel, dicromato de potássio, e cobre, ocorreu uma diminuição significativa do número de isolados que conseguem se desenvolver *in vitro*.

Observou-se que para o íon Cu(II) (Fig 2-a), o isolado 263 apresentou maior tolerância à concentração de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em contrapartida, os isolados 297 e 309, foram sensíveis a concentrações acima de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Para o Zn(II) (Fig 2-b), os isolados 248, 274, 287, 290 e 309 não foram afetados por nenhuma concentração utilizada; apenas o isolado 320 apresentou a maior sensibilidade a concentração de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, se compararmos aos demais. Quando se analisa a tolerância ao Cr(VI) (Fig 2-c) observa-se que $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi a concentração que mais prejudicou no desenvolvimento dos isolados. Nota-se que os isolados tolerantes ao Cd(II) (Fig 2-d), não ultrapassaram concentrações acima de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo os isolados 248 e 263 afetados a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, seguidos do isolado 274 que apresentou sensibilidade a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para o Cr(III) (Fig 2-e), os isolados 290 e 291 não foram afetados por nenhuma das concentrações utilizadas, visto que, os demais isolados (exceto o 274) apresentaram sensibilidade a concentrações acima de $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Nota-se ainda, que para o Ni(II) (Fig 2-f), todos os isolados apresentaram a mesma tolerância, tendo sido afetados com concentrações acima de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Através do cálculo matemático utilizando o modelo Weibull, foi possível obter os valores para parâmetros de escala (beta) e formato (alfa), além de obter os valores de significância estatística (valores de p), e os valores para IC₅₀, que permitem identificar as cepas que tiveram maior sensibilidade aos metais utilizados (Tabela 2). Os valores dos parâmetros em negrito indicam que estes foram estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0,05$). Na análise dos íons metálicos Zn(II), e Cr(III), colunas que contém o sinal “+”, significa que todos os isolados foram capazes de crescer em todas as concentrações testadas ($0,5$

– 5,0 mmol L⁻¹). Para o íon Cd(II), as colunas que contém o sinal “-”, significa que os isolados foram sensíveis a todas as concentrações.

Tabela 2 – Valores dos parâmetros do modelo Weibull para a tolerância dos isolados nas diferentes concentrações de metais.

<i>Metais</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>ISOLADOS</i>							
		274	320	263	248	291	290	309	287
<i>Cu(II)</i>	alfa	-28,88	-23,60	-34,16	-23,60	-28,88	-28,88	-35,35	-35,35
	beta	2,62	2,12	3,12	2,12	2,62	2,62	1,79	1,79
	IC50	2,65	2,15	3,16	2,15	2,65	2,65	1,81	1,81
<i>Zn(II)</i>	alfa		-35,35	-34,16		-34,16	+	+	+
	beta		1,79	3,12		3,12	+	+	+
	IC50		1,81	3,16		3,16			
<i>Cr(VI)</i>	alfa	-28,88	-23,60	-23,60	-23,60	-23,60	-23,60	-23,60	-23,60
	beta	2,62	2,12	2,12	2,12	2,12	2,12	2,12	2,12
	IC50	2,65	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15
<i>Cd(II)</i>	alfa	-7,60	-	-	-	-35,35	-35,35	-35,35	-35,35
	beta	0,60	-	-	-	1,79	1,79	1,79	1,79
	IC50	0,63				1,81	1,81	1,81	1,81
<i>Cr(III)</i>	alfa	-23,60	-39,44	-39,44	-39,44	+	+	-39,44	-39,44
	beta	4,24	3,62	3,62	3,62	+	+	3,62	3,62
	IC50	4,30	3,66	3,66	3,66			3,66	3,66
<i>Ni(II)</i>	alfa	-28,88	-28,88	-28,88	-28,88	-28,88	-28,88	-28,88	-28,88
	beta	2,62	2,62	2,62	2,62	2,62	2,62	2,62	2,62
	IC50	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65

Valores dos parâmetros alfa e beta em negrito indicam que foram estatisticamente significativos para o modelo ($p < 0.05$). IC₅₀ foi expresso em mmol/L para cada elemento traço. “+” significa que todos os isolados foram capazes de crescer em todas as concentrações testadas (0,5 – 5,0 mmol L⁻¹). “-” indica que os isolados foram sensíveis a todas as concentrações.

3.2.1 Análise de correspondência da tolerância a metais

A figura 3, corresponde ao biplot formado pela análise de correspondência, onde observa-se que os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2), explicam 93% da variabilidade original, com valores de 70,1% e 22,9% para CP1 e CP2 respectivamente. A projeção em um plano bidimensional, o biplot, procura especificar o comportamento das variáveis e contemplar a sensibilidades entre os isolados, e os metais utilizados. Os isolados que se encontram próximos do sentido das variáveis, indicam menores sensibilidade ao metal, e no sentido contrário, maiores sensibilidade.

A finalidade da utilização desta ferramenta é exibir as informações mais relevantes de uma tabela de dados para facilitar a apresentação dos dados como novas variáveis comuns chamadas de componentes principais (Abdi & Williams, 2010).

Na figura 3, é possível observar coerência com a figura 2, e identificar que os isolados 320, 263 e 248 foram extremamente sensíveis ao Cd(II), sendo localizadas no extremo diametralmente oposto. Comparando com a figura 2-d, podemos observar que basicamente todos os isolados foram sensíveis a este metal, visto que os maiores valores do IC₅₀ correspondem a 1,81. Para o elemento Zn(II), podemos observar que os isolados 263, 320, e 291, também encontram-se na extremidade oposta, demonstrando que foram afetados pelas diferentes concentrações do metal testado, sendo respectivamente seus valores de IC₅₀ para 320 de 1,81 e para os isolados 263 e 291 IC₅₀ de 3,16 (Figura 2-b). Os isolados 290, 287, 309, 274, e 263 apresentaram menores sensibilidades aos elementos Ni(II) (IC₅₀ 2,65), Cr(III) (IC₅₀ 3,66 – 4,30), Cr(VI) (IC₅₀ 2,15 - 2,65) e Cu(II) (IC₅₀ 1,81 – 3,16).

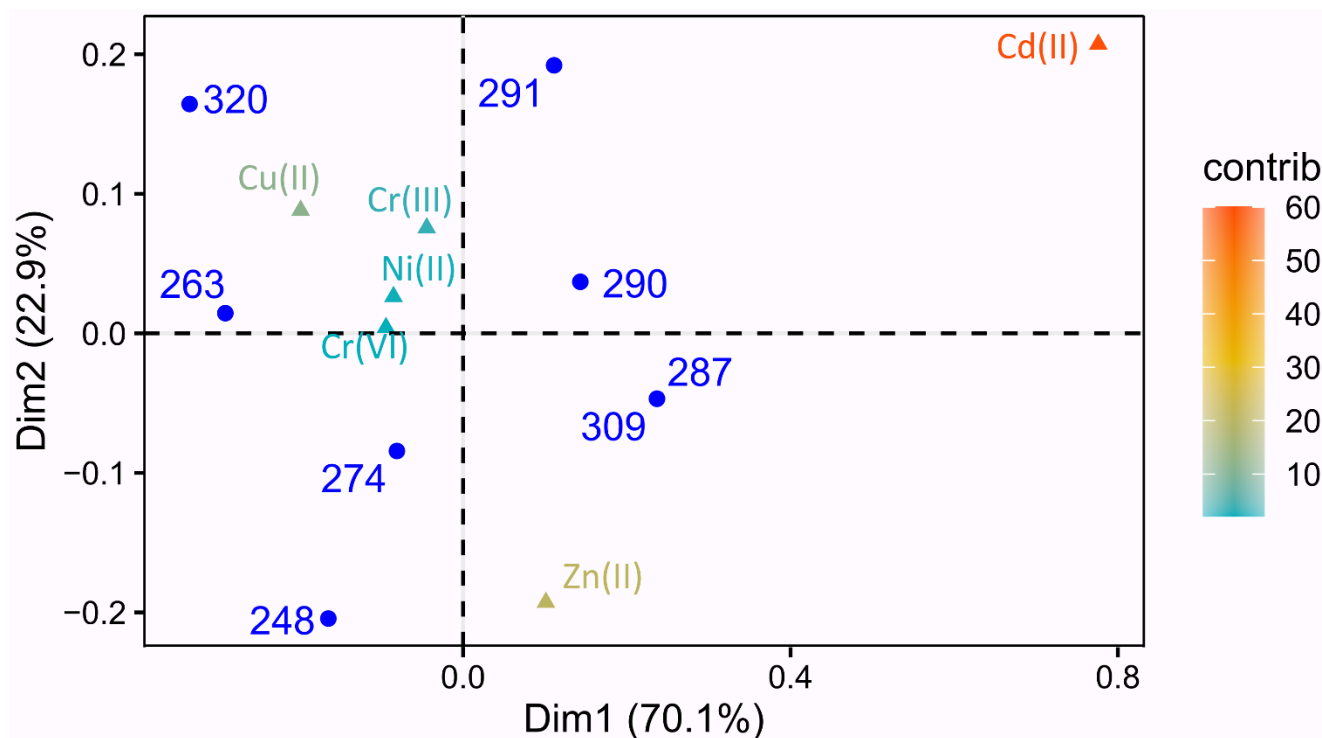


Figura 3 – Análise de correspondência para a tolerância aos metais (Cu(II), Zn(II), Cd(II), Cr(III), Ni(II) e Cr(VI)) das oito cepas de *Bacillus subtilis*.

3.3 Antagonismo *in vitro* contra fungos fitopatogênicos

Os isolados foram avaliados em relação a quatro patógenos (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phyllosticta citricarpa*, e *Geotrichum citri-aurantii*) em dois meios de cultura, BDA, e B de King (Tabela 3).

Tabela 3 - Presença (+) ou ausência (-) de antagonismo *in vitro* contra o fungo *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phyllosticta citricarpa*, e *Geotrichum citri-aurantii* em meio de cultura BDA e B. de King

Fungos								
Isolados	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		<i>Phyllosticta citricarpa</i>		<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	
	Meio de Cultura							
	BDA	B de King	BDA	B de King	BDA	B de King	BDA	B de King
274	+	+	+	+	+	++	+	+
320	+	+	+	+	+	++	+	+
263	+	+	+	+	+	++	+	+
248	+	+	+	++	+	++	+	+
291	+	+	+	++	+	++	+	+
290	+	-	-	+	+	+	+	-
309	+	+	+	+	+	++	+	++
287	+	+	+	++	+	++	+	++

+ → fraco antagonismo, com o fungo evitando crescer sobre a colônia bacteriana

++ → forte antagonismo, presença de halo contendo o fungo

- → ausência de antagonismo, com crescimento fúngico sobre a colônia bacteriana

Sete isolados foram capazes de apresentar antagonismo *in vitro* contra o fungo *Alternaria alternata* para ambos meios de cultura testados (Tabela 3), e apenas o isolado 290 apresentou ausência de antagonismo (no meio cultura, B de King), permitindo que o fungo crescesse sobre sua colônia (Figura 4). Neste teste, o antagonismo exibido por esse isolado mostrou-se fraco. Não houve a presença de halo de inibição, e os isolados bacterianos apenas impossibilitaram o crescimento do fungo por cima de suas colônias, sugerindo uma possível competição por nutrientes.

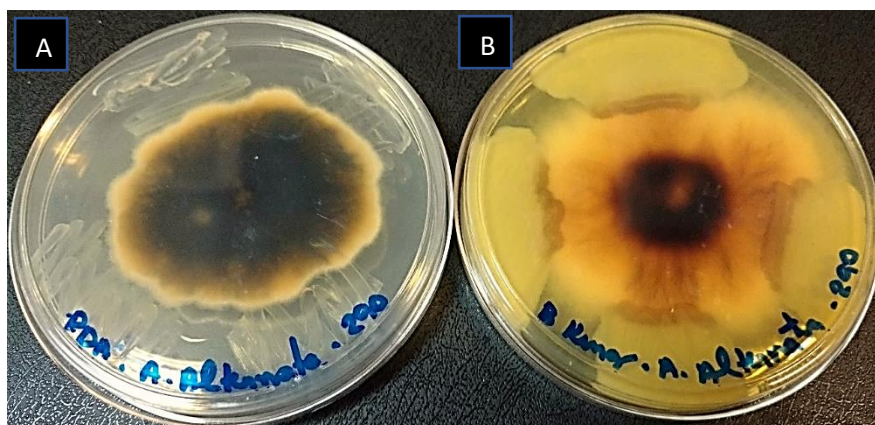


Figura 4 - Antagonismo *in vitro* entre isolado 290 e o fungo *Alternaria alternata*. A - Meio de cultura BDA; B – meio de cultura B de King.

O teste de antagonismo para o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, os isolados 248, 291, e 287 apresentaram formação de halo, sendo eficiente sobre o fungo em meio B de King (Figura 5). Já para o meio BDA, sete isolados exibiram um antagonismo fraco, mostrando apenas o crescimento de ambos os microrganismos, e apenas o isolado 290 em meio BDA apresentou ausência de antagonismo, apresentando crescimento do fungo por cima de sua colônia.

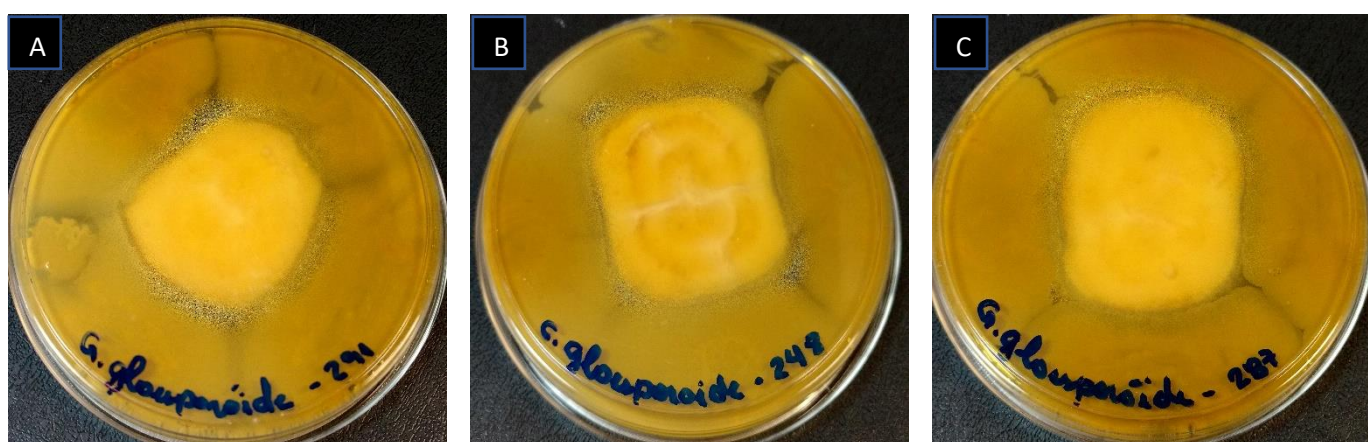


Figura 5 - Antagonismo *in vitro* para o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, me meio de cultura B de King. A – Isolado 291; B – Isolado 248; C – Isolado 287.

O fungo *Phyllosticta citricarpa*, foi inibido por todos os isolados, exceto pelo isolado 290, que apresentou um fraco antagonismo. Os isolados 248, 263, 287, 320, 274, 309 e 291 foram capazes de produzir um halo ao redor da colônia do fungo, contendo-o (Figura 6).

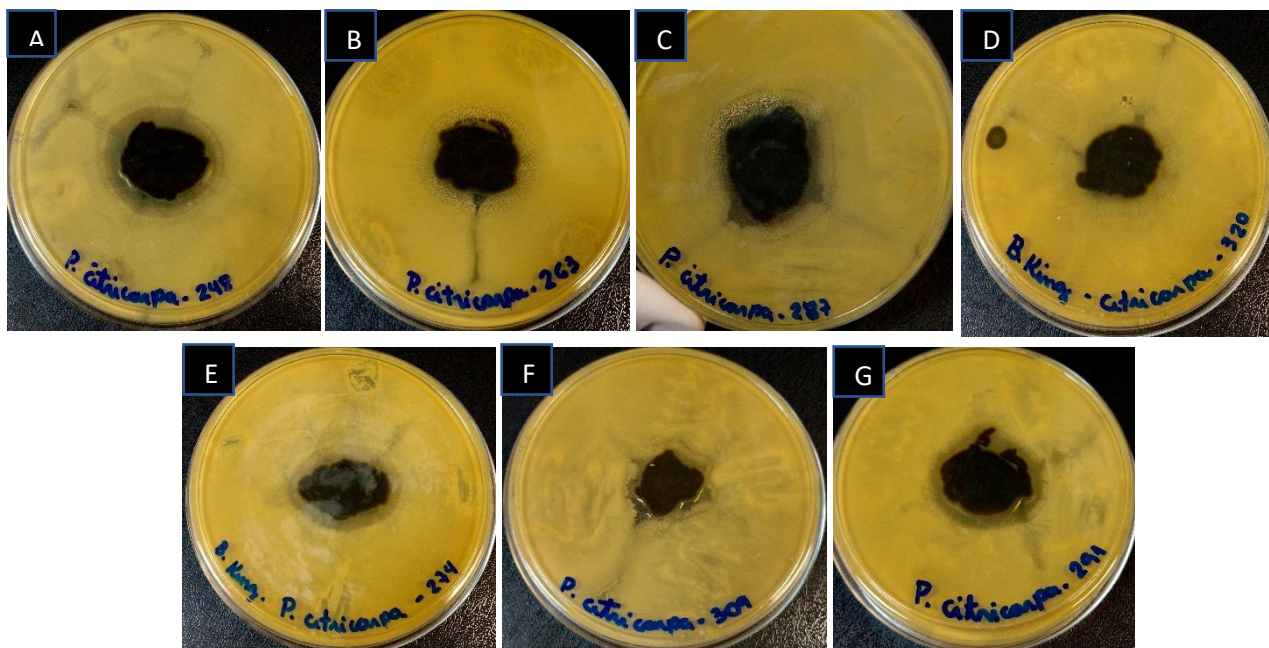


Figura 6 - Antagonismo *in vitro* para o fungo *Phyllosticta citricarpa*, me meio de cultura B de King. A – Isolado 291; B – Isolado 263; C – Isolado 287; D – Isolado 320; E – Isolado 274; F – Isolado 309; G – Isolado 291.

O patógeno *Geotrichum citri-aurantii*, foi inibido apenas por dois isolados – 309 e 287 que foram capazes de exibir halos ao redor da colônia fúngica no meio B de King (Figura 7 – A/B). Os demais isolados 274, 320, 263, 248, e 291 apresentaram antagonismo fraco, sugerindo apenas competição nutricional, sendo que, o isolado 290 não apresentou antagonismo para o *Geotrichum citri-aurantii*, no meio B de King, tendo o fungo cobrindo sua colônia (Figura 7 - C).

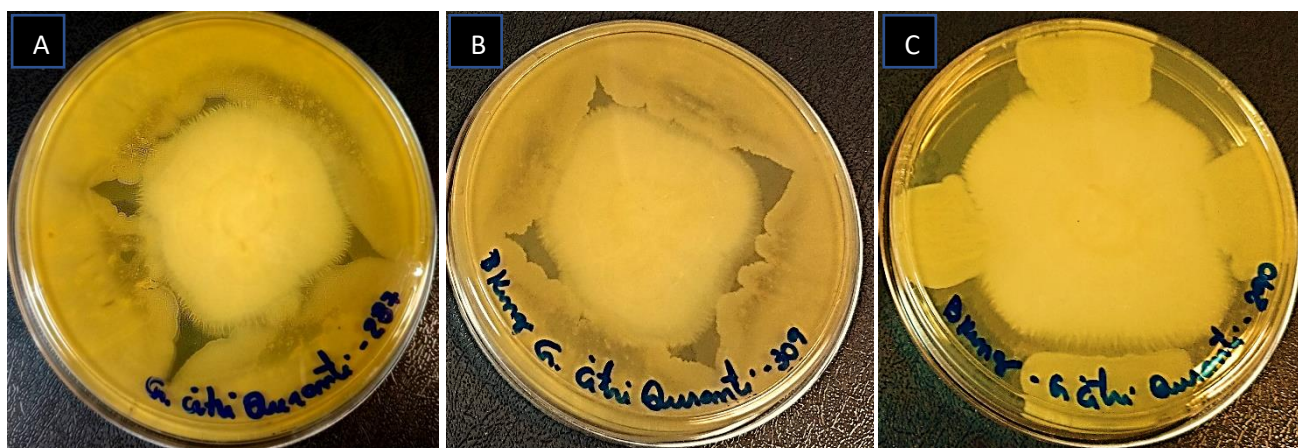


Figura 7 - Antagonismo in vitro para o fungo *Geotrichum citri-aurantii*, em meio de cultura B de King. A – Isolado 287; B – Isolado 309; C – Isolado 290;

3.4 Produção de Sideróforos

A produção de sideróforos foi verificada cultivando os isolados em placas de petri em meio de cultura deficiente em ferro. Dos 8 isolados da mesma espécie, apenas 6 foram capazes de se desenvolver na carência de ferro, sem inibição de seu crescimento (Figura 8). Através da presença de um halo amarelo ao redor da colônia, é possível identificar a reação positiva para sideróforos pelo método CAS (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

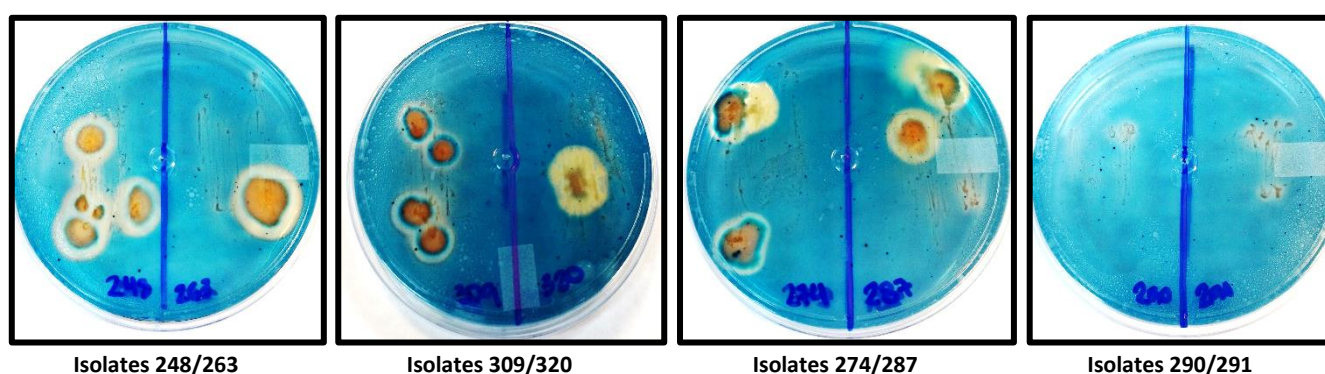


Figura 8 - Crescimento dos isolados *Bacillus subtilis* em meio de cultivo contendo CAS, mostrando a formação de halos ao redor das colônias, indicando reação positiva para a produção de sideróforos.

O tempo para produção do halo ao redor das colônias foi diferente para cada isolado, apresentando halos entre 8 a 15 dias após a inoculação. Os isolados 290 e 291 não se desenvolveram tão bem quanto aos demais, apresentando um fraco halo alaranjado ao redor de sua colônia.

4. Discussão

Através dos testes realizados *in vitro* para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, com oito cepas de *B. subtilis*, foi possível verificar que todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, bem como produzir amilase e celulase (Figura 1, a, b, c). Testes *in vitro* são imprescindíveis para entender e conhecer as habilidades dos microrganismos (ROCHA *et al.*, 2017).

A solubilização de fosfato verificada em todas as cepas indica que tais isolados proporcionam a disponibilização deste elemento para as plantas, a fim de promover seu crescimento, melhorando seu desempenho, conforme estudos anteriores (LOBO, 2018; DIAZ 2018; SANTOS *et al.*, 2020).

As plantas podem apenas absorver o P em duas formas iônicas solúveis, a monobásica e a dibásica (GLASS, 1989; BHATTACHARYYA e JHA, 2012), pois este nutriente é o mais limitante, depois do N. O fósforo é um macronutriente indispensável e essencial para o crescimento e produção vegetal, atuando em importantes processos como a transferência e armazenamento de energia, fotossíntese, divisão celular, crescimento das raízes, respiração; formação de sementes, qualidade de frutos e grãos (KHAN *et al.*, 2009). Geralmente os solos brasileiros apresentam uma grande quantidade de fósforo, entretanto, na sua maior parte na forma não disponível por estarem adsorvidos na porção do solo (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; FREITAS; BANERJEE; GERMIDA, 1997).

Bactérias promotoras de crescimento de plantas do gênero *Bacillus* possuem habilidades de solubilizar fosfato através da produção ácidos orgânicos e de enzimas, como a fosfatase e a fitases que são excretadas no solo (HARIPRASAD; NIRANJANA, 2009; PATIÑO-TORRES; SANCLEMENTEREYES, 2014). Tais substâncias modificam as formas

orgânicas e inorgânicas de fosfato indisponível, em formas químicas assimiláveis, que uma vez incorporadas na raiz, podem ser armazenadas, e quando necessário o fósforo pode ser conduzido até a parte superior onde fica acessível para reações metabólicas das plantas (ALEXANDER, 1978; KPOMBLEKOU-A e TABATABAI, 1994; JHA; SARAF, 2015). Trabalhos anteriores realizados com os mesmos *Bacillus*, para a cultura do milho, e cultura do algodão (LOBO, 2018; DIAZ 2018) apresentaram resultados eficientes para a solubilização do fósforo, além de apresentarem concentrações significativas na matéria seca de raiz e parte aérea.

Todas as cepas de *Bacillus* foram capazes de degradar o amido. O amido, é um carboidrato sintetizado pelas plantas, constituindo-se de um polímero de glicose de alta massa molar, que pode ser acumulado como reserva energética para a maioria das plantas superiores e essenciais para muitos microrganismos (VAN DER VEEN *et al.*, 2000; VIEILLE; ZEIKUS, 2001). Na maioria das plantas, o amido é resultante do armazenamento de açúcares acumulados, e que pode ser distinto em duas formas: ramificada – amilopectina, e não – ramificada - amilose. A amilopectina e a amilose são acumuladas em forma de grãos de amido insolúveis no interior dos amiloplastos e cloroplastos das células vegetais, sendo possível ser fragmentada em monossacarídeos através de uma reação de hidrólise (AMARAL *et al.*, 2007; EVERT e EICHHORN, 2014). Estudos realizados por Santos *et al.*, (2020) verificaram que estas cepas promoveram o crescimento e desenvolvimento de plantas na cultura do milho, se comparado ao controle, o que sugere uma simbiose direta com a planta, pois tais cepas foram capazes de fornecer elementos essenciais para seu desenvolvimento, e que possivelmente a planta forneceu ao microrganismo esta fonte de carbono em forma de energia, favorecendo sua estabilidade.

Todos os *Bacillus* foram capazes de degradar o carboximetilcelulase. Bactérias do gênero *Bacillus* tendem a produzir celulasas na presença de carboximetilcelulase, mas isso nem sempre ocorre quando são expostos a outros substratos (ITO, 1998; RASTOGI *et al.*, 2010). A produção de celulase por microrganismos é observada como um mecanismo para auxiliar à colonização da planta hospedeira. Este tipo de penetração é ativo e independente de aberturas naturais ou feridas que ocorrem durante o crescimento da planta. A penetração dos *Bacillus* pode desencadear a

resistência sistêmica do hospedeiro, o que é conhecido como outro mecanismo de ação de agente de controle biológico (HALLMANN *et al.*, 1997).

Os *Bacillus* foram capazes de apresentar tolerância aos seis íons metálicos testados – Cu(II), Zn(II), Cd(II), Cr(III), Ni(II) e Cr(VI), apresentando o IC₅₀ acima de 0,5 mmol L⁻¹ exceto as cepas 248, 263 e 320 para o elemento Cd(II) (Figura 2). A tolerância a tais contaminantes para algumas espécies bacterianas pode ser desenvolvida por características de seu metabolismo e genoma, através de uma variedade de sistemas de resistências mediadas por plasmídeos, cromossomos e transposon. Embora a resistência a metais pode acontecer em razão de exposição prolongada, na qual beneficia a seleção e multiplicação de microrganismos tolerantes ao estresse provocados pelos metais, alguns mecanismos de resistência podem ocorrer através do transporte ativo, redução da sensibilidade dos alvos celulares aos íons metálicos; exclusão por barreira permeável e sequestro intra e extracelular. (HUTCHINSON e SYMINGTON, 1997; BRUINS, *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2011).

Nota-se que do total de oito cepas, três *Bacillus* – 274, 290 e 291 foram resistentes ao Cu(II) numa concentração de 2,5 mmol L⁻¹ (Figura 2-a); dois - 248 e 320 foram resistentes a concentração de 2,0 mmol L⁻¹; dois - 287 e 309 foram resistentes a concentração de 1,5 mmol L⁻¹; e apenas um – 263 apresentou a maior resistência a 3,0 mmol L⁻¹. O Cu(II) é um micronutriente essencial para células procarióticas e eucarióticas, contudo, em altas concentrações podem causar inativação enzimática, bloqueio de reações bioquímicas, lise celular, interferência no processo de tradução e transcrição de genes, e inativação enzimática (NIES, 1999; MATYAR, *et al.*, 2010; ORELL, *et al.*, 2010).

Quando a tolerância apresentada ao íon Zn(II), cinco cepas – 248, 274, 287, 290 e 309, foram capazes de desenvolver-se a concentração 5,0 mmol L⁻¹, duas cepas - 263 e 291 foram resistentes a concentração de 3,0 mmol L⁻¹, e apenas uma – 320 resistente a concentração de 1,5 mmol L⁻¹ (Figura 2-b). Ali *et al.* (2009) relataram a resistência de *Bacillus subtilis* a concentração de 10,43 mM de zinco. O zinco é um elemento essencial para o metabolismo microbiano, constituindo um componente importante para muitas enzimas e proteínas de ligação, sendo essencial para o desempenho da célula, porém, em altas concentrações pode se tornar tóxico formando complexos (BRUINS *et al.*, 2000; DOPSON *et al.*, 2003).

Observou-se que do total de oito cepas, apenas cinco foram tolerantes ao Cd(II), apresentando maior resistência na concentração de 1,5 mmol L⁻¹ (Figura 2-d). Ayano *et al.*, (2014) verificou que a concentração de cádmio a 2,0 mmol L⁻¹ inibiu o crescimento de bactérias isoladas de solo. A presença deste elemento pode ocasionar danos irreversíveis as células bacterianas, visto que se ligam a proteínas respiratórias produzindo oxigênio reativo, o que leva a diminuição da densidade celular, reduzindo a taxa de crescimento e causando até mesmo a morte (LEE *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2009).

Quando se analisa a resistência ao Cr, sabemos que este elemento pode estar presente em vários estados de oxidação, sendo possível ocorrer em estados de oxidação de -2 a +6. Contudo, apenas Cr(III) e Cr(VI) são estáveis. O Cr(VI) ocorre como cromato (CrO₄)²⁻ e dicromato (Cr₂O₇)²⁻, dependendo do pH da solução (SHEN e WANG, 1994; DERMOU *et al.*, 2007). Na utilização do Cr(III) podemos observar que as cepas 290 e 291 apresentaram maior resistência, se desenvolvendo a 5 mmol L⁻¹; já para a cepa 274, a concentração que mais interferiu no desenvolvimento foi de 4,5 mmol L⁻¹ (Figura 2-e); e para as demais cepas a concentração 3,5 mmol L⁻¹. Quando as cepas foram submetidas ao Cr(VI), foi possível observar que sete isolados apresentaram o mesmo comportamento de resistência ao metal, com valores de concentração 4,0 mmol L⁻¹, e apenas um bacilo (274) foi capaz de se desenvolver a 5,0 mmol L⁻¹ (Figura 2-c). O resultado para maior resistência ocorreu em meio contendo Cr(III), um estado menos tóxico deste metal, para o preparo do meio de cultivo. Embora este metal apresente toxicidade na forma trivalente e hexavalente, nota-se que a este elemento, algumas bactérias são tolerantes. A resistência a metais está relacionada à produção de substâncias quelantes que podem se ligar e complexar metais, propiciando o desenvolvimento de tais microrganismos em ecossistemas em que a microbiota se encontra em constante competição (ULLAH *et al.*, 2015).

Para a determinação da tolerância de todas as cepas ao íon metálico Ni(II) a concentração de 2,5 mmol L⁻¹ (Figura 2-f) foi suficiente para dificultar seu desenvolvimento. Embora o Ni(II) seja importante para a atividade e constituição metaloenzimas (MARSCHNER, 1995; NEGI *et al.*, 2014), ele pode provocar alterações nos padrões de metilação de citosina causando hipermetilação ou hipometilação do DNA, que pode ocasionar a suscetibilidade dos cromossomos

para a quebra ou sua instabilidade cromossômica (KOVALCHUK *et al.*, 2001). A interação deste íon metálico com microrganismos pode levar a uma genotoxicidade induzida, onde o Ni(II) pode interagir com proteínas da cromatina, e formar ligação cruzada proteína-DNA (ROSSMAN, 1995; ANJUM *et al.*, 2015).

A tolerância a metais tóxicos, é um fator determinante a ser apontado em estudos de remediação de áreas contaminadas, de modo que esta resistência está pontualmente ligada a capacidade de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento bacteriano, perante a elevadas concentrações de metais pesado (KANG *et al.*, 2016).

A atividade exercida pelos isolados de *Bacillus* contra patógenos foi demonstrada para os fungos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phyllosticta citricarpa* e *Geotrichum citri-aurantii*, fungos causadores de doenças na cultura da laranja (Tabela 3). A ação da bactéria ocorre através da inibição do crescimento fúngico *in vitro*, no qual todas as cepas foram capazes de apresentar antagonismo, exceto a cepa 290 que apresentou ausência de antagonismo para o fungo *Alternaria Alternata* em meio B de king, *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA, e *Geotrichum citri-aurantii* em meio B de king. O *Bacillus* é um gênero de bactéria que apresenta poder antagonista de maior relevância, destacando-se por sua capacidade de formar endósporos resistentes a circunstâncias adversas e apresentar uma abundância de mecanismos antagônicos, de modo a inibir e driblar as defesas dos fitopatógenos, o que permite a sua espécie sobrevivência em nichos ecológicos específicos (LANNA FILHO *et al.*, 2010). Além disso, bactérias do gênero *Bacillus* dispõem da característica de produzir enzimas hidrolíticas, como celulase, que degradam componentes da parede celular de outros microrganismos, o que lhe permite conferir a característica de micoparasitismo (ZAGO *et al.*, 2000). Chen *et al* (2008) verificaram que o *Bacillus subtilis* foi capaz de produzir 14 compostos voláteis antifúngicos que inibiram o desenvolvimento de *Botrytis cinérea*, causador do mofo cinzento em vegetais e frutas. Braga Junior *et al.* (2017) testaram sete cepas de *Bacillus subtilis*, contra *Fusarium subglutinans*, *Curvularia luneta* e *Bipolaris spp* e constataram que os isolados demonstraram potencial no controle biológico, sendo eficazes na inibição do crescimento micelial.

A produção de sideróforos ocorreu após 8 dias da inoculação, e apenas 6 cepas foram capazes de formar halo alaranjado ao redor da colônia (Figura 8). Os isolados 290 e 291 não apresentaram crescimento significativo, apresentando fraco halo ao redor da colônia.

Sideróforos são metabolitos secundários altamente eletronegativos sendo sua produção uma característica que concede vantagens à sobrevivência de microrganismos nos mais distintos ambientes, em vista da colaboração do ferro em métodos biológicos essenciais, sendo um fator significativo de competição microbiana (LYNCK *et al.*, 2001). São compostos de baixa massa molecular que agem na captação do ferro existente no ambiente, em função de sua elevada afinidade por Fe(III), que embora apresente baixa solubilidade, os sideróforos são capazes de agir como quelantes deste cátion e transportá-lo para o interior da célula (HIDER e KONG, 2010). Crescimento de plantas podem ser promovidos indiretamente através da produção de sideróforos, assim como mecanismos biológicos que podem impedir a proliferação de fitopatógenos ao redor das raízes devido ao sequestro de ferro rizosférico (BUYSENS *et al.*, 1996; DAVISON, 1998).

5. Conclusão

As análises realizadas não permitiram um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos de cada isolado, porém, foi possível identificar cepas que possuem habilidades de síntese enzimática, resistência a metais, produção de sideróforos, e ação antagônica. Esses resultados abrem caminho para novas investigações na tentativa de esclarecer quais são as características genéticas envolvidas em cada mecanismo de ação, para que seja ideal na utilização de novos bioinoculantes, em processos de biorremediação, e produtos biotecnológico.

6. Referência Bibliográfica

ABDI, H.; e WILLIAMS L.J. (2010) Principal component analysis. Wiley interdisciplinary reviews: **computational statistics** 2(4):433-459

ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. **Soil Science**, v. 125, n. 5, p. 331, maio 1978.

ALI, N.; HAMEED A, AHMED, S. Physicochemical characterization and bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by indigenous bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, 164:322 – 8, 2009.

AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v.34, n. 4, p. 425-431, 2007.

ANJUM, N. A.; SINGH, H. P.; KHAN, M. I. R.; MASOOD, A.; PER, T. S.; NEGI, A.; BATISH, D. R.; KHAN, N. A.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I. Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. **Environmental Science Pollution Research**, Berlin, v. 22, p. 3361–3382, 2015.

AYANO, H.; MIYAKE, M.; TERASAWA, K.; KURODA, M.; SODA, S.; SAKAGUCHI, T.; IKE, M. Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 117, p. 576-581, 2014.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, abr. 2012.

BORÉM, A. A História da Biotecnologia. Biotecnologia, **Ciência e Desenvolvimento** v. 34, n. VIII, p. 10–12, 2005.

BRAGA JUNIOR, G.M.; CHAGAS JUNIOR, A.F.; CHAGAS, L.F.B.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L.O.; SANTOS, G.R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazonia**, v. 7, n. 3, p. 45 – 51, 2017.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.

BUYSENS, S., HEUNGENS, K., POPPE, J., HOFTE, M., 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Appl Environ Microbiol** 62: 865-871.

CAMPOS, E.V.R.; DE OLIVEIRA, J.L.; FRACETO, L.F. Applications of controlled release systems for fungicides, herbicides, acaricides, nutrients, and plant growth hormones. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, Stevenson Ranch, v. 6, n. 4, p. 373-387, 2014.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, n.5, p.919–923, 2008.

DAVISON, J., 1988. Plant beneficial bacteria. **Nat Biotechnol** 6: 282-286

DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Elementos essenciais e benéficos às plantas superiores. In: Fernandes, M.S. (ed.) Nutrição mineral de plantas. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2006. p.1-5.

DERMOU, E.; VELISSARIOU, A.; XENOS, D.; VAYENAS, D.V. Biological removal of hexavalente chromium in trickling filters operating with diferente filter media types. **Desalination**, 211, p. 156 – 163, 2007.

DIAZ, P.A.E.; BARON, N.C.; RIGOBELLO, E.C. (2019); *Bacillus*; spp. as plant growth-promoting bacteria incotton under greenhouse conditions. **Austr J Crop Sci** 13(12):2003

DOPSON, M.; BAKER – AUSTIN, C.; KOPPINEEDI, P.R.; BOND, P.L.; Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. **Microbiology**, 149: 1959-70, 2003.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Rio de Janeiro: **EMBRAPA-SPI**, 2006. 306 p.

EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Raven: Biologia Vegetal. 8ªEdição. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2014.

FREITAS, J. R. de; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria Enhance the Growth and Yield but Not Phosphorus Uptake of Canola (Brassica Napus L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, n. 4, p. 358–364, 1 maio 1997.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Appl. Environ.Microbiol.** 57(8):2351-2359

GLASS, A. D. **Plant nutrition: an introduction to current concepts**. Boston: Jones and Bartlett, 1989.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial Endophytes in Agricultural Crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, out. 1997.

HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. R. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria to Improve Plant Health of Tomato. **Plant and Soil**, v. 316, n.1–2, p. 13–24, 1 mar. 2009.

HIDER, R.C.; KONG, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. **Nat Prod Rep** 27: 637- 657

HUTCHINSON T.C.; SYMINGTON M.S. Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed. **Journal of Geochemical Exploration**, New York, v. 58, p. 323-330, 1997.

ITO, S. Alkaline cellulases from alkaliphilic Bacillus: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. **Extremophiles**, v.1, p. 61 – 66, 1998.

JHA, D. C.; SARAF, M. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, 2015.

KANG, C.H.; KWON, Y.J.; SO, J.S. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. **Ecological Engineering**, v. 89, p. 64–69, 2016.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. (2009) Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture - A Review, in: **Sustainable Agriculture**. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 551–570.

KOVALCHUK, O.; TITOV, V.; HOHN, B.; KOVALCHUK, I. A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 568–572, 2001.

KPOMBLEKOU-A, K.; TABATABAI, M. Effect of Organic Acids on Release of Phosphorus From Phosphate Rocks. **Soil Science**, v. 158, p. 442–453, 1 dez. 1994.

KRASTANOV, A.; ALEXIEVA, Z.; YEMENDZHIEV, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 13,n.1, p. 76-87, 2013.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E.L.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, J.J. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v.17, p.6–15, 2004

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010

LEE, S-W.; GLICKMANN, E.; COOKSEY, D. A. Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1437–1444, 2001.

LOBO, L.L.B.; DOS SANTOS, R.M.; RIGOBELLO, E.C. (2019) Promotion of maize growth using endophytic bacteria under greenhouse and field conditions. **Aust J Crop Sci** 13(12):2067

LOPES, A.; REMÉDIOS, C.; DEUS, C.; BARROS, S. Identificação da Presença de Bactérias Resistentes a Metais em Solos não Contaminados por Poluição Industrial. **Revista CAPTAR**, Aveiro, v. 3, p. 95-103, 2011.

LYNCK, D.; O'BRIEN, J.; WELCH, T.; CROSA, J.H.; and O'CONNELL, M. (2001) Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. **J Bacteriol** 183:2576 –2585

MA, ZHEN.; JACOBSEN, F. E.; GIEDROC, D. P. Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. **Chemical Review**, Easton, v. 109, p. 4644–4681, 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition in higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 1995.

MATYAR, F.; AKKAN, T.; UÇAK, Y.; ERASLAN, B. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Oskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). **Environmental Monitoring Assess**, v. 167, n.1, p. 309-320, 2010.

MILANI, R. M.; *Bacillus subtilis* isolates with different abilities to promote plant growth in maize, cotton, and soybean crops. **ASIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, BIOTECHNOLOGY AND ENVIRONMENTAL SCIENCE**, v. 21, p. 5-14, 2019.

MORTVEDT, J.J. Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. **Fertilizer Research**, The Hague, v.43. p.55-61, 1996.

NAUTIYAL, C.S. An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, New York, v.70, p.265- 270, 1999.

NEGI, A.; SINGH, H. P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Ni²⁺-inhibited radicle growth in germinating wheat seeds involves alterations in sugar metabolism. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 36, p. 923–929, 2014.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51,n. 6, p. 730- 750, 1999.

NITHYA, C.; GNANALAKSHMI, B.; PANDIAN, S. K. Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. **Marine Environmental Research**, New York, v. 71, p. 283-294, 2011.

ORELL, A.; NAVARRO, C. A., ARANCIBIA, R., MOBAREC, J. C., JEREZ, C. A. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. **Biotechnology Advances**. v. 28,n. 6, p. 839-848, 2010.

PATÍÑO-TORRES, C. O.; SANCLEMENTE-REYES, O. E. Phosphate-solubilizing microorganisms (PSM): a biotechnological alternative solution for a sustainable agriculture. **Entramado**, v. 10, n. 2, p. 288–297, 2014.

RAMAMOORTHY, V; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1-20, 2001

RASTOGI, G.; BHALLA, A.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K.M.; HUGHES, S.R.; CHRISTOPHER, L.P.; SANI, R.K. Characterization of thermostable celulasas produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8798 – 8806, 2010.

RIBEIRO, M. A. C. Contaminação do solo por metais pesados. 2013. 249f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

ROCHA, B.C.; LIMOEIRO, A.G.S.; BUENO, C.E.S.; SOUZA, F.S.; BRAITT, A.H. (2017) In vitro study of the flow rate of five root canal sealers: Endofill, AH Plus, MTA Fillapex, Sealer 26 and Pulp Canal Sealer EWT. **Dental Press Endodontics**v7 n 2.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 12, p. 16, 1986.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.** 17:319–339.

ROMEIRO, R.S. (2007) Controle biológico de doenças de plantas: **Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV. 269.

ROSSMAN, T.G. Metal mutagenesis. In: GOYER, R. A.; CHERIAN, G. C. (Ed.). **Toxicology of metals**, New York: Springer, 1995, p 373–430.

SANTOS, B. M. S.; SILVA, M. S. R. A.; CHAVEZ, D. W. H.; RIGOBELLO, E.C. Genetic and nutritional diversity of *Bacillus subtilis* isolates demonstrating different aspects related to plant growth promoting. **AUSTRALIAN JOURNAL OF CROP SCIENCE** (ONLINE), v. 14, p. 880-888, 2020.

SCHWYN, B.; NEILANDS, B. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 47-56, 1987.

SHEN, H.; WANG, Y. Biological reduction of chromium by *E. coli*. **Journal of Environmental Engineering**, v. 120, p. 560 – 572, 1994.

SOTERO-MARTINS, A.; VIANA, M. O.; CARVAJAL, E. Bioprospecção de bactérias com potencial tecnológico para biorremediação de ecossistemas impactados por mercúrio e cromo. **Geochimica Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 36-42, 2014.

SOUZA, H; OLIVEIRA, L; ANDRADE, J. Seleção de *Basidiomycetes* da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 116-124, 2008.

STURZ, A. V., NOWAK, J. (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, 15:183-190.

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

VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of Cyclodextrin Glycosyltransferase Reaction and Product Specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336-360, 2000.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hiperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 65, p. 1-43, 2001.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudonomas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127).

CAPÍTULO 4 - Considerações finais

O presente estudo abordou a importância do estudo e caracterização de isolados de *Bacillus subtilis*, para que possam ser empregados em novas formulações para bioinoculantes. Na execução deste trabalho, foram estudadas oito cepas de isolados de *B. subtilis* que anteriormente, apresentaram comportamentos diferentes em relação a promoção do crescimento de plantas.

Os isolados demonstraram a capacidade em consumir diversas fontes de carbono; promover o crescimento de plantas da cultura do milho em casa de vegetação; apresentar a produção de metabólitos de interesse biotecnológico, tais como amilase e celulase; capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, exibir tolerância a metais; produzir sideróforos; e apresentar antagonismo contra fungos fitopatogênicos.

Os resultados mostraram que os isolados de *B. subtilis* apesar de pertencerem a mesma espécie mostraram diferenças de consumo de fontes de carbono, diferenças de níveis de promoção de crescimento de plantas, e diferenças na tolerância aos metais. Interessantemente que o isolado 290 que tem mostrado um grande potencial de promoção de crescimento de plantas foi o único isolado que consumiu o ácido glutâmico como fonte de carbono.

Outros estudos podem ser realizados para uma melhor separação e caracterização dos isolados buscando um melhor entendimento entre as características genéticas e fisiológicas com a capacidade de promoção de crescimento.