



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. COM ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL E INIBIÇÃO *IN VITRO* DE PATÓGENOS DE SOLO.

Brasília-DF

2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. COM ATIVIDADE PROMOTORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL E INIBIÇÃO *IN VITRO* DE PATÓGENOS DE SOLO

Orientação: Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum

Coorientação: Dr. Rose Gomes Monnerat

Tese de doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Agronomia.

Área de Concentração: Sistemas de produção agrícolas sustentáveis.

Brasília-DF

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. COM ATIVIDADE PROMOTORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL E INIBIÇÃO *IN VITRO* DE PATÓGENOS DE SOLO

JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA.

APROVADA POR:

Alessandra Monteiro de Paula, D. Sc. Solos e Nutrição de Plantas /FAV-UnB/ (Membro
interno). CPF: 820.032.201-78 e-mail: alessandramp@unb.br

Antônia Débora Camila de Lima Ferreira, D. Sc. Agronomia / Soluscience® (Membro
externo). CPF: 082.466.844-85 e-mail: deboracamilla1@hotmail.com

Lincon Rafael da Silva, D. Sc. Fitopatologia / Prof. Universidade Estadual de Goiás/
(Membro externo). CPF: 032163601-56 e-mail: lincon_rafael10@hotmail.com

Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, D. Sc. Fitopatologia/FAV-UnB/ (Orientador Presidente)
CPF: 333.965.071-34, e-mail: luizblum@unb.br

BRASÍLIA/DF, 27 de março de 2024.

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Jônatas Barros dos

Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. com atividade promotora de crescimento vegetal e inibição *in vitro* de patógenos de solo/

Orientação: Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum/Coorientação: Dra. Rose Gomes Monnerat – Brasília, 2024. p. 107. Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2024.

1. Controle biológico. 2. Promoção de crescimento vegetal. 3. Antibiose. 4. Voláteis. 5. Salinidade

I. Blum, L.E.B. II. Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. com atividade promotora de crescimento vegetal e inibição *in vitro* de patógenos de solo.

CDD ou CDU Agris / FAO

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA: SANTOS, J. B. Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. com atividade promotora de crescimento vegetal e inibição *in vitro* de patógenos de solo. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, 110 p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS NOME DO AUTOR: JÔNATAS BARROS DOS SANTOS
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. com atividade promotora de crescimento vegetal e inibição *in vitro* de patógenos de solo. GRAU: Doutor. ANO: 2024 É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

DEDICO

À Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente nas horas de angústia, por ter me concedido as forças necessárias, a perseverança e a fé para realização e concretização deste trabalho, ao meu pai Vilson, a minha mãe Terezinha (“*In Memoriam*”) e ao meu irmão Rodrigo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus, por me conceder o dom da vida e por guiar meus passos durante minha caminhada.

À minha família: meus pais Vilson e Terezinha, pelo amor dedicado a nós e por mostrar que a família é a base de tudo; ao meu irmão Rodrigo, por estar sempre ao meu lado.

À outra parte da minha família, tios, avós, primos, parentes e aos irmãos de coração, que mesmo longe me apoiaram e incentivaram os meus sonhos.

À minha companheira e parceira de vida que se fez presente durante todo o percurso do Doutorado, Rosimaria Souza, pelo seu amor, carinho e incentivo sempre.

Aos amigos que a UnB me deu, José Cruz e Emanuel Dias, e que se fizeram presentes sempre que possível na execução e condução deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, por ter acreditado em mim, aceitado ser meu orientador, por sua dedicação, convivência, ensinamentos e por todo apoio prestado sempre que necessário.

À minha coorientadora, Dra. Rose Gomes Monnerat, por ter me dado uma oportunidade para seguirmos na mesma caminhada mais uma vez, acreditado em mim, pela sua orientação, dedicação, convivência, ensinamentos e pela honra de fazer parte de sua equipe de pesquisa mais uma vez.

À toda a equipe de pesquisa da Embrapa Recursos Genéticos, Dr. Paulo Queiroz, Dra. Maria Carolina Bassioli Moraes, Dra. Barbara Eckstein, pela paciência e contribuições nesse trabalho.

Ao funcionário José Alves (Zezinho) pela amizade e todo apoio prestado.

Ao funcionário Luís Palhares por toda dedicação e ajuda prestada.

Aos que estão ou estiveram na equipe LBE durante a realização deste trabalho.

Aos que já seguiram os seus caminhos acadêmicos ou profissionais, mas que durante sua estada sempre proporcionaram momentos de descontração e amizade.

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília e aos seus professores, coordenadores e funcionários, pelas oportunidades e ensinamentos passados.

À Embrapa Recursos Genéticos por disponibilizar a estrutura e recursos necessários para a realização desse trabalho.

À FAP-DF pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Meu muito obrigado a todos!

Porque o Senhor dá a sabedoria, e da Sua boca
vem à inteligência e o conhecimento.

Provérbios 2:6

Há um tempo certo para cada coisa; há um tempo
certo para cada propósito debaixo do céu: Tempo
para nascer e tempo para morrer; tempo para
plantar e tempo para colher.

Eclesiastes 3

RESUMO GERAL

No contexto de uma agricultura sustentável, o controle biológico tem ganhado cada vez mais adeptos. Os microrganismos com atividade de promoção de crescimento podem atuar de diversas maneiras, solubilizando nutrientes, controlando patógenos, produzindo hormônios vegetais, amenizando estresses bióticos e abióticos, dentre outras, isso resulta em melhor desenvolvimento da planta ou antecipa a ida de mudas a campo. O objetivo desse trabalho foi selecionar, identificar e caracterizar estirpes com atividade de promoção de crescimento, oriundas do Banco de Germoplasma de *Bacillus* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia visando obter estirpes que agreguem características relacionadas ao desenvolvimento vegetal e possam ser usadas como inoculante biológico ou controle de fitopatógenos. Para isso, procederam-se ensaios *in vitro* de pareamento com fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*, ensaios de solubilização de fosfato, produção e quantificação de ácido indolacético (AIA) e de crescimento em condições de estresse. Foram selecionadas 15 estirpes principalmente com base nos resultados de pareamento fúngico. Essas estirpes foram caracterizadas molecularmente por PCR em tempo real para a detecção de genes relacionados a lipopeptídeos (bacillomycina D, fengicina D, bacilisina e surfactina A) com características antifúngicas e 4 estirpes por cromatografia gasosa visando identificar os compostos orgânicos voláteis com potencial para inibir o desenvolvimento fúngico. Em 5 estirpes (50, 2784, 2785, 2788, 2791) foram detectados todos os genes que codificam os 4 lipopeptídeos citados anteriormente. Em 3 estirpes há a ocorrência de 3 lipopeptídeos (49, 206 e 2536). A bacilomicina foi o composto que apresentou maior ocorrência de detecção durante esse estudo. Em laboratório de Tecnologia de Sementes da Universidade de Brasília, três estirpes que se destacaram na inibição de patógenos fúngicos (204, 2785, 2791) obtidas nos ensaios anteriores foram utilizadas para tratar sementes de Soja, Grão-de-bico, Trigo e Algodão, visando avaliar o efeito da inoculação das bactérias na qualidade fisiológica de sementes das culturas citadas. Além disso, as estirpes foram testadas quanto ao seu potencial de promoção de crescimento vegetal, produção de AIA, solubilização de fosfato, resistência a metais pesados e crescimento em condições de estresse *in vitro*, diferentes condições de salinidade e temperatura. Sementes de soja foram inoculadas com as bactérias testadas e submetidas a diferentes potenciais osmóticos produzidos por adição de NaCl (p/v) (0, -0.1, -0.2, -0.4, -0.6 MPa) e novamente verificado a sua qualidade fisiológica. Em casa de vegetação montou-se o mesmo ensaio, porém, em caixas de areia onde testou-se diferentes doses de salinidade via irrigação e avaliou-se as características morfométricas e bioquímica das plantas de soja tratadas com duas bactérias que apresentaram resultados promissores nos ensaios *in vitro* (204 e 2785). Em ambos os ensaios se observou que as plantas tratadas com as bactérias 204 e 2785 apresentaram melhor desenvolvimento, onde reduziu-se os efeitos do estresse salino mantendo os parâmetros de crescimento das plantas bem como da manutenção dos teores de clorofila total.

Palavras-chave: Controle biológico, crescimento vegetal, antibiose, condições de estresse, salinidade.

ABSTRACT

In the context of sustainable agriculture, biological control has gained more and more followers. Microorganisms with growth-promoting activity can act in several ways, solubilizing nutrients, controlling pathogens, producing plant hormones, alleviating biotic and abiotic stresses, among others, resulting in better plant development or anticipating the seedlings going to the field. The objective of this work was to select, identify and characterize strains with growth-promoting activity, originating from the *Bacillus* spp. Germplasm Bank, from Embrapa Genetic Resources and Biotechnology aiming to obtain strains that add characteristics related to plant development and can be used as a biological inoculant or control of phytopathogens. To this end, *in vitro* pairing tests were carried out with phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum*, phosphate solubilization tests, production and quantification of indoleacetic acid (IAA) and growth under stress conditions. 15 strains were selected mainly based on fungal pairing results. These strains were molecularly characterized by real-time PCR to detect genes related to lipopeptides (bacillomycin D, fengycin D, bacilysin and surfactin A) with antifungal characteristics and 4 strains by gas chromatography to identify volatile organic compounds with the potential to inhibit the fungal development. In 5 strains (50, 2784, 2785, 2788, 2791) all genes encoding the 4 lipopeptides mentioned above were detected. In 3 strains there is the occurrence of 3 lipopeptides (49, 206 and 2536). Bacillomycin was the compound with the highest occurrence of detection during this study. In the Seed Technology laboratory at the University of Brasília, 3 strains that stood out in the inhibition of fungal pathogens (204, 2785, 2791) obtained in previous tests were used to treat Soybean, Chickpea, Wheat and Cotton seeds, aiming to evaluate the effect of bacterial inoculation on the physiological quality of seeds of the aforementioned crops. Furthermore, the strains were tested for their potential to promote plant growth, IAA production, phosphate solubilization, resistance to heavy metals and growth under *in vitro* stress conditions, different salinity and temperature conditions. Soybean seeds were inoculated with the tested bacteria and subjected to different osmotic potentials produced by the addition of NaCl (w/v) (0, -0.1, -0.2, -0.4, -0.6 MPa) and the physiological quality was again checked. In a greenhouse, the same test was set up, however, in sandboxes where different doses of salinity were tested via irrigation and the morphometric and biochemical characteristics of soybean plants treated with two bacteria that showed promising results in the tests were evaluated. *in vitro* (204 and 2785). In both tests, it was observed that plants treated with bacteria 204 and 2785 showed better development, reducing the effects of saline stress, maintaining plant growth parameters as well as maintaining total chlorophyll levels.

Key Words: Biological control, plant growth, antibiosis, stress conditions, salinity.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
SUMÁRIO	3
1. INTRODUÇÃO GERAL	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 A AGRICULTURA BRASILEIRA	8
2.2 PRODUTOS BIOLÓGICOS NO BRASIL	9
2.3 PATÓGENOS DE SOLO	10
2.4 EFEITOS ABIÓTICOS NA PRODUÇÃO DAS CULTURAS	12
2.5 O GÊNERO <i>BACILLUS</i> SPP.	15
2.5 GRUPO DO <i>B. CEREUS</i>	15
2.6 GRUPO DO <i>B. SUBTILIS</i>	16
2.7 CICLO DE VIDA E ESPORULAÇÃO.....	17
2.8 HABITAT E IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA	19
2.9 PAPEL DAS BACTÉRIAS NA DISPONIBILIDADE DE P NO SOLO.....	21
2.10 PRODUÇÃO DE HORMÔNIOS E MITIGAÇÃO DE ESTRESSES	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
Capítulo 1. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR ESTIRPES DE <i>Bacillus</i> spp.....	38
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 ORIGEM E PREPARO DAS ESTIRPES DE <i>Bacillus</i> SPP.	43
2.2 SELEÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Bacillus</i> ANTAGONISTAS A FUNGOS PATOGÊNICOS.....	43
2.3 ATIVIDADE DE QUITINASE DAS ESTIRPES DE <i>Bacillus</i>	44
2.3.2 DETERMINAÇÃO DA ÉPOCA DE MAIOR PRODUÇÃO DE QUITINASE.....	45
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA DAS ESTIRPES DE <i>BACILLUS</i>	46
2.6 ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL (QPCR).....	46
2.8 COLETA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVS) PRODUZIDOS POR ESTIRPES DE <i>Bacillus</i>	47
2.9 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE <i>Sclerotinia Sclerotiorum</i> E <i>Bacillus</i> POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	49

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4. CONCLUSÕES	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
6. APÊNDICE	71
Capítulo 2. EFEITO DE BACTÉRIAS COM ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE GRANDES CULTURAS E SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO EM SOJA.....	78
1. INTRODUÇÃO	80
2. MATERIAIS E METODOS	84
2.1 ORIGEM E PREPARO E SELEÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>Bacillus</i> SPP.....	84
2.2 DETECÇÃO IN VITRO DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	84
2.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO (AIA).....	84
2.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE	85
2.5 ESTUDO DE RESISTÊNCIA AOS METAIS CÁDMIO, MERCÚRIO E COBALTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ADICIONADOS AO MEIO EMBRAPA SÓLIDO.....	85
2.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE GRANDES CULTURAS TRATADAS COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL	85
2.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS COM BACTÉRIAS SOB CONDIÇÕES SALINAS	86
2.8 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS COM BACTÉRIAS SOB CONDIÇÕES SALINAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	87
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	889
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4. CONCLUSÕES	100
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca por um sistema agrícola mais sustentável tornou-se um objetivo rotineiro no meio rural, sendo que dentre estes, melhorar a biologia do solo é uma das práticas mais visadas. Vários microrganismos têm sido utilizados na agricultura com os mais diversos fins, dentre eles os mais conhecidos são os de controle de pragas. Porém, alguns desses microrganismos podem ser utilizados visando a promoção de crescimento de plantas também conhecidos como PGPR (rizobactérias promotoras de crescimento de plantas).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal podem atuar de uma ou de diversas maneiras como a já citada capacidade de suprimir patógenos de solo, a solubilização de nutrientes como fósforo (P), potássio (K), zinco (Zn), promoção de hormônios vegetais, fixação biológica de nitrogênio (N), função micorrízica e regulação de etileno, minimizam estresses abióticos, promovem a indução de resistência, além de estarem envolvidos nos processos de decomposição de nutrientes e absorção de aminoácidos, o que resulta em melhor desenvolvimento da planta, pode antecipar a ida de mudas ao campo, tendo seu efeito expresso tanto pelo desenvolvimento em altura como na matéria seca de parte aérea ou raízes.

Para a obtenção de altas produtividades diversos fatores influenciam no desempenho da cultura, dentre eles o clima, potencial genético, manejo fitossanitário e as condições do solo, incluindo a sua biologia e fertilidade. Os solos do cerrado naturalmente apresentam alta acidez e saturação por alumínio, e uma baixa saturação de bases.

Um fator de grande interesse quanto ao uso das PGPRs está relacionado ao favorecimento de diferentes fontes de nutrientes uma vez que estes microrganismos podem ser capazes de solubilizar o que para as plantas estaria insolúvel naquele momento. Dessa forma, tendo em vista o aumento geral dos custos dos insumos agrícolas nos últimos anos, principalmente os fertilizantes, pode-se adotar diferentes fontes minerais que naturalmente possuem uma solubilidade mais baixa, como rochas fosfatadas ou potássicas e contar com a atuação dos microrganismos selecionados para este fim para solubilizar e fornecer os nutrientes para a cultura. O uso de PGPR possui benefícios econômicos, ecológicos e ambientais, uma vez que seu uso pode reduzir a quantidade de fertilizantes químicos a serem aplicados evitando contaminações ambientais do solo ou a eutrofização das águas superficiais (Vieira Junior et al., 2013; Nowaki et al., 2017).

O P é um nutriente essencial para as plantas e que naturalmente ocorre em baixas quantidades nos solos dessa região. Possui baixa mobilidade no solo e a sua disponibilidade é influenciada por uma série de fatores, como natureza e teor de argila, matéria orgânica,

sesquióxidos ativos, calcário e pH, além de possuir grande afinidade com os constituintes inorgânicos passíveis de alta fixação de P (óxidos, oxi-hidroxi e hidróxidos de ferro e alumínio) (Sousa e Lobato, 2004).

Em geral, altas produtividades somente são alcançadas quando os níveis de P estão adequados ou acima do ideal, com teores variando de 15 a 20 mg dm⁻³. Dessa forma, as adubações fosfatadas são feitas principalmente utilizando-se as fontes solúveis, que ao serem adicionadas ao solo, aumentam rapidamente a sua concentração na solução do solo, tendo em vista ainda que as quantidades utilizadas são várias vezes superiores às necessidades das culturas, uma vez que cerca de 80% do P aplicado torna-se indisponível após a incorporação ao solo (Silva et al. 2007).

Os fosfatos insolúveis são fosfatos naturais reativos (FNR) na forma de apatita que possuem baixa solubilidade em água e eficiência, se dissociam lentamente na solução do solo e tendem a aumentar a disponibilidade do P para as plantas ao longo do tempo, influenciados principalmente pela matéria orgânica, que contém cerca de 0,5% desse nutriente e é o principal reservatório de reabastecimento do íon fosfato para a solução do solo (Lopes et al., 2004).

A solubilização do fosfato é mediada por variados mecanismos biológicos, dentre estes, a produção de ácidos orgânicos, enzimas como a fitase, quelação e reações de troca (Istina et al., 2015; Kumar et al., 2014; Rodriguez, Fraga 1999; Almoneafy et al., 2014). As principais bactérias envolvidas nesse processo de mineralização do P são pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* (Rodriguez e Fraga, 1999).

Dentre essas bactérias, *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* são as mais promissoras (Chakdar et al., 2018). Principalmente as do gênero *Bacillus* pelas suas vantagens adaptativas, produção de enzimas, sua capacidade de esporulação e sobrevivência no solo, resistentes ao calor e a dessecação, possuindo facilidade para formulação e armazenagem dos produtos favorecendo o seu uso no desenvolvimento de um biofertilizante ou inoculante. Atualmente, diferentes inoculantes estão disponíveis no mercado utilizando diferentes espécies de *Bacillus* tanto para práticas de biocontrole, quanto para biofertilização (Pereg e Mcmillan, 2015).

A produção de metabolitos secundários é de fundamental importância para o grupo das PGPR. Os metabolitos secundários que possuem ação direta contra outro microrganismo, atuam pelo mecanismo antagônico da antibiose. Dentre esses metabolitos incluem os antibióticos, enzimas e compostos voláteis produzidos pelas bactérias e que são fundamentais na agricultura, biotecnologia e indústrias farmacêuticas (Shafi et al., 2017).

