

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EVIDENCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS TRAÇOS DE PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO VEGETAL EM ISOLADOS DE
COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A CANA-DE-
AÇÚCAR**

Sabrina Custodio Dibelli

Bióloga

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EVIDENCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS TRAÇOS DE PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO VEGETAL EM ISOLADOS DE
COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A CANA-DE-
AÇÚCAR**

Discente: Sabrina Custodio Dibelli

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

Coorientadora: Profa. Dra. Rita De Cássia Panizzi

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

2023

D544e

Dibelli, Sabrina Custodio

Evidenciação de múltiplos traços de promoção de crescimento vegetal em isolados de comunidades bacterianas associadas a cana-de-açúcar / Sabrina Custodio Dibelli. -- Jaboticabal, 2023
64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Daniel Guariz Pinheiro

Coorientadora: Rita de Cássia Panizzi

1. BPCPs. 2. Biocontrole. 3. Defensivos agrícolas. 4. Fitossanidade.
5. Saccharum spp.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto esperado: O estudo tem grande importância socioeconômica por abordar a questão da sustentabilidade na agricultura. A intensificação do uso de insumos agrícolas pode causar danos ao ecossistema e à saúde dos consumidores. Nesse contexto, a prospecção de bactérias benéficas para as plantas apresenta-se como uma alternativa mais sustentável para reduzir o uso de agroquímicos sintéticos.

Expected impact: The study has great socioeconomic importance for addressing the issue of sustainability in agriculture. The intensification of the use of agricultural inputs can cause damage to the ecosystem and the health of consumers. In this context, the prospecting of beneficial bacteria for plants presents itself as a more sustainable alternative to reduce the use of synthetic agrochemicals.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EVIDENCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS TRAÇOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM ISOLADOS DE COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A CANA-DE-AÇÚCAR

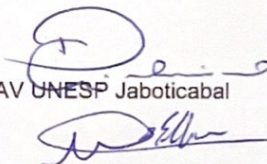
AUTORA: SABRINA CUSTODIO DIBELLI

ORIENTADOR: DANIEL GUARIZ PINHEIRO

COORDINADORA: RITA DE CÁSSIA PANIZZI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

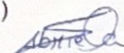
Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal



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



Dra. GABRIELA CABRAL FERNANDES (Participação Virtual)
Usina São Martinho / Pradópolis/SP



Jaboticabal, 10 de janeiro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Sabrina Custodio Dibelli, nascida em 18 de dezembro de 1997, no município de Ribeirão Preto, São Paulo, filha de Waldemar Dibelli Junior e Maria Abadia Custodio Dibelli. Graduiu-se como Bacharel em Ciências Biológicas (2016-2019) pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - Campus de Ituiutaba, Minas Gerais. Desenvolveu sua iniciação científica e trabalho de conclusão de curso intitulado “Hipertensão arterial sistêmica em estudantes e seus fatores de risco no início e fim do curso universitário”, sob orientação da Profa. Dra. Luciana Karen Calábria. No ano de 2020, iniciou o mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, na FCAV/UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, desenvolvendo o projeto intitulado “Evidenciação de múltiplos traços de promoção de crescimento vegetal em isolados de comunidades bacterianas associadas a cana-de-açúcar”, culminando no presente documento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por sempre me guiar e me mostrar o caminho que devo seguir, e pela intercessão de Santa Rita e Nossa Senhora Aparecida.

Aos meus pais, Waldemar e Maria Abadia, meu irmão Sávio Lucas e ao Arthur, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim e aos demais familiares que me ajudaram direta ou indiretamente.

Ao professor Dr. Daniel Guariz Pinheiro pela orientação e pelos ensinamentos e viabilização desta pesquisa.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioinformática Michelli Inacio Gonçalves Funnicelli e Lucas Amoroso Lopes de Carvalho, por toda a ajuda e todos os momentos em que ficamos juntos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/Unesp) pelo suporte acadêmico e infraestrutura utilizada durante o período do mestrado e ao Conselho do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária do qual tive a oportunidade de fazer parte como representante dos alunos.

Aos laboratórios de Biologia Molecular e de Proteômica Vegetal por toda ajuda e por disponibilizar reagentes, equipamentos e demais recursos.

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

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram direta ou indiretamente com esse trabalho.

Sumário

EVIDENCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS TRAÇOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM ISOLADOS DE COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A CANA-DE-AÇÚCAR.....	iii
EVIDENCE OF MULTIPLE PLANT GROWTH-PROMOTING TRAITS OF ISOLATES FROM SUGARCANE ASSOCIATED BACTERIAL COMMUNITIES.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Uso excessivo de defensivos agrícolas	4
2.2. Bactérias promotoras de crescimento em plantas	5
2.3. Mecanismos diretos	6
2.3.1. Produção de fitormônios	6
2.3.2. Fixação biológica de nitrogênio.....	8
2.3.3. Solubilização de fosfato	9
2.3.4. Produção de sideróforos	10
2.4. Mecanismos indiretos.....	11
2.4.1. Resistência sistêmica induzida	11
2.4.2. Produção de antibióticos	11
2.4.3. Controle biológico.....	12
2.5. Potencial da cana-de-açúcar para encontrar as BPCPs	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Comunidades bacterianas selecionadas	15
3.2. Isolamento das bactérias	15
3.3. Genotipagem dos isolados por ERIC e BOX-PCR	16
3.4. Identificação das bactérias por sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i>	17
3.5. Ensaio de Atributos de Promoção de Crescimento	18
3.5.1. Produção de ácido cianídrico (HCN).....	18
3.5.2. Produção de sideróforos	18
3.5.3. Solubilização de fosfato	19
3.5.4. Produção de Quitinase.....	20
3.5.5. Produção de proteases, lipases e esterases	20
3.5.6. Atividade de celulase e amilase	21
3.5.7. Tolerância a NaCl e glicerol	21
3.5.8. Produção de Biofilme	22
3.5.9. Produção de Amônia.....	23
3.5.10. Fixação de nitrogênio	23
3.5.11. Produção de ácido 3-indol acético (AIA).....	24
3.5.12. Quantificação da atividade de ACC deaminase	24
3.6. Ensaio de antagonismo	25
3.6.1. Fungos fitopatogênicos	25
3.6.2. Antagonismo direto	26
3.6.3. Produção de compostos voláteis para patógenos fúngicos.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Isolados e genotipagem	28
4.2. Perfis de traços de controle biológico e promoção de crescimento vegetal.....	30
4.3. Teste de antagonismo contra fitopatógenos	35
5. DISCUSSÃO	37

6. CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES.....	62

EVIDENCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS TRAÇOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM ISOLADOS DE COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS A CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO – A utilização de insumos agrícolas, tanto para adubação de plantas quanto para controle de pragas, intensificou-se nos últimos anos, caracterizando sistemas de agricultura intensiva, que podem causar diversos danos, tanto para o ecossistema agrícola quanto para a saúde dos consumidores. Em contrapartida, os insumos da agricultura sustentável têm se mostrado uma alternativa mais sustentável, uma vez que possibilitam a redução do uso de agroquímicos sintéticos e seus efeitos adversos. Nesse sentido, a prospecção de bactérias com características promotoras de crescimento vegetal é um tipo de estratégia que vem ganhando destaque gradativamente para reconhecer microrganismos benéficos que possam ser utilizados como bioinoculantes a fim de favorecer o desenvolvimento e a produtividade das culturas. Assim, este estudo teve como objetivo investigar 36 isolados obtidos de seis comunidades bacterianas de ambientes epífitos ou endofíticos em cana-de-açúcar. Essas comunidades bacterianas já haviam sido avaliadas quanto a características promotoras de crescimento de plantas. No entanto, agora os isolados foram caracterizados considerando mecanismos diretos e indiretos. A partir da análise das sequências do gene 16S rRNA, foi possível realizar a atribuição taxonômica, ao menos em nível de gênero, com sugestão de espécies para cada isolado. Nesse sentido, destacam-se as espécies do gênero *Enterobacter* (*E. mori*, *E. asburiae* e *E. cancerogenus*), além das espécies *Serratia surfactantfaciens*, *Agromyces iriotenses* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Por ensaios in vitro, esses isolados apresentaram resultados promissores, com destaque para a alta produção de amônia, solubilização de fosfato, ACC-deaminase e produção de sideróforos, além de produção de compostos orgânicos voláteis inibidores de crescimento de fungos fitopatógenos. Em conclusão, identificamos muitas e várias características funcionais associadas aos isolados bacterianos, com potencial para promover o desenvolvimento saudável da planta.

Palavras-chave: BPCP, biocontrole, defensivos agrícolas, fitossanidade, *Saccharum* spp.

EVIDENCE OF MULTIPLE PLANT GROWTH-PROMOTING TRAITS OF ISOLATES FROM SUGARCANE ASSOCIATED BACTERIAL COMMUNITIES

ABSTRACT – The usage of agricultural inputs, both for plant fertilization and pest control, has intensified in recent years, characterizing intensive agriculture systems, which can cause several damages, both for the agricultural ecosystem and for the health of consumers. In contrast, biological farming inputs have shown themselves as a more sustainable alternative once they enable the reduction of synthetic agrochemicals usage and their adverse outcomes. In this sense, the prospection of bacteria with plant growth-promoting traits is a type of strategy that has gradually gained prominence to recognize beneficial microorganisms that could be used as bioinoculants to favor the development and productivity of crops. Thus, this study aimed to investigate 36 isolates obtained from six bacterial communities from epiphytic or endophytic environments in sugarcane. These bacterial communities had already been evaluated for plant growth-promoting traits. However, now the isolates were characterized by considering direct and indirect mechanisms. From the analysis of the 16S rRNA gene sequences, it was possible to carry out the taxonomic assignment, at least at the genus level, with a suggestion of species for each isolate. In this sense, we highlight the species of the genus *Enterobacter* (*E. mori*, *E. asburiae* and *E. cancerogenus*), in addition to the species *Serratia surfactantfaciens*, *Agromyces iriotenses* and *Stenotrophomonas maltophilia*. By in vitro assays, these isolates showed promising results, with highlights the high ammonia production, phosphate solubilization, ACC-deaminase, siderophore production and production of volatile compounds. In conclusion, we identified many and various functional characteristics associated with several bacterial isolates, with the potential to promote healthy plant development.

Keywords: PGPB, biocontrol, pesticides, plant health, *Saccharum* spp.

1. INTRODUÇÃO

No meio ambiente, os defensivos agrícolas causam diversos efeitos negativos, como a contaminação da água e do solo, causando desequilíbrio ecológico na interação natural entre as espécies com seu uso excessivo (Novello et al., 2021). A fim de mitigar esses efeitos ambientais nocivos, os agricultores estão sendo pressionados pela comunidade internacional a introduzir métodos de cultivo que causem menor impacto ao meio ambiente, ou seja, que a produção de alimentos seja realizada de uma maneira mais sustentável e ecologicamente correta com novas estratégias de controle eficazes (Malusá et al., 2012; Ramakrishna et al., 2019; Palmieri et al., 2022).

Uma das alternativas ao uso de defensivos agrícolas, é a utilização de agentes promotores de crescimento, tais como as “Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas” (BPCPs), e agentes de biocontrole, os quais ganharam importância na última década pois são capazes de proteger plantas das infecções causadas por outros organismos, aumentar a fertilidade do solo e a produção agrícola, além também, de aumentar o rendimento das culturas (Abhilash et al., 2016; Ramakrishna et al., 2019).

Bactérias associadas às plantas, podem proporcionar direta ou indiretamente seu crescimento (Aquino et al., 2019). Os mecanismos diretos centralizam-se na produção de fitohormônios e fornecimento de nutrientes, dessa forma, esses microrganismos podem facilitar a aquisição de nitrogênio, fósforo e ferro, além também, de produção e modulação de ácido indol acético (AIA), 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminase e entre outros (Abhilash et al., 2016; Felestrino et al., 2018).

Os mecanismos indiretos, por sua vez, incluem características de inibição a patógenos, ou de biocontrole, seja na planta, ou pela produção de antibióticos e enzimas líticas (como, as proteases e quitinases), e competição direta contra patógenos por nutrientes (Abhilash et al., 2016; Felestrino et al., 2018; Glick, 2012), além também da produção de metabólitos secundários, incluindo antimicrobianos, os

quais compreendem um dos principais mecanismos na supressão de atividade fitopatogênica (Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Singh et al., 2019), e também a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs), nos quais são moléculas gasosas que são capazes de interagir com plantas no ambiente do solo, promovendo o crescimento vegetal direta ou indiretamente (Santoro et al. 2015), eles estão abrangidos em sistemas de defesa, de comunicação e de atração de polinizadores da planta (Cappellari et al. 2017).

Desse modo, fitopatógenos, como os fungos, desenvolvem inúmeras estratégias de infecção para penetrar no tecido vegetal, podendo assim, causar sérios danos às plantas (El-Baky et al., 2021). Esses microrganismos drenam nutrientes das plantas e apresentam um efeito negativo na fitossanidade, afetando a produtividade e a vitalidade de diferentes culturas agrícolas (Ahemad e Khan, 2011).

A inoculação de BPCPs reconhecidos e que já tenham passado por avaliação em campo para aferir a sua eficácia e segurança pode ser considerado um método sustentável para a agricultura, já que esses microrganismos também desempenham um papel importante na estimulação do crescimento das plantas, nas atividades fisiológicas gerais e nos processos de remediação do solo, aumentando sua produtividade e seus nutrientes, melhorando, assim, seu déficit de nutrientes (Bhattacharyya et al., 2020; Majeed et al., 2018)

Dentre as BPCPs, estão incluídas as bactérias de vida livre no solo próximo às raízes, as rizobactérias e as bactérias endofíticas e epifíticas (Ramakrishna et al., 2019), que além de possuírem uma grande influência no crescimento das plantas, também podem ser uma fonte importante de compostos naturais bioativos. As BPCPs realizam um papel importante dentre os diversos microrganismos que correspondem à comunidade microbiana do solo, influenciando, assim, a fertilidade desse solo e a produtividade das plantas posteriormente (Abdallah et al., 2019).

As rizobactérias representam o grupo mais conhecido das BPCPs. Isso ocorre, pois elas contribuem no crescimento das plantas por meio de regulação dos níveis hormonais, aquisição de recursos nutricionais e biocontrole de diferentes patógenos, além também de reduzir a produção de etileno, possibilitando que as

plantas desenvolvam uma raiz mais longa e melhor se estabeleçam no começo do crescimento (Bhattacharyya et al., 2020; Zandi e Basu, 2016).

No caso das bactérias endofíticas é relevante ressaltar que elas colonizam os tecidos internos das plantas, onde não causam alterações morfológicas e nem causam doenças, além de possuírem traços característicos *in vitro*, em contraste aos fitopatógenos (Malfanova et al., 2013). Encontradas na superfície da planta, as bactérias epifíticas podem habitar locais na cutícula cerosa que cobre as células epidérmica e tricomas (Sabaratnam e Beattie, 2003), fornecendo nutrientes para as plantas (Lindow; Brandl, 2003).

Apesar dos inúmeros benefícios, existem ainda diversos desafios relacionados às BPCPs, como a procura de novos microrganismos para atender a demanda de conhecimentos para que possam ser empregados como bioinsumos para a agricultura, incluindo a determinação das características mais importantes para o desempenho eficaz e para a seleção subsequente das cepas com atividades biológicas apropriadas. Isso levará a um melhor entendimento das vantagens e desvantagens de sua possível aplicação comercial de acordo com as especificidades de cada situação (Vessey, 2003; Weisskopf, 2014).

Considerando a importância de se prospectar novas cepas de BPCPs, como identificar os traços benéficos promovidos por esses, o presente trabalho avaliou uma série de isolados bacterianos com evidências de potencial para promover crescimento em plantas. Essas bactérias foram isoladas a partir de seis comunidades bacterianas cultivadas, tendo como fonte de obtenção a cultura da cana-de-açúcar.

Essas comunidades foram cultivadas e investigadas em um estudo prévio (Teheran-Sierra et al., 2021), o qual apresentou evidências de suas capacidades em promover benefícios às plantas. Aquelas com maior destaque, foram selecionadas para o presente trabalho. A fim de avaliar a resposta individual de bactérias dessas comunidades, realizamos o isolamento, avaliação de traços de promoção de crescimento e a identificação taxonômica, utilizando-se do sequenciamento do gene 16S rRNA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Uso excessivo de defensivos agrícolas

A intensificação da agricultura tem crescido de modo acelerado, de acordo com a demanda atual. Isso tende a se agravar, tendo em vista que é estimado que até o ano de 2050 a produção global de alimentos deverá aumentar em até 60% (Alexandratos e Bruinsma, 2012). O uso de defensivos agrícolas é destinado a prevenir e controlar organismos biológicos considerados como pragas, além de auxiliar na melhoria do rendimento das culturas (Abubakar et al., 2020; Rawat et al., 2021). Dessa forma, para atender essa demanda, práticas agrícolas convencionais têm-se utilizado de defensivos agrícolas de forma intensiva, resultando em um custo ambiental e ecológico insustentável e na consequente contaminação de ecossistemas (Muller et al., 2017; Majeed et al., 2018).

Além de todo prejuízo que afeta a natureza, esses defensivos também afetam a saúde dos agricultores e trabalhadores rurais, os quais são constantemente expostos e podem sofrer com efeitos agudos e crônicos à saúde, tais como sintomas de envenenamento (Hutter et al., 2020) e, em casos mais graves, doenças crônicas como câncer e Doença de Parkinson (Van Maele-Fabry et al., 2012; Wesseling et al., 1996). Também há questões sobre a má prática associada a utilização desses produtos, como as aplicações descontroladas, descarte inadequado, não uso de equipamentos de proteção e também o uso de produtos adulterados (Lykogianni et al., 2021; Zikankuba et al., 2019).

Dessa forma, é crucial reduzir os impactos causados pelo uso excessivo de defensivos agrícolas (Muller et al., 2017) através do desenvolvimento de novos métodos e práticas agrícolas. Tornar a agricultura mais sustentável permitirá atender às necessidades alimentares crescentes da população, garantindo o mínimo de impacto no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais e consumidores (Lykogianni et al., 2021). Estudos realizados têm como o principal foco aumentar o rendimento das culturas, além da qualidade e propriedades sanitárias dos alimentos, em conjunto com o valor nutricional (Yavarian et al., 2021).

Práticas já existentes, porém incipientes, como o uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas e procedimentos de biocontrole têm potencial para serem amplamente usados na agricultura para garantir a qualidade do solo e de outros fatores determinantes para o crescimento vegetal, garantindo a produção de grandes culturas de forma sustentável (Majeed et al., 2018; Gouda et al., 2018).

2.2. Bactérias promotoras de crescimento em plantas

A interação entre plantas e microrganismos envolve vários mecanismos, podendo ser sinérgicos, nos quais são essenciais para ambas partes (Majeed et al., 2018). Dentre as bactérias com capacidade de interagir com as plantas, estão incluídas as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) e rizobactérias promotoras de crescimento (RPCPs), são grupos de bactérias benéficas, presentes no solo, que possuem a capacidade de colonizar as raízes das plantas, incluindo espécies de rizóbios que formam nódulos nas raízes de plantas leguminosas, bactérias endofíticas - as quais colonizam os tecidos internos da planta (Olanrewaju et al., 2017; Santoyo et al., 2016; Yadegari et al., 2010) - e bactérias epifíticas, as quais são encontradas na filosfera de plantas (Sánchez-López et al., 2018).

Bactérias endofíticas são capazes de exercer mais prontamente um efeito benéfico, tendo em vista que essas se encontram em contato direto com as células vegetais (Santoyo et al., 2016). Já as bactérias epifíticas apresentam características para enfrentar condições ambientais restritivas, como temperaturas extremas, escassez de chuva e radiação UV (Sánchez-López et al., 2018). Ambos os grupos se destacam no ecossistema natural, bem como na agricultura, pois podem estimular o crescimento das plantas fixando nitrogênio, melhorando a disponibilidade de nutrientes do solo, suprimindo fitopatógenos (como bactérias, fungos e nematoides), e modificando respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos (Suzuki et al., 2014).

As BPCPs podem apresentar diversos traços metabólicos positivos na fisiologia da planta, podendo ser responsáveis pela modulação da resposta da planta, atuando de forma direta ou indireta. Como mecanismos diretos, podemos citar a produção de fitormônios (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, entre outros), produção de sideróforos, fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização e mineralização de fosfato. Os mecanismos indiretos, por sua vez, são representados pela produção de metabólitos secundários, (antibióticos), enzimas líticas (quitinases, proteases) e tolerância a estresses abióticos e bióticos, além também de resistência sistêmica induzida (ISR) e produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) (Kumar e Verma, 2018; Suzuki et al., 2014; Bhattacharyya e Jha, 2012).

Desse modo, para encontrar essas bactérias benéficas para as plantas, é utilizado o sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S (rRNA) por meio do qual viabiliza a identificação de isolados bacterianos, bem como pode ser utilizado para determinar as relações filogenéticas entre as bactérias (Patel, 2001). O gene 16S rRNA é o mais utilizado por ser presente em todas as bactérias, apresentando, muitas vezes, múltiplas cópias no genoma, e também pela natureza constitutiva de sua função para manutenção (“housekeeping”) da homeostase celular, que o mantém conservado ao passo que mudanças em regiões hipervariáveis na sequência são sugestivamente medidas de evolução (Janda e Abbott, 2007). Assim, esse gene representa o marcador taxonômico mais aplicado para identificar microrganismos por semelhança de sequência e assim, agrupá-los em grupos taxonômicos sempre levando em consideração a filogenia (Garza e Dutilh, 2015).

2.3. Mecanismos diretos

2.3.1. Produção de fitormônios

Os fitormônios estão diretamente relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, podendo, além disso, atuar junto a mecanismos de resistência a diferentes condições de estresse (Kudoyarova et al., 2019). Os reguladores de crescimento vegetal são classificados em diversos grupos, sendo os

mais conhecidos, as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico, que agem em diferentes processos de crescimento das plantas (Kaur et al., 2016).

As auxinas são importantes para o fototropismo, na formação de raízes, pelos radiculares, dentre outros processos. A auxina mais conhecida é o ácido indolacético (AIA), produzido por bactérias, plantas e fungos (Tsukanova et al., 2017). Esse hormônio atua principalmente no papel da divisão celular, além de estimular o desenvolvimento radicular e o desenvolvimento das folhas e flores (Phillips et al., 2011).

Muitas plantas já possuem mecanismos de neutralização para controlar o excesso de AIA, como por exemplo, sua inativação por conjugação com açúcares ou aminoácidos. Esse hormônio, deve ser utilizado cuidadosamente para evitar efeitos inibitórios causados por superdosagem (Sitbon et al., 1992). Alguns gêneros de bactérias, como as das espécies do gênero *Pseudomonas* e outras espécies como, *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*, estão entre as principais produtoras de AIA, sendo assim mais eficientes na sua síntese (Barra et al., 2016; Camilios-Neto et al., 2014; Tahir et al., 2017).

As citocininas e giberelinas também são pertencentes à classe de fitohormônios essenciais para a planta, encontradas nas rizobactérias. As citocininas estão presentes na regulação do crescimento e do desenvolvimento radicular das plantas (Porcel et al., 2014). As giberelinas regulam o crescimento e o desenvolvimento da planta (Poupin et al., 2013), essa classe de fitohormônio age em diferentes processos durante a vida da planta, como no controle do alongamento e divisão celular, e também no aumento do desenvolvimento e taxas de absorção de nutrientes (Martínez et al., 2016; Saleem et al., 2015).

Estudos revelam que a citocinina pode acelerar a biossíntese de clorofila, podendo também proteger as funções do cloroplasto sob estresse de luz, além de atuar na regulação da expressão de genes nucleares (Cortleven e Schmülling, 2015). O estudo de Liu et al. (2013) correlacionou a produção de citocininas por bactérias da espécie *Bacillus subtilis* à capacidade de brotos de pinheiros resistirem ao estresse hídrico.

As giberelinas podem induzir a expansão do xilema e desenvolvimento da parede celular secundária em espécies de árvores (Guo et al., 2015). Estudos realizados anteriormente relatam que bactérias produtoras de giberelinas, tal como as do gênero *Sphingomonas*, ocasionam um aumento no tamanho de brotos e raízes de tomateiros (Khan et al., 2014). Observa-se, também, que plantas com inoculação de bactérias produtoras de giberelinas possuem melhores taxas de crescimento (Poupin et al., 2013).

O etileno associa-se ao crescimento das raízes, caules, folhas, flores e frutos, porém, sua síntese pode ser afetada por diferentes fatores como, por exemplo, temperatura, luz, nutrição e concentração de outros hormônios vegetais (Glick, 2014). O etileno produzido em baixos níveis é essencial para maturação vegetativa e, principalmente, para o alongamento e ramificação radicular, em contrapartida, quando produzido em altos níveis, pode se tornar tóxico, causando diversos efeitos negativos na planta, como a inibição do crescimento radicular (Desbrosses et al., 2009).

Dessa forma, quando a planta é submetida a algum estresse ambiental, ela passa a produzir altas concentrações de etileno. A enzima ACC deaminase é capaz de atuar na clivagem do precursor dessa molécula, o 1- aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (Misra e Chauhan, 2020). Assim, a ACC deaminase, produzida por algumas bactérias, é considerada benéfica para as plantas, uma vez que é capaz de reduzir os efeitos da exposição a concentrações excessivas de etileno (Ali e Kim, 2018). As espécies mais conhecidas como produtoras de ACC deaminase são as do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Azotobacter* (Kamran et al., 2016; Misra e Chauhan, 2020; Patil, 2011).

2.3.2. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um nutriente que pode ser encontrado no solo em diversas formas, tais como a amônia, nitrito, nitrato, e na matéria orgânica viva. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo realizado por algumas espécies de bactérias de fundamental importância no fornecimento de nitrogênio para

determinados grupos de plantas (Soumare et al., 2020). Nesse processo, o N_2 presente no ar é convertido em sua forma amoniacal, tornando-o disponível para a absorção vegetal (Zgadza et al., 2016).

A FBN ocorre a partir da enzima nitrogenase, codificada pelo conjunto de genes *nif* (Li e Chen, 2020). Os rizóbios abrangem um grupo de bactérias que realizam uma simbiose fixadora de nitrogênio, onde eles se estabelecem em nódulos radiculares que possuem condições adequadas para a realização do processo de fixação de nitrogênio, já que a nitrogenase é sensível ao oxigênio (Li e Chen, 2020; Rosenblueth et al., 2018). Desse modo, as FBN de vida livre precisam regular sua absorção de metais para adquirir metais essenciais, como o ferro (Fe), o molibdênio (Mo) e vanádio (V). Assim, vários fatores podem influenciar na biodisponibilidade do metal do solo, como o uso eficiente de luz limitante e a fixação de nitrogênio (Rueter e Petersen 1987, Kraepiel et al. 2009).

Além disso, as bactérias fixadoras de nitrogênio possuem inúmeras funções, devido à sua alta diversidade genética, na qual abrange inúmeros benefícios para as plantas, como a produção de ácido indol acético (AIA), produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de proteases, biocontrole, síntese de fitormônios, como a citocinina e a giberelina, entre outros (De Lima et al., 2021; Vejan et al., 2016). Assim, algumas bactérias fixadoras de N, já são amplamente utilizadas e comercializadas na agricultura. São elas representadas, principalmente, pelos gêneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* e *Bacillus* (Hiremath, 2012; Okumura et al., 2012; Rosenblueth et al., 2018; Sessitsch et al., 2002).

2.3.3. Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um macronutriente, sendo um dos minerais essenciais para o crescimento adequado das plantas, já que este é um elemento chave em diversas reações metabólicas (Billah et al., 2019). O P aumenta a atividade fotossintética (Caione et al., 2015), além de estar presente em todos os aspectos de crescimento da planta, desde o desenvolvimento das raízes e fortalecimento dos caules, até na

maturação e produção de energia, sendo considerado como o segundo macronutriente mais importante para plantas, seguido do nitrogênio (Kalayu, 2019).

O fósforo se encontra presente nos solos, porém, em maior concentração em duas formas insolúveis, seja em sua forma inorgânica (mineral) ou orgânica, ambas não são prontamente absorvidas pelas plantas. Há apenas uma pequena fração de fósforo solúvel no solo, na forma de ânions H_2PO_4 e HPO_4 (Wierzbowska et al. 2020), isso revela a necessidade da utilização de fertilizantes fosfatados (Rawat et al., 2021). Assim, o fósforo naturalmente presente no solo pode ser solubilizado por microrganismos com essa capacidade, ou seja, de torna-lo biodisponível para as plantas (Billah et al., 2019; Qiao et al., 2019). Alguns gêneros solubilizadores de fosfatos são: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, entre outros (Gyaneshwar et al., 1999; Otieno et al., 2015).

2.3.4. Produção de sideróforos

O ferro (Fe) é um nutriente essencial e desempenha um papel importante na planta, pois ele é necessário para síntese da clorofila e para o pleno funcionamento do aparelho fotossintético (Broadley et al., 2012; Ferreira et al., 2019). Porém sua biodisponibilidade para microrganismos se encontra em uma baixa parcela no seu estado solúvel, sendo assim limitada (Al Shaer et al., 2020). Assim, ambientes que possuem deficiência de ferro necessitam de microrganismos como bactérias e fungos, para adquirir o ferro nesses ambientes, no qual produzem sideróforos (Ferreira et al., 2019).

Os sideróforos são metabólitos secundários de baixo peso molecular, e possuem alta afinidade com o ferro. Eles possibilitam que microrganismos, como as bactérias, sequestram íons férricos (Fe^{3+}) presentes no ambiente, tornando-o disponível para a absorção vegetal (Al Shaer et al., 2020; Drechsel e Jung, 1998). Espécies de bactérias como *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, têm alta capacidade de produção de sideróforos, até mesmo em ambientes com estresse (Ferreira et al., 2019).

2.4. Mecanismos indiretos

2.4.1. Resistência sistêmica induzida

A resistência sistêmica induzida (RSI) é um estado de defesa da própria planta, induzida por microrganismos benéficos, em resposta às infecções causadas por patógenos, como fungos, bactérias e vírus (Messa, 2021). Esses mecanismos abrangem a produção de espécies reativas de oxigênio, proteínas referentes à patogênese e a formação de barreiras físicas nas paredes celulares (Köhl et al., 2019; Wiesel et al., 2014).

A resistência sistêmica pode ser classificada em dois tipos, a resistência sistêmica induzida (RSI) e a resistência sistêmica adquirida (RSA), sendo sistemas diferentes e independentes (Yu et al., 2022). O SRA é um sistema dependente do ácido salicílico (AS). Esse sistema é ativado após um ataque de fitopatógeno, onde a planta expressa diversos mecanismos de respostas, como sinais que podem chegar a diferentes partes das plantas e também a produção de certas proteínas (Kumar, 2014; Messa, 2021).

Já os mecanismos de defesa da RSI incluem a produção de metabólitos secundários, que previne a proliferação de fungos fitopatogênicos, através da síntese de antibióticos e enzimas que degradam a parede celular, associadas à defesa da planta, como o cianeto de hidrogênio (HCN), as quitinases, proteases, lipases e glucanases, os quais podem ser ativados pela colonização de rizobactérias promotoras de crescimento (Bhattacharyya e Jha, 2012; Olanrewaju et al., 2017; Yavarian et al., 2021).

2.4.2. Produção de antibióticos

A produção de antibióticos está entre os mecanismos indiretos produzidos pelas bactérias, e são toxinas de baixo peso molecular, que ajudam na ação contra o acometimento de diferentes fitopatógenos nas plantas (Tabassum et al., 2017). Os

genes responsáveis pela síntese de antibióticos, são encontrados altamente conservados (Fernando et al., 2006).

Assim, algumas bactérias podem produzir apenas um único antibiótico enquanto outras podem secretar inúmeras substâncias (Reimer e Bode, 2014; Tabassum et al., 2017), podendo ser uma propriedade intrínseca (inerentes ao genoma da espécie) ou adquirida (através de mutações em genes ou transferência horizontal entre outros organismos) (Ramakrishna et al., 2019).

2.4.3. Controle biológico

O controle biológico ou biocontrole está dentre os mecanismos indiretos, pois inibem o funcionamento de patógenos que tentam atacar a planta, podendo ser eles bactérias ou fungos (Olanrewaju et al., 2017). Os agentes de biocontrole, protegem as plantas de diferentes culturas vegetais de danos causados por patógenos, assim, uma vez que esses podem ser limitados por antagonistas de diferentes maneiras (Köhl et al., 2019).

Os microrganismos de controle biológico podem induzir ou aumentar a resistência contra infecções causadas por patógenos, bem como competir com esses por nutrientes e espaço de colonização dos tecidos (Pieterse et al., 2014; Spadaro e Droby, 2016), ou ainda agir de modo direto, como a antibiose, por meio de produção de metabólitos secundários, que afetam o antagonista, concedendo uma vantagem na competição entre eles (Köhl et al., 2019; Mhatre et al., 2019).

Atualmente, o controle biológico de doenças tem se destacado na agricultura, pois trata-se de uma estratégia sustentável e eficaz para o controle de diferentes doenças que acometem as plantas, principalmente as causadas por nematóides, insetos, bactérias e fungos. A demanda por formulações de agentes de biocontrole é grande e tende a crescer, visto as pressões internacionais por um manejo agrícola sustentável (Prajapati et al., 2020; Palmieri et al., 2022)

O uso de bactérias de controle biológico se destaca no manejo de doenças fúngicas, as quais representam perdas consideráveis, além de serem de difícil

controle e necessitem de uso excessivo de fungicidas (Smolińska e Kowalska, 2018). Assim, as bactérias antagonistas agem diretamente na diminuição dos agentes causais e, conseqüentemente, na proteção do cultivo, além de constituírem métodos seguros e de custos relativamente menores (Carmona-Hernandez et al., 2019). Os gêneros de bactérias que se destacam no controle biológico, associadas ao solo e às plantas, são: *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium* (Fira et al., 2018).

2.5. Potencial da cana-de-açúcar para encontrar as BPCPs

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), pertencente à família *Poaceae* (Kellogg, 2013), é uma gramínea C4, alta (Zhao e Li, 2015), cultivada em regiões tropicais e subtropicais, é reconhecida principalmente pela sua capacidade de produção de sacarose, sendo a principal cultura açucareira mundial (Xu et al., 2019). Além de ser considerada importante para a indústria relacionada a produção de bioenergia (Zhao e Li, 2015).

O Brasil, atualmente, representa o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (Camargo et al., 2020), tendo como principal objetivo a produção de açúcar, e a produção de etanol (Dotaniya et al., 2016). Assim, estima-se para a safra de 2022/23 um volume de produção de cana-de-açúcar de 572.874,9 mil toneladas, e um volume calculado relativo à produção de etanol de 25,83 bilhões de litros (Conab, 2022).

O açúcar é obtido a partir do caldo de cana concentrado, extraído do colmo (caule), já o álcool ou etanol, é produzido a partir do processo fermentativo desse caldo (Meghana e Shastri, 2020). Na indústria são aproveitadas todas as partes da planta, mesmo os resíduos dos processos, tal como a vinhaça, um resíduo líquido gerado a partir do processamento da cana-de-açúcar durante a produção de etanol, o qual tem utilidade como fertilizante, pois é rico em nutrientes, como o cálcio, nitrogênio, potássio e matéria orgânica (Moran-Salazar et al., 2016).

Atualmente, o desafio na agricultura é aumentar a produtividade das culturas de cana-de-açúcar com o mínimo de impacto ambiental (Rodrigues et al., 2016), já que, à medida em que aumenta a importância econômica da cana-de-açúcar, também aumenta os anseios de uma produtividade maior e ambientalmente mais sustentável (De Souza et al., 2016). Desse modo, as bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole desempenham um papel fundamental para o crescimento saudável das plantas, minimizando assim, o custo de fertilizantes, os riscos ambientais e suscitando a supressão de doenças (Mehnaz, 2011).

Assim, os microrganismos associados à cana-de-açúcar, têm sido investigados por muito tempo pelo seu potencial em promover o crescimento de plantas (De Souza et al., 2016). Diversos trabalhos apresentam estudos realizados a partir de bactérias isoladas de cana-de-açúcar, cuja caracterização revelou seus benefícios à essa cultura.

O estudo de Rodrigues et al. (2016) teve como objetivo isolar bactérias da família *Enterobacteriaceae* de cana-de-açúcar a fim de avaliar suas capacidades para promover crescimento em plantas. Da mesma forma, o trabalho realizado por Pereira et al. (2019), apresentou a caracterização de potenciais BPCPs isolados da rizosfera da cana-de-açúcar, pertencentes ao gênero *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Microbacterium*, de modo a avaliar seu potencial benéfico em plantas submetidas a estresse hídrico, no qual esses gêneros apresentaram resultados positivos.

Outro estudo com cana-de-açúcar, realizado em casa de vegetação utilizou fontes distintas de fertilizantes fosfatados para determinar a importância das rizobactérias promotoras de crescimento na disponibilização de P para as plantas (Borges et al., 2019). Ainda, Chandra et al. (2021) demonstrou que bactérias, como *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*, isoladas a partir da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar apresentam características de promotores de crescimento, e seriam potenciais candidatos a comporem fórmulas de biofertilizantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comunidades bacterianas selecionadas

Para o processo de isolamento de colônias, foram selecionadas 6 comunidades de bactérias oriundas do ambiente epifítico ou endofítico de colmo ou ambiente epifítico de folha (manejo convencional e manejo orgânico) de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Foram selecionadas as comunidades com melhor desempenho geral, considerando os ensaios realizados *in vitro* e *in planta* para a busca por atributos de promoção de crescimento vegetal (Teheran-Sierra et al., 2021).

Dentre os atributos avaliados há a produção de ACC deaminase, solubilização de fosfato, produção de AIA, além de parâmetros como aumento do peso fresco da raiz e parte aérea relacionados ao crescimento e desenvolvimento de gramíneas (*Brachiaria ruziziensis*) após inoculação. Características relacionadas a mecanismos indiretos como produção de enzimas líticas (quitinases, proteases, entre outras) também foram avaliadas, mas tiveram pouca influência no desempenho geral.

3.2. Isolamento das bactérias

Os isolados foram obtidos a partir do cultivo de uma alíquota de 10 µL do estoque das comunidades. Essa alíquota foi adicionada a 1,1 mL de meio de cultura BRX (Teheran-Sierra et al., 2021) em placas do tipo *deep well* (DW) de 96 poços, que posteriormente foram incubadas à temperatura de 30 °C, com agitação a 250 rpm por um período de 48 h.

Após esse período, a placa foi centrifugada a 4.000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram ressuspensos em 300 µL de solução de NaCl a 0,85% (m/v). A biomassa ressuspensa das comunidades foi submetida à diluição seriada até a uma concentração de 10⁶, sendo a última diluição

plaqueada nos meios de cultura: TSA 10%, meio R2A e BRX. As placas foram, então, incubadas a 30 °C durante 72 h.

Após, as colônias de bactérias terem sido isoladas com base em características morfológicas, tais como tamanho, forma, elevação, cor e textura das colônias. Os isolados foram inoculados em meio de cultura BRX, da mesma forma citada anteriormente, em frascos de 25 mL. Após 48 h, as placas contendo os isolados foram centrifugadas a 4.000 x g por 15 min a 4 °C. Então, os isolados foram ressuspensos em 300 µL de meio de cultura BRX suplementado com glicerol em uma concentração de 20% (m/v). Por fim, foram transferidos 150 µL de cada isolado para microtubos de 1,5 mL e o restante foi estocado a -80 °C.

3.3. Genotipagem dos isolados por ERIC e BOX-PCR

Para avaliar o perfil molecular dos isolados, uma alíquota de 150 µL da biomassa de cada isolado foi lavada com tampão PBS e centrifugada por 1 min a 12.000 rpm para formação de pellets. O DNA genômico dos isolados foi extraído a partir dos pellets lavados, seguindo a metodologia proposta por Marmur (1961). Os DNAs extraídos foram diluídos para uma concentração final de 100 ng.µL⁻¹, e então, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) para amplificações específicas de fragmentos de DNA usando Firepol Master Mix 5x (Solis BioDyne, Tartu, Estônia), com os conjuntos de *primers Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) (Versalovic et al., 1991), e BOX-A PCR (Kyaw et al., 2019), para avaliar o perfil genômico dos isolados. As condições dos ciclos de amplificação foram configuradas de acordo com as estabelecidas por Kumar et al. (2018).

Por fim, os produtos de PCR foram separados em gel de agarose, a 1,5%, e o resultado das bandas foi visualizado e registrado pelo sistema de fotodocumentação Gel Doc XR+ Gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A análise das imagens dos géis foi realizada com o programa PyElph (Pavel e Vasile, 2012) para estimar o peso molecular dos perfis de bandas. A matriz de peso molecular gerada pelo programa foi convertida para formato binário, considerando 1 para presença de bandas e 0 para ausência. A distância foi calculada utilizando a função “dist” com o

método “binary” do pacote R “stats” do software estatístico R (R Core Team, 2021). A clusterização foi feita usando a função “upgma” do pacote R “phangorn” (Schliep, 2011). O dendrograma da clusterização foi gerado pelo pacote R “ggtree” (Yu et al., 2017).

3.4. Identificação das bactérias por sequenciamento do gene *16S rRNA*

O DNA dos isolados selecionados foi extraído usando Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, USA), seguindo as indicações do fabricante. O DNA obtido foi ressuspenso em água ultrapura estéril, quantificado por espectrofotometria em Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA), para conferir pureza e concentração. A amplificação do gene *16S rRNA* foi realizada por PCR com os *primers* 27F e 1492R. A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: 0,5 µL da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 10 µL de tampão 5x Phusion HF, 1,0 µL de dNTPs 10 mM, 2,5 µL do *primer* 27F (10 µM), 2,5 µL do *primer* 1492R (10 µM), 15 µL de DNA com concentração de 10 ng/µL e a solução resultante foi complementada com 18,5 µL de água ultrapura estéril, para atingir o volume de 50 µL.

A amplificação do gene *16S rRNA* foi realizada de acordo com o protocolo do kit utilizado, seguindo uma etapa inicial de desnaturação a 98 °C por 30 segundos, 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento de 57 °C por 30 segundos, extensão à 72 °C por 45 segundos e extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, USA). Os fragmentos purificados foram submetidos a sequenciamento com a metodologia de Sanger (Davidson et al., 2012; Sanger et al., 1977), com a plataforma ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems), utilizando os mesmos referidos *primers* (27F e 1492R) para a obtenção de sequências forward e reverse de cada amplificação, a fim de cobrir a maior parte do gene *16S rRNA*. Também utilizamos o *primer* 907R e o *primer* 1492R em certos casos em que não foi possível considerar o sequenciamento com o *primer* 27F, o qual levou em alguns casos a obtenção de sequências de baixa qualidade que foram descartadas. As

sequências obtidas para as amplificações de cada isolado foram montadas com o programa phredPhrap do pacote Phred-Phrap-Consed (Ewing e Green, 1998).

Após o processo de montagem, bases de baixa qualidade foram removidas com o programa BioEdit (Hall et al., 2011). Para o processo de atribuição taxonômica, as sequências do gene *16S rRNA* foram submetidas ao BLASTn (Altschul et al., 1990), onde foram consultadas em banco de dados de referências específico para este gene (“16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)”). Para este fim, considerou-se a espécie com a melhor correspondência de acordo com a pontuação de alinhamento (“Max Score”). Adicionalmente, as sequências também foram anotadas pela ferramenta “ACT (Alignment, Classification and Tree Service)” da plataforma SILVA (Quast et al., 2013) mantendo os parâmetros pré-selecionados (*default*).

3.5. Ensaios de Atributos de Promoção de Crescimento

3.5.1. Produção de ácido cianídrico (HCN)

Para a avaliação de produção de cianeto de hidrogênio (HCN), foi utilizada uma técnica qualitativa, utilizando meio sólido na qual os isolados foram inoculados em meio TSB suplementado com Glicina 4,4 g/L (El-Sayed et al., 2014). Foi utilizado para esse teste a placa de Petri de tamanho 60 x 15 mm, onde foi colocado na tampa da placa um papel filtro do tipo Whatman No. 1, impregnado com solução indicadora de ácido pícrico (0,5% ácido pícrico em Na₂CO₃ 2%), e depositado 10 uL do inóculo no meio de cultura. Posteriormente, as placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias. A produção de HCN foi marcada pela mudança de cor do papel de filtro de amarelo para laranja-marrom (Goswami et al., 2014).

3.5.2. Produção de sideróforos

Para esse procedimento, a produção de sideróforos foi avaliada utilizando uma técnica quantitativa, utilizando um ensaio líquido (Payne, 1994; Schwyn e Neilands, 1987), onde os isolados foram ativados em meio M9, por 12 h e após esse período, foram centrifugados e a densidade óptica (D.O) foi medida e padronizada

para acima de 1,0. Foram inoculados 10 uL de cada cultivo bacteriano nos poços da placa do tipo DW contendo meio M9, na qual foi incubada por 250 rpm, a 30 °C por um período de 24 h.

Posteriormente, realizou-se uma nova centrifugação para a remoção das células, e coletou-se 500 uL do sobrenadante para ser testado quanto à presença dos compostos. Ao sobrenadante, foi adicionado 500 uL de solução CAS (CTAB, FeCl₃, Cromo azurol S e Piperazina) para a realização da quantificação de sideróforos em espectrofotômetro a 630nm.

A fim de definir a absorbância da amostra (As), foi medida a densidade óptica a 630 nm. A partir de uma solução de controle, composta por meio mínimo e solução de ensaio CAS (sem sideróforos), estabeleceu-se a absorbância de referência (Ar). Assim, o percentual de unidades de sideróforos foi calculado pela seguinte fórmula: $[(Ar-As) / Ar] \times 100 = \% \text{ de unidades de sideróforos}$ (Goswami et al., 2014; Payne, 1994). Vale ressaltar que todo o material utilizado neste teste estavam livres de qualquer resíduo de ferro.

3.5.3. Solubilização de fosfato

Para avaliar a capacidade de solubilizar fosfato, os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio com os seguintes reagentes (g/L): 10g de glicose; 0,05g de extrato de levedura, 15g de ágar; 50 mL de CaCl₂ a 10% e 25 mL de K₂HPO₄ a 10%. Os reagentes CaCl₂ a 10% e K₂HPO₄ a 10% foram esterilizados separadamente e misturados com os demais na hora de verter. As placas foram incubadas por até 96 h a 30 °C e fotografadas para a obtenção de medidas de área de halos e colônias.

Os isolados que desenvolveram zonas claras ao redor de suas colônias, foram considerados PSBs (bactérias solubilizadoras de fosfato) (Kumar Meena et al., 2015; Pande et al., 2017), as imagens obtidas durante esse período foram analisadas no software Fiji (Schindelin, 2012) e o índice de solubilização de fosfato

(SI), calculado usando a equação abaixo (Pande et al., 2017): $SI = \frac{\text{Área da colônia} + \text{Área do halo}}{\text{Área da colônia}}$.

3.5.4. Produção de Quitinase

Para determinar a produção de quitinase, foi realizado um teste contendo quitina coloidal. As amostras contendo os isolados foram inoculadas em meio BRX, com crescimento de 24h, e transferidos 1,5 mL de cada cultivo para a placa DW, onde foi centrifugada a 3.500 rpm por 25 min, 4 °C. Após isso, as células foram lavadas com PBS 1x e ao finalizar, os isolados foram carimbados em placas de Petri (140x15) contendo o meio com quitina coloidal (Gómez Ramírez et al., 2004), com os seguintes reagentes: 15g/L de ágar, 10/L de quitina coloidal, 0,7g/L de K_2HPO_4 , 0,5g/L de $MgSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.3g/L de KH_2PO_4 , 0.01g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0mg/L de $MnCl_2$ e 1.0mg/L de $ZnSO_4$ com pH 7. O processo foi feito em triplicata.

Após isso, as placas foram incubadas à 30 °C, por 7 dias e a atividade quitinolítica foi confirmada pela formação de um halo de hidrólise, caracterizados pelo aparecimento de zonas claras em torno das colônias cultivadas em placas de ágar quitina (Modi e Patel, 2017; Salas-Ovilla et al., 2019). Para a quantificação dos halos produzidos pelos isolados, as placas foram fotografadas e as imagens foram processadas usando o software FIJI (Schindelin, 2012), medindo a área das colônias (AC) e dos halos (AH), gerando, assim, um índice de degradação de quitina (SI), utilizando o cálculo: $SI = AC + (AH / AC)$ (Pande et al., 2017).

3.5.5. Produção de proteases, lipases e esterases

Para a realização do teste de proteólise foi usado um meio de ágar e leite desnatado (Szilagyi-Zecchin et al., 2014), contendo: leite desnatado 10 g/100 mL, TSB $\frac{1}{5}$, 30g/L, ágar 4% 40g/L. As placas foram inoculadas e incubadas a 30 °C por um período de 3 dias, o teste foi considerado positivo quando os inóculos apresentaram halos claros ao redor das colônias (Ramnath et al., 2017). Para a quantificação dos halos produzidos pelos isolados, foi utilizado o software FIJI

(Schindelin, 2012) e o índice enzimático foi avaliado através do índice de solubilização: $SI = \frac{\text{Área da colônia} + \text{Área do halo}}{\text{Área da colônia}}$ (Pande et al., 2017).

Já para os testes de lipases e esterases foram utilizados 1% de Tween 20 e Tween 80 como substratos destas enzimas, respectivamente. Os meios contendo os substratos, foram preparados, como (g/L): 10g/L de peptona, 5g/L de NaCl, 0,1g/L de CaCl_2 , 15g/L de ágar, 10 mL de Tween 20 e 10 mL de Tween 80 (Ramnath et al., 2017). As placas foram incubadas por 7 dias a 30 °C e a formação de um precipitado na cor branca embaixo das colônias foi considerado como resultado positivo para produção e ação da enzima.

3.5.6. Atividade de celulase e amilase

Foram realizados testes de metabolismo dos polissacarídeos avicel (celulose microcristalina), celulose (carboximetilcelulose sódica) e amido em ágar contendo os substratos para o meio adequado: CMC-Na; em g/ L: 2,0 de KH_2PO_4 , 1,4g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 de CaCl_2 , 0,4 de extrato de levedura, 0,005 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0016 de MnSO_4 , 0,0017 de ZnCl_2 , 0,002 de CoCl_2 , 5,0 de CMC-Na ou 5,0 de amido ou 5,0 de avicel, e por fim, 15g de ágar, pH 5,0 (Liang et al., 2014).

Após o preparo das placas, elas foram incubadas a 30 °C por 5 dias, e a presença do halo ao redor das colônias foi o critério utilizado para considerar resultado positivo para a atividade de celulase em determinado substrato. Para esse ensaio, as placas foram tratadas com 10 mL de solução de vermelho congo $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ por 15 min e lavadas com solução de NaCl 1M por 15 min. Para o teste de amido, as placas foram tratadas com iodo, onde a presença de um halo claro ao redor da colônia foi o critério utilizado para considerar resultado positivo para atividade de amilase (Teheran-Sierra et al., 2021).

3.5.7. Tolerância a NaCl e glicerol

Para o teste de tolerância de NaCl e glicerol, foram definidas diferentes concentrações de NaCl, como: 0,5%, 2,0%, 5,0%, 6,0%, 8,0%, 10,0% e 15,0%; e glicerol: 5,0%, 15,0% e 25,0%. Os isolados foram inoculados em placas de DW, contendo 1,1 mL de meio LB com as diferentes concentrações determinadas para a tolerância de NaCl, e para o glicerol foi utilizado o meio BRX trocando o xarope de cana-de-açúcar por glicerol. Após isso, as placas foram incubadas a 30 °C em 250 rpm e o crescimento foi medido pela absorbância a 595 nm.

As quantificações das placas foram realizadas utilizando microplacas Elisa no leitor de placas iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), a leitura foi realizada duas vezes, a primeira quando os isolados foram inoculados nos respectivos meios e após 24 h de crescimento. Vale ressaltar que foram incluídos controles negativos de cada meio sem inóculo para o cálculo da absorbância final em cada tratamento (Teheran-Sierra et al., 2021).

3.5.8. Produção de Biofilme

O método utilizado para testar a produção de biofilme foi conduzido de acordo com a metodologia de O'Toole (2011), usando o meio BRX base. Os isolados foram ativados por 24 h, agitados em 120 rpm a 30 °C em meio BRX e, em seguida, foram centrifugados e lavados com tampão PBS 1X. Os meios de cultura foram inoculados à razão de 1:100 (inóculo:meio) e uma alíquota de 100 µL dos meios foram depositados na placa DW, sendo realizadas oito réplicas por tratamento, bem como um controle negativo contendo o meio sem inóculo.

As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h, e posteriormente, lavadas 3 vezes com água Milli-Q estéril e em cada poço foi depositado 125 µL de solução de cristal violeta 0,1% e incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com água Milli-Q e secas “*overnight*” em temperatura ambiente. Após isso, foram adicionados 125 µL de ácido acético 30% e incubadas por 15 min à temperatura ambiente.

Desse modo, a absorbância de cada tratamento, do controle negativo e do branco de ácido acético 30%, foi quantificada a 550 nm em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, USA). Os resultados tiveram suas médias comparadas com a média do controle e para a comparação da distribuição dos diferentes tratamentos, utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, no qual verificou-se a rejeição da hipótese de igualdade das distribuições dos tratamentos com uma confiabilidade de 95% (p -valor < 0,05).

3.5.9. Produção de Amônia

Nesse experimento, foi aplicado o método do reagente Nessler, onde o iodeto e íons de mercúrio reagem com amônia em condições alcalinas para produzir um complexo marrom-avermelhado (Zhao et al., 2019). Dessa forma, os isolados foram ativados por 24 h em meio BRX e posteriormente, 10 uL desse meio com os isolados foram cultivados em placas DW, contendo 1,1 mL de caldo de Água Peptonada, por um período de 72h (Barra et al., 2008).

Após o crescimento, as placas foram centrifugadas a 4.000 rpm, 30 min por 4 °C, e 1 mL do sobrenadante dos isolados, foi misturado com 1 mL do reagente Nessler em tubos de ensaio de tamanho mediano. A presença de coloração marrom-avermelhada nos tubos, foi indicativa de produção de amônia e, então, sua densidade óptica foi medida usando o espectrofotômetro em 450 nm. A concentração de amônia foi estimada usando a curva padrão de sulfato de amônio no intervalo de 0,1–1 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Goswami et al., 2014).

3.5.10. Fixação de nitrogênio

O teste de fixação de nitrogênio foi realizado, de forma qualitativa, seguindo a metodologia de Weber et al., (1999) e Kuss et al., (2007), onde implementa-se meio NFb livre de nitrogênio. Com isso, os isolados bacterianos foram cultivados no meio BRX por 24 h para a sua ativação. Após o crescimento dos isolados durante esse período houve a centrifugação a 4.000 rpm, 30 min por 4 °C e após houve a lavagem das células bacterianas.

A seguir foi medida a D.O para concluir a concentração celular, sendo padronizada entre 0,500 a 0,999. Desse modo, foi inoculado 10 μ L de cada isolado na placa de petri de tamanho 60 x 15 mm, contendo o meio NFb sólido. Após a inoculação, as placas foram colocadas na estufa a 30 °C durante 5 dias. Em seguida, as placas foram fotografadas e avaliadas, foi considerado positivo para fixação de nitrogênio a mudança de cor do meio, de verde claro para a cor azul-esverdeada, sendo também considerado o aspecto visual relativo à troca de coloração, a qual pode ocorrer com maior ou menor intensidade para alguns isolados.

3.5.11. Produção de ácido 3-indol acético (AIA)

Para a realização do teste de produção de AIA, foi implementada a metodologia descrita por Ambrosini e Passaglia (2017), a qual utiliza meio líquido com Triptofano. Os isolados foram cultivados em 1,1 mL de meio LB suplementado com 1 mg.mL⁻¹ de L-Triptofano em placas do tipo DW por 48 h a 30 °C, sob agitação constante a 250 rpm.

Após isso, as placas DW contendo os isolados, foram centrifugadas a 30 min 4.000 $\times$ g e uma alíquota de 500 μ L de cada suspensão, com duas repetições para cada isolados, foi retirada e misturada com 1 mL do reagente de Salkowski (1 mL de FeCl₃.6 H₂O 0,5 M em 50 mL de HClO₄ a 70%). Por fim, as placas foram incubadas a temperatura ambiente, no escuro, por 30 min e, então, lidas. A concentração de AIA foi detectada a 530 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO e comparadas com uma curva padrão de AIA (10 - 100 μ g.mL⁻¹) (Teheran-Sierra et al., 2021).

3.5.12. Quantificação da atividade de ACC deaminase

Neste ensaio, o meio de cultura para quantificação deve conter o substrato ACC, a fim de avaliar a capacidade de metabolizar o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) mediante a ação da enzima ACC-deaminase, com a consequente liberação de ácido alfa-ceto butírico (Penrose e Glick, 2003).

Primeiramente, os isolados selecionados foram ativados em BRX e colocados sob agitação por 24 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 30 min e o sobrenadante, descartado. Após isso, as células foram lavadas com meio estéril de sais DF, segundo a fórmula de Dworkin e Foster (1958), e ressuspensos em 10 mL de meio DF contendo ACC 3 mM, com a finalidade de induzir a produção da enzima nos isolados.

Os inóculos foram colocados em agitação por mais 24 h e depois desse período, foram centrifugados e duplamente lavados com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6. Na sequência, os inóculos foram ressuspensos em 600 μ L de Tris-HCl 100 mM pH 8,5. Por fim, foi misturado 30 μ L de tolueno com a suspensão celular para a obtenção de extratos celulares e, após a agitação por vortex, um volume de 100 μ L foi separado para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).

Para a quantificação da enzima ACC deaminase, 20 μ L de uma solução de ACC 0,5 M foi adicionado a um volume de 300 μ L do cultivo contendo as células tratadas com tolueno, misturado e incubado em banho-maria a 30 °C por 15 min. Logo após, 1 mL de HCl 0,56 M foi adicionado e misturado.

Depois desse processo, a suspensão foi centrifugada e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e misturado com 800 μ L de HCl 0,56 M. Então, foram adicionados 200 μ L de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (2,4-dinitrofenil-hidrazina 0,2% em HCl 2 M). A mistura foi incubada novamente em banho-maria a 30 °C por 30 min e a reação foi concluída com a adição de um volume de 2 mL de NaOH (2N). As amostras foram lidas em duplicatas e a absorbância foi medida em espectrofotômetro Multiskan GO a 540 nm e comparadas com uma curva padrão de ácido alfa ceto-butírico (0,05-1 μ mol).

3.6. Ensaio de antagonismo

3.6.1. Fungos fitopatogênicos

Para a avaliação de antagonismo foram utilizados isolados de fungos fitopatogênicos pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia do

Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil.

Foram empregadas espécies de fungos fitopatógenos de amplo espectro (vários hospedeiros) e fitopatógenos específicos, de cana-de-açúcar e de outras culturas. Foram priorizadas espécies de fungos mais comuns em cana-de-açúcar, como o gênero *Colletotrichum*, além também, de fungos que podem infectar membros da mesma família *Poaceae*, como *Fusarium* e *Rhizoctonia*.

Os fungos fitopatogênicos utilizados, foram: *Alternaria* sp. (citros), *Botrytis cinerea* (podridão da banana), *Colletotrichum* sp. (cana-de-açúcar e citrus), *Didymella* sp., *Fusarium* sp. (cebola e milho), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. (arroz) e várias espécies de *Macrophomina*, como: *M. pseudophaseolina*, *M. phaseolina* e *M. euphorbiicola*.

3.6.2. Antagonismo direto

As atividades de antagonismo direto foram analisadas por meio de um ensaio de enfrentamento aos patógenos em meio BDA (Caulier et al., 2018). Os isolados bacterianos foram cultivados inicialmente em meio BRX, por 24 h sob agitação constante de 150rpm a 30 °C. Para avaliação *in vitro* da capacidade de inibição do crescimento dos fungos, gotas de 5 µL de cada cultura bacteriana cultivada em BRX, onde foram adicionadas em uma das extremidades das margens das placas com BDA.

O inóculo do fungo partiu de um disco de aproximadamente 5 mm de diâmetro do micélio da cultura do fungo fitopatogênico crescido em placa com BDA e colocado no centro da placa, entre as posições onde foram depositadas as gotas com os cultivos bacterianos. Como controle, foi realizado o cultivo do micélio do fungo sem qualquer inóculo bacteriano.

Após o inóculo das bactérias e dos fungos, as placas foram incubadas a 25 °C e a avaliação foi realizada quando o crescimento do fungo na placa controle atingiu a borda da placa. A porcentagem de inibição de crescimento micelial (GI%) foi calculada, comparando a área de superfície coberta pelo patógeno na presença do isolado e o controle negativo, conforme descrito por Caulier et al. (2018). Graduou-se a atividade antagonista em quatro classes: (1) GI <30%; (2) GI ≥ 30% e < 50%; (3) GI ≥ 50% e < 70%; e (4) GI ≥ 70%.

3.6.3. Produção de compostos voláteis para patógenos fúngicos

Nesse procedimento, foram utilizadas placas de Petri bipartidas nas quais, em um lado continha o meio BDA para o fitopatógeno e no outro, o meio TSB para o crescimento dos isolados bacterianos. Então, foram adicionados 0,1 mL da cultura do antagonista em fase logarítmica de crescimento na parte da placa de Petri contendo meio de cultura TSB, onde houve um espalhamento uniforme. Do outro lado (meio BDA), foi depositado um disco de 0,5 cm de diâmetro contendo o micélio do fungo antagonista (Romeiro, 2007).

Como controle, placas de Petri contendo apenas os fungos fitopatógenos foram incubadas a 28±2 °C e o diâmetro da colônia dos patógenos do teste foi medido após uma semana. A inibição percentual do crescimento micelial dos patógenos testados foi calculada de acordo com a fórmula: $PI (\%) = 100 \times [(C-T)/C]$; onde, C = área do crescimento do patógeno no controle e T = área de crescimento do patógeno no tratamento (Alijani et al., 2019).

4. RESULTADOS

4.1. Isolados e genotipagem

Inicialmente, o processo de isolamento das comunidades selecionadas resultou na obtenção de 73 isolados. Em cada comunidade (C) havia até 6 tipos distintos de morfologia, sendo que as comunidades C7, C8 e C12 obtiveram cinco morfotipos diferentes e um total de 15, 13 e 12 isolados, respectivamente. A partir da comunidade C9 foi recuperado o maior número de morfotipos, sendo 6 distintos e um total de 18 isolados. Já a comunidade C27, atingiu 3 diferentes morfotipos, dentre 9 isolados. Por fim, a comunidade C28 contemplou apenas 2 morfotipos distintos, dentre os 6 isolados obtidos (Tabela 1).

Tabela 1. Comunidades selecionadas e suas origens em ambientes de cana-de-açúcar, números de morfotipos e isolados selecionados.

Comunidades	Tecido	Nicho	Manejo	Nº Morfotipos	Nº de isolados total	Nº de isolados selecionados
C7	Colmo	Epifítico	Convencional	5	15	8
C8	Colmo	Endofítico	Convencional	1	13	6
C9	Colmo	Epifítico	Convencional	6	18	10
C12	Colmo	Epifítico	Convencional	5	12	6
C27	Folha	Endofítico	Orgânico	3	9	4
C28	Colmo	Endofítico	Convencional	2	6	2

Com o objetivo de avaliar perfis distintos e remover as redundâncias entre os isolados, foi avaliado o perfil genômico destes a partir dos *primers* ERIC e BOX-A. Assim, foi realizado um processo de genotipagem dos 73 isolados obtidos, onde foi possível selecionar 36 perfis distintos, os quais foram considerados para as demais análises (Material suplementar Fig. 1A).

Os resultados do processo de designação taxonômica a partir do sequenciamento do gene *16S rRNA* dos isolados evidenciaram uma diversidade de 13 gêneros distintos, sendo eles: *Cryseobacterium* (4), *Stenotrophomonas* (1), *Shingobacterium* (1), *Enterobacter* (17), *Pantoea* (1), *Agromyces* (2), *Dermacoccus* (1), *Terribacillus* (3), *Microbacterium* (2), *Pseudolysinimonas* (1), *Protaetiibacter* (1), *Microvirga* (1) e *Serratia* (1) (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação taxonômica dos isolados de acordo com as consultas realizadas

utilizando alinhamentos de sequências em bancos de dados referência para gene 16S rRNA, GenBank (BLASTn) e SILVA (ACT).

BLAST				SILVA	
Isolated	Species	GenBank Acc. nº	Identity	Taxa	Identity
7-1C	<i>Chryseobacterium gleum</i>	NR_113722.1	98,80%	<i>Chryseobacterium</i>	98,91%
7-2C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99,30%	<i>Stenotrophomonas</i>	99,53%
7-3B	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	NR_113706.1	99,61%	<i>Sphingobacterium</i>	99,76%
7-4A	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,68%	<i>Enterobacter</i>	99,68%
7-4C	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	98,54%	<i>Enterobacter</i>	99,45%
7-5A	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_111998.1	98,08%	<i>Enterobacter</i>	98,86%
7-5B	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	100%	<i>Enterobacter</i>	100%
7-5C	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,61%	<i>Enterobacter</i>	99,61%
8-1B	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,54%	<i>Enterobacter</i>	99,47%
8-2B	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,69%	<i>Enterobacter</i>	99,62%
8-3B	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,44%	<i>Enterobacter</i>	98,10%
8-4A	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,76%	<i>Enterobacter</i>	99,76%
8-5B	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,44%	<i>Enterobacter</i>	99,44%
8-5C	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,69%	<i>Enterobacter</i>	99,62%
9-1A	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,44%	<i>Enterobacter</i>	99,44%
9-1B	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	100%	<i>Enterobacter</i>	100%
9-1C	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,68%	<i>Enterobacter</i>	99,68%
9-2A	<i>Agromyces humi</i>	NR_174218.1	97,68%	<i>Agromyces</i>	96,84%
9-3A	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	NR_044872.1	98,75%	<i>Micrococcales</i>	98,75%
9-4A	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	NR_041356.1	99,85%	<i>Terribacillus</i>	98,73%
9-4B	<i>Terribacillus goriensis</i>	NR_043895.1	99,78%	<i>Terribacillus</i>	99,33%
9-4C	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	NR_041356.1	99,92%	<i>Terribacillus</i>	99,39%
9-5A	<i>Agromyces humi</i>	NR_174218.1	97,57%	<i>Agromyces</i>	96,72%
9-6B	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	98,95%	<i>Enterobacter</i>	98,95%
12-1A	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	NR_114342.1	99,45%	<i>Microbacterium</i>	99,45%
12-2C	<i>Enterobacter mori</i>	NR_146667.2	99,65%	<i>Enterobacter</i>	99,65%
12-3B	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	NR_114342.1	99,61%	<i>Microbacterium</i>	99,61%
12-4A	<i>Pseudolysinimonas kribbensis</i>	NR_044240.1	98,41%	<i>Microbacteriaceae</i>	98,42%
12-4B	<i>Protaetiibacter larvae</i>	NR_173588.1	98,67%	<i>Microbacteriaceae</i>	98,27%
12-5A	<i>Microvirga zambiensis</i>	NR_117847.1	99,13%	<i>Microvirga</i>	98,18%
27-1A	<i>Chryseobacterium camelliae</i>	NR_133724.1	98,76%	<i>Chryseobacterium</i>	98,76%
27-1C	<i>Chryseobacterium hagamense</i>	NR_115852.1	97,79%	<i>Chryseobacterium</i>	97,80%
27-2A	<i>Enterobacter asburiae</i>	NR_024640.1	98,84%	<i>Enterobacter</i>	98,84%
27-3A	<i>Serratia surfactantfaciens</i>	NR_169468.1	99,62%	<i>Serratia</i>	99,69%
28-1C	<i>Chryseobacterium camelliae</i>	NR_133724.1	98,74%	<i>Chryseobacterium</i>	98,74%
28-2C	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	NR_116756.1	98,33%	<i>Enterobacter</i>	98,57%

4.2. Perfis de traços de controle biológico e promoção de crescimento vegetal

Nos testes de proteases, foram encontrados oito isolados com capacidade proteolítica em meio com leite desnatado, *Chryseobacterium gleum* (7-1C) com 7,85, *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C) com 11,51, *Dermacoccus nishinomiyaensis* (9-3A) com 11,67, *Microbacterium saccharophilum* (12-1A) com 3,98, *Chryseobacterium camelliae* (27-1A e 28-1C) com 11,87 e 12,50 respectivamente, *C. hagamense* (27-1C) com 12,02, e *Serratia surfactantfaciens* (27-3A) com 5,84 (Tabela 3).

Já para a detecção de lipases foi possível detectar produção nos isolados *Chryseobacterium gleum* (7-1C), *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), *Sphingobacterium multivorum* (7-3B), *Dermacoccus nishinomiyaensis* (9-3A), *Terribacillus saccharophilus* (9-4A), *Serratia surfactantfaciens* (27-3A), *C. hagamense* (27-1C) e *Chryseobacterium camelliae* (27-1A e 28-1C).

No teste de esterases foi possível detectar a produção nos isolados *Chryseobacterium gleum* (7-1C), *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), *Sphingobacterium multivorum* (7-3B), *Dermacoccus nishinomiyaensis* (9-3A), *Microbacterium saccharophilum* (12-1A), *Chryseobacterium camelliae* (27-1A e 28-1C), e *Serratia surfactantfaciens* (27-3A) (Tabela 3).

Nos testes de produção de celulasas (avicel e CMC) e amilases (amido), não se registrou qualquer atividade por parte dos isolados (Tabela 3). Também não foi possível detectar a capacidade de produção de HCN dentre o período de 48 h até sete dias de incubação, já que nenhuma mudança foi observada no indicador de ácido pícrico.

Referente a produção de sideróforos, notou-se a presença em todos os isolados, que apresentaram valores variando entre 9,16% (*Sphingobacterium multivorum* [7-3B]) a 44% (*Enterobacter cancerogenus* [28-2C]). Quanto ao teste de biofilme, notou-se a produção nos isolados 9-4B e 28-1C. Sendo que o *Chryseobacterium camelliae* (28-1C) apresentou produção máxima (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos mecanismos diretos e indiretos de diferentes traços de promoção de crescimento dos 36 isolados.

Mecanismos Diretos							Mecanismos Indiretos								
Isolados	Fixação de nitrogênio	Índice solubilização de fosfato	AIA (µg/mL)	ACC d. (nmol mg ⁻¹ h ⁻¹)	Amônia umol/ml	Sideróforos%	Biofilme Abs 550nm	Índice de Quitina	Protease	Esterase tween 20	Lipase tween 80	Avicel	Amilase	Celulase CMC	HCN
7-1C	-	-	-	7,21	3,88	25,71	-	-	7,85	+	+	-	-	-	-
7-2C	+	-	-	6,16	8,73	16,82	-	6,24	11,51	+	+	-	-	-	-
7-3B	-	-	9,57	21,55	3,83	9,19	-	-	-	+	+	-	-	-	-
7-4A	+	2,58	4,48		3,72	30,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-4C	+	2,58	2,36	54,40	6,03	26,79	-	0-	-	-	-	-	-	-	-
7-5A	+	2,37	3,52		3,97	13,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-5B	-	2,43	1,89		3,87	11,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-5C	+	2,43	2,94		3,71	13,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-1B	+	2,81	4,16		3,79	13,58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-2B	+	2,83	4,23		3,58	24,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-3B	+	2,45	3,15		4,02	31,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-4A	+	2,47	2,10		4,02	38,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-5B	+	2,80	10,70		4,13	19,89	-	3,26	-	-	-	-	-	-	-
8-5C	+	2,50	2,91		3,87	33,53	-	3,57	-	-	-	-	-	-	-
9-1A	+	2,48	0,90		3,5	31,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-1B	+	2,33	1,88		3,95	26,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-1C	+	2,49	2,04		3,51	32,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-2A	-	-	-	97,21	7,03	28,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-3A	-	-	-		2,86	33,64	-	-	11,67	-	+	-	-	-	-
9-4A	-	-	5,45		4,85	29,01	-	-	-	+	-	-	-	-	-

9-4B	-	-	2,61	-	5,87	30,35	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9-4C	-	-	4,67		2,78	25,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-5A	-	-	-		3,71	26,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-6B	+	2,92	5,36		3,44	24,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-1A	+	-	4,73		2,71	29,26	-	-	3,98	+	-	-	-	-	-
12-2C	-	2,89	4,17	58,37	5,27	23,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-3B	-	-	7,08		3,29	32,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-4A	-	-	1,70		2,9	29,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-4B	-	-	1,42		3,34	34,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-5A	-	-	0,94		3,13	30,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27-1A	-	-	4,35	28,34	4,22	25,04	-	-	11,87	-	+	-	-	-	-
27-1C	-	-	3,94	24,16	4,13	34,31	-	-	12,02	-	+	-	-	-	-
27-2A	+	2,62	6,79		4,52	43,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27-3A	+	7,33	2,30	28,07	6,56	25,91	-	5,45	5,84	+	+	-	-	-	-
28-1C	+	-	4,23	52,70	4,33	34,83	+	-	12,50	+	+	-	-	-	-
28-2C	+	2,72	5,90		3,58	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: - sem atividade; + com atividade.

A atividade de quitinase foi detectada em 4 dos 36 isolados testados: *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), *Enterobacter mori* (8-5B e 8-5C) e *Serratia surfactantfaciens* (27-3A). O destaque nesse teste foi *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C) a qual apresentou o maior índice de degradação de quitina (6,24) (Tabela 3).

Para a produção de amônia foi possível observar que 6 isolados tiveram produção maior que $5,00 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, sendo o maior de $8,73 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para o isolado *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), sendo o destaque entre os demais. A menor produção foi para o isolado *Microbacterium saccharophilum* com apenas $2,71 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (12-1A).

No teste realizado para a fixação de nitrogênio, utilizando meio livre de nitrogênio, a maioria dos isolados apresentaram fixação de nitrogênio, sendo eles: *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), *Enterobacter mori* (7-4A, 7-4C, 7-5C, 8-1B, 8-2B, 8-3B, 8-4A, 8-5B, 8-5C, 9-1A, 9-1B, 9-1C, 9-6B), *Pantoea agglomerans* (7-5A), *Microbacterium saccharophilum* (12-1A), *Enterobacter asburiae* (27-2A), *Serratia surfactantfaciens* (27-3A), *Chryseobacterium camelliae* (28-1C) e por fim *Enterobacter cancerogenus* (28-2C).

No total, 19 dos 36 isolados apresentaram zona de solubilização de fósforo em placa. O maior índice de solubilização foi registrado para o isolado *Serratia surfactantfaciens* (27-3A), sendo este 7,33. O menor índice foi detectado para *Enterobacter mori* (9-1B), sendo este de 2,33. Porém a média se manteve entre 3,0 e 2,5 (Tabela 3). Registrou-se também produção de ácido 3-indolacético em 32 isolados, com o valor máximo de produção de $10,70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o *Enterobacter mori* (8-5B) (Tabela 3).

Para o teste de atividade da enzima ACC-deaminase, foram considerados para esses teste somente os isolados com maior desempenho no experimento de produção de amônia ($> 5,0 \mu\text{mol.mL}$), bem como aqueles cuja taxonomia indicava precedentes de produção dessa enzima na literatura. Dessa forma, foram selecionados os seguintes isolados: *Chryseobacterium gleum* (7-1C), *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), *Sphingobacterium multivorum* (7-3B), *Enterobacter mori* (7-4C e 12-2C), *Agromyces humi* (9-2A), *Terribacillus goriensis* (9-

4B), *Chryseobacterium camelliae* (27-1A e 28-1C), *Chryseobacterium hagamense* (27-1C) e *Serratia surfactantfaciens* (27-3A). Dentre esses, detectou-se a produção em 10 dos 11 isolados selecionados, exceto para o isolado *Terribacillus goriensis* (9-4B). Os valores variaram de 6,16 a 97,21 nmol mg⁻¹h⁻¹, sendo este maior valor obtido para o *Agromyces humi* (9-2A) (Tabela 3).

O crescimento dos isolados em meio suplementado com NaCl sob diferentes concentrações, apresentaram como resultado um declínio gradual na D.O. a medida em que se elevou as concentrações testadas (Tabela 4). A concentração de LB inicial (0,5% de NaCl) apresentou o maior número de isolados tolerantes (Tabela 4).

Além disso, 19 dos 36 isolados testados toleraram até a concentração de 8,0%, destacando-se o gênero *Enterobacter* (Isolados: 7-4A, 7-4C, 7-5B, 7-5C, 8-1B, 8-2B, 8-3B, 8-4A, 8-5B, 8-5C, 9-1A, 9-1B, 9-1C 9-6B e 12-2C, 27-2A e 28-2C) e as espécies, *Pantoea agglomerans* (7-5A) e *Serratia surfactantfaciens* (27-3A). Foram testadas as concentrações de 10 e 15% de NaCl, porém nenhum dos isolados foi capaz de tolerar essas concentrações. Para a tolerância à glicerol, 27 isolados resistiram a concentração inicial (5%), porém nenhum isolado tolerou concentrações superiores (15 e 25%) (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados de testes de tolerância a NaCl e glicerol. Para o caso do teste de tolerância a NaCl foi usada uma escala baseada no aumento da turbidez.

Isolados	NaCl 0,5%	NaCl 2,0%	NaCl 5,0%	NaCl 6,0%	NaCl 8,0%	Glicerol 5,0%	Glicerol 15,0%
7-1C	+	+	-	-	-	+	-
7-2C	+	+	+	-	-	-	-
7-3B	+	+	-	-	-	+	-
7-4A	+	+	+	+	+	+	-
7-4C	+	+	+	+	+	+	-
7-5A	+	+	+	+	+	+	-
7-5B	+	+	+	+	+	+	-
7-5C	+	+	+	+	+	+	-
8-1B	+	+	+	+	+	+	-
8-2B	+	+	+	+	+	+	-
8-3B	+	+	+	+	+	+	-
8-4A	+	+	+	+	+	+	-

8-5B	+	+	+	+	+	+	-
8-5C	+	+	+	+	+	+	-
9-1A	+	+	+	+	+	+	-
9-1B	+	+	+	+	+	+	-
9-1C	+	+	+	+	+	+	-
9-2A	-	-	-	-	-	+	-
9-3A	+	-	-	-	-	+	-
9-4A	-	-	-	-	-	-	-
9-4B	-	-	-	-	-	-	-
9-4C	-	-	-	-	-	-	-
9-5A	+	-	-	-	-	+	-
9-6B	+	+	+	+	+	+	-
12-1A	+	+	-	-	-	-	-
12-2C	+	+	+	+	+	+	-
12-3B	+	+	-	-	-	+	-
12-4A	-	-	-	-	-	-	-
12-4B	-	-	-	-	-	-	-
12-5A	-	-	-	-	-	-	-
27-1A	+	+	-	-	-	+	-
27-1C	+	+	-	-	-	-	-
27-2A	+	+	+	+	+	+	-
27-3A	+	+	+	+	+	+	-
28-1C	+	+	-	-	-	+	-
28-2C	+	+	+	+	+	+	-

Legenda: leitura D.O. (595nm): ≤0,1: -; 0,1-1,0: +.

4.3. Teste de antagonismo contra fitopatógenos

Para o teste de antagonismo direto em cultivo dual, notou-se que nenhum dos isolados apresentou efeitos inibitórios sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos. Contudo, foi observada uma formação de “goma” no crescimento dos isolados *Serratia surfactantfaciens* e *Microbacterium saccharophilum* (27-3A e 12-1A), quando co-inoculados com o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp., oriundo da cana-de-açúcar.

Para avaliar a produção de compostos orgânicos voláteis, foram considerados apenas os isolados oriundos de grupos bacterianos com produção previamente reportada (Ezrari et al., 2021; Gong et al., 2019; Kumar et al., 2021; Rojas-Solís et al., 2018; Su et al., 2016). Dessa forma, foram selecionados os isolados: *Cryseobacterium gleum* (7-1C), *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), *Sphingobacterium multivorum* (7-3B), *Enterobacter mori* (7-4C) e *Serratia surfactantfaciens* (27-3A).

Com isso, o isolado *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C) apresentou no total 63,67% de inibição contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. (cana-de-açúcar) (Material Suplementar; Fig. 2A-A) e o isolado *Enterobacter mori* (7-4C), apresentou 32,96% de inibição contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. (citrus) (Material Suplementar; Fig. 2A-B). O isolado *Serratia surfactantfaciens* (27-3A) apresentou 45,02% de inibição contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. (cana-de-açúcar) (Material Suplementares; Fig 2A-C) e 75,95% de inibição contra o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* (Material Suplementar; Fig 2A-D).

5. DISCUSSÃO

A genotipagem feita com os marcadores utilizados neste trabalho, ERIC e BOX-A, é considerado um método rápido e altamente discriminatório para cepas bacterianas (Zhai et al., 2010). Pode-se afirmar que o perfil obtido com ERIC e BOX-A foi capaz de refletir a diversidade genética dos isolados de forma objetiva, permitindo-nos selecionar isolados distintos mesmo quando estes apresentavam morfotipos semelhantes, já que tais sequências repetitivas variam em frequência em diferentes genomas bacterianos (De Lima et al., 2021; Freitas et al., 2008).

Apesar do gene *16S rRNA* ser muito utilizado para identificação taxonômica de bactérias, ele pode possuir limitações na classificação de determinados grupos, especialmente quando utilizado apenas regiões parciais do mesmo (Johnson et al., 2019). Além disso, a dependência de sequências-referências depositadas em bancos de dados pode levar a um baixo poder discriminatório para distinguir espécies pouco estudadas ou desconhecidas (Dixit et al., 2021).

Assim, verifica-se que nem sempre há correspondência entre a identificação obtida através do sequenciamento desse gene, quando comparado ao sequenciamento do genoma completo (Funniceilli et al., 2021; Janda e Abbott, 2007). Abordagens mais recentes têm utilizado análises genômicas para identificação de novas espécies a partir de métodos *in-silico* como dDDH e ANI (Prior et al., 2016).

Com a análise da sequência do gene *16S rRNA* notou-se a alta prevalência de isolados pertencentes ao gênero *Enterobacter*, o qual incluiu as espécies *E. mori*, *E. asburiae* e *E. cancerogenus*. Esse gênero pode ser considerado como abundante no que se refere à atuação em benefício às plantas, conforme demonstrado no estudo de Gong et al. (2019), onde se demonstrou a capacidade da espécie *E. aerogenes* em combater patógenos pós-colheita, além de outras evidências favoráveis relacionadas a atividade de biocontrole.

Contudo, é válido mencionar que os membros da família *Enterobacteriaceae* podem ser difíceis de serem identificados com segurança ao utilizar apenas o sequenciamento do gene *16S rRNA* (Richter et al., 2013). Tal característica poderia

explicar a discrepância entre a diversidade observada nos perfis genotípicos (Material Suplementar - Fig. A1) e as classificações taxonômicas baseadas neste gene (Tabela 2).

A caracterização bioquímica dos isolados, permitiu a observação de perfis metabólicos distintos, que podem indicar diferentes papéis benéficos às plantas. Os resultados positivos dos testes realizados indicam que esses isolados podem ser potenciais candidatos a testes em plantas. Ao todo, 19 isolados apresentaram a capacidade de solubilização de fosfatos, ou seja, eles foram capazes de transformar o fosfato insolúvel em fósforo solúvel, um importante traço de promoção de crescimento em plantas (Goswami et al., 2014).

Neste estudo, foi possível observar que mais da metade dos isolados produziram o halo de fosfato, entre eles membros do gênero *Enterobacter* sp., conforme também visto no estudo de Singh et al. (2021). Outras características de destaque, se dão pela produção de quitinase e de sideróforos por parte dos isolados (Tabela 3), sendo este último associado com capacidade de auxiliar no controle biológico de fitopatógenos e insetos-praga (Liotti et al., 2018 e Gu et al., 2020) e na disponibilização de metais para as plantas (Dimkpa et al., 2009).

A produção de amônia por BPCPs é uma das etapas essenciais para o processo de fixação biológica de nitrogênio (Yavarian et al., 2021). No presente estudo, a produção foi observada para vários isolados (Tabela 3), sendo que a maior produção foi observada para o isolado *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), no valor de 8,73 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Tal produção observada nesse isolado, foi superior à observada em resultados obtidos com outros microrganismos em estudos prévios, como o de Bhattacharyya et al. (2020) e Goswami et al. (2014), os quais obtiveram valores de 7,54 μmol e 4,72 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, respectivamente, para seus melhores produtores.

Para a fixação de nitrogênio no presente estudo, a maioria dos isolados 20 dos 36 estudados apresentaram evidências de atividade de fixação de nitrogênio. Um desses isolados foi a *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), a qual já foi reportada em associação aos ciclos de nitrogênio exercendo importantes funções

(An e Berg, 2018), esse resultado vai também de encontro com o estudo realizado por Huda et al. (2022), onde, relatou-se que *S. maltophilia* apresentou resultado positivo para a fixação de nitrogênio, sendo essa espécie considerada uma candidata para a promoção de crescimento em plantas.

Os isolados relacionados ao gênero *Enterobacter*, também destacaram nesse ensaio, pois os isolados identificados com 3 espécies desse gênero, apresentaram atividade de fixação de nitrogênio, sendo: *E. mori*, *E. asburiae* e *E. cancerogenus*, espécies desse gênero reportadas previamente como fixadoras de nitrogênio (Guo et al., 2020). Além disso, *E. asburiae* é relatada em trabalhos como uma espécie potencial fixadora de nitrogênio, além de apresentar todas as características de BPCPs para a cana-de-açúcar (Singh et al., 2021; Jetiyanon 2015). Vale ressaltar que os isolados, apesar da identificação realizada, não é totalmente livre de equívocos, é uma evidência que aponta para um determinado isolado ser identificado com uma espécie. No entanto, a reunião de várias evidências é necessária para determinar de fato a espécie.

Também foi demonstrada a capacidade de produção de ácido indol acético (AIA) nos isolados bacterianos. Esse fitormônio pode influenciar positivamente o desenvolvimento de plantas, já que é capaz de tornar a absorção de nutrientes mais eficientes (Goswami et al., 2014; Tsavkelova et al., 2007). A maior parte dos isolados estudados apresentaram produção de AIA (Tabela 3), sendo que o isolado 8-5B (*Enterobacter mori*) se destacou ao produzir $13 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esse valor é relativamente superior ao encontrado no estudo de Yavarian et al. (2021), cujo maior valor observado foi de $9,704 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para um isolado de *Bacillus megaterium*.

Estudos sobre a capacidade de tolerância de BPCPs em condições de estresse abiótico têm sido cada vez mais frequentes e nesse estudo, é evidenciado que os isolados que mais se destacaram quanto à tolerância de NaCl (até 8%) são aqueles pertencentes ao gênero *Enterobacter*. No trabalho de Goyal et al., (2022), cujo enfoque se deu em cepas de *Enterobacter*, revelou-se que bactérias desse gênero apresentaram bom crescimento em concentrações de 6% de NaCl e, portanto, podem ser consideradas halotolerantes.

Bactérias capazes de expressar a enzima ACC-deaminase, são responsáveis por clivar o precursor de etileno encontrado nas plantas, resultando em raízes e brotos mais longos (Glick, 2014). Aqui, foram registrados diversos isolados capazes de produzir ACC-deaminase (Tabela 2). Para o futuro, deseja-se que essas bactérias substituam os defensivos agrícolas que causam diversos efeitos colaterais nas plantas, pois as bactérias produtoras de ACC são uma das soluções para aumentar a resistência contra estresses abióticos e bióticos (Singh et al., 2022).

Além dos testes citados acima, os isolados identificados como *Serratia surfactantfaciens* (27-3A), *Agromyces humi* (9-2A) e *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C), se destacaram nos resultados obtidos nos testes de mecanismos diretos e indiretos. A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* apresentou 63,67% de inibição contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. analisado no perfil de compostos voláteis. Isso vai de encontro com o estudo realizado por Rojas-Solís et al. (2018), onde a mesma espécie foi capaz de produzir compostos voláteis antifúngicos, além de exibir efeitos promotores de crescimento em plantas.

O isolado identificado como sendo, a espécie *Serratia surfactantfaciens* (27-3A) apresentou 45,02% de inibição contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. e 75,95% de inibição contra o fungo *Botrytis cinerea*. Estudos relatam que bactéria desse gênero podem expressar uma variedade de compostos orgânicos voláteis e metabólitos secundários (Soenens e Imperial, 2020; (Su et al., 2016). Além disso, há evidências de que bactérias desse gênero podem produzir inibidores da rede de comunicação célula-célula (quorum-sensing), responsável por regular a produção de antibióticos, pigmentos, exoenzimas e toxinas (Chernin et al. 2011, Plyuta et al. 2016).

No teste de antagonismo direto, foi observado uma formação de “goma”, nos isolados bacterianos *Serratia surfactantfaciens* (27-3A) e *Microbacterium saccharophilum* (12-1A). Existem vários tipos de interação que podem ocorrer entre as bactérias antagonicas e os patógenos, sendo encontrados diferentes tipos de mecanismos de ação (Sivanantham et al., 2013). Entender esses mecanismos de ação é crucial para prospectar novos agentes de biocontrole (Köhl et al., 2019; Palmierl et al., 2022).

O estudo de Gkarmirl et al. (2015) mostrou que as espécies do gênero *Serratia*, *S. proteamaculans* e *S. plymuthica*, ocasionaram a inibição do crescimento do fungo *Rhizoctonia solani*. Desse modo, entende-se que a formação de “goma” por parte do isolado atribuído a espécie *Serratia surfactantfaciens*, pode fazer parte de mecanismos desenvolvidos em resposta a presença do fungo. Além disso, as espécies do gênero *Serratia* apresentam um rico metabolismo secundário, e fazem com que as bactérias do gênero *Serratia* sejam organismos atrativos para fins de biocontrole (Soenens e Imperial, 2020).

No caso das bactérias do gênero *Microbacterium*, é relatada em estudo com uma fraca taxa de inibição de 9,5 mm ante a presença de fungo fitopatogênico (Bahmani et al., 2021). Aponta-se, ainda, que bactérias endofíticas, tais como as estudadas acima, são melhores agentes de biocontrole (Nawangsih et al., 2011).

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho caracterizou diversos isolados bacterianos com grande potencial para promover crescimento em plantas. Os traços observados vão desde produção de enzimas e metabólitos essenciais para o pleno desenvolvimento vegetal, até a atuação como agentes de biocontrole contra fitopatógenos.

Assim, o estudo colabora para a compressão sobre as bactérias promotoras de crescimento, incluindo seus mecanismos de ação diretos e indiretos. Este trabalho também contribui com a prospecção de potenciais microrganismos que potencialmente podem ser utilizados para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável, uma vez que podem ser considerados como possíveis alternativas à utilização de fertilizantes minerais, defensivos (fungicidas), dentre outros produtos agroquímicos.

Como perspectiva futura, apontamos a necessidade de realizar validações experimentais *in planta*, uma vez que a compatibilidade microrganismo-planta e a sinergia dos isolados com a microbiota indígena poderiam ser fatores a serem considerados, além das características observadas neste estudo com ensaios *in vitro*. Dessa forma, esperamos confirmar a viabilidade dentre os isolados, de potenciais candidatos à formulação de inoculantes e bioprodutos.

7. REFERÊNCIAS

- Abhilash PC, Dubey RK, Tripathi V, Gupta VK, Singh HB (2016) Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. **Trends in Biotechnology** 34: 847–850. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.005>
- Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, Adetunji CO, Kala S, Kryeziu TL, Ifemeje JC, Patrick-Iwuanyanwu KC (2020) Chapter 3 - Pesticides, History, and Classification. In: Egbuna C, Sawicka B (Eds), Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control. **Academic Press**, 29–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>
- Ahemad M, Khan MS (2011) Ecotoxicological assessment of pesticides towards the plant growth promoting activities of Lentil (*Lensculentus*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRL3. **Ecotoxicology** 20: 661–669. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0606-4>
- Al Shaer D, Al Musaimi O, de la Torre BG, Albericio F (2020) Hydroxamate siderophores: Natural occurrence, chemical synthesis, iron binding affinity and use as Trojan horses against pathogens. **European Journal of Medicinal Chemistry** 208: 112791. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112791>
- Alexandratos N, Bruinsma J (2012) World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision.
- Ali S, Kim W-C (2018) Plant Growth Promotion Under Water: Decrease of Waterlogging-Induced ACC and Ethylene Levels by ACC Deaminase-Producing Bacteria. **Frontiers in Microbiology** 9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01096> (September 25, 2022).
- Alijani Z, Amini J, Ashengroph M, Bahramnejad B (2019) Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. **International Journal of Food Microbiology** 307: 108276. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108276>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215: 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ambrosini A, Passaglia LMP (2017) Plant Growth–Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and Screening of PGP Activities. **Current Protocols in Plant Biology** 2: 190–209. <https://doi.org/10.1002/pb.20054>
- An S-Q, Berg G (2018) *Stenotrophomonas maltophilia*. **Trends in Microbiology** 26: 637–638. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.006>
- Aquino JPA de, Macedo Junior FB de, Antunes JEL, Figueiredo M do VB, Alcântara

Aydi Ben Abdallah R, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M (2019) Exploring the Beneficial Endophytic Microorganisms for Plant Growth Promotion and Crop Protection: Elucidation of Some Bioactive Secondary Metabolites Involved in Both Effects. In: Singh HB, Keswani C, Reddy MS, Sansinenea E, García-Estrada C (Eds), Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications. **Springer, Singapore**, 319–352. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_16

Bahmani K, Hasanzadeh N, Harighi B, Marefat A (2021) Isolation and identification of endophytic bacteria from potato tissues and their effects as biological control agents against bacterial wilt. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 116: 101692. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101692>

Barra PJ, Inostroza NG, Acuña JJ, Mora ML, Crowley DE, Jorquera MA (2016) Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea americana* Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. **Applied Soil Ecology** 102: 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.014>

Barra VR, Silva R da, Ferraz HGM, Macagnan D, Silva HSA, Moura AB, Halfeld-Vieira B de A, Mendonça HL, Vieira Júnior JR (2008) Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica** 34: 121–126. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000200002>

Bhattacharyya C, Banerjee S, Acharya U, Mitra A, Mallick I, Haldar A, Haldar S, Ghosh A, Ghosh A (2020) Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. **Scientific Reports** 10: 15536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72439-z>

Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 28: 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

Billah M, Khan M, Bano A, Hassan TU, Munir A, Gurmani AR (2019) Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. **Geomicrobiology Journal** 36: 904–916. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>

Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology** 4: 343–350. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7)

Borges BMMN, Abdala DB, Souza MF de, Viglio LM, Coelho MJA, Pavinato PS, Franco HCJ (2019) Organomineral phosphate fertilizer from sugarcane byproduct and its effects on soil phosphorus availability and sugarcane yield. **Geoderma** 339: 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.12.036>

Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F (2012) Chapter 7 - Function of Nutrients: Micronutrients. In: Marschner P (Ed.), Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). **Academic Press, San Diego**, 191–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8>

Caione G, Prado R de M, Campos CNS, Rosatto Moda L, de Lima Vasconcelos R, Pizauro Júnior JM (2015) Response of Sugarcane in a Red Ultisol to Phosphorus Rates, Phosphorus Sources, and Filter Cake. **The Scientific World Journal** 2015: e405970. <https://doi.org/10.1155/2015/405970>

Camargo JMO, Gallego-Ríos JM, Neto AMP, Antonio GC, Modesto M, Leite JTC (2020) Characterization of sugarcane straw and bagasse from dry cleaning system of sugarcane for cogeneration system. **Renewable Energy** 158: 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.107>

Camilios-Neto D, Bonato P, Wassem R, Tadra-Sfeir MZ, Brusamarello-Santos LC, Valdameri G, Donatti L, Faoro H, Weiss VA, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM (2014) Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics** 15: 378. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-378>

Carmona-Hernandez S, Reyes-Pérez JJ, Chiquito-Contreras RG, Rincon-Enriquez G, Cerdan-Cabrera CR, Hernandez-Montiel LG (2019) Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: **A Review. Agronomy** 9: 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>

Caulier S, Gillis A, Colau G, Licciardi F, Liépin M, Desoignies N, Modrie P, Legrève A, Mahillon J, Bragard C (2018) Versatile Antagonistic Activities of Soil-Borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and Other Potato Pathogens. **Frontiers in Microbiology** 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00143>

Chandra A, Chandra P, Tripathi P (2021) Whole genome sequence insight of two plant growth-promoting bacteria (*B. subtilis* BS87 and *B. megaterium* BM89) isolated and characterized from sugarcane rhizosphere depicting better crop yield potentiality. **Microbiological Research** 247: 126733. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126733>

Chernin L, Toklikishvili N, Ovadis M, Kim S, Ben-Ari J, Khmel I, Vainstein A (2011) Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. **Environmental Microbiology Reports** 3: 698–704. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00284.x>

Cortleven A, Schmölling T (2015) Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. **Journal of Experimental Botany** 66: 4999–5013. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv132>

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 9, n. 2, agosto 2022.

Davidson CJ, Zeringer E, Champion KJ, Gauthier M-P, Wang F, Boonyaratanakornkit J, Jones JR, Schreiber E (2012) Improving the limit of detection for Sanger sequencing: A comparison of methodologies for KRAS variant detection. **BioTechniques** 53: 182–188. <https://doi.org/10.2144/000113913>

de Lima DRM, dos Santos IB, Oliveira JTC, da Costa DP, de Queiroz JVJ, Romagnoli EM, Andreote FD, Freire FJ, Kuklinsky-Sobral J (2021) Genetic diversity of N-fixing and plant growth-promoting bacterial community in different sugarcane genotypes, association habitat and phenological phase of the crop. **Archives of Microbiology** 203: 1089–1105. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02103-7>

Desbrosses G, Contesto C, Varoquaux F, Galland M, Touraine B (2009) PGPR-Arabidopsis interactions is a useful system to study signaling pathways involved in plant developmental control. **Plant Signaling & Behavior** 4: 319–321. <https://doi.org/10.4161/psb.4.4.8106>

Dimkpa C o., Merten D, Svatoš A, Büchel G, Kothe E (2009) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. **Journal of Applied Microbiology** 107: 1687–1696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04355.x>

Dotaniya ML, Datta SC, Biswas DR, Dotaniya CK, Meena BL, Rajendiran S, Regar KL, Lata M (2016) Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture** 5: 185–194. <https://doi.org/10.1007/s40093-016-0132-8>

Drechsel H, Jung G (1998) Peptide siderophores. **Journal of Peptide Science** 4: 147–181. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1387\(199805\)4:3<147::AID-PSC136>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199805)4:3<147::AID-PSC136>3.0.CO;2-C)

Dworkin M, Foster JW (1958) Experiments With Some Microorganisms Which Utilize Ethane And Hydrogen. **Journal of Bacteriology** 75: 592–603. <https://doi.org/10.1128/jb.75.5.592-603.1958>

El-Baky NA, Abdel Rahman RA, Sharaf MM, Amara AAF (2021) The Development of a Phytopathogenic Fungi Control Trial: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* Infection in Jojoba Tissue Culture as a Model. **The Scientific World Journal** 2021: e6639850. <https://doi.org/10.1155/2021/6639850>

El-Sayed WS, Akhkha A, El-Naggar MY, Elbadry M (2014) In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. **Frontiers in Microbiology** 5: 651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00651>

Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research** 8: 186–194.

Ezrari S, Mhidra O, Radouane N, Tahiri A, Polizzi G, Lazraq A, Lahlali R (2021) Potential Role of Rhizobacteria Isolated from Citrus Rhizosphere for Biological Control of Citrus Dry Root Rot. **Plants** 10: 872. <https://doi.org/10.3390/plants10050872>

Felestrino ÉB, Vieira IT, Caneschi WL, Cordeiro IF, Assis R de AB, Lemes CG de C, Fonseca NP, Sanchez AB, Cepeda JCC, Ferro JA, Garcia CCM, do Carmo FF, Kamino LHY, Moreira LM (2018) Biotechnological potential of plant growth-promoting bacteria from the roots and rhizospheres of endemic plants in ironstone vegetation in southeastern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 34: 156. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2538-0>

Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang Y (2006) Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases. In: Siddiqui ZA (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. **Springer Netherlands, Dordrecht**, 67–109. https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_3

Ferreira CMH, Vilas-Boas Â, Sousa CA, Soares HMVM, Soares EV (2019) Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. **AMB Express** 9: 78. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0796-3>

Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology** 285: 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

Freitas DB, Reis MP, Lima-Bittencourt CI, Costa PS, Assis PS, Chartone-Souza E, Nascimento AM (2008) Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. **BMC Research Notes** 1: 92. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-92>

Funnicelli MIG, Pinheiro DG, Gomes-Pepe ES, de Carvalho LAL, Campanharo JC, Fernandes CC, Kishi LT, Carareto Alves LM, de Macedo Lemos EG (2021) Metagenome-assembled genome of a Chitinophaga sp. and its potential in plant biomass degradation, as well of affiliated Pandoraea and Labrys species. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 37: 162. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03128-w>

Gkarmiri K, Finlay RD, Alström S, Thomas E, Cubeta MA, Högborg N (2015) Transcriptomic changes in the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 in response to the antagonistic bacteria *Serratia proteamaculans* and *Serratia plymuthica*. **BMC Genomics** 16: 630. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1758-z>

Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica** 2012: e963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research** 169: 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>

Gómez Ramírez M, Rojas Avelizapa LI, Rojas Avelizapa NG, Cruz Camarillo R (2004) Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R®, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods** 56: 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.011>

Gong A-D, Dong F-Y, Hu M-J, Kong X-W, Wei F-F, Gong S-J, Zhang Y-M, Zhang J-B, Wu A-B, Liao Y-C (2019) Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. **Food Control** 106: 106718. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106718>

Goswami D, Dhandhukia P, Patel P, Thakker JN (2014) Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. **Microbiological Research** 169: 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.004>

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin H-S, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research** 206: 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>

Goyal D, Kumar S, Meena D, Solanki S s., Swaroop S, Pandey J (2022) Selection of ACC deaminase positive, thermohalotolerant and drought tolerance enhancing plant growth-promoting bacteria from rhizospheres of *Cyamopsis tetragonoloba* grown in arid regions. **Letters in Applied Microbiology** 74: 519–535. <https://doi.org/10.1111/lam.13633>

Gu S, Wei Z, Shao Z, Friman V-P, Cao K, Yang T, Kramer J, Wang X, Li M, Mei X, Xu Y, Shen Q, Kümmerli R, Jousset A (2020) Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. **Nature Microbiology** 5: 1002–1010. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0719-8>

Guo D-J, Singh RK, Singh P, Li D-P, Sharma A, Xing Y-X, Song X-P, Yang L-T, Li Y-R (2020) Complete Genome Sequence of *Enterobacter roggkampii* ED5, a Nitrogen Fixing Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium With Biocontrol and Stress Tolerance Properties, Isolated From Sugarcane Root. **Frontiers in Microbiology** 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.580081> (October 26, 2022).

Guo H, Wang Y, Liu H, Hu P, Jia Y, Zhang C, Wang Y, Gu S, Yang C, Wang C (2015) Exogenous GA3 Application Enhances Xylem Development and Induces the Expression of Secondary Wall Biosynthesis Related Genes in *Betula platyphylla*. **International Journal of Molecular Sciences** 16: 22960–22975. <https://doi.org/10.3390/ijms160922960>

Gyaneshwar P, Parekh LJ, Archana G, Poole PS, Collins MD, Hutson RA, Kumar GN (1999) Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. **FEMS Microbiology Letters** 171: 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13436.x>

Haas D, Keel C, Reimann C (2002) [No title found]. **Antonie van Leeuwenhoek** 81: 385–395. <https://doi.org/10.1023/A:1020549019981>

Hall T, Biosciences I, Carlsbad C, others (2011) BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull Biosci** 2: 60–61.

Hiremath G (2012) Isolation And Characterization Of Nitrogen Fixing *Bacillus Subtilis* Strain As-4 From Agricultural Soil. **International Journal of Recent Scientific Research** 3: 762–765.

Huda N ul, Tanvir R, Badar J, Ali I, Rehman Y (2022) Arsenic-Resistant Plant Growth Promoting *Pseudoxanthomonas mexicana* S254 and *Stenotrophomonas maltophilia* S255 Isolated from Agriculture Soil Contaminated by Industrial Effluent. **Sustainability** 14: 10697. <https://doi.org/10.3390/su141710697>

Hutter H-P, Poteser M, Lemmerer K, Wallner P, Shahraki Sanavi S, Kundi M, Moshhammer H, Weitensfelder L (2020) Indicators of Genotoxicity in Farmers and Laborers of Ecological and Conventional Banana Plantations in Ecuador. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 17: 1435. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041435>

Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology** 45: 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>

Jetiyanon K (2015) Multiple Mechanisms of *Enterobacter asburiae* strain RS83 for Plant Growth Enhancement. : 8.

Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong B-Y, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM (2019) Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. **Nature Communications** 10: 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

Kalayu G (2019) Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. **International Journal of Agronomy** 2019: e4917256. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>

Kamran MA, Eqani SAMAS, Bibi S, Xu R, Amna, Monis MFH, Katsoyiannis A, Bokhari H, Chaudhary HJ (2016) Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. **Ecotoxicology**

and Environmental Safety 126: 256–263.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.002>

Kaur H, Kaur J, Gera R (2016) Plant growth promoting rhizobacteria: a boon to agriculture. **Int J Cell Sci Biotechnol** 5: 17–22.

Kellogg EA (2013) Phylogenetic Relationships of Saccharinae and Sorghinae. In: Paterson AH (Ed.), *Genomics of the Saccharinae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. **Springer, New York, NY**, 3–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5947-8_1

Khan AL, Waqas M, Kang S-M, Al-Harrasi A, Hussain J, Al-Rawahi A, Al-Khiziri S, Ullah I, Ali L, Jung H-Y, Lee I-J (2014) Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology** 52: 689–695. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>

Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ (2019) Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. **Frontiers in Plant Science** 10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00845> (September 22, 2022).

Kudoyarova G, Arkhipova T, Korshunova T, Bakaeva M, Loginov O, Dodd IC (2019) Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses. **Frontiers in Plant Science** 10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01368> (September 6, 2022).

Kumar A, Verma JP (2018) Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? **Microbiological Research** 207: 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>

Kumar AS, Aiyannathan KEA, Nakkeeran S, Manickam S (2018) Documentation of virulence and races of *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* in India and its correlation with genetic diversity revealed by repetitive elements (REP, ERIC, and BOX) and ISSR markers. **3 Biotech** 8: 479. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1503-9>

Kumar D (2014) Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science** 228: 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.014>

Kumar M, Charishma K, Sahu KP, Sheoran N, Patel A, Kundu A, Kumar A (2021) Rice leaf associated *Chryseobacterium* species: An untapped antagonistic flavobacterium displays volatile mediated suppression of rice blast disease. **Biological Control** 161: 104703. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104703>

Kumar Meena R, Kumar Singh R, Pal Singh N, Kumari Meena S, Singh Meena V (2015) Isolation of low temperature surviving plant growth - promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth

promoting traits. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 4: 806–811. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.006>

Kuss AV, Kuss VV, Lovato T, Flôres ML (2007) Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42: 1459–1465. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013>

Kyaw HWW, Tsuchiya K, Matsumoto M, Aye SS, Iiyama K, Kurose D, Horita M, Furuya N (2019) Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of solanaceous crops in Myanmar by rep-PCR analysis. **Journal of General Plant Pathology** 85: 33–38. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0818-z>

Li Q, Chen S (2020) Transfer of Nitrogen Fixation (*nif*) Genes to Non-diazotrophic Hosts. **ChemBioChem** 21: 1717–1722. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900784>

Liang Y-L, Zhang Z, Wu M, Wu Y, Feng J-X (2014) Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International** 2014: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/512497>

Lindow SE, Brandl MT (2003) Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>

Liotti RG, da Silva Figueiredo MI, da Silva GF, de Mendonça EAF, Soares MA (2018) Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research** 207: 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.011>

Liu F, Xing S, Ma H, Du Z, Ma B (2013) Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology** 97: 9155–9164. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5193-2>

Lykogianni M, Bempelou E, Karamaouna F, Aliferis KA (2021) Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. **Science of The Total Environment** 795: 148625. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148625>

Majeed A, Muhammad Z, Ahmad H (2018) Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. **Plant Cell Reports** 37: 1599–1609. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2341-2>

Malfanova N, Lugtenberg BJJ, Berg G (2013) Bacterial Endophytes: Who and Where, and What are they doing there? In: de Bruijn FJ (Ed.), *Molecular Microbial*

Ecology of the Rhizosphere. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 391–403. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch36>

Malusá E, Sas-Paszt L, Ciesielska J (2012) Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. **The Scientific World Journal** 2012: e491206. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>

Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology** 3: 208-IN1. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)

Martínez C, Espinosa-Ruiz A, Prat S (2016) Gibberellins and plant vegetative growth. In: **Annual Plant Reviews**, Volume 49. John Wiley & Sons, Ltd, 285–322. <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch10>

Meena M, Swapnil P, Zehra A, Dubey MK, Upadhyay RS (2017) Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 50: 629–648. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1357360>

Meghana M, Shastri Y (2020) Sustainable valorization of sugar industry waste: Status, opportunities, and challenges. **Bioresource Technology** 303: 122929. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122929>

Mehnaz S (2011) Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane. In: Maheshwari DK (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 165–187. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_7

Messa VR (2021) Biocontrol by induced systemic resistance using plant growth promoting rhizobacteria. **Rhizosphere** 17: 100323. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100323>

Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, Divya KL, Venkatasalam EP, Srinivasan S, Ramkumar G, Saranya C, Shanmuganathan R (2019) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 17: 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.009>

Misra S, Chauhan PS (2020) ACC deaminase-producing rhizosphere competent *Bacillus* spp. mitigate salt stress and promote *Zea mays* growth by modulating ethylene metabolism. **3 Biotech** 10: 119. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2104-y>

Modi K, Patel P (2017) Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Associated with *Saccharum officinarum* L. **Current Synthetic and Systems Biology** 05: 132. <https://doi.org/10.4172/2332-0737.1000132>

Moran-Salazar RG, Sanchez-Lizarraga AL, Rodriguez-Campos J, Davila-Vazquez G, Marino-Marmolejo EN, Dendooven L, Contreras-Ramos SM (2016) Utilization of

vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. **SpringerPlus** 5: 1007. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2410-3>

Muller A, Schader C, El-Hage Scialabba N, Brüggemann J, Isensee A, Erb K-H, Smith P, Klocke P, Leiber F, Stolze M, Niggli U (2017) Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture. **Nature Communications** 8: 1290. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01410-w>

Nawangsih AA, Damayanti I, Wiyono S, Kartika JG (2011) Selection and Characterization of Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt Disease. **HAYATI Journal of Biosciences** 18: 66–70. <https://doi.org/10.4308/hjb.18.2.66>

Neto F de, Araujo ASF de, Aquino JPA de, Macedo Junior FB de, Antunes JEL, Figueiredo M do VB, Alcântara Neto F de, Araujo ASF de (2019) Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum1. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 49. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4956241>

Novello G, Cesaro P, Bona E, Massa N, Gosetti F, Scarafoni A, Todeschini V, Berta G, Lingua G, Gamalero E (2021) The Effects of Plant Growth-Promoting Bacteria with Biostimulant Features on the Growth of a Local Onion Cultivar and a Commercial Zucchini Variety. **Agronomy** 11: 888. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050888>

O'Toole GA (2011) Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments**. <https://doi.org/10.3791/2437>

Okumura RS, Mariano DDC, Dallacort R, De AN, Klynger A, Lobato S, Maria E, Guedes S, Oliveira CFD, Eugênio H, Conceição O, Antonio G, Alves R (2012) Azospirillum: A new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grasses.

Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 33: 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

Otieno N, Lally R, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine K, Dowling D (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. **Frontiers in Microbiology** 6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00745> (September 15, 2022).

Palmieri D, Ianiri G, Del Grosso C, Barone G, De Curtis F, Castoria R, Lima G (2022) Advances and Perspectives in the Use of Biocontrol Agents against Fungal Plant Diseases. **Horticulturae** 8: 577. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070577>

Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, Kaushik S (2017) Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 15: 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>

Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarszewski A, Chaumeil P-A, Hugenholtz P (2018) A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology** 36: 996–1004. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>

Patil V (2011) Production of Indole Acetic Acid by *Azotobacter* sp. : 4.

Pavel AB, Vasile CI (2012) PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. **BMC Bioinformatics** 13: 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>

Payne SM (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology** 235: 329–344. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)

Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum** 118: 10–15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>

Pereira LB, Andrade GS, Meneghin SP, Vicentini R, Ottoboni LMM (2019) Prospecting Plant Growth-Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Sugarcane Under Drought Stress. **Current Microbiology** 76: 1345–1354. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01749-x>

Phillips KA, Skirpan AL, Liu X, Christensen A, Slewinski TL, Hudson C, Barazesh S, Cohen JD, Malcomber S, McSteen P (2011) vanishing tassel2 Encodes a Grass-Specific Tryptophan Aminotransferase Required for Vegetative and Reproductive Development in Maize. **The Plant Cell** 23: 550–566. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075267>

Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. **Annual Review of Phytopathology** 52: 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

Plyuta V, Lipasova V, Popova A, Koksharova O, Kuznetsov A, Szegedi E, Chernin L, Khmel I (2016) Influence of volatile organic compounds emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains on *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. **APMIS** 124: 586–594. <https://doi.org/10.1111/apm.12547>

Porcel R, Zamarreño ÁM, García-Mina JM, Aroca R (2014) Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. **BMC Plant Biology** 14: 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-36>

Poupin MJ, Timmermann T, Vega A, Zuñiga A, González B (2013) Effects of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*. **PLOS ONE** 8: e69435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069435>

Prajapati S, Kumar N, Kumar S, Lakharan L, Maurya S (2020) Biological control a sustainable approach for plant diseases management: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 9: 1514–1523.

Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B, Allen C (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics** 17: 90. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>

Qiao C, Penton CR, Xiong W, Liu C, Wang R, Liu Z, Xu X, Li R, Shen Q (2019) Reshaping the rhizosphere microbiome by bio-organic amendment to enhance crop yield in a maize-cabbage rotation system. **Applied Soil Ecology** 142: 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.04.014>

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research** 41: D590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Ramakrishna W, Yadav R, Li K (2019) Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. **Applied Soil Ecology** 138: 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>

Ramnath L, Sithole B, Govinden R (2017) Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. **Biotechnology Reports** 15: 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.004>

Rawat P, Das S, Shankhdhar D, Shankhdhar SC (2021) Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 21: 49–68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>

Reimer D, Bode HB (2014) A natural prodrug activation mechanism in the biosynthesis of nonribosomal peptides. **Nat. Prod. Rep.** 31: 154–159. <https://doi.org/10.1039/C3NP70081J>

Rodrigues AA, Forzani MV, Soares R de S, Sibov ST, Vieira JDG (2016) Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 46: 149–158. <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4639526>

Rojas-Solís D, Zetter-Salmón E, Contreras-Pérez M, Rocha-Granados M del C, Macías-Rodríguez L, Santoyo G (2018) *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 13: 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.007>

Rosenblueth M, Ormeño-Orrillo E, López-López A, Rogel MA, Reyes-Hernández BJ, Martínez-Romero JC, Reddy PM, Martínez-Romero E (2018) Nitrogen Fixation in Cereals. **Frontiers in Microbiology** 9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01794> (September 14, 2022).

Sabaratham S, Beattie GA (2003) Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 1220–1228. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1220-1228.2003>

Salas-Ovilla R, Gálvez-López D, Vázquez-Ovando A, Salvador-Figueroa M, Rosas-Quijano R (2019) Isolation and identification of marine strains of *Stenotrophomonas maltophilia* with high chitinolytic activity. **PeerJ** 7: e6102. <https://doi.org/10.7717/peerj.6102>

Saleem M, Zamir MSI, Haq I, Irshad MZ, Khan MK, Asim M, Zaman Q, Ali I, Khan A, Rehman S (2015) Yield and Quality of Forage Oat (*Avena sativa* L.) Cultivars as Affected by Seed Inoculation with Nitrogenous Strains. **American Journal of Plant Sciences** 06: 3251. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.619316>

Sánchez-López AS, González-Chávez Ma del CA, Solís-Domínguez FA, Carrillo-González R, Rosas-Saito GH (2018) Leaf Epiphytic Bacteria of Plants Colonizing Mine Residues: Possible Exploitation for Remediation of Air Pollutants. **Frontiers in Microbiology** 9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03028> (October 6, 2022).

Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 74: 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda Ma, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research** 183: 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods** 9: 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schliep KP (2011) phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics** 27: 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry** 160: 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H, Martínez-Romero E (2002) Advances in Rhizobium Research. **Critical Reviews in Plant Sciences** 21: 323–378. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044278>

Singh M, Singh D, Gupta A, Pandey KD, Singh PK, Kumar A (2019) Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. **Elsevier**, 41–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00003-3>

Singh P, Singh RK, Li H-B, Guo D-J, Sharma A, Lakshmanan P, Malviya MK, Song X-P, Solanki MK, Verma KK, Yang L-T, Li Y-R (2021) Diazotrophic Bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* Promote Sugarcane Growth by Inducing Nitrogen Uptake and Defense-Related Gene Expression. **Frontiers in Microbiology** 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.600417> (May 31, 2022).

Singh P, Singh RK, Li H-B, Guo D-J, Sharma A, Lakshmanan P, Malviya MK, Song X-P, Solanki MK, Verma KK, Yang L-T, Li Y-R (2021) Diazotrophic Bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* Promote Sugarcane Growth by Inducing Nitrogen Uptake and Defense-Related Gene Expression. **Frontiers in Microbiology** 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.600417> (May 31, 2022).

Singh RP, Ma Y, Shadan A (2022) Perspective of ACC-deaminase producing bacteria in stress agriculture. **Journal of Biotechnology** 352: 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.002>

Sitbon F, Hennion S, Sundberg B, Little CHA, Olsson O, Sandberg G (1992) Transgenic Tobacco Plants Coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens* *iaaM* and *iaaH* Genes Display Altered Growth and Indoleacetic Acid Metabolism 1. **Plant Physiology** 99: 1062–1069. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1062>

Sivanantham T, Rasaiyah V, Satkunanathan N, Arulanantham C (2013) In vitro screening of antagonistic effect of soil borne bacteria on some selected phytopathogenic fungi. 5.

Smolińska U, Kowalska B (2018) Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. **Journal of Plant Pathology** 100: 1–12. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0>

Soenens A, Imperial J (2020) Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. **Phytochemistry Reviews** 19: 577–587. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09657-5>

Soumare A, Diedhiou AG, Thuita M, Hafidi M, Ouhdouch Y, Gopalakrishnan S, Kouisni L (2020) Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. **Plants** 9: 1011. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>

Souza RSC, Okura VK, Armanhi JSL, Jorrín B, Lozano N, da Silva MJ, González-Guerrero M, de Araújo LM, Verza NC, Bagheri HC, Imperial J, Arruda P (2016) Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports** 6: 28774. <https://doi.org/10.1038/srep28774>

Spadaro D, Droby S (2016) Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology** 47: 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

Su C, Xiang Z, Liu Y, Zhao X, Sun Y, Li Z, Li L, Chang F, Chen T, Wen X, Zhou Y, Zhao F (2016) Analysis of the genomic sequences and metabolites of *Serratia surfactantifaciens* sp. nov. YD25T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2. **BMC Genomics** 17: 865. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3171-7>

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014) Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist** 203: 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>

Symbiosis School of Biological Sciences (SSBS), Symbiosis International (Deemed University), Pune, India, Dixit K (2021) Benchmarking of 16S rRNA gene databases using known strain sequences. **Bioinformatics** 17: 377–391. <https://doi.org/10.6026/97320630017377>

Tabassum B, Khan A, Tariq M, Ramzan M, Iqbal Khan MS, Shahid N, Aaliya K (2017) Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. **Applied Soil Ecology** 121: 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>

Tahir HAS, Gu Q, Wu H, Raza W, Hanif A, Wu L, Colman MV, Gao X (2017) Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology** 8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00171> (September 13, 2022).

Teheran-Sierra LG, Funniceilli MIG, de Carvalho LAL, Ferro MIT, Soares MA, Pinheiro DG (2021) Bacterial communities associated with sugarcane under different agricultural management exhibit a diversity of plant growth-promoting traits and evidence of synergistic effect. **Microbiological Research** 247: 126729. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126729>

Tsukanova KA, Chebotar VK, Meyer JJM, Bibikova TN (2017) Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. **South African Journal of Botany** 113: 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>

Van Maele-Fabry G, Hoet P, Vilain F, Lison D (2012) Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Environment International** 46: 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.05.004>

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrullah Boyce A (2016) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. **Molecules** 21: 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research** 19: 6823–6831.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil** 255: 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>

Weisskopf L (2014) The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. In: Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education.

Wesseling C, Ahlbom A, Antich D, Rodriguez Ac, Castro R (1996) Cancer in Banana Plantation Workers in Costa Rica. **International Journal of Epidemiology** 25: 1125–1131. <https://doi.org/10.1093/ije/25.6.1125>

Wiesel L, Newton AC, Elliott I, Booty D, Gilroy EM, Birch PRJ, Hein I (2014) Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. **Frontiers in Plant Science** 5. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00655> (October 19, 2022).

Xu Q, Ji T, Gao S-J, Yang Z, Wu N (2019) Characteristics and Applications of Sugar Cane Bagasse Ash Waste in Cementitious Materials. **Materials** 12: 39. <https://doi.org/10.3390/ma12010039>

Yadegari M, Rahmani HA, Noormohammadi G, Ayneband A (2010) Plant Growth Promoting Rhizobacteria Increase Growth, Yield and Nitrogen Fixation in Phaseolus Vulgaris. **Journal of Plant Nutrition** 33: 1733–1743. <https://doi.org/10.1080/01904167.2010.503776>

Yavarian S, Jafari P, Akbari N, Feizabadi MM (2021) Selective screening and characterization of plant growth promoting bacteria for growth enhancement of tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Iranian Journal of Microbiology** 13: 121–129. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5502>

Yavarian S, Jafari P, Akbari N, Feizabadi MM (2021) Selective screening and characterization of plant growth promoting bacteria for growth enhancement of tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Iranian Journal of Microbiology** 13: 121–129. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5502>

Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TT-Y (2017) ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. **Methods in Ecology and Evolution** 8: 28–36. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>

Yu Y, Gui Y, Li Z, Jiang C, Guo J, Niu D (2022) Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. **Plants** 11: 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>

Zandi P, Basu SK (2016) Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as BioFertilizers in Stabilizing Agricultural Ecosystems. In: Nandwani D (Ed.), Organic Farming for Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity. **Springer International Publishing, Cham**, 71–87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26803-3_3

Zgad Zaj R, Garrido-Oter R, Jensen DB, Koprivova A, Schulze-Lefert P, Radutoiu S (2016) Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 113: E7996–E8005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616564113>

Zhai J, Luo Y, Zheng D, Huang X (2010) Evaluation of Genetic Diversity of Highly Virulent Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by rep-PCR Fingerprinting. **Journal of Phytopathology** 158: 764–768. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01707.x>

Zhao D, Li Y-R (2015) Climate Change and Sugarcane Production: Potential Impact and Mitigation Strategies. **International Journal of Agronomy** 2015: e547386. <https://doi.org/10.1155/2015/547386>

Zhao Y, Shi R, Bian X, Zhou C, Zhao Y, Zhang S, Wu F, Waterhouse GIN, Wu L, Tung C, Zhang T (2019) Ammonia Detection Methods in Photocatalytic and Electrocatalytic Experiments: How to Improve the Reliability of NH₃ Production Rates? **Advanced Science** 6. <https://doi.org/10.1002/advs.201802109>

Zikankuba VL, Mwanyika G, Ntwenya JE, James A (2019) Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. Yildiz F (Ed.). **Cogent Food & Agriculture** 5: 1601544. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1601544>

Cappellari L del R, Chiappero J, Santoro MV, Giordano W, Banchio E (2017) Inducing phenolic production and volatile organic compounds emission by inoculating *Mentha piperita* with plant growth-promoting rhizobacteria. *Scientia Horticulturae* 220: 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.002>

Kraepiel AML, Bellenger JP, Wichard T, Morel FMM (2009) Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *BioMetals* 22: 573–581. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9222-7>

Rueter JG, Petersen RR (1987) Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 435–445. <https://doi.org/10.1080/00288330.1987.9516239>

Santoro M, Cappellari L, Giordano W, Banchio E (2015) Production of Volatile Organic Compounds in PGPR. In: Cassán FD, Okon Y, Creus CM (Eds), Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols. Springer International Publishing, Cham, 307–317. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_17

Wierzbowska J, Sienkiewicz S, Zalewska M, Żarczyński P, Krzebietke S (2020) Phosphorus fractions in soil fertilised with organic waste. Environmental Monitoring and Assessment 192: 315. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8190-9>

APÊNDICES

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura suplementar. 1A. Dendrograma do agrupamento dos perfis genômicos dos 73 isolados, obtidos a partir da genotipagem usando os *primers* ERIC E BOX-A. Os rótulos do dendrograma indicam o ID dos isolados, os IDs destacados em vermelho correspondem aos isolados selecionados.

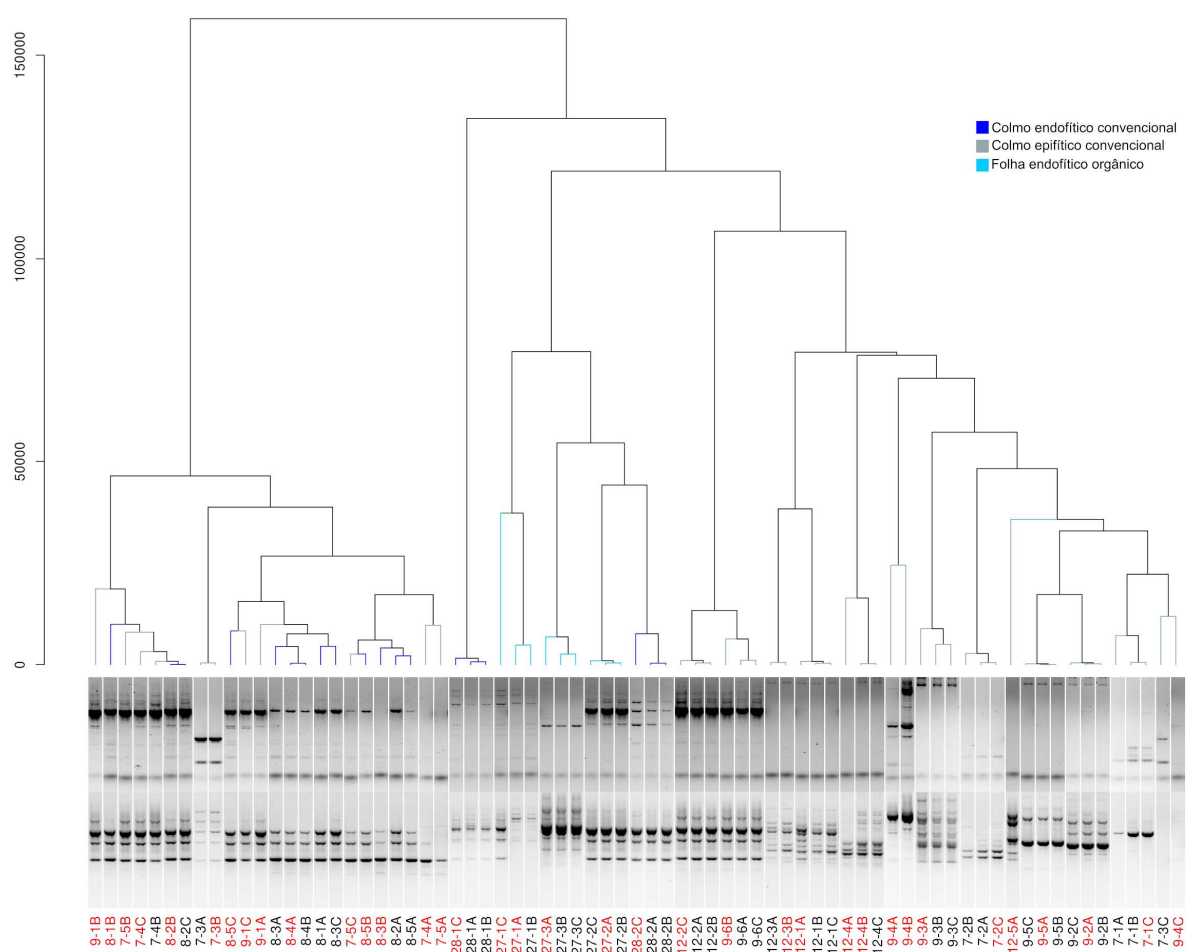


Figura suplementar 2A. Ensaio de antagonismo por compostos voláteis. (A) enfrentamento do isolado *Enterobacter mori* (7-4C) com o fungo patógeno *Colletotrichum* sp. (citrus); (B) enfrentamento do isolado *Stenotrophomonas maltophilia* (7-2C) com o fungo patógeno *Colletotrichum* sp. (cana-de açúcar); (C) enfrentamento do isolado *Serratia surfactantfaciens*, (27-3A) com o fungo patógeno *Colletotrichum* sp. (cana de açúcar); (D) enfrentamento do isolado *Serratia surfactantfaciens*, (27-3A) com o fungo patógeno *Botrytis cinerea* (podridão da banana).