Algumas espécies de *Bacillus* sintetizam vários tipos de lipopeptídeos baseados em metabólitos secundários com atividades específicas contra patógenos de plantas que lhes conferem uma importância única na promoção de crescimento. Diversos são os efeitos conhecidos de antibiose, como a inibição de germinação ou crescimento micelial ou inativação de células por meio de intoxicação química. Estes compostos atuam como bactericidas, fungicidas ou fungistáticos e, em alguns casos nematocida (Romero, 2007; Shafi et al., 2017).

Lipopeptídeos antimicrobianos como a micoss subtilina, iturina, surfactina, fengicina, bacilomicina e pliplastina A, tem sido muito estudados devido seu papel na indução da resistência da planta e inibição do crescimento contra fitopatógenos (Chen et al., 2007; Ongena e Jacques 2008; Almoneafy et al., 2014; Gong et al., 2015; Sun et al., 2018).

A identificação dos compostos antifúngicos que possam estar envolvidos no processo de inibição normalmente é caracterizada por métodos genéticos e bioquímicos. O genoma da cepa *B. amyloliquefaciens* FZ252 revelou que aproximadamente 8,5% são dedicados ao metabolismo secundário (Chen et al., 2007; Almoneafy et al., 2014). Essa estirpe de *Bacillus* FZ252, apresentou supressão de patógenos bacterianos e fúngicos por estimulação do crescimento de plantas e biossíntese de moléculas complexas (Scholz et al., 2014; Gong et al., 2015).

Montalvão et al. (2021), avaliaram 178 isolados de *Bacillus* quanto ao seu antagonismo a *Fusarium oxysporum*, destes, 13 foram selecionados para ensaios posteriores e quatro apresentaram redução do crescimento micelial de *Fusarium* por conta da produção de metabólitos não voláteis e duas estirpes apresentaram redução do crescimento micelial por voláteis. Por fim, os autores propuseram um meio de cultura específico para o pareamento fúngico e uma escala diagramática para as avaliações de inibição e que foi adotada neste trabalho.

Outro mecanismo utilizado pelas PGPR são a produção de fitohormônios, esses estão diretamente relacionados a promoção de crescimento vegetal, e são um dos principais mecanismos das bactérias promotoras de crescimento. Os fitohormônios mais comumente produzidos pelos microrganismos são as auxinas (ácido indolacético), giberelinas, a citocinina e o etileno (Silveira, 2007; Vieira Junior et al., 2013).

Dentre as estes, o ácido indolacético (AIA) é o principal fitohormônio relacionado ao alongamento de células, estimulando a síntese celular ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da

membrana, promovendo a formação de raízes adventícias no caule e a expansão radicular (Taiz e Zeiger, 2009; Lana et al., 2017).

A síntese de AIA pode ser realizada em microrganismos tendo como via metabólica a utilização de triptofano como precursor. Prevaecem como gêneros característicos para produção de AIA os *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* (Patten e Glick, 1996; Tsavkelova et al., 2006, Lana et al., 2017). A detecção do AIA produzido por microrganismos ocorre basicamente por colorimetria e sua determinação é útil visando a identificação de bactérias que possam ser úteis no desenvolvimento de inoculante biológico visando a promoção do crescimento de plantas agrícolas.

A EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um banco de Germoplasma de *Bacillus* com mais de 2800 cepas, isoladas ou cedidas de outras instituições que veem sendo utilizado principalmente para ensaios de patogenicidade das estirpes de contra dípteros, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, lepidópteros *Plutella xylostella*, *Anticarsia gemmatilis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera* e coleóptero, *Anthonomus grandis*, *Tenebrio molitor* (Monnerat et al., 2001), sendo que em sua grande maioria ainda não foi avaliada quanto ao seu potencial como PGPR (Santos et al. 2023).

Nesse contexto, essa pesquisa buscou identificar estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da EMBRAPA que possuem atividade promotora de crescimento e que proporcionassem melhorias nos atributos de desenvolvimento das plantas para que futuramente possam vir a ser utilizadas pelos produtores como alternativa ou suplemento ao manejo químico no sistema de produção, bem como, visando amenizar possíveis estresses decorrentes de fatores bióticos e abióticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Agricultura Brasileira

O Brasil destaca-se mundialmente pela sua agricultura, exportando commodities, frutas, vegetais e produtos agropecuários diversos para vários países do mundo, contribuindo para a segurança alimentar mundial. A busca pela sustentabilidade nas lavouras tornou-se frequente e cada vez mais exigida pelos países compradores, principalmente por meio de certificações agrícolas. Embora a agricultura brasileira seja historicamente conhecida por sua extensificação sobre a vegetação natural como o Cerrado e a Amazônia, dados recentes demonstram que a extensificação diminuiu e foi substituída por uma forte tendência de intensificação (Dias et al.,

2016). A intensificação significa a capacidade de aumentar a produção agrícola de uma mesma área, e tem sido proposto como uma das principais estratégias para fornecer segurança alimentar global (Strassburg et al., 2014). Isso só é possível devido as condições ambientais favoráveis e ao uso de tecnologias associadas aos processos produtivos.

Segundo a FAO/FAOSTAT (2020), o Brasil foi o quarto maior produtor de grãos (7,8% do total) em 2020, depois da China, Estados Unidos e Índia. E o segundo maior país em exportação de grãos no mundo, com cerca de 123 milhões de toneladas de grãos exportados, representando 19% do total mundial comercializado.

De fato, o Brasil possui vastas áreas aptas a agricultura e a tendência adotada tem sido a de recuperar áreas degradadas ou em estado de degradação, normalmente utilizadas em manejos pecuários incorretos, ao invés da abertura de novas áreas com vegetação nativa. O manejo e a conservação do solo brasileiro, o uso de tecnologias adequadas e a práticas agrícolas mais sustentáveis tem trazido resultados em produtividade e resultando no aumento das exportações. Dentre as práticas agrícolas adotadas estão o uso da irrigação, cultivares melhoradas, máquinas e equipamentos agrícolas e o uso de insumos químicos ou biológicos.

2.2 Produtos Biológicos no Brasil

O manejo biológico das culturas agrícolas tornou-se parte da estratégia de manejo integrado de pragas e vem ganhado cada vez mais adeptos uma vez que pode atuar de diversas formas, como uma alternativa de devolver a biodiversidade biológica ao solo afetada pelos processos de produção, ser possível manejar pragas, principalmente as de solo, que normalmente os produtos químicos não apresentam resultados satisfatórios, e pela segurança ambiental que representam principalmente pela especificidade dos alvos a serem controlados. Muitos produtos químicos usais nas lavouras brasileiras já foram ou estão em processo para serem retirados de mercado pelos órgãos controladores devido seus altos níveis de toxicidade que os torna incompatíveis com a realidade atual devido os riscos à saúde humana e ao meio ambiente (Soltanzadeh et al. 2016).

O Brasil tornou-se referência mundial na utilização de defensivos agrícolas biológicos possuindo ao todo 552 produtos registrados desde o ano de 2000. Os defensivos agrícolas biológicos são considerados produtos de baixo impacto por possuírem ingredientes ativos biológicos, microbiológicos, semioquímicos, bioquímicos, extratos vegetais e reguladores de crescimento, podendo ser autorizados em vários casos na agricultura orgânica (MAPA, 2022).

Segundo consultorias especializadas, a tendência de crescimento do mercado de biológicos é gigantesca. Atualmente apenas 20% dos produtores utilizam o manejo integrado

com produtos biológicos e estimativas indicam que em 10 anos o mercado de biológicos praticamente triplicará em relação ao que é hoje. As grandes culturas como soja, cana-de-açúcar e milho, representam 75% desse mercado, com a soja sendo a mais representativa, 40% do total.

Dentre o mercado dos produtos biológicos comerciais brasileiros, produtos à base de microrganismos utilizados no controle de pragas 39% correspondem a fungos, como a *Beauveria bassiana*, o *Trichoderma asperellum*, e o *Metarhizium anisopliae*. O segundo grupo de maior representatividade são as bactérias, correspondendo a 19% do total (CropLife 2020). Dentre as bactérias, as pertencentes ao gênero *Bacillus* são praticamente a totalidade, sendo uma alternativa biotecnológica no controle de pragas e vetores de saúde pública, principalmente através da produção de bioinseticidas formulados à base de *B. thuringiensis*, uma vez que este apresenta a capacidade de produção de proteínas tóxicas a várias ordens de insetos de importância agrícola (Palma et al. 2014). O que leva a isso são as vantagens adaptativas da espécie, a produção de enzimas, sua capacidade de esporulação e sobrevivência no solo, resistentes ao calor e a dessecação, resultando em maior facilidade para formulação e armazenagem dos produtos favorecendo o seu uso no desenvolvimento de produtos biológicos como bioinseticidas, biofertilizante e inoculantes (Pereg e Mcmillan, 2015). Além disso, sintetizam metabólitos secundários, biopolímeros, antibióticos e enzimas como, por exemplo, as quitinases expressas pelo gene *Chi* e que tem sido utilizada para controlar a presença de pragas de culturas agrícolas (Kramer et al. 1997, Chandrasekaran et al. 2012).

2.3 Patógenos de solo

O ecossistema do solo é composto por interações entre as comunidades microbianas e suas variáveis físico-químicas, contribuindo para a qualidade geral dos solos (Hermans et al. 2020).

A composição da comunidade bacteriana do solo está fortemente ligada ao tipo de uso do solo, respondendo direta ou indiretamente às mudanças no ambiente do solo provocadas pela atividade antrópica. Apesar disso, as práticas de manejo frequentemente ignoram as mudanças ocasionadas nas comunidades biológicas (Hermans et al. 2020).

As principais atividades da comunidade microbiana do solo incluem a decomposição da matéria orgânica, solubilização de nutrientes, fixação de nitrogênio, a proteção das raízes e a supressão de pragas (Abawi e Widmer, 2000). Tendo em vista que estimativas obtidas por observações de satélite indicam uma faixa de 74 a 99 milhões de ha em estado de degradação

(Cai et al., 2011; Mosier et al. 2021), o monitoramento e manejo adequado do solo e da sua biodiversidade é crucial para garantir a sustentabilidade das indústrias agrícolas e pastoris.

O desequilíbrio da comunidade biológica do solo pode levar ao surgimento de doenças onde a incidência e severidade impactam diretamente nos custos de produção e na produtividade e na qualidade dos produtos agrícola oriundos do sistema. As doenças fúngicas, são consideradas um dos grupos mais dominantes de patógenos de culturas de cereais e hortaliças, com agentes que causam doenças em todos os estágios de produção da planta (Dean et al. 2012; Doehlemann et al. 2017; Newitt et al. 2019). No solo e na rizosfera, as bactérias usam quitina de insetos e fungos como fonte de carbono e nitrogênio (Cohen-Kupiec, Chet 1998; Geisseler et al. 2010; Veliz et al. 2017). Desta forma, eles contribuem para a circulação de carbono e nitrogênio na natureza e participam da proteção das plantas (Brzezinska et al. 2013).

As doenças radiculares são mais severas e causam perdas consideráveis aos vegetais quando as condições do solo são precárias, como alta compactação com drenagem inadequada ou baixo teor de matéria orgânica (Abawi e Widmer, 2000). Doenças radiculares podem ser causadas por diferentes tipos de microrganismos, dentre eles, bactérias, fungos e nematoides (Dean et al. 2012) e são frequentes nas principais culturas agrícolas. Fungos patogênicos do solo invadem principalmente as raízes das plantas, podendo causar podridão radicular, murcha, plantas debilitadas em horários mais quentes, ao mesmo tempo em que esgotam os nutrientes da planta hospedeira.

As espécies de *Fusarium* normalmente não causam a senescência da planta, mas podem causar podridão das raízes, murcha e contaminação de grãos com micotoxinas, afetando negativamente o rendimento e causando uma redução drástica na qualidade da produção (Newitt et al. 2019). *Fusarium oxysporum* corresponde a um complexo de espécies e é composto por fungos do solo que inclui patógenos de plantas, patógenos humanos e muitos não patógenos (Edel-Hermanne e Lecomte 2019). Apresenta alta diversidade funcional e genética e possui uma ampla gama de hospedeiros que inclui grandes culturas, plantas perenes, hortícolas, plantas daninhas e aquáticas onde as cepas patogênicas causam murcha ou apodrecimento da raiz (Edel-Hermanne e Lecomte 2019).

Sclerotinia sclerotiorum é o fungo causador da podridão do caule, se espalha rapidamente pela lavoura e é uma das doenças mais importantes para a cultura da soja (Liu et al. 2022; Cheng et al. 2022), possui ainda mais de 400 espécies hospedeiras globalmente (Boland e Hall, 1994).

O manejo da doença é complicado pela sobrevivência a longo prazo dos escleródios no solo e pela ausência de cultivares resistentes (Willbur et al. 2019).

Para a maioria das doenças fúngicas o manejo adotado visando o controle é por meio da utilização de produtos químicos. Doenças de solo possuem manejo mais difícil principalmente por produzirem estruturas de resistência que podem ficar muito tempo no solo. A adoção do manejo unicamente químico nessas condições normalmente não produz resultados satisfatórios, além de representar riscos para a saúde humana e para o meio ambiente. A adoção combinada de estratégias de controle químico, cultural e biológico pode apresentar melhores resultados (Peltier et al. 2012; Willbur et al. 2019).

2.4 Efeitos abióticos na produção das culturas

O impacto das mudanças climáticas na produção das culturas é cada vez maior. Eventos de estresses abióticos tem ganhado notoriedade pela frequência rotineira em que vem ocorrendo. Temperaturas extremas, longos períodos de seca, erosão, degradação do solo e salinização são alguns exemplos que vem se tornando comuns e representam ameaças ao desenvolvimento das culturas, a saúde humana e ao desenvolvimento social e nacional (Koyro et al. 2011).

A salinidade, juntamente com a seca, são um dos principais fatores abióticos na agricultura, que causam redução do crescimento, anomalias fisiológicas e menor produção das culturas em todo o mundo (Majeed e Muhammad 2019). O estresse hídrico (seca) prejudica o desenvolvimento normal das plantas, perturba as relações hídricas e reduz a eficiência do uso da água, reduz a taxa fotossintética, causa danos as membranas e alterações das atividades enzimáticas (Farooq et al. 2012).

A salinização do solo é definida como o acúmulo de sais solúveis em água no solo a um nível que impacta a produção agrícola, a saúde ambiental e o bem-estar econômico (FAO, 2011). Bem como é caracterizada por apresentar uma condutividade elétrica do solo que excede 4 dS m^{-1} , que é equivalente a 40 mM de NaCl, solos salinos contêm sais solúveis em excesso, principalmente cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de sódio (Na_2SO_4) ou outros sais neutros (FAO, 2015). De acordo com a FAO, solos afetados pela salinidade afetam globalmente mais de 100 países e sua extensão é estimada em cerca de 1 bilhão de hectares (FAO, 2015). Outro estudo indica que a salinidade pode estar presente em 20% de todas as áreas irrigadas mundialmente (Ghassemi et al., 1995; Qadir et al., 2014; Negacz et al. 2022).

Na América do Sul, dados de 30 anos atrás já estimavam a área afetada por salinidade e sodicidade em de 129,3 milhões de ha (UNEP, 1992). No Brasil as principais áreas afetadas encontram-se na região nordeste, em zonas áridas e semiáridas (Holanda et al. 2016; Silva et al. 2021). A salinidade pode ocorrer por causas naturais (fatores primários) bem como através da ação humana (fatores secundários). Dentre os fatores primários cita-se principalmente os processos geológicos, os tipos de minerais nas rochas originárias do solo e o clima. Como fator secundário o fator principal é a prática da irrigação, quando realizada com água rica em sais, em más condições de drenagem e exploração excessiva das águas subterrâneas (Rusco et al., 2008; Ruto et al., 2018; Negacz et al. 2022). Bem como a elevada taxa de evaporação nos trópicos também aumenta o nível de sais nas terras agrícolas.

Concentrações iônicas superiores a 4 dS m^{-1} na rizosfera resultam em condições de estresse para as plantas provocando o aumento a pressão osmótica, diminuem a disponibilidade de água e inibem o crescimento das plantas, alteram as taxas de transpiração e fotossíntese, a abertura e fechamento dos estômatos e nas atividades funcionais das raízes das plantas. A sodicidade provoca ainda a dispersão de partículas de argila e resulta na deterioração da estrutura do solo, baixa aeração e permeabilidade à água e eleva o pH (Khataar et al. 2018; Majeed e Muhammad 2019). Além dos aspectos físico-químicos e fisiológicos, a salinidade afeta também a microbiota do solo, reduzindo sua diversidade (Kumar et al. 2020).

Apesar da maioria das culturas apresentem sensibilidade ao stress salino, existe uma certa variação nas respostas ao stress com base no seu nível de tolerância (Majeed e Muhammad 2019). Alguns dos principais grãos de consumo humano são altamente sensíveis a salinidade como o Caupi, Grão de bico, Amendoim, Lentilha, Ervilha, Milho e Feijão (Ayers e Westcot, 1999; Dias et al. 2016). Dessa forma a necessidade de estudos de formas alternativas de manejo da salinidade visa, dentre outros fatores, a segurança alimentar global.

Os impactos dos sais na inibição do crescimento vegetal ocorrem de duas formas. Inicialmente, reduz a capacidade da planta de absorver água e isso leva a um crescimento mais lento. Este é o efeito osmótico ou de déficit hídrico da salinidade. Em segundo lugar, pode entrar na corrente de transpiração e eventualmente danificar as células das folhas que transpiram, reduzindo ainda mais o crescimento. Este é o efeito específico do sal ou do excesso de íons da salinidade (Pahirar et al. 2015). Os dois efeitos dão origem a uma resposta de crescimento em duas fases à salinidade estabelecida por Munns (2005) (Fig. 1).

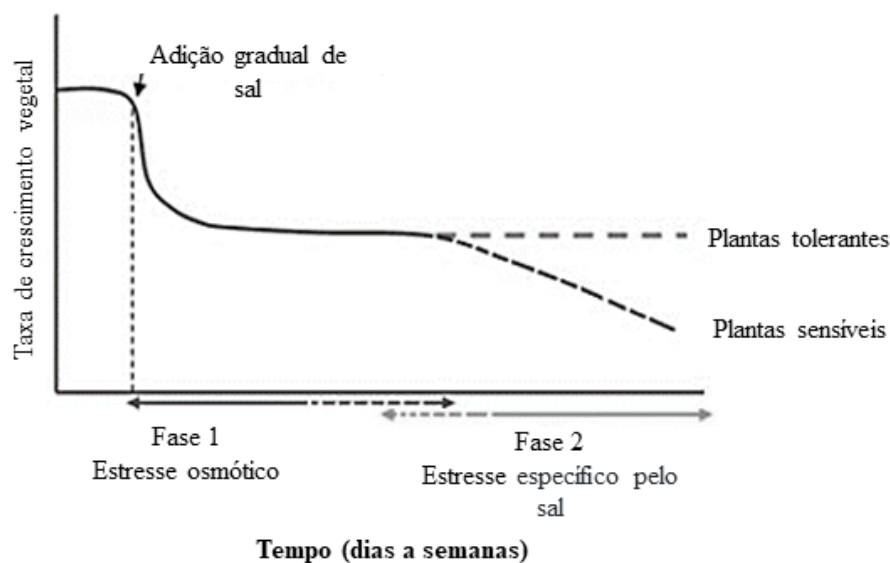


Figura 1. Resposta geral de crescimento à salinidade em duas fases para plantas com diferentes sensibilidades ao sal (adaptado de Munns 2005).

Embora os problemas decorrentes da salinidade sejam globais, poucas são as respostas obtidas pelo melhoramento vegetal quanto a isso, bem como as informações recentes e precisas sobre práticas agronômicas adequadas nas áreas afetadas e a busca de métodos viáveis e com boa relação custo-benefício para reduzir os efeitos drásticos da salinidade nas principais culturas (Kumar et al. 2020).

O controle biológico por meio de microrganismos tolerantes surge como uma excelente alternativa a salinidade. Esta abordagem mais ecológica, somada as demais práticas culturais adequadas, é sensata visando a recuperação simultânea de solo salino e melhoria da produtividade, produzindo respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas para lidar com o estresse salino (Kumar et al. 2020; Mishra et al. 2021)

Esses mecanismos incluem ajuste osmótico pela homeostase iônica e acúmulo de osmólitos, proteção contra radicais livres pela formação de enzimas eliminadoras de radicais livres, respostas ao estresse oxidativo e manutenção dos parâmetros de crescimento pela síntese de fitohormônios e outros metabólitos, melhorando a sobrevivência das plantas sob salinidade (Mishra et al. 2021).

2.5 O gênero *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* é composto de bactérias Gram positivas membros do filo Firmicutes, possuem forma de bastonete, são formadoras de endósporos, podem estar isoladas, em pares ou filamentos de tamanhos variados e a maioria é aeróbia, podem apresentar motilidade por flagelos peritríquios, ou podem ser imóveis. Devido em grande parte ao fato de que eles são habitantes comuns de solo e sedimentos aquáticos, espécies dentro do gênero são difundidas na natureza e são encontrados em praticamente todos os ambientes. Crescem em temperatura que varia entre 25 °C e 37 °C, apesar de existirem espécies com crescimento em faixas de temperaturas muito altas ou muito baixas. Algumas espécies também suportam extremos de pH, podendo crescer entre pH 2 e 10. Essas grandes heterogeneidades de ambientes e condições de crescimento se refletem na variedade de nichos ecológicos que as espécies de *Bacillus* podem ocupar e na quantidade de substratos que estas podem utilizar no seu crescimento e ao grande complexo enzimático produzido por esta espécie (Habib e Andrade, 1998; Logan, de Vos, 2009; Rooney et al., 2009).

Embora as suas principais funções pareçam envolver ciclagem de carbono e nitrogênio, algumas espécies são patogênicas a humanos e animais bem conhecidos (por exemplo, *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*) e agentes patogênicos de insetos (por exemplo, *Bacillus thuringiensis*). No entanto, a grande maioria das espécies de *Bacillus* não são patogênicas. Devido a esse fato, muitos deles têm sido explorados para aplicações biotecnológicas e industriais (Hou et al., 2005, Ruiz-García et al., 2005a, b, Bischoff et al., 2006, Rooney et al., 2009).

O gênero *Bacillus* é dividido em grandes grupos de espécies que apresentam alto percentual de similaridade genética, sendo estreitamente relacionadas. O agrupamento fenotípico destas espécies baseadas na morfologia, fisiologia, perfil de ácidos graxos, fermentação de carboidratos é muitas vezes enganosa (Logan e Berkeley, 1984; Wunschel et al., 1995). Os grupos de maior representatividade são o do *Bacillus cereus* e o grupo do *Bacillus subtilis* por sua importância médica, biotecnológica e industrial.

2.5 Grupo do *B. cereus*

O grupo do *B. cereus* é referido como *B. cereus sensu lato* (s.l., que significa “no sentido mais amplo”) é um *cluster* homogêneo, ou seja, composto por espécies altamente relacionadas taxonomicamente (Jensen et al., 2003; Tourasse et al 2006; Guinebretière et al., 2013).

O grupo *Bacillus cereus* compreende atualmente 12 espécies estreitamente relacionadas, incluindo a primeira espécie descrita *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B.*

mycoides, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides*, *B. gaemokensis*, *B. manliponensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. bingmayongensis* e *B. wiedmannii*. Destes, *B. gaemokensis*, *B. manliponensis* e *B. bingmayongensis* foram efetivamente publicados, mas ainda não foram validamente publicados (Liu et al. 2015; Miller et al. 2016; Liu et al. 2017).

A taxonomia do “grupo *B. cereus*” ainda é bastante controversa. Alguns autores sugerem que estas espécies, por serem tão proximamente relacionadas, devem ser agrupadas como membros de uma única espécie (Hendriksen et al., 2006; Didelot et al., 2009; Guinebretiere et al 2010).

As espécies de *B. cereus sensu lato* podem ser classificadas como distintas devido essencialmente às suas características fenotípicas. *B. anthracis* caracterizam-se pelos fatores de patogenicidade de formação de cápsula e pela produção de toxinas que causam o carbúnculo hemático em humanos e animais, doença conhecida como Antrax (Arnesen et al., 2008). *B. thuringiensis* distingue-se pela produção de endotoxinas produzidas durante sua esporulação, que são utilizadas comercialmente como inseticida. *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* exibem um crescimento típico rizoide em ágar (Nakamura, 1998) e *B. weihenstephanensis* é constituído por estirpes psicrotróficas com multiplicação abaixo de 7 °C, mas não a 43 °C (Lechner et al., 1998; Arnesen et al., 2008).

2.6 Grupo do *B. subtilis*

O grupo do *B. subtilis sensu lato* compreende as espécies: *B. subtilis sensu stricto*, *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. vallismortis*, *B. sonorensis*, dentre outros (Wang et al., 2007; de VOS et al., 2009; Rocha et al. 2023).

Assim como no grupo do *B. cereus*, as espécies do grupo são estreitamente relacionadas, não sendo possível fazer a distinção entre as linhagens baseando-se somente em análises de sequências de rDNA/rRNA 16S (de VOS et al., 2009; Wang et al., 2007; Wattiau et al., 2001).

As espécies desse grupo não são patogênicas e apresentam grande potencial biotecnológico (Streshinskaya et al., 2011). As principais aplicações na indústria são a produção de enzimas (proteases, amilases e celulasas, dentre outras hidrolases), antibióticos, fermentação de alimentos, vitaminas (Jeyaram et al., 2011; Wang et al., 2007) etc. A espécie *B. subtilis sensu stricto* participa da formação de biofilme que previne infecções causadas por patógenos de plantas e é explorada como mecanismo de crescimento vegetal (Lugtenberg e Kamilova, 2009; Kloepper et al., 2004).

2.7 Ciclo de vida e esporulação

A formação de esporos é mais importante na identificação de nível de gênero. Antes de tentar identificar em nível de espécie é importante estabelecer que a estirpe seja realmente uma formadora de endósporo, e que outras inclusões não estão sendo confundidas com esporos.

A capacidade de formar endósporos em condições aeróbias é um fator que define o gênero *Bacillus* desde 1920, e tem sido aplicada em todas as edições do Manual de Bergey's (de Vos *et al.*, 2009). Endósporos são assim chamados porque eles são formados intracelularmente, e elas diferem das suas células vegetativas de origem em muitas maneiras: eles são refrativos opticamente, e são altamente resistentes a tensões químicas e físicas que são letais para células vegetativas. Estas propriedades são conferidas aos esporos: composição química especial e ultraestrutura, e muito esforço tem sido dispendido ao longo de muitos anos, a fim de elucidar os processos de formação de esporos e germinação, e os mecanismos moleculares que fazem dos endósporos a forma mais resistente da vida conhecido na Terra. Embora os endósporos possam ser encontrados em outros gêneros, *Clostridium*, por exemplo, os esporos de *Bacillus subtilis* foram os mais intensamente estudados, especialmente os da estirpe 168 (de VOS *et al.*, 2009).

A formação de um esporo pode ser dividida, didaticamente, em sete estágios morfológicos, intimamente associados às mudanças na expressão gênica (Setlow, 2007; Hilbert, Piggot, 2004; Driks, 1999). Os principais eventos morfológicos, bioquímicos e da regulação da expressão gênica que ocorrem durante cada estágio da esporulação estão resumidos abaixo (Hilbert e Piggot, 2004):

Estágio 0: Célula em estado vegetativo, com genoma duplicado; Estágio I : Formação de um filamento axial, onde as duas cópias do genoma se condensam e alongam para formar um filamento distribuído ao longo do eixo celular; Estágio II : Formação do septo assimétrico que divide a célula em diferenciação (esporângio) em dois compartimentos, o menor (pré-esporo) e o maior (célula mãe); Estágio III : Engolfamento do pré-esporo; Estágio IV : Síntese do córtex: deposição de camadas de peptideoglicano, ligadas frouxamente, no espaço entre as membranas que envolvem o núcleo do pré-esporo; Estágio V : Formação da capa; Estágio VI : Maturação do esporo; Estágio VII : Lise da célula mãe e liberação do esporo maduro.

O esporo maduro resultante do processo de diferenciação é composto por um conjunto de estruturas de proteção arranjadas em camadas concêntricas. Em conjunto com componentes do citoplasma, ou núcleo do esporo, cada um desses componentes contribui para a resistência do esporo, que pode ser viável por décadas (Moeller *et al.*, 2014).

A esporulação foi caracterizada primeiramente em *B. subtilis* e essa espécie permanece como principal modelo do processo (Hilbert e Piggot, 2004). Entretanto, os mesmos fatores chave de regulação ativos em *B. subtilis* foram identificados em diversas outras espécies formadoras de endósporos, com genomas inteiramente sequenciados, inclusive *B. anthracis* e *Clostridium difficile*. As conclusões obtidas a partir de estudos com *B. subtilis* são geralmente válidas para os membros da família *Bacillaceae*, além de outras, e representam as características gerais de diferenciação celular (Orem et al. 2019).

A decisão em esporular é uma resposta de *quorum sensing*. Em conjunto com alta densidade celular e moléculas sinalizadoras, a esporulação é disparada por sinais ambientais, principalmente, baixas concentrações de C, N ou P, em algumas circunstâncias (Setlow, 2007; Hilbert e Piggot, 2004). Os sinais metabólicos e ambientais percebidos por *B. subtilis*, e outras bactérias formadoras de endósporos, são integrados a um sistema de transferência sequencial de fosfato, denominada cascata de fosforilação (Orem et al. 2019).

O esporo resultante desse processo é uma estrutura altamente refratável e vista com um brilho destacado ao microscópio de contraste de fase (Figura 2) (de Vos et al., 2009; Hilbert e Piggot, 2004). Os tipos morfológicos de esféricos a ovalados, bem como a localização, central, subterminal, terminal ou lateral, e a observação de deformação ou não do esporângio durante a formação do esporo, são utilizados como parâmetros de classificação (Orem et al. 2019).

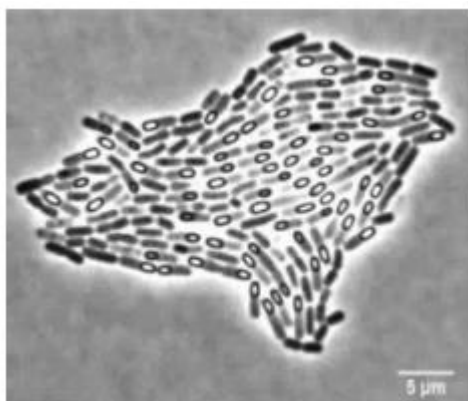


Figura 2. Células de *B. subtilis* em esporulação. Células em estágios avançados da esporulação observadas por microscopia de contraste de fase, onde é possível visualizar os esporos ovalados em formação com o brilho característico dentro dos esporângios. Adaptado de Eijlander *et al.*, 2014.

2.8 Habitat e Importância Tecnológica

Embora as estirpes da maioria das espécies estabelecidas fossem derivadas do solo, ou de ambientes que possam ter sido contaminados, direta ou indiretamente pelo solo, a gama de fontes de isolamento é muito vasta e incluem, além das áreas temperadas, solos ácidos, neutros e alcalinos, água doce e marinha, alimentos e amostras clínicas, ar, sedimentos ricos em metais pesados, processamento resíduos de mineração, salmoura, compostagem, insetos, pena, couro, fezes, tecidos internos das plantas, invertebrados, leite, fontes de água aquecida naturalmente, estrume, papel, algas, soluções salinas e ambientes hipersalinos, esgoto e processos de tratamento de águas residuais, lagos e águas subterrâneas. A maioria das espécies de *Bacillus* são organismos heterotróficos que foram isolados em meios orgânicos complexos, o que provavelmente explica a grande quantidade de substâncias produzidas por este gênero (de Vos *et al.*, 2009).

A ampla distribuição das bactérias do gênero é em parte devido à sua extraordinária longevidade de endósporos, que mostram alta resistência física e a agentes químicos, tais como o calor, o frio, dessecação, radiação, desinfetantes, antibióticos e outros agentes tóxicos, do que as suas células vegetativas. Os endósporos são tipicamente mais resistentes ao calor do que as células vegetativas por um fator de 10^5 vezes ou mais, enquanto a resistência a radiação UV e pode ser de 100 vezes ou mais. Se protegido da radiação, os esporos podem sobreviver durante períodos muito longos (Logan e de Vos, 2009).

A maioria das espécies têm pouco ou nenhum potencial patogênico e raramente estão associados com a doença em seres humanos ou outros animais; uma exceção é *Bacillus anthracis*, o agente do antraz; várias outras espécies podem causar intoxicação alimentar e infecções oportunistas, e estirpes de *Bacillus thuringiensis* são patogênicas para invertebrados (de Vos *et al.*, 2009).

Estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (Monnerat *et al.*, 2001). Representantes de várias espécies, incluindo *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus endophyticus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*, foram isolados a partir dos tecidos internos de plantas saudáveis, incluindo algodão, uva, ervilha, abetos e milho doce, e algumas cepas parecem ter um papel importante na promoção do crescimento e proteção de plantas (Logan e de Vos, 2009). Essas bactérias com hábito de crescimento endofíticos ou epifíticos podem ter potencial como agentes de controle biológico de doenças de plantas, e os

seus esporos, oferecem vantagens na formulação de tais preparações (Emmert e Handelsman, 1999).

As espécies de *Bacillus* também desempenham também um papel importante na degradação de quitina. As quitinases estão entre as hidrolases bacterianas com maior potencial no controle biológico, esta atividade foi demonstrada em estirpes de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* (Gomaa, 2012), *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, e cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis* que utilizam a quitina de resíduos de crustáceos também foram isolados (Sabry, 1992; Wang e Hwang, 2001). A importância desta propriedade é que estirpes com atividade quitinolítica podem ser patogênicas a insetos e/ou pragas agrícolas e possuir propriedades antifúngicas. Quitinases de um isolado do solo de *Bacillus amyloliquefaciens* foram encontrados apresentando propriedades antifúngicas (Wang et al., 2002).

Outras estirpes de *Bacillus* também têm sido isoladas acumulando íons metálicos não enzimaticamente por adsorção a sua superfície celular: células de *Bacillus licheniformis* podem acumular cério, cobalto e íons de cobre a partir de soluções de resíduos (Hafez et al., 2002), *Bacillus subtilis* podem acumular alumínio, cádmio, ferro e zinco, e aluminossilicatos (Urrutia e Beveridge, 1995). Essa propriedade pode ser de importância tanto no tratamento de resíduos urbanos e industriais quanto na recuperação de áreas degradadas ou contaminadas.

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* vêm sendo muito utilizadas em aplicações industriais, ocupando o maior lugar dentre os outros microrganismos com aplicações práticas. Eles são organismos com atrativo industrial por possuírem diversas características vantajosas, tais como sua alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para fermentação, sua capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular e o estado GRAS (Generally Recognized as Safe), considerado pelo FDA (Food and Drug Administration), de algumas espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Schallmeyer et al. 2004), as quais são muito próximas, filogeneticamente, de *Bacillus amyloliquefaciens*. Estes organismos são uma fonte muito importante de enzimas extracelulares utilizadas industrialmente, incluindo proteases e amilase (Lisboa et al. 2006).

Ji et al. (2013), pesquisando o isolado de *B. amyloliquefaciens* CNU114001 que foi identificado por observação morfológica e molecular de dados, apresentou atividade de amplo espectro contra 12 fungos fitopatogênicos por método de cultura dupla, analisando a inibição do patógeno. As substâncias antifúngicas do isolado foram extraídas e purificadas por

cromatografia em gel de sílica em coluna, cromatografia em camada fina e cromatografia líquida de alta eficiência. O composto estável foi identificado como iturina A, um lipopéptido. O composto semi-purificado inibe significativamente o crescimento micelial de fungos patogênicos (*Alternaria Panax*, *Botrytis cinera*, *Colletotrichum orbiculare*, *Penicillium digitatum*, *Pyricularia grisea* e *Sclerotinia sclerotiorum*) em 200 ppm de concentração.

A estirpe FZB42 de *B. amyloliquefaciens* apresentou supressão a nematoides e produz lipopeptídeos, surfatinas, bacilomicina D e fengicinas, que são metabolitos secundários com atividade principalmente antifúngica (Chen et al., 2006). Estes metabolitos têm atividades antifúngicas e antibacterianas, afetam a motilidade bacteriana e promovem a formação de biofilme, e agem como efetores para indução de resistência sistêmica (Pérez-García et al., 2011).

Nam et al., (2016), observou que a aplicação foliar da cultura bacteriana da estirpe *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 reduziu significativamente a incidência de doenças em quatro patossistemas (*Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum coccodes* e *Fusarium oxysporum*) apresentando resultados semelhantes ao produto comercial a base da estirpe de *B. subtilis* QST-713, utilizado como controle.

Para a agricultura existe a necessidade contínua do lançamento de novos produtos, principalmente devido à alta toxicidade dos existentes e que estão sendo retirados de mercado e substituídos por produtos menos tóxicos, além da baixa eficiência de controle de determinados produtos a pragas e doenças específicas (Rezende-Teixeira et al. 2022). Dessa forma, as preparações biológicas de *Bacillus* sp. são preferidas do ponto de vista tecnológico, porque a sua viabilidade a longo prazo facilita o desenvolvimento de produtos comerciais (Borriss, 2015). Estas bactérias associadas às plantas são caracterizadas pela sua atividade simultânea de promoção do crescimento das plantas e biocontrole. Os efeitos de promoção do crescimento das plantas e biocontrole reforçam a sanidade e resistência aos agentes patogênicos, reduzindo as perdas na colheita (Kamilova et al., 2015). Infelizmente, o sucesso de tais biológicos na agricultura ainda é dificultado por desempenho de campo às vezes inconsistente devido ao conhecimento insuficiente sobre os mecanismos básicos de interações entre *Bacillus* e plantas, embora alguns avanços tenham sido feitos na última década (Ravensberg, 2015).

2.9 Papel das bactérias na disponibilidade de P no solo

O fósforo é um nutriente essencial para as plantas que o absorvem da solução do solo como ânion fosfato. É o elemento menos móvel na planta e no solo, ao contrário de outros macronutrientes.

A dinâmica do P do solo é caracterizada por aspectos físico-químicos (sorção-dessorção) e processos biológicos (imobilização-mineralização). Onde grande parte do P aplicado como fertilizante se torna indisponível através da reação de precipitação com hidróxidos de Fe e Al, resultando em uma eficiência dos fertilizantes fosfatados a nível mundial em cerca de 10 - 25% (Isherword, 1998; Khan et al. 2009). Dessa forma, os microrganismos do solo desempenham um papel fundamental na dinâmica do P do solo e subsequente disponibilidade de fosfato para as plantas (Richardson, 2001; Khan et al. 2009).

Bactérias solubilizadoras de fósforo desempenham um papel fundamental na nutrição de fósforo, aumentando sua disponibilidade para as plantas por meio da liberação de pools de P do solo inorgânico e orgânico por solubilização e mineralização. O principal mecanismo no solo para a solubilização do fosfato mineral é a redução do pH do solo pela produção microbiana de ácidos orgânicos e a mineralização do P orgânico pelas fosfatases ácidas. O uso de bactérias solubilizadoras de fósforo como inoculantes aumenta a absorção de fósforo. Essas bactérias também aumentam as perspectivas de uso de rochas fosfáticas ou de outras fontes secundárias de P na produção agrícola (Khan et al., 2009; Saeid et al., 2018).

Uma das rizobactérias mais dominantes são os *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, etc.), estes microrganismos desenvolveram diferentes mecanismos para aumentar o crescimento das plantas, aumentando a disponibilidade do P no solo (Saha et al. 2016, Song et al. 2015, Bahadur et al. 2017). Um dos principais mecanismos reconhecidos como responsáveis pela liberação de formas disponíveis de fósforo para as plantas no solo é a produção de ácidos orgânicos possibilitando a solubilização de compostos de fosfato inorgânico insolúveis, como fosfato tricálcico, fosfato bicálcico, hidroxiapatita e fosfatos de rocha (Oteino et al., 2015; Park et al. 2011; Xu et al. 2019, Liu et al. 2021, Zhang et al. 2020).

Uma vez definidos os microrganismos adequados, fontes de fosforo orgânico poderiam ser mais utilizadas na agricultura convencional, aumentando a eficiência deste tipo de fertilizante que normalmente é baixa uma vez que, o P presente é praticamente insolúvel, necessitando de uma longa taxa de liberação, isso tornaria a técnica de menor custo e de baixo gasto energético em comparação com os fertilizantes fosfatados inorgânicos.

Diversos ácidos orgânicos são relatados na literatura como sendo produzidos por microrganismos durante a fermentação. A quantidade produzida varia de acordo com fatores químicos e físicos ambientais e com o genoma do organismo. Embora a solubilização de fosfato seja geralmente atribuída à liberação de ácidos orgânicos, poucos estudos identificaram e quantificaram os ácidos orgânicos e definiram seu papel na solubilização de fosfatos insolúveis

por microrganismos. Os ácidos orgânicos mencionados na literatura são: oxálico, 2-cetoglucônico, maleico, cítrico, tartárico, fumárico, glucônico, málico, glicólico, lático, succínico, propiônico (Marra et al., 2015; Pande et al. 2017). Além desses, os ácidos pirúvico e alfacetoglutárico também foram identificados (Mardad et al. 2013; Singh e Amberger, 1998).

Saied et al., (2018), identificou estirpes de *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* como microrganismos solubilizadores de fosfato em diferentes fontes de P e produtores de ácidos orgânicos (glucônico, lático, acético, succínico e propiônico) detectados por meio de cromatografia líquida de alta precisão.

Mehta et al., (2014), trabalhando com o isolado CKAM pertencente a espécie *B. methylotrophicus* identificaram capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido e líquido, além de uma ampla gama de metabólitos secundários incluindo sideróforos, cianeto de hidrogênio (HCN) e ácido indolacético (AIA), o isolado demonstrou ainda eficácia no antagonismo de fungos fitopatogênicos e na indução do crescimento das plantas. Os autores concluíram que o isolado CKAM poderia ser usado como potencial biofertilizante e como um potencial agente de controle biológico.

Delfim et al., (2018) demonstrou resultados positivos para o uso de um microrganismo solubilizador de fosfato a base de *B. thuringiensis* quando inoculado em um solo de origem vulcânica em plantas de trigo.

2.10 Produção de hormônios e mitigação de estresses

A auxina, ácido indol-3-acético (AIA), é um hormônio produzido por 80% da flora bacteriana na rizosfera. As auxinas são responsáveis por estimular o alongamento celular, divisão celular, diferenciação tecidual e auxiliam na dominância apical. Microrganismos produtores de AIA são capazes de promover o desenvolvimento vegetal, auxiliando no crescimento geral da planta (Goswami et al. 2015). A maioria dos PGPRs utiliza L-triptofano que é secretado em exsudatos de raízes como precursor para a produção de AIA (Goswami et al. 2015.)

Almoneafy et al. (2014) verificaram correlação positiva entre a produção de AIA por estirpes bacterianas de *B. amyloliquefaciens* variando de 44,25 µg/ml a 59,56 µg/ml e a massa fresca/seca de tomateiros inoculados com esses isolados. Os autores relatam ainda que a capacidade de aumentar os parâmetros de crescimento vegetal estão diretamente relacionados aos níveis de produção de AIA e solubilização de fosfato.

Além da solubilização de fosfato e produção de hormônios vegetais, as rizobactérias podem ainda reduzir o efeito de estresses bióticos e abióticos que afetam negativamente o crescimento,

desenvolvimento, produtividade e produção de biomassa das plantas (Chaudhary et al., 2012; Hashem et al., 2019).

Dentre os estresses bióticos mais comuns estão os fungos, vírus, bactérias, nematoides e ácaros. Todos esses têm capacidade de prejudicar o desenvolvimento das plantas, reduzir o vigor e ainda induzir a mortalidade. Estresses abióticos como salinização do solo, sodificação do solo, seca, pH do solo e temperatura ambiental são os principais fatores limitantes na produção agrícola. A salinização do solo e a sodificação do solo são um dos processos de degradação do solo mais difundidos na Terra, colocando em risco o potencial de uso dos solos (Rengasamy, 2006; Ladeiro, 2012; Goswami et al. 2015).

Dessa forma, a adoção de métodos visando amenizar o efeito de estresses nas plantas deve ser levado em conta, isso inclui a busca e utilização de microrganismos adaptados afim de promover o desenvolvimento vegetal mesmo em condições adversas.

A tolerância a estresses abióticos está relacionada a expressão gênica e produção de hormônios relacionados como a ACC deaminase que atua degradando o precursor do etileno, fazendo com que a planta mantenha o crescimento normal sob condições estressantes, a produção de sideróforos que ajudam a manter o equilíbrio iônico, promovem o movimento da água nos tecidos vegetais (Hashem et al., 2019).

Sorty et al. (2016), isolaram bactérias tolerantes a salinidade de plantas daninhas da espécie *Psoralea corylifolia* e verificaram que a inoculação em sementes de trigo em condições salinas promovia melhora na sua germinação e no seu crescimento, ajudando a planta a suportar o ambiente de estresse, além disso, todos os isolados testados foram capazes de produzir sideróforos e AIA.

Estirpes bacterianas podem provocar a indução de resistência da planta a fatores bióticos, por meio da ativação da resistência sistêmica induzida (ISR), produzindo respostas de defesa contra patógenos, mesmo antes da presença destes como por exemplo induzir a síntese de ácido jasmônico (JA), etileno e do gene regulador NPR1 em plantas (Garcia-Gutierrez et al., 2013; Hashem et al., 2019).

Ongena et al. (2007), verificaram efeito protetor mediado por ISR em plantas de feijão após utilizar fengicina e surfactina purificadas contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea*.

Chowdhury et al. (2015), verificaram aumento da expressão do gene *PDF1.2* na interação entre *B. amyloliquefaciens* FZB42 e *Rhizoctonia solani* em plantas de alface, sugerindo que o lipopeptídeo cíclico contribuiu para a resposta de defesa da planta desencadeada por ISR.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G. S.; WIDMER, T. L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology*, v. 15, n. 1, p. 37–47, ago. 2000.
- ALMONEAFY, A. A. et al. Tomato plant growth promotion and antibacterial related mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis*, v. 63, n. 2, p. 59–70, jun. 2014.
- ARNESEN, L.P.S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, v.32, n.4, p.579-606, 2008.
- BAHADUR, I. et al. Mineral Release Dynamics of Tricalcium Phosphate and Waste Muscovite by Mineral-Solubilizing Rhizobacteria Isolated from Indo-Gangetic Plain of India. *Geomicrobiology Journal*, p. 1–13, 6 set. 2016.
- BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 11–18, 2009.
- BISCHOFF, K. M. et al. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 21, p. 1761–1765, 10 ago. 2006.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 16, n. 2, p. 93–108, jun. 1994.
- BORRISS, R. *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. In: *Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture*. Cham: Springer international publishing, 2014. p. 379-391.
- CAI, X.; ZHANG, X.; WANG, D. Land Availability for Biofuel Production. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 1, p. 334–339, jan. 2011.
- CHAUDHARY, D. P. et al. Maize as fodder? An alternative approach. Directorate of Maize Research, Pusa Campus, New Delhi - 110 012, Technical Bulletin 2012/04, p. 32. 2012.

CHAKDAR, H. et al. Characterization of mineral phosphate solubilizing and plant growth promoting bacteria from termite soil of arid region. 3 Biotech, v. 8, n. 11, 28 out. 2018.

CHEN, X.-H. et al. Structural and Functional Characterization of Three Polyketide Synthase Gene Clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. Journal of Bacteriology, v. 188, n. 11, p. 4024–4036, jun. 2006.

CHEN, X. H. et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nature Biotechnology, v. 25, n. 9, p. 1007–1014, 19 ago. 2007.

CHENG, Y. et al. Dual RNA Sequencing Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Sclerotinia sclerotiorum* During Infection of Soybean Seedlings by *S. sclerotiorum* Unveils Antagonistic Interactions. Frontiers in Microbiology, v. 13, 23 jun. 2022.

CHOWDHURY, S. P. et al. Cyclic Lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance Plant Defense Responses Toward the Bottom Rot Pathogen *Rhizoctonia solani*. Molecular Plant-microbe Interactions, v. 28, n. 9, p. 984–995, 28 ago. 2015.

DIAS, N. S., et al. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade (Salinity effects on plants and tolerance of crops to salinity). In: GHEYI, H. R., DIAS, N.D.S., LACERDA, C.F.D., GOMES FILHO, E., (editors). Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados. Fortaleza, CE, Brazil: Instituto Nacional em Ciência e Tecnologia em Salinidade (National Institute of Science and Technology Applied to Salinity). p. 151-162. 2016.

DELFIM, J. et al. Phosphorus Availability in Wheat, in Volcanic Soils Inoculated with Phosphate-Solubilizing *Bacillus thuringiensis*. Sustainability, v. 10, n. 2, p. 144, 11 jan. 2018.

DIDELOT, X. et al. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. Systematic and Applied Microbiology, v. 32, n. 2, p. 81–90, abr. 2009.

DIMKIĆ, I. et al. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 117, p. 101754, jan. 2022.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v. 13, n. 4, p. 414–430, 4 abr. 2012.

DOEHLEMAN, G. et al. Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 1, 1 fev. 2017.

DRIKS, A. *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 1, p. 1–20, 1 mar. 1999.

EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current Status of *Fusarium oxysporum* Formae Speciales and Races. *Phytopathology*, v. 109, n. 4, p. 512–530, abr. 2019.

EIJLANDER, R. T. et al. SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, p. D685–D691, 28 out. 2013.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, v. 171, n. 1, p. 1–9, fev. 1999.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Staff. OECD-FAO Agricultural Outlook, 2015-2024. OECD. 2015. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i4738e/i4738e.pdf>

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture Organization: Status of the World's Soil Resources (SWSR)–Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy. 2015.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT; U.S. Bureau of Labor Statistics. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>; Acesso: 11/02/2024

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture – Systems at breaking point (SOLAW 2021). FAO, 2021.

FAROOQ, M. et al. Drought Stress in Plants: An Overview. *Plant Responses to Drought Stress*, p. 1–33, 2012.

GONG, A.-D. et al. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. PLOS ONE, v. 10, n. 2, p. e0116871, 17 fev. 2015.

GOMAA, E. Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. The Journal of Microbiology, v. 50, n. 1, p. 103–111, fev. 2012.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food & Agriculture, v. 2, n. 1, 19 jan. 2016.

GUINEBRETIÈRE, M.-H. et al. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 63, p. 31–40, 1 jan. 2013.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: Controle Microbiano de Insetos. (ed.) ALVES, S. B.; 2 ed. Piracicaba. 1998.

HAFEZ, M. B.; FOUAD, A.; W. EL-DESOUKY. Accumulation of some metal ions on *Bacillus licheniformis*. Journal of radioanalytical and nuclear chemistry, v. 251, n. 2, p. 249–252, 1 jan. 2002.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; FATHI ABD_ALLAH, E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 26, n. 6, p. 1291–1297, set. 2019.

HENDRIKSEN, N. B.; HANSEN, B. M.; JOHANSEN, J. E. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. Antonie van Leeuwenhoek, v. 89, n. 2, p. 239–249, 21 abr. 2006.

HERMANS, S. M. et al. Using soil bacterial communities to predict physico-chemical variables and soil quality. Microbiome, v. 8, n. 1, 2 jun. 2020.

HILBERT, D. W.; PIGGOT, P. J. Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 68, n. 2, p. 234–262, jun. 2004.

HOLANDA, J.S. et al. Qualidade da água para irrigação. (2a ed.) In: Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos aplicados, Cap. 2, INCTSAL, Fortaleza (2016), p. 9-15

HOU, C. T.; LABEDA, D. P.; ROONEY, A. Evaluation of microbial strains for linoleic acid hydroxylation and reclassification of strain ALA2. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 88, n. 2, p. 167–171, 1 ago. 2005.

ISHERWORD, K. F. Fertilizer use and environment. In: N. Ahmed and A. Hamid (eds.), *Proc. Symp. Plant Nutrition Management for Sustainable Agricultural Growth*. NFDC, Islamabad. p. 57-76. 1998.

ISTINA, I. N. et al. Phosphate-solubilizing microbe from Saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. *Procedia Food Science*, v. 3, p. 426-435. 2015

JENSEN, G. B. et al. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, v. 5, n. 8, p. 631–640, 18 jul. 2003.

JEYARAM, K.; et al.; Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. *Journal of microbiological methods*, v. 87, p. 161-164. 2011.

JI, S.-H. et al. Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against Fungal Plant Diseases. *Mycobiology*, v. 41, n. 4, p. 234–242, 1 dez. 2013.

KAMILOVA, F. et al. Commercialization of Microbes: Manufacturing, Inoculation, Best Practice for Objective Field Testing, and Registration. Springer eBooks, p. 319–327, 1 jan. 2015.

KHAN, A. A. et al. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science*, v.1, n. 1, p. 48-58. 2009.

KHATAAR, M.; MOHAMMADI, M. H.; SHABANI, F. Soil salinity and matric potential interaction on water use, water use efficiency and yield response factor of bean and wheat. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 8 fev. 2018.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C.-M.; ZHANG, S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology®*, v. 94, n. 11, p. 1259–1266, nov. 2004.

KOYRO, H. et al. Abiotic stress responses in plants: an overview. In: Ahmad, P.; Prasad, M. N. V. (eds) Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Springer Science & Business Media, p. 1-28. 2012.

KUMAR, S. et al. Amendments of microbial biofertilizers and organic substances reduces requirement of urea and DAP with enhanced nutrient availability and productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). Ecological engineering, v. 71, p. 432-437. 2014

LADEIRO, B. Saline Agriculture in the 21st Century: Using Salt Contaminated Resources to Cope Food Requirements. Journal of Botany, 2012.

LANA, U. D. P. et al. Seleção em larga escala de bactérias produtoras do hormônio ácido indolacético (AIA), auxina associada à promoção de crescimento em plantas. (Embrapa Milho e Sorgo, Documentos 218), 2017.

LECHNER, S. et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 48, n. 4, p. 1373–1382, 1 out. 1998.

LISBOA, M. P. et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, v. 9, n. 2, p. 111–118, 1 jun. 2006.

LIU, Y. et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. Scientific Reports, v. 5, n. 1, 16 set. 2015.

LIU, Y. et al. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 67, n. 8, p. 2499–2508, 1 ago. 2017.

LIU, X. et al. Phosphorus solubilizing bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Pantoea ananatis* simultaneously promote soil inorganic phosphate dissolution and soil Pb immobilization. Rhizosphere, v. 20, p. 100448. 2021.

LIU, J. et al. Digital gene expression profiling of the transcriptional response to *Sclerotinia sclerotiorum* and its antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* in soybean. Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 1025771. 2022.

LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. W. Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. Microbiology, v. 130, n. 7, p. 1871–1882, 1 jul. 1984.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 174AL. v.3 . The firmicutes 2º Ed. 2009.

LOPES, A. S. et al. Sistema Plantio Direto: bases para o manejo da fertilidade do solo. São Paulo: ANDA, 2004.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F.; Plant-growth promoting rhizobacteria. Annual review microbiology, v. 63, p. 541-556. 2009.

MAJEED, A.; MUHAMMAD, Z. Salinity: A Major Agricultural Problem—Causes, Impacts on Crop Productivity and Management Strategies. Plant Abiotic Stress Tolerance, p. 83–99, 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio. Brasil 2014/15 a 2024/25. Projeções de longo Prazo, p. 133. 2015., Brasília/DF. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-2014-2015-a-2024-2025.pdf/view>

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DEFESA AGROPECUÁRIA - Mapa registra 46 defensivos agrícolas, incluindo sete produtos biológicos. (2022) Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias-2022/mapa-registra-46-defensivos-agricolas-incluindo-sete-produtos-biologicos> Acesso: 04/08/2022

MARDAD, I.; DELGADO, A. S.; SOUKRI, A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. African Journal of Microbiology Research, v. 7, n. 8, p. 626-635. 2013.

MARRA, L. M. et al. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. Brazilian Journal of Microbiology, v. 46, n. 2, p. 367–375, 2015.

MEHTA, P. ET al. Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylotrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities. Acta physiologiae plantarum, v. 36, p. 2033-2045. 2014

- MILLER, R. A. et al. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 66, n. 11, p. 4744-4753. 2016.
- MOELLER, R. et al. Resistance of *Bacillus subtilis* Spore DNA to Lethal Ionizing Radiation Damage Relies Primarily on Spore Core Components and DNA Repair, with Minor Effects of Oxygen Radical Detoxification. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 1, p. 104-109. 2014.
- MONNERAT, R.G. et al. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. 65p. (Documentos, 60). 2001.
- MONTALVÃO, S. C. L. et al. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* With *Bacillus* spp. Strains. *Journal of Agricultural Science*, v. 13, n. 9, p. p1, 15 ago. 2021.
- MOSIER, S.; CÓRDOVA, S. C.; ROBERTSON, G. P. Restoring soil fertility on degraded lands to meet food, fuel, and climate security needs via perennialization. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, p. 706142. 2021.
- NAKAMURA, L. K. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, n. 3, p. 1031–1035, 1 jul. 1998.
- NAM, H.-S. et al. Biological Control Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 Isolated from the Feces of *Allomyrina dichotoma* Larvae. *The Plant Pathology Journal*, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1 jun. 2016.
- NEWITT, J. T. et al. Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using Streptomycetes. *Pathogens*, v. 8, n. 2, p. 78, 1 jun. 2019.
- NOWAKI, R. H. D. et al. Phosphorus over-fertilization and nutrient misbalance of irrigated tomato crops in Brazil. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1–11. 2017.
- ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, v. 9, n. 4, p. 1084-1090. 2007.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, v.16, n. 3, p. 115-125. 2008.

- OREM, J. C. et al. Phylogenetic diversity of aerobic spore-forming Bacillales isolated from Brazilian soils. *International Microbiology*, 22, 511-520. 2019.
- OTEINO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 745. 2015.
- PANDE, A. et al. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 15, n. 2, p. 379-391. 2017.
- PARK, J. H. et al. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of hazardous materials*, v. 185, n.2-3, p. 829-836. 2011.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, v. 42, n. 3, p. 207-220. 1996.
- PELTIER, A. J. et al. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. *Journal of Integrated Pest Management*, v. 3, p. 1-7. 2012.
- PEREG, L.; MCMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 80, p. 349-358. 2015.
- PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187-193. 2011.
- RAVENSBERG, W. J. Commercialisation of microbes: present situation and future prospects. In: *Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture*, 309-317. 2015. Cham: Springer International Publishing. 2015.
- RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of experimental botany*, v. 57, n. 5, p. 1017-1023. 2006.
- RESENDE, Á. V. et al. Solos de fertilidade construída: características, funcionamento e manejo. International Plant Nutrition Institute (IPNI), *Informações Agrônômicas* N° 156. 2016.

REZENDE-TEIXEIRA, P. et al. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. *Environmental Pollution*, v. 300, p. 118983. 2022.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, n. 9, p. 897, 2001.

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

ROMERO, D. et al. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, n. 4, p. 430-440. 2007.

ROONEY, A. P. et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 2429–2436. 2009.

RUIZ-GARCIA, C. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 191–195. 2005.

Sabry, S. A. Microbial degradation of shrimp-shell waste. *Journal of basic microbiology*, v. 32, n. 2, p. 107-111. 1992.

SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANEK, J. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, v. 23, n. 11, p. 2897. 2018.

SAHA, M. et al. Can potassium-solubilising bacteria mitigate the potassium problems in India?. In: *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture*, New Delhi: Springer. p. 127-136. 2016.

SANTOS, J. B. et al. Detection and evaluation of volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Bacillus* spp. strains. *Microbiological Research*, v. 275, p. 127465. 2023.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, v. 50, n. 1, p. 1-17. 2004.

- SCHOLZ, R. et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, v. 196, n. 10, p. 1842-1852. 2014.
- SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 172-180. 2007.
- SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 31, n. 3, p. 446-459. 2017.
- SILVA, M. D. O. et al. Desempenho da mucuna preta quando adubada com diferentes tipos de fosfatos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 7, n. 1, p. 127-132. 2007.
- SILVA, D. C. et al. Principal component analysis and biophysical parameters in the assessment of soil salinity in the irrigated perimeter of Bahia, Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*, v. 112, p. 103580. 2021.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.
- SINGH, C. P.; AMBERGER, A. Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Bioresource Technology*, v. 63, n. 1, p. 13-16. 1998.
- SOLTANZADEH, M.; NEJAD, M. S.; BONJAR, G. H. S. Application of soil-borne actinomycetes for biological control against Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum*) caused by *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Journal of Phytopathology*, v. 164, p. 967-978, 2016.
- SONG, M. et al. (2015). K-extraction from muscovite by the isolated fungi. *Geomicrobiology Journal*, v. 32, n. 9, p. 771-779.
- SORTY, A. M. et al. Effect of plant growth promoting bacteria associated with halophytic weed (*Psoralea corylifolia* L) on germination and seedling growth of wheat under saline conditions. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 180, p. 872-882. 2016.
- SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). Cerrado: correção do solo e adubação. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 416 p. il.

STRASSBURG, B. B. N. et al. When enough should be enough: Improving the use of current agricultural lands could meet production demands and spare natural habitats in Brazil. *Global Environmental Change*, v. 28, p. 84-97. 2014.

STRESHINSKAYA, G. M. et al. Carbohydrate-Containing Cell Wall Polymers of some Strains of the *Bacillus Subtilis* Group. *Microbiology*, v. 80. p. 21-29. 2011.

SUN, J. et al. Knockout of *rapC* improves the bacillomycin D yield based on de novo genome sequencing of *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 66, n. 17, p. 4422-4430. 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4º. ed. Porto Alegre. Artmed, 2009.

TOURASSE, N. J. et al. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, p. 579-593. 2006.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied biochemistry and microbiology*, 42, 117-126. 2006

UNEP. Proceedings of the Ad-hoc Expert Group Meeting to Discuss Global Soil Databases and Appraisal of GLASOD/SOTER, February 24-28. Nairobi, Quenia, p. 39. UNEP. 1992.

URRUTIA, M. M.; BEVERIDGE, T. J. Formation of short-range ordered aluminosilicates in the presence of a bacterial surface (*Bacillus subtilis*) and organic ligands. *Geoderma*, v. 65, p. 149-165. 1995.

VIEIRA JÚNIOR, J. R. et al. Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. (Embrapa Rondônia. Documentos, 155).

WANG, L. T. et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 57, p. 1846-1850. 2007.

WANG, S. L.; HWANG, J. R. Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 376-382. 2001.

- WANG, S. L. et al. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 2241-2248. 2002
- WATTIAU, P. et al. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its applications to the monitoring of wastewater biotreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 816-819. 2001.
- WILLBUR, J. et al. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Tropical Plant Pathology*, v. 44, p. 3-11. 2019.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.
- WUNSCH, D. et al. Discrimination among the *B. cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* v. 17, n. 4, p. 625–635. 1995.
- XU, J. C. et al. Effective lead immobilization by phosphate rock solubilization mediated by phosphate rock amendment and phosphate solubilizing bacteria. *Chemosphere*, v. 237, p. 124540. 2019.
- ZHANG, K. et al. Effective passivation of lead by phosphate solubilizing bacteria capsules containing tricalcium phosphate. *Journal of hazardous materials*, v. 397, p. 122754. 2020.

Capítulo 1. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR ESTIRPES DE *Bacillus* spp.

RESUMO

No contexto de uma agricultura sustentável, o controle biológico de fitopatógenos tem ganhado cada vez mais adeptos. O estudo de identificação dos compostos antifúngicos produzidos por microrganismos benéficos tem ganhado relevância nesse sentido. Dentre eles os lipopeptídeos surfatinas, iturinas e fengicinas que estão envolvidos na maioria dos mecanismos de ação contra diferentes patógenos. Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por sua ampla gama de moléculas produzidas com ação à diversas pragas agrícolas, agindo na indução de crescimento vegetal e no controle vetores de saúde pública. A identificação de estirpes com potencial biotecnológico passa por bioensaios *in vitro* e testes moleculares. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi selecionar, dentro do Banco de Germoplasma de *Bacillus* pertencente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/DF, estirpes com potencial para o controle dos patógenos fúngicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* em ensaios de pareamento, avaliar a produção de quitinase, realizar a detecção de genes relacionados à síntese de substâncias antifúngicas Bacillomycina D, Fengicina sintetase D, Bacilisina e Surfactina sintetase A por meio de PCR em Tempo Real, identificar e quantificar os voláteis produzidos pelas bactérias que apresentaram maior inibição, e ainda, analisar a interação de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Bacillus* por microscopia eletrônica de varredura. Selecionou-se inicialmente 18 isolados com potencial de controle por pareamento em placa. Destes, em 6 estirpes (49, 50, 2784, 2785, 2788, 2791) foram detectados todos os genes que codificam os 4 lipopeptídeos citados anteriormente. Em 2 estirpes há a ocorrência de 3 dos 4 lipopeptídeos testados (206 e 2536). A Bacilomicina foi o composto que apresentou maior ocorrência de detecção durante esse estudo. Compostos orgânicos voláteis com atividade antifúngica foram identificados nas cepas testadas.

Palavras-chave: Antibiose, Controle biológico, metabolitos, Bacilomicina, Fengicina.

ABSTRACT

In the context of sustainable agriculture, biological control of phytopathogens has gained more and more followers. The study of identifying antifungal compounds produced by beneficial microorganisms has gained relevance in this sense. Among them, the lipopeptides surfatins, iturins and fengycins are involved in most of the action mechanisms against different pathogens. Bacteria of the genus *Bacillus* are known for their wide range of molecules produced with action against various agricultural pests, acting to induce plant growth and control public health vectors. The identification of strains with biotechnological potential involves in vitro bioassays and molecular tests. Thus, the objective of this work was to select, within the *Bacillus* Germplasm Bank belonging to Embrapa Genetic Resources and Biotechnology/DF, strains with potential for controlling the fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* in pairing assays, evaluate the production of chitinase, perform the detection of genes related to the synthesis of antifungal substances Bacillomycina D, Fengicina synthetase D, Bacilisin and Surfactin synthetase A through Real Time PCR, identify and quantify the volatiles produced by the bacteria that showed greater inhibition, and also analyze the interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bacillus* by scanning electron microscopy. Initially, 18 isolates with control potential were selected by plate pairing. Of these, in 6 strains (49, 50, 2784, 2785, 2788, 2791) all genes encoding the 4 lipopeptides mentioned above were detected. In 2 strains there is the occurrence of 3 of the 4 lipopeptides tested (206 and 2536). Bacillomycin was the compound with the highest occurrence of detection during this study. Volatile organic compounds with antifungal activity were identified in the tested strains.

Key words: Antibiosis, Biological control, metabolites, Bacillomycin, Fengicin.

1. INTRODUÇÃO

Doenças fúngicas podem causar danos a diversas culturas agrícolas durante todas as etapas de produção incluindo a pós-colheita e armazenamento. O manejo de doenças fúngicas normalmente é realizado por meio do controle químico, o que com o uso intensivo dos mesmos produtos e mesma forma de ação leva ao surgimento de organismos resistentes e impactos ao meio ambiente. Além disso, vários fitopatógenos, principalmente os patógenos de solo, são capazes de produzir estruturas de resistência, tornando-os de mais difícil controle, e não sendo controlados eficientemente por métodos químicos (Panth et al. 2020). Além disso, há ainda a demanda crescente de alimentos livre de agrotóxicos. A integração dos métodos de controle somados ao controle biológico através dos microrganismos antagônicos naturais surge como alternativa aos defensivos químicos de maneira mais sustentável e segura.

Bactérias isoladas do solo ou da rizosfera das plantas têm sido relatadas como potenciais agentes de controle biológico para variados patógenos em variadas culturas e/ou promotoras de crescimento vegetal (Berg, 2009; Lutemberg e Kamilova, 2009; Grosh et al. 2012; Almoneafy et al. 2014). Berg et al. (2009), relataram que de 1 a 35% de microbianos isolados da rizosfera de plantas possuem capacidade de inibição de patógenos fúngicos *in vitro* enquanto a proporção de microrganismos com a capacidade de promover o crescimento vegetal pode chegar a 75% da população cultivável (Berg, 2009).

As características referentes ao controle biológico ou a promoção de crescimento dependem de vários fatores. A pesquisa visa o constante desenvolvimento e seleção de microrganismos que agreguem o máximo de características possíveis visando a produção de bioprodutos para uma agricultura sustentável.

Sobre as formas de atuação, as bactérias promotoras de crescimento vegetal podem atuar suprimindo patógenos de solo, promovendo a solubilização de nutrientes como fósforo (P), potássio (K), zinco (Zn), produção de hormônios vegetais, como a produção de ácido indol-3-acético (IAA), citocinina e giberelina, a fixação biológica de nitrogênio (N), função micorrízica e regulação de etileno, visando minimizar estresses bióticos e abióticos, podem promover a indução de resistência, além de estarem envolvidos nos processos de decomposição de nutrientes e absorção de aminoácidos, o que resulta em melhor desenvolvimento da planta, pode ainda antecipar a ida de mudas ao campo, tendo seu efeito expresso tanto pelo desenvolvimento em altura como na matéria seca de parte aérea ou raízes.

A antibiose através da produção de metabólitos antifúngicos e antibióticos é provavelmente o mecanismo mais conhecido e mais importante usado por bactérias de biocontrole para

restringir a colonização de patógenos nos tecidos da planta hospedeira (Arguelles-Arias et al., 2009). Dentre as bactérias promotoras de crescimento vegetal, os *Bacillus* apresentam grande potencial de biocontrole uma vez que são microrganismos presentes em vários nichos ecológicos, isolados de diversos ambientes, principalmente do solo, que apresentam vários atributos relacionados a promoção de crescimento vegetal e possuem rápido crescimento e fácil manipulação (Yadav, et al. 2017, Dimkić et al. 2022).

Já é bem descrito na literatura sobre a eficiência de algumas espécies de *Bacillus* a pragas agrícolas, principalmente *B. thuringiensis* a Lepidópteros, Coleópteros e demais ordens de pragas de interesse agrícola e sanitário, além de promover crescimento vegetal (Costa et al. 2020), *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* são eficazes para o controle de várias doenças de plantas causadas por patógenos de solo (Arguelles-Arias et al., 2009) ou pós-colheita. *B. amyloliquefaciens* pode ainda produzir hormônios e compostos orgânicos voláteis induzindo o crescimento vegetal e desenvolvimento radicular, solubilizar nutrientes, aumentar a resistência das plantas a estresses bióticos e produzir metabólitos secundários com atividade antimicrobiana (Luo et al. 2022). Bem como, estudos revelaram que a quitina e seus coprodutos podem ser usados como agentes de controle de doenças de plantas, condicionadores do solo, bactericidas e nematicidas (Rkhaila et al. 2021).

A capacidade de sintetizar numerosos compostos antimicrobianos por *B. amyloliquefaciens* é bem estabelecida *in vitro*, como o caso da estirpe FZB42 em que quase 10% do seu genoma é dedicado à síntese de metabólitos antimicrobianos e genes de imunidade correspondentes (Chowdhury et al. 2015a). Ainda neste contexto, a cepa GA1 de *B. amyloliquefaciens* apresenta alta atividade inibitória *in vitro* para o crescimento de múltiplos patógenos fúngicos de plantas (TOURÉ et al. 2004; Arguelles-Arias et al. 2009) e quando utilizada no tratamento de sementes, a cepa GA1 demonstrou mitigar os danos causados por doenças de plântulas por meio de antibiose direta contra patógenos do solo.

Dentre os compostos antibacterianos e/ou antifúngicos identificados a partir de estirpes de *Bacillus* estão os lipopeptídeos não ribossomais (surfactina, fengycina, bacilomicina-D, bacilisina e bacilibactina) e policetídeos (bacilaeno, macrolactina e difficidina) (Dunlap et al. 2019, Ngalimat et al. 2021)

Chowdhury et al. (2015a) relatam que a atividade antifúngica se deve à produção de fengycina e bacilomicina D, sendo esta última identificada como sendo o metabólito antifúngico mais poderoso *in vitro* produzido por FZB42.

Além disso, os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Bacillus* spp. tem sido estudados como forma de controle de patógenos e de induzir crescimento vegetal (Chen et al., 2007; Yu et al., 2012; Ji et al., 2021; Luo et al. 2022)

Dessa forma, a busca por estirpes de *Bacillus* tóxicas, independentemente do alvo, passa por bioensaios de patogenicidade *in vitro*. Portanto, os objetivos deste trabalho foram selecionar e identificar estirpes de *Bacillus* com atividade antifúngica a *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* em ensaios de pareamento *in vitro*, avaliar a atividade de quitinase das estirpes, caracterizar molecularmente por meio de PCR em tempo real a presença de genes relacionados a compostos antifúngicos e caracterizar bioquimicamente por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa os compostos orgânicos voláteis COVs produzidos por estirpes de *Bacillus* com capacidade para inibir o desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem e preparo das estirpes de *Bacillus* spp.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio Embrapa líquido (MONNERAT et al., 2007) a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, por 72 horas a 200 rpm. A composição do meio EMBRAPA líquido é descrita a seguir: 8g/l de caldo nutriente, 1 g/l de extrato de levedura, 1g/l de KH_2PO_4 ; 1 mg/l de CaCO_3 ; 1 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH ajustado a 7,0 por adição de NaOH. Uma gota com cada uma das estirpes de *Bacillus* foi visualizada em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 100X para observação de esporos e/ou cristais.

2.2 Seleção de estirpes de *Bacillus* antagonistas a fungos patogênicos

Foram avaliadas trezentas estirpes de *Bacillus* quanto o antagonismo a fungos patogênicos (*Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*). Os patógenos *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*, foram cedidos pelo laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF, foram pareados com as estirpes testadas a fim de se verificar a sua capacidade de produção de compostos antifúngicos. Adotou-se a metodologia de condução de experimento e a escala diagramática desenvolvida por Montalvão et al. (2021) para as avaliações dos bioensaios.

O meio definido por Montalvão et al. (2021), para o ensaio de pareamento é uma mistura de dois meios pré-definidos, o meio Embrapa (ME) sólido e o meio Batata Dextrose (BD) sintético, sendo chamados aqui de BD/ME, visando com essa mistura de meios não beneficiar nenhum dos dois microrganismos. Inicialmente as bactérias foram crescidas em meio ME líquido, descrito anteriormente, enquanto os patógenos foram multiplicados em meio Batata Dextrose Agar (BDA) sintético e mantidos em câmara de crescimento tipo BOD a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias ou até atingirem a borda da placa.

Para a realização dos ensaios, placas de petri foram vertidas com o meio BD/ME. Foram feitos discos de ágar com 0,5 cm de diâmetro em placa de cultura pura do patógeno, esses discos foram inoculados no centro das placas contendo o meio BD/ME. O caldo bacteriano das estirpes testadas foi distribuído em 4 pontos na placa de ensaio na quantidade de 10 μl e de forma equidistante (Figura 1), afastadas da borda por aproximadamente 1 cm. O controle foi composto por placas contendo apenas os discos do patógeno. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas nas condições de cultivo dos fungos, mantidos em câmara de crescimento tipo BOD a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas e mantidas até o momento em que as placas do tratamento

controle atingiram a borda da placa, o que ocorria com aproximadamente 5 dias sendo então avaliados pela escala diagramática (Montalvão et al. 2021).

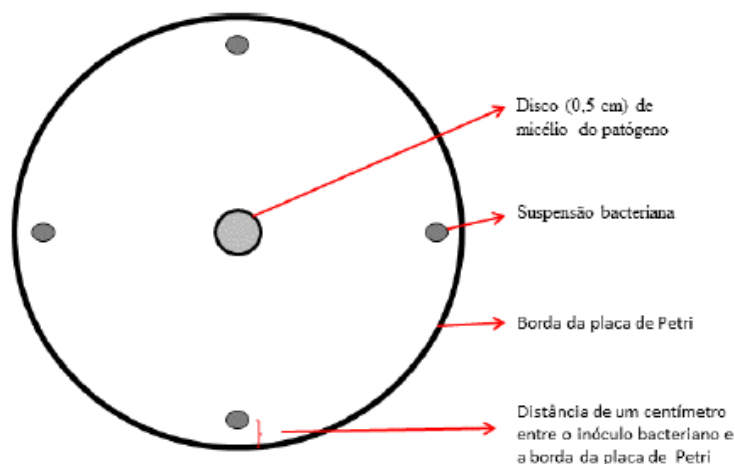


Figura 1. Esquema de montagem do bioensaio de pareamento bactéria x fungo. Setas indicam a disposição de cada um dos componentes do ensaio. O disco com o patógeno foi disposto no centro da placa e a suspensão bacteriana em quatro pontos laterais e equidistantes. Adaptado de Montalvão et al. (2021).

Após a seleção das estirpes, montou-se um ensaio nas mesmas condições de pareamento descritas anteriormente visando analisar os resultados de antibiose em diferentes datas. Dessa forma, o ensaio foi conduzido em triplicata e avaliado com 1, 3 e 5 dias após a sua montagem.

2.3 Atividade de quitinase das estirpes de *Bacillus*

2.3.1 Obtenção de quitina por crescimento fúngico e Ensaio de Produção de quitinase

Devido sua maior velocidade de crescimento, cultivou-se o patógeno *S. sclerotiorum* em meio Batata Dextrose (Sigma) líquido em erlenmayer de 125 ml com 30% de capacidade e pH ajustado para 6,5 por 7 dias a 200 RPM e temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ em incubador rotativo. Após esse período o material fúngico foi retido e lavado em água corrente utilizando-se uma peneira granulométrica com abertura de 500 mesh (0,250 mm), visando a remoção de resquícios do meio de cultura. O material fúngico obtido foi colocado para secar em estufa de circulação de ar forçado por 72°C pelo período de 72h. Por fim, o material seco foi triturado e macerado até a obtenção de um fino pó e passado novamente em peneira uma peneira granulométrica (0,250mm) para padronização do material.

O pó proveniente do processo anterior foi utilizado na produção de um meio de cultura líquido adotando-se a proporção de 1% (p/v) do material fúngico seco, adicionando os sais minerais constituintes do meio EMBRAPA (1 mg/l de CaCO_3 ; 1 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) sem a adição de outra fonte de carbono e nitrogênio, pH ajustado a 7,0. O meio quitinolítico foi distribuído em Erlenmeyer com capacidade de 50 ml e preenchido até o volume de 15 ml e autoclavado na sequência a 120 °C por 20 minutos.

Dezesseis estirpes bacterianas oriundas de produção em meio líquido foram inoculadas neste meio de cultura em capela de fluxo laminar e incubadas a $28^\circ\text{C} \pm 2$, por 6 dias a 200 rpm em incubador rotativo. Após a retirada das amostras, estas foram centrifugadas a 11000 G por 10 minutos visando a obtenção da cultura sobrenadante. A partir dessa, foram realizados os ensaios de atividade de quitinase.

A atividade de quitinase foi medida utilizando-se a Quitina Azure (Sigma-Aldrich®), uma quitina coloidal acrescida com o corante Violeta Brilhante 5R Remazol. A quitina azure foi utilizada na concentração de 10 mg/ml através da diluição em solução tampão TRIS HCl (200 mM) e pH 6,8.

O ensaio foi composto da adição de 250 µl da solução de quitina azure acrescidos de 250 µl do tampão e 500 µl do sobrenadante das bactérias em micro tubos de plástico do tipo Eppendorf. Estes foram dispostos em mesa agitadora a 200 RPM pelo período de 2h a 28°C . Após isso, o material foi centrifugado a 11000 G por 3 minutos e o sobrenadante colocado em cubetas e lido em espectrofotômetro a 570 nm de comprimento de onda.

2.3.2 Determinação da época de maior produção de quitinase

Selecionou-se as melhores estirpes produtoras de quitinase com base nos resultados obtidos no experimento anterior e procedeu-se um novo bioensaio visando determinar o período adequado de avaliação com a maior atividade quitinolítica das estirpes com o meio de cultura testado. O ensaio foi conduzido novamente com avaliações da produção de quitinase aos 4 e 8 dias, comparando-se o resultado com o obtido aos 6 dias de inoculação. As estirpes que foram significativamente distintas do controle foram selecionadas como produtores de quitinase.

2.4 Extração de DNA das estirpes de *Bacillus*

As estirpes selecionadas com base no ensaio de pareamento fúngico foram cultivadas em meio EMBRAPA sólido por 16h à 28°C (MONNERAT, et al., 2007). Com auxílio de uma alça bacteriológica descartável estéril de 10µL as colônias foram coletadas e colocadas em 200µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA•Na₂ pH 8,0) em tubos de polipropileno de 1,5 mL, em seguida, as estirpes foram incubadas com 2µL de lisozima (25mg/mL) a 37°C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram inoculadas em agitador orbital por 3 horas, em temperatura ambiente.

Para a extração de DNA adotou-se o seguinte protocolo: após a incubação das amostras, adicionou-se 20 µl de proteinase K e 300 µl de tampão de lise (20 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 8,0; 4 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0; 38 ml de NaCl 5 M; 500 µl de Triton X-100 e 2 ml de SDS 10%). Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 60 °C, por 10 minutos. Após o resfriamento das soluções bacterianas, realizou-se o processo de precipitação do DNA, em que consistiu na adição de 500 µl álcool etílico 100% gelado. O DNA extraído foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm, e posteriormente purificado por duas lavagens com 500 µl de álcool etílico 70%, sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O DNA foi diluído com TE 0,1X (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA•Na₂ pH 8,0).

O DNA obtido foi quantificado utilizando o aparelho Quantus™ Fluorometer com o kit QuantiFluor® ONE dsDNA System (PROMEGA CORPORATION, 2015), de acordo com o manual do fabricante. Os DNAs foram então diluídos para um valor padrão de 10ng/µL para que as curvas padrões fossem construídas.

A partir da quantificação do DNA preparou-se uma solução estoque de 10 ng/ul da estirpe modelo. Realizou-se uma diluição seriada (1:2) para obter valores e concentrações finais de 5 ng/µL, 2,5 ng/µL, 1,25 ng/µL e 0,625 ng/µL. Cada ponto foi realizado em triplicata determinando-se então os parâmetros de CT, Coeficiente de determinação (R^2), eficiência (eff%), Coeficiente linear (Y-intercept) e Coeficiente angular (Slope).

2.6 Ensaios de PCR em tempo real (qPCR)

Os conjuntos de primers de PCR em tempo real utilizados foram selecionados a partir de descrições prévias de artigos que realizaram a detecção de genes relacionados à síntese de substâncias antifúngicas Bacillomycina D, Fengicina D, Bacilisina e Surfactina (Tabela 1) que são produzidas por estirpes de *Bacillus*.

Cada reação foi preparada adicionando-se 10 µl do mix GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 0,4 µl de cada primer na concentração de 10 µM, 0,2 µl de CXR Reference Dye (Promega), 2 µl de DNA (10 ng/µl) e água nuclease-free suficiente para completar 20 µl de reação.

A amplificação por qPCR durante a termociclagem seguiu o protocolo de desnaturação a 95 °C por 2 min, 44 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos e anelamento a 61 °C por 3 segundos em equipamento da marca AB Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System®, no laboratório de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF).

Tabela 1. Característica dos iniciadores utilizados para detecção dos genes fengicina, bacilisina, surfactina e bacilomicina D, em estirpes de *Bacillus*.

Nome do iniciador	Produto de expressão	Sequência (5' → 3')	Locus	Referência
FEND-F	Fengicina D	AGGCAGTGTTCGACAGTTT	1945925	Almoneafy et al. 2014
FEND-R		TTTGGGAGGCGGAGATGATG	- 1935150	
BAC-F	Bacilisina	TGTCTGGCCAGCTCATTTGT	3909856	Almoneafy et al. 2014
BAC-R		CTGTCATCGTATCCCACCCG	- 3909251	
SRFA-F	Surfactina	TCAAATCTTGCCGGGTTCGG	329519-	Almoneafy et al. (2014)
SRFA-R		TCGATAGTCAGCGGACGGTA	340273	
bmyD-F	Bacillomycin	TTCAGGATGCCGTTACACTTG	-	Sun et al. (2018)
bmyD-R	D	GAAATCACATGCTGCTGTTCTG		

2.8 Coleta dos Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por estirpes de *Bacillus*

Os COVs de quatro cepas de *Bacillus* (2785, 49, 50 e 204) que reduziram fortemente o desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum* foram coletados por aeração. Para tanto foram utilizadas 05 placas de Petri (90 × 15 mm) contendo 30 mL de meio sólido BD/ME foram aerados nos seguintes tratamentos: (1) placas contendo apenas cepas bacterianas, 10 µL aplicados em quatro pontos; (2) placas com bactérias em quatro pontos e um disco de micélio patogênico (0,5 cm Ø) no centro, e (3) placas apenas com disco de micélio patogênico,

semelhantermente ao processo de pareamento fúngico descrito anteriormente. Nesse sistema de coleta de voláteis, o ar entra através de um filtro de carvão ativado, garantindo a passagem do ar purificado, e o ar escapa a $0,6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, por uma bomba de vácuo conectada a um tubo de vidro contendo 100 mg de Polímero adsorvente Porapak Q (malha 50–80, Supelco, PA, EUA), através de conexões de politetrafluoretileno (PTFE). Os compostos orgânicos voláteis foram coletados durante 72 horas. Depois disso, as amostras de aeração foram eluídas dos adsorventes com 500 μL de n-hexano e enriquecido com 1 μL de 16-hexadecanolactona como padrão interno (IS), preparado em concentração de 0,01 mg/mL em n-hexano destilado; depois disso, as amostras foram concentradas para 50 μL usando um fluxo suave de N_2 . O resultado das amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise em um cromatógrafo gasoso conectado a um detector de ionização de chama (GC-FID) e GC acoplado para um detector de espectrometria de massa (GC-MS).

2.8.1. Análises químicas

Para análise quantitativa, 2 μL de cada amostra foram injetados no Coluna GC-FID (Agilent 7890-A, CA, EUA) (DB-5MS 30 m de comprimento $\times$ 0,32 mm de diâmetro interno $\times$ filme de 0,25 μm , Agilent, CA, EUA), usando um modo de injeção splitless e hélio como gás de arraste. A rampa inicial a temperatura era de 50°C . Foi aumentado gradualmente a 5°C por minuto até 180°C . O segundo gradiente foi de 10°C por minuto até 250°C e foi mantido nesta temperatura por 20 minutos. A temperatura do detector foi de 270°C e a temperatura do injetor 250°C . Compostos liberados foram determinados comparando as áreas de cada composto com o padrão. Portanto, o fator de resposta do detector para todos os compostos foi considerado igual a 1. Os dados foram coletados usando GC Open Lab Programas. A análise multivariada dos dados foi realizada considerando os três grupos: bactérias, fungos e a interação bactéria-fungo. Para análise qualitativa, os extratos selecionados foram analisados por GC (Agilent GC7890A, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa (Agilent 5975MSD, EUA) equipado com um analisador quadrupolo, uma coluna DB 5MS apolar (30 m $\times$ 0,25 mm DI e 0,25 μm de espessura de filme; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA) e um injetor splitless com hélio como gás de arraste usando o programa de temperatura acima. A ionização foi por impacto de elétrons (70-eV e temperatura da fonte 200°C). Os dados foram coletados e analisados com o software GC-MS ChemStation 2.1 (Agilent, Califórnia, EUA). Os compostos voláteis nos extratos foram identificados por comparando espectros com bancos de dados de biblioteca (NIST 2020) ou publicados espectros e confirmados com padrões autênticos quando disponíveis.

2.9 Análise da interação de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Bacillus* por microscopia eletrônica de varredura.

Para a visualização detalhada da interação entre as estirpes de *Bacillus* e do patógeno, utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foi coletado amostras da região de confronto entre patógeno e a bactéria para obtenção das imagens.

Dessa forma, discos de 5 mm de diâmetro provenientes de áreas do confronto entre as colônias de *Bacillus* e do fungo (*Sclerotinia sclerotiorum*) foram coletados e submetidos a metodologia descrita por Bossola & Russel (1998), adaptado por Alves (2004), a seguir: realizado tratamento com solução fixadora (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M a pH 7,2) para fixação a 4 °C durante 24 horas, seguido de 4 lavagens com tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2) e pós-fixados durante 1 hora a 4 °C com tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato 0,01 M (pH 7,2). As amostras foram então lavadas três vezes com água destilada, e desidratadas em gradiente crescente de acetona (30, 50, 70, 80, 90 e duas vezes de 100%). Para secagem ao ponto crítico, utilizou-se dióxido de carbono (CO₂) no aparelho Elmitech Critical Point Drayer K850. Após a secagem, foram utilizados suportes metálicos para a fixação das amostras e essas em seguida foram metalizadas com ouro, utilizando corrente de 25 mA, em atmosfera de ar de 1.10⁻² mbar durante 2'30". As visualizações foram realizadas no microscópio eletrônico Zeiss, modelo DSM 962. As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Buscou-se por micrografias indicativas de toxicidade na morfologia do fungo causada pelas bactérias testadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudar as abordagens bioquímicas e moleculares da interação dupla entre rizobactérias benéficas e plantas fornece um melhor entendimento pelo qual essas rizobactérias podem promover o crescimento das plantas (Van Loon et al. 1998; Davey e O'Toole 2000; Dobbelaere et al. 2003; Fravel 2005; Almoneafy et al. 2014). Consequentemente, isso melhora significativamente nossa seleção para o PGPR adequado com o melhor procedimento de formulação.

Seleção de estirpes de Bacillus antagonistas a fungos patogênicos

A partir do ensaio de pareamento em placa foram selecionadas 16 estirpes para testes posteriores. A tabela 2 apresenta os resultados obtidos para pareamento nas condições descritas anteriormente. A partir da análise da tabela 2, é possível identificar 6 estirpes que apresentaram controle fúngico superior a 75% para ambos patógenos testados quando comparados a escala de referência (Montalvão et al. 2021). Cada ensaio foi realizado 2 vezes em triplicata.

Tabela 2. Resultados de inibição fúngica produzida por estirpes de *Bacillus* spp. em *S. sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*.

Espécie	Estirpe	(%) Inibição em <i>S. sclerotiorum</i> *	(%) Inibição em <i>F. oxysporum</i> *
<i>B. amyloliquefaciens</i>	49	75	75
<i>B. amyloliquefaciens</i>	50	75	90
<i>B. amyloliquefaciens</i>	204	85	75
<i>Bacillus</i> sp.	206	85	90
<i>B. thuringiensis</i>	615**	0	0
<i>B. thuringiensis</i>	2026	90	60
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2062	60	25
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2536	90	60
<i>B. aryabhattai</i>	2538	25	12
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2784	75	60
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2785	90	82
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2788	75	60
<i>Paenibacillus alvei</i>	2789	50	50
<i>B. subtilis</i>	2790	75	25
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2791	75	50
<i>Bacillus megaterium</i>	2793	60	0

*Valores médios de 2 ensaios realizados em triplicata. Considerou-se o maior valor da escala de inibição de Montalvão et al. 2021. **Estirpe utilizada como controle negativo.

A Figura 2 apresenta os resultados da interação fúngica de *S. sclerotiorum* e das melhores estirpes bacterianas, selecionadas com base no ensaio anterior, em diferentes períodos, 1, 3 e 5 dias.

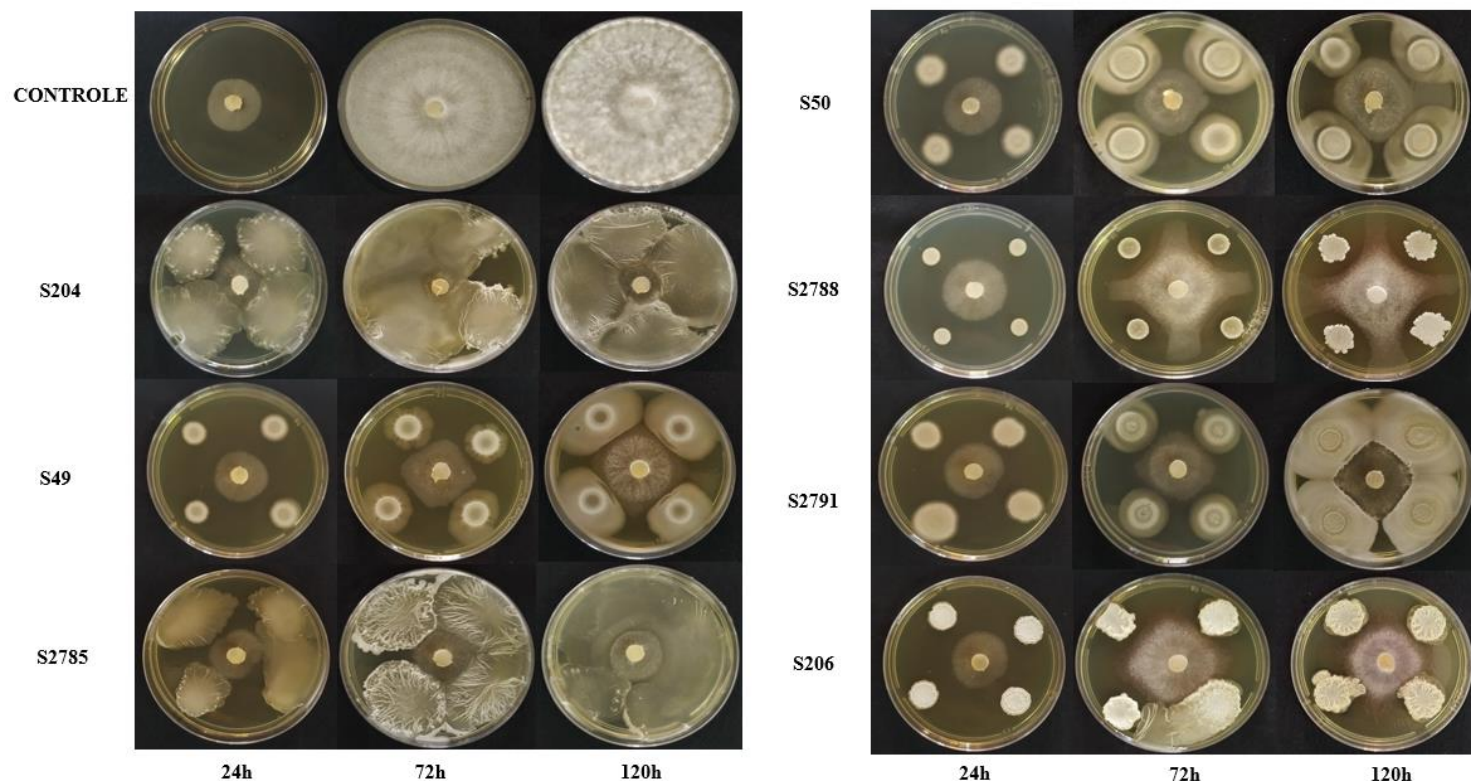


Figura 2. Análise do crescimento bacteriano e inibição fúngica de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes períodos.

A análise conjunta da Tabela 2 e da Figura 2 são de grande importância. A inibição quase total ocorrida logo nos primeiros dias como nas bactérias 204 e 2785 indica uma facilidade da bactéria em se adaptar ao meio em que se encontra e competir melhor com o patógeno. Já é conhecido que várias doenças de plantas podem ser controladas por microrganismos antagônicos naturais (Shafi et al. 2017), como é o caso de integrantes da espécie *Bacillus*. A produção de metabólitos secundários é o principal fator relacionado com função de controle biológico. A variada gama de compostos antimicrobianos produzidos como lipopeptídeos, antibióticos, voláteis, enzimas, além da competição por espaço, nutrientes, oxigênio que ocorre dentro da placa no ambiente *in vitro*, ajuda a compreender a supressão dos fungos patogênicos que foi observada na Tabela 2. Portanto, é possível supor que os metabólitos produzidos pelas estirpes, seus compostos orgânicos voláteis e ainda outros metabólitos até então não identificados estejam atuando na supressão dos fungos testados nesse experimento.

Atividade de quitinase produzidas por estirpes de *Bacillus* spp.

O primeiro ensaio de produção de quitinase aos 6 dias apresentou resultados significativos ($p < 0,05$) para a absorbância obtida entre as estirpes conforme a tabela 3.

Tabela 3. Resultados de produção de quitinase por estirpes de *Bacillus* spp. cultivados em meio quitinolítico aos 6 dias medidos pela absorbância em 570 nm.

Estirpe	Absorbância (570 nm) *
2062	0,225 a
2790	0,164 b
2538	0,155 b
601	0,146 b
426	0,135 c
2026	0,122 c
615	0,102 d
49	0,077 e
2785	0,075 e
2784	0,075 e
Controle	0,073 e
2791	0,073 e
206	0,071 e
50	0,067 e
204	0,067 f
2789	0,037 g

*Médias comparadas pelo teste de Scott&Knott a 5% de probabilidade. Coeficiente de Variação: 8,71%.

A partir dos resultados obtidos da tabela 3 verificou-se a eficiência do meio utilizado em distinguir estirpes com potencial para a produção de quitinase das demais estirpes. Procedeu-se novamente a realização do mesmo ensaio com as estirpes selecionadas, porém, com avaliação aos 4 e 8 dias para avaliar a época de maior atividade de quitinase e compará-los com os dados obtidos aos 6 dias.

Os resultados do ensaio montado com diferentes datas estão apresentados na tabela 4. Observou-se que houve uma tendência de crescimento para a maioria das estirpes analisadas.

Com base nos resultados obtidos verificou-se uma tendência de aumento da produção de quitinase com os diferentes períodos avaliados. Por viabilidade técnica, logística e economia de recursos, indicou-se o período de 6 dias para incubação e testes futuros com o material.

Tabela 4. Resultados de comparação da produção de quitinase por estirpes de *Bacillus* spp. aos 4, 6 e 8 dias, medidos pela absorbância em 570 nm.

Estirpe	Absorbância (570 nm) *		
	Período (Dias)		
	4	6	8
2538	0,217 aA**	0,155 bcB	0,230 aA
2062	0,174 bB	0,225 aA	0,189 bB
2790	0,136 cB	0,164 bA	0,153 cA
426	0,125 cB	0,135 cAB	0,143 cA
601	0,118 cC	0,146 bcB	0,178 bA
Controle	0,073 dA	0,059 dA	0,062 dA
Média dos tratamentos	0,154	0,165	0,1786

* Médias comparadas pelo teste de Scott&Knott a 5% de probabilidade. ** Letras minúsculas comparam as médias na coluna enquanto as letras maiúsculas comparam as medias na linha. C.V: 5,46%

Com base nos resultados obtidos verificou-se uma tendência de aumento da produção de quitinase com os diferentes períodos avaliados. Por viabilidade técnica, logística e economia de recursos, indicou-se o período de 6 dias para incubação e testes futuros com o material.

Gomaa et al. (2012), partiram do mesmo princípio de utilização da quitina obtida de fungos para realização de bioensaio de atividade de quitinase. Os autores testaram diferentes espécies fúngicas, dentre elas, *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum* e utilizaram o material fúngico final na concentração de 2g/L sem adição de outra fonte de carbono e energia. Porém, os mesmos autores observaram que o meio foi otimizado quando foi utilizando 1,5% de quitina coloidal, com caseína como fonte de nitrogênio, a 30°C após cinco dias de incubação (Gomaa et al. 2012).

Os dados obtidos mostraram que as estirpes com maior potencial de inibição fúngica não foram as mesmas estirpes com maior produção de quitinase, indicando que a forma de inibição dessas estirpes aos fungos seria por meio da produção de outros tipos de compostos, identificados posteriormente.

Análise molecular das estirpes de *Bacillus* com potencial de inibição fúngica.

Em sequência, foram testados os iniciadores de qPCR quanto à capacidade de identificação dos genes relacionados à síntese das substâncias bacilomicina D, surfactina, fengicina e bacilisina. Para a efetiva detecção foram estabelecidos os parâmetros de amplificação e eficiência apresentados na tabela 5. Obteve-se, então, a curva padrão de amplificação dos quatro conjuntos de iniciadores para a detecção dos genes (Figura 3).

Tabela 5. Parâmetros de amplificação dos iniciadores de PCR em tempo real para a identificação dos genes inibidores de crescimento em várias estirpes de *Bacillus* spp.

Gene	slope	Y-intercept	R2	Eff%	Ct
<i>Fengicina D</i>	-3.309	18.533	0,995	100,53	15,401 ± 0,153
<i>Bacilisina</i>	-3.315	17.343	0,994	100.298	14,081 ± 0,131
<i>Gapdh</i>	-3.237	18.815	0,986	103.666	16,031 ± 0,013
<i>Bacilomicina</i>	-3.276	18.315	0,988	101.953	15,285 ± 0,778
<i>Surfactina</i>	-3.321	23.501	0,99	100.043	20,339 ± 0,330

Coefficiente de determinação (R^2), eficiência (eff%), Coeficiente linear (Y-intercept) e Coeficiente angular (Slope).

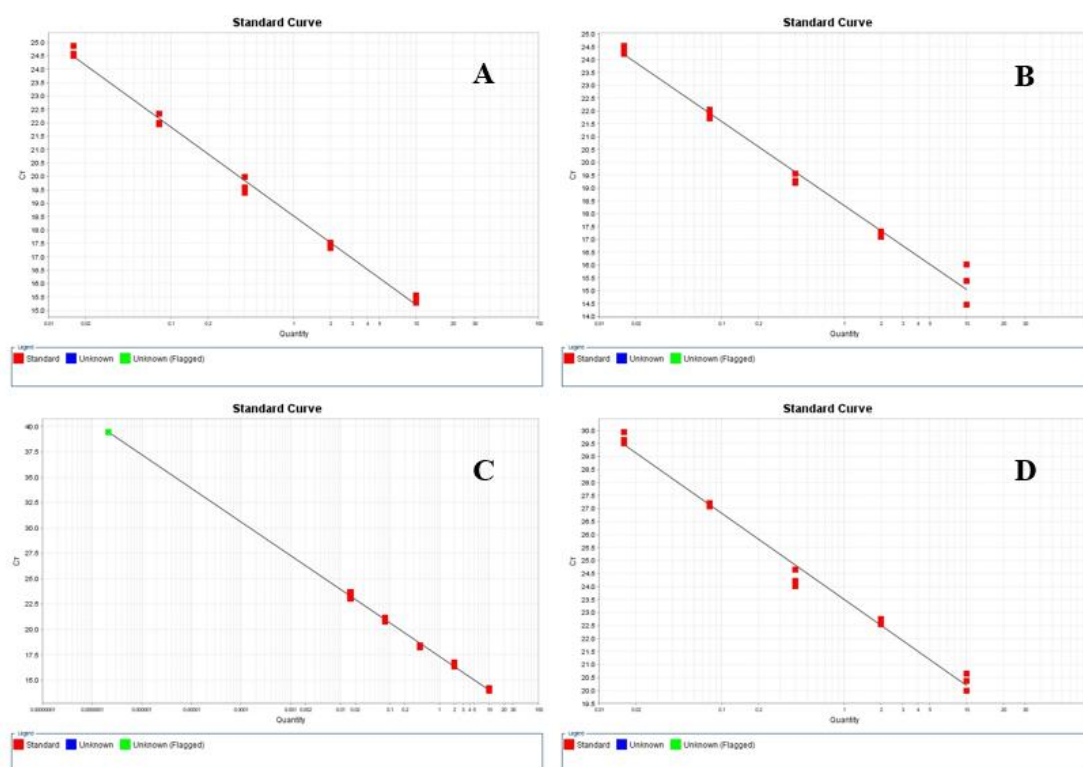


Figura 3. Curva de amplificação padrão dos quatro conjuntos de primers para detecção de genes. **A:** Fengicina D, **B:** Bacilomicina D, **C:** Bacilusina, **D:** Surfactina.

Posteriormente as estirpes bacterianas foram testadas quanto a presença de 4 genes relacionados a produção de lipopeptídeos antifúngicos incluindo surfactina, bacilomicina, bacilisina e fengycina, descritos anteriormente na Tabela 1. A detecção molecular e de compostos antimicrobianos é fundamental para a seleção de microrganismos com potencial como agente de controle biológico (Athukorala et al., 2009, Tapi et al., 2010; Farzand et al. 2019)

No presente estudo, os resultados obtidos (Tabela 6) demonstraram que das 14 estirpes de *Bacillus* testadas nesse ensaio, em 6 estirpes (49, 50, 2784, 2785, 2788, 2791) foram detectados

todos os genes que codificam os 4 lipopeptídeos citados anteriormente. Em 2 estirpes há a ocorrência de 3 dos 4 lipopeptídeos testados (206 e 2536). Bacilomicina foi o composto que apresentou maior ocorrência de detecção durante esse estudo. A estirpe 615 foi usada nesse experimento como um controle negativo uma vez que não apresentou controle fúngico nos ensaios de pareamento e nos de qPCR também não apresentou amplificação para nenhum dos primers testados.

Percebe-se também que houve bactérias em que não ocorreu amplificação para nenhum dos lipopeptídeos antifúngicos testados, podendo indicar que há a produção de outros compostos que não foram avaliados neste trabalho.

Tabela 6. Detecção de genes Bacilomicina, Fengicina, Surfactina e Bacilisina envolvidos na produção de compostos antimicrobianos por marcadores genéticos em diferentes estirpes *Bacillus* spp que apresentaram controle aos fungos fitopatogênicos.

ESTIRPES	Genes usados na detecção por qPCR			
	Bacilomicina D	Fengicina D	Surfactina	Bacilisina
49	+	+	+	+
50	+	+	+	+
204	+	-	+	-
206	+	+	-	+
615	-	-	-	-
2026	+	+	-	-
2062	-	-	+	+
2536	+	+	+	-
2784	+	+	+	+
2785	+	+	+	+
2788	+	+	+	+
2789	-	-	-	-
2790	-	-	-	-
2791	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-

+ : Amplificação positiva. - : Amplificação negativa.

A identificação de um amplo espectro de genes relacionados a produção compostos antimicrobianos pode estar relacionada, em certa medida, a sua alta capacidade competitiva contra outros microrganismos (Zeng et al. 2021), nesse caso, teste com diferentes microrganismos e em condições de campo precisariam ser realizados para validar essa suposição.

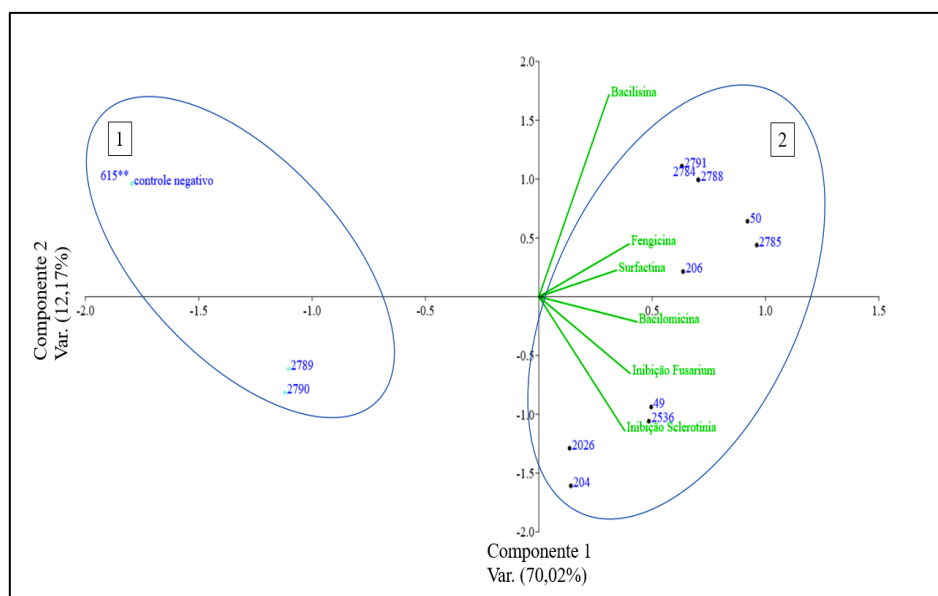


Figura 4. Biplot CP1 × CP2 sobre as variáveis % de inibição fúngica e presença de genes relacionados a produção de compostos antimicrobianos pela análise de componentes principais.

Farzand et al. (2019), avaliando 47 estirpes de *Bacillus* spp. quanto a presença de genes relacionados a produção de 8 compostos antifúngicos (surfactina, bacilomicina, iturina, fengicina/plipastatina, bacilisina, bacillaene, bacillibactina e plantazolicin) verificaram resultados positivos em 19 delas, enquanto a presença da maioria dos genes testados ocorreu em 7 estirpes, 5 estirpes apresentaram 7 dos 8 genes testados e todas as dezenove cepas mostraram a presença do gene produtor de surfactina.

O gráfico Biplot na Figura 4, apresenta uma análise de componentes principais entre a porcentagem de inibição ocorrida para os patógenos *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* em função da presença dos genes relacionados a produção de compostos antifúngicos. Há a formação de dois grupos entre eles. O grupo 1 apresenta as estirpes em que não foi detectado nenhum dos genes em estudo e o controle negativo. O grupo 2 apresenta as estirpes com alto potencial de controle dos patógenos e as estirpes em que foram identificados a maioria dos genes. O gene detectado em maior frequência foi o da Bacilomicina D, seguido de Fengicina e Surfactina que se igualaram na quantidade de observações. A menor ocorrência foi obtida pela Bacilisina. A maior ocorrência de bacilomicina a coloca próximo das linhas de inibição no gráfico enquanto o contrário ocorre para bacilisina.

Lipopeptídeos são comumente relatados como tendo uma poderosa atividade antifúngica em patógenos de plantas (Falardeau et al. 2013; Kawagoe et al. 2015). Mora et al. (2015) e

Farzand et al. (2019), relacionaram a atividade antifúngica de cepas de *Bacillus* com o número de genes antimicrobianos detectados, indicando seu papel na atividade antifúngica dessas cepas.

Dessa forma, é possível inferir que houve correlação entre os resultados do bioensaio de pareamento e os resultados de qPCR obtidos. As estirpes que apresentaram os maiores índices de controle fúngicos são as mesmas que apresentaram resultado de amplificação para um ou mais lipopeptídeos. A maioria das cepas de *Bacillus* produz uma série de lipopeptídeos, que atuam sinergicamente ou separadamente para suprimir a presença de patógenos fúngicos (Ongena e Jacques, 2008; Xu et al. 2013), como é o caso da surfactina que atua sinergicamente com a iturina e aumenta sua ação fungitóxica (Mulligan et al., 2014).

Sun et al. (2018), analisando o genoma da bactéria *B. amyloliquefaciens* fmbJ, verificou a presença de vários grupos de genes de lipopeptídeos antimicrobianos (bacilomicina D, surfactina e fengycin), e homólogos de bacilomicina D foram identificados de forma mais abrangente.

Xu et al. (2013), verificaram atividade antagônica da estirpe *B. amyloliquefaciens* SQR9 a *F. oxysporum*, além da inibição eficaz da germinação de seus conídios (98%) e por meio de abordagens bioquímicas e genéticas demonstraram que a Bacilomicina D é o principal composto responsável pela inibição do crescimento de *F. oxysporum* e pela formação de biofilme.

Análise da cromatografia

Em todos os tratamentos avaliados, Fungo, Bactéria, e Fungo + Bactéria, foram identificados 110 picos e, destes, 107 compostos foram identificados provisoriamente ou com padrões autênticos (Apêndice 1). Entre os compostos, 27 cetonas, 23 álcoois, 15 ésteres, 12 aromáticos, 11 aldeídos, nove terpenos e nove hidrocarbonetos foram identificados, enquanto outros sete compostos não puderam ser identificados. A identificação e as quantidades (média $\pm$ erro padrão) de COVs de diferentes grupos por análise cromatográfica são mostradas no Apêndice 1.

A acetoina tem sido descrita como um importante composto produzido por rizobactérias (Yi et al., 2016), tendo sido detectada neste trabalho, porém, em baixos níveis. O composto majoritário nas quatro linhagens estudadas foi tentativamente identificado como 2-metil-3-oxobutanoato de metila, com índice de retenção de 849. Quando os COVs da cepa 2785 de *Bacillus* combinados com os fungos foram coletados, a quantidade desse composto dobrou. O mesmo efeito não foi observado para as demais cepas bacterianas. Além desses compostos, as

cepas bacterianas também produziram uma série de 5- e 6 -metil cetonas, bem como pirazinas. O principal composto identificado em *S. sclerotiorum* foi o diterpeno pimaradieno, que não foi detectado nas cepas bacterianas.

Alguns dos compostos identificados no presente estudo como 6-metil-2-heptanona, 6-metil-2-heptanona, 2-nonanona, 2-decanona, benzaldeído, nonanal, n-decanal e 1-hexanol, são descritos na literatura (Tabela 7) por possuir atividade antifúngica.

Yuan et al. (2012) e Chaves-López et al. (2015) relatam que a atividade antifúngica de cetonas é negativamente correlacionada com o número de átomos de carbono, dessa forma, cetonas com alto número de carbono, como as encontradas neste trabalho (Apêndice 1), mostram forte atividade de inibição fúngica. Dessa forma, o resultado desses COVs com atividade antagônica a fungos fitopatogênicos descritos na literatura acrescidos das cetonas com alto números de carbono estão possivelmente envolvidos na inibição obtida pelas estirpes de *Bacillus* sob *S. sclerotiorum*.

A Tabela 7 apresenta um breve resumo da literatura disponível com relação aos compostos orgânicos voláteis com atividade antifúngica produzidos por bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*.

Tabela 7. Compostos voláteis produzidos por *Bacillus* com atividade antifúngica descritos na literatura.

Composto	Patógeno	Espécie	Referência
6-metil-2-heptanona	<i>Alternaria solani</i>	<i>B. subtilis</i>	Zhang et al. 2022
6-metil-2-heptanona			
2-pentilfurano	<i>Monilinia fructicola</i>	<i>B. vallismortis</i>	Liu et al., 2018
Cedrol		<i>B. altitudinis</i>	
metacrilato de isodecil			
3-metil-1-butanol, 2-butanona, Propanona, 1-butanol, dissulfeto de carbono, ácido acético, ácido 3-metil butanóico, ácido 2-metil propanóico, acetato de etila	<i>Moniliophthora perniciosa</i> <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. cereus</i>	Chaves-López et al. (2015)
2-nonanona 2-decanona benzaldeído Diacetil	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Yuan et al. (2012)
2-metilpirazina 2-nonanona β-benzenoetanamina 2-decanona	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>B. cinerea</i> <i>S. sclerotiorum</i>	<i>B. pumilus</i> <i>B. thuringiensis</i>	Zheng et al. (2013)
o-anisalaldeído nonanal n-decanal	<i>Alternaria alternata</i> <i>B. cinerea</i> <i>S. sclerotiorum</i>		Andersen et al. 1994, Fernando et al. 2005, Zhang et al. 2013
1-hexanol ciclohexanol 2-etil benzotiazol dimetil trissulfeto	<i>S. sclerotiorum</i>		Fernando et al. 2005

A figura 6 apresenta o somatório total dos voláteis produzidos pelas bactérias, pelo fungo e pelo pareamento das estirpes com o fungo. Foi possível observar diferença estatística entre os tratamentos analisados. As bactérias 2785 e 49 foram as que produziram maior quantidade de voláteis. A bactéria 2785 destacou-se pelo aumento da quantidade de voláteis quando em contato com o patógeno fúngico. Enquanto a quantidade de voláteis do tratamento Fungo manteve-se praticamente uniforme dentre as análises.

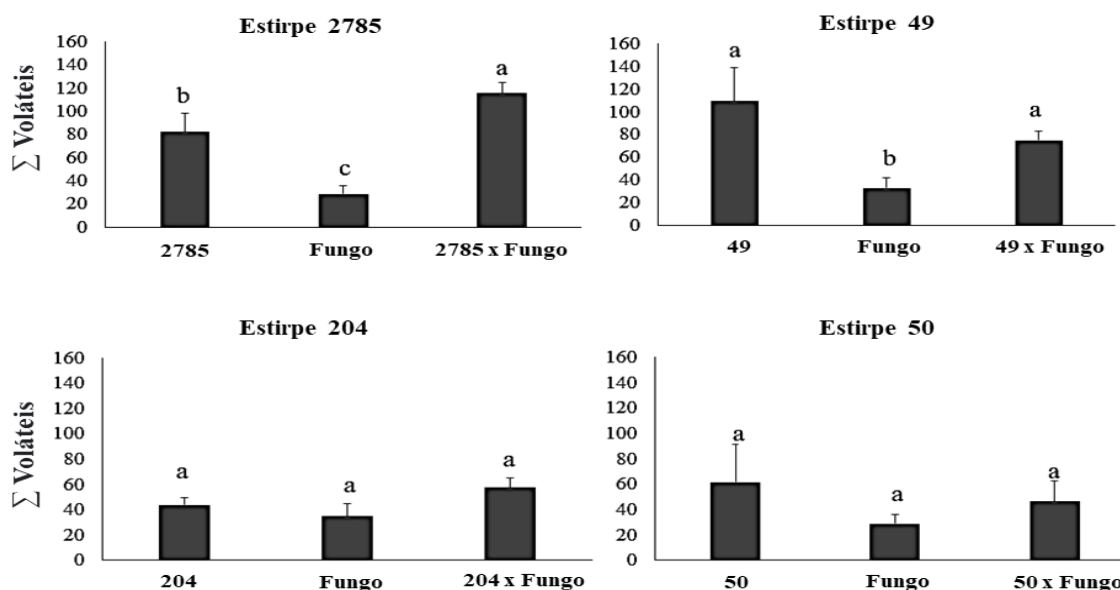


Figura 6. Somatório dos compostos produzidos pelo fungo *S. sclerotiorum*, pelas estirpes 2785, 49, 204, 50 e pelo pareamento combinado da bactéria e do fungo. As mesmas letras não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

A análise química dos COVs demonstrou que os voláteis obtidos neste trabalho podem ser divididos em sete classes químicas: aldeídos, álcoois, aromáticos, cetonas, ésteres, hidrocarbonetos e terpenos. Com predominância de três classes de compostos: aromáticos, cetonas e ésteres (Figura 7). A Figura 7 apresenta ainda o resultado das análises de comparações múltiplas realizados por classe química pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos Fungo, Bactérias e Bactéria-Fungo.

A análise da Figura 7 apresenta ainda a produção COVs liberados por classe química, aromáticos, cetonas e ésteres, foram maiores em sua maioria nos tratamentos em que estavam as bactérias em condição isolada, ou em pareamento com o fungo, apresentando diferença estatística para esse tratamento. As bactérias em teste também se destacaram na produção das demais classes químicas, não diferindo estatisticamente do tratamento Fungo, apenas no grupo

dos aldeídos. Por outro lado, o tratamento fungo destacou-se na produção de terpenos, o que pode indicar que seus compostos de defesa estejam concentrados nesse agrupamento.

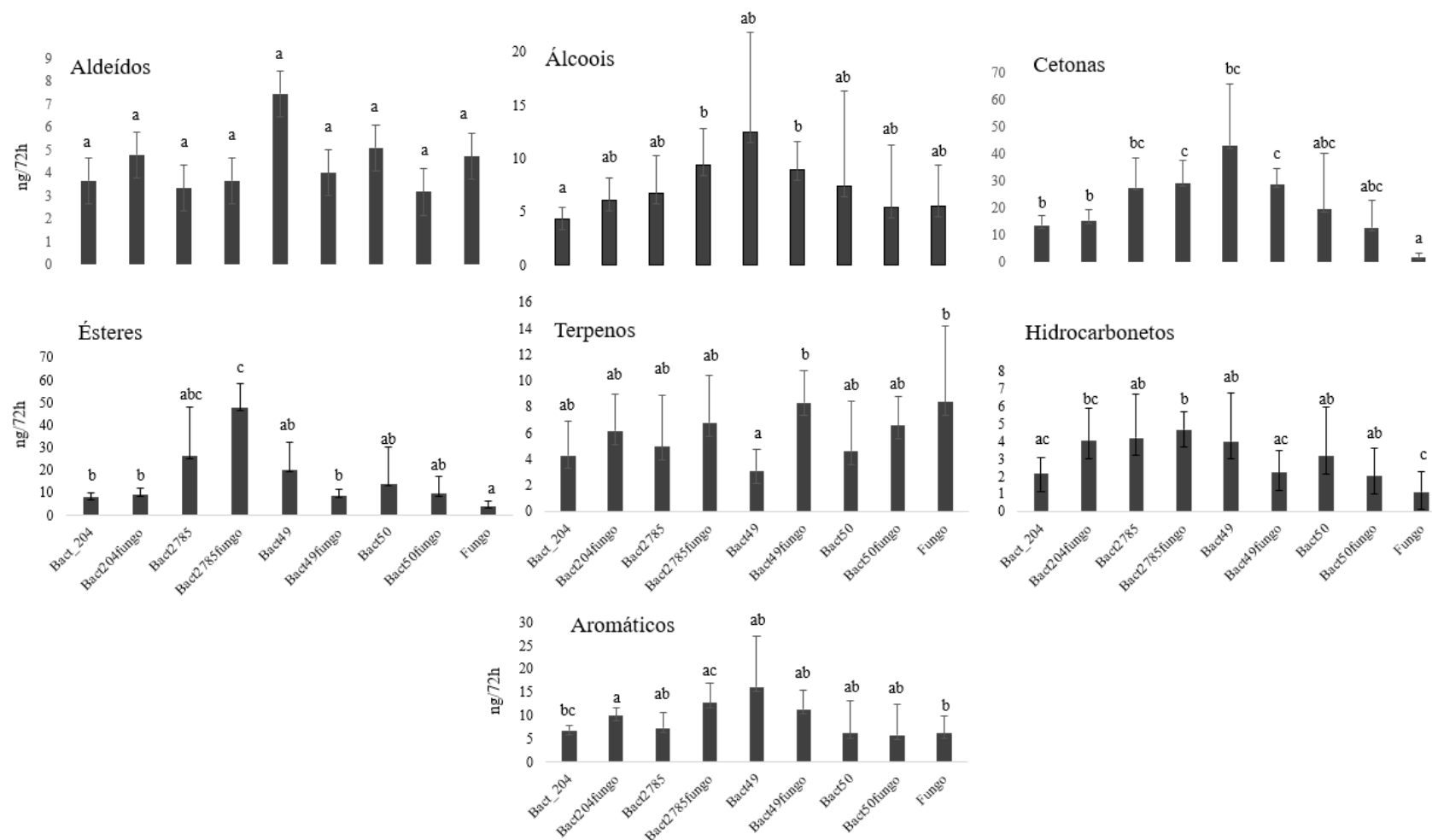


Figura 7. Quantidade total (média $\pm$ erro padrão) das classes químicas de compostos orgânicos voláteis liberados pelo fungo *S. sclerotiorum*, pelas estirpes 2785, 49, 204, 50 e por meio do pareamento combinado das bactérias com o fungo coletados por 72h. As barras marcadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Em uma avaliação da produção de COVs por cepas de *Bacillus*, Mülner et al (2020) relataram um amplo espectro de voláteis, como hidrocarbonetos (alcanos/alquenos), álcoois, cetonas, compostos contendo enxofre e pirazinas.

Uma alta produção de cetonas, aromáticos e álcoois, produzidos por isolados de *Trichoderma*, com inibição fúngica contra *S. sclerotiorum*, foi relatada por Silva et al (2020). Da mesma forma, Chen et al. (2016) relataram a produção de cetonas e outros compostos químicos como inibidores do crescimento fúngico patogênico. Para estudos futuros, sugere-se avaliar os efeitos isolados ou combinados dos principais compostos em relação à ocorrência de inibição fúngica contra *S. sclerotiorum* e outros fitopatógenos.

A análise de ACP (Figura 8) indicou similaridade entre o perfil químico dos COVs produzidos pelo grupo bactéria e o grupo bactéria + fungo, dada a proximidade dos pontos nas linhagens 2785, 204 e 50, enquanto a distância do grupo fungo dos demais foi maior.

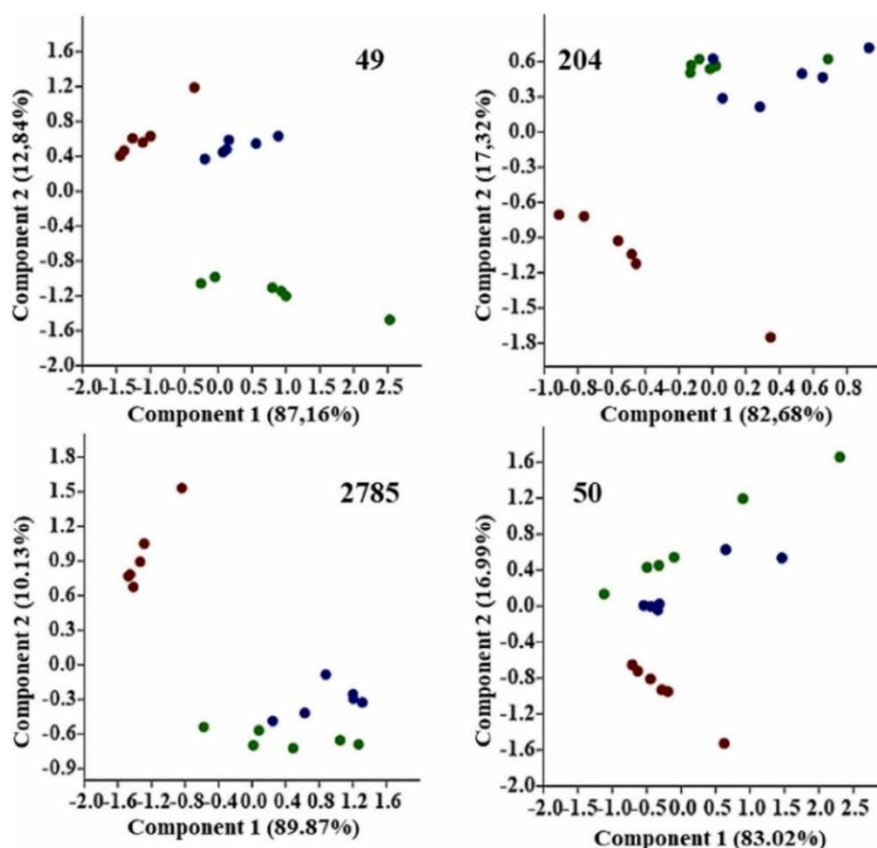


Figura 8. ACP1 × ACP2 biplot do grupo bacteriano (pontos verdes), grupo fungo (pontos vermelhos) e grupo bactéria-fungo (pontos azuis) relacionado à produção total de compostos orgânicos voláteis (COV), com base na análise de componentes principais.

O perfil químico dos COVs derivados de fungos + bactérias foi uma combinação dos COVs produzidos por fungos e bactérias separadamente, e nenhum novo composto foi detectado

quando bactérias e fungos foram combinados para coleta volátil (Apêndice 1). O maior nível de COVs emitidos por 2785 nos tratamentos bactéria e bactéria + fungo foi decisivo para o agrupamento desses tratamentos (Figura 8).

Dois grandes grupos relevantes (clusters) foram detectados pelo processo de agrupamento (Figura 9). O primeiro incluiu exatamente todas as observações do grupo bacteriano e do par bactéria-fungo e o segundo exatamente todas as observações do grupo fungo. Esse resultado é interessante, por mostrar que os 110 compostos apresentam padrões de composição relativamente distintos para fungos e similares para o grupo bacteriano e pareamento fungo-bactéria, confirmando o que é mostrado no biplot da Figura 8.

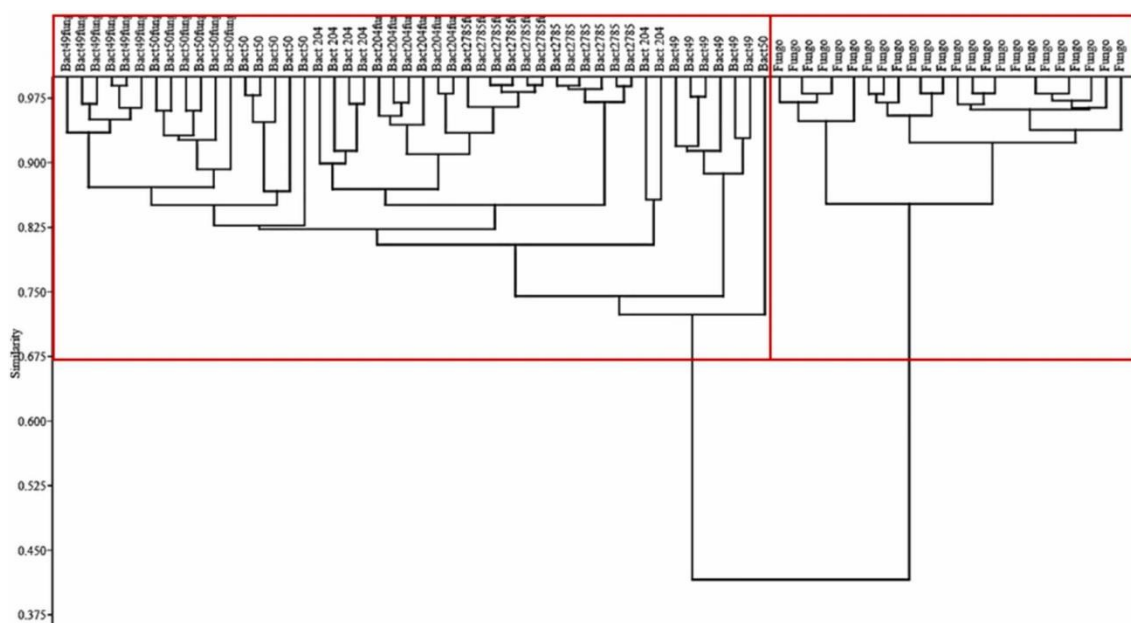


Figura 9. Agrupamento das observações com base nos 110 compostos obtidos e separação em dois grupos.

Análise da interação de Sclerotinia sclerotiorum e Bacillus por microscopia eletrônica de varredura.

O objetivo foi utilizar imagens de microscopia eletrônica de varredura para mostrar alterações morfológicas no patógeno que corroborassem os resultados do estudo de pareamento fúngico. Nesse sentido, as imagens da cepa 204 em pareamento com o patógeno foram excepcionalmente representativas (Figura 10), pois mostraram ruptura da parede celular, extravasamento e adesão e colonização de bactérias ao tecido fúngico de *S. sclerotiorum*.

Gu et al. (2017), verificaram alterações na membrana plasmática e parede celular de hifas e conídios de *F. graminearum*, e atribuíram os resultados obtidos a produção de bacillomicina

induzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio pela estirpe FZB42. Alterações na permeabilidade da membrana e a abertura de poros nas paredes celulares de *F. oxysporum* foram verificadas por Montalvão et al. (2021), através do pareamento com estirpes de *Bacillus* spp.

Por outro lado, Geraldine et al. (2013) associaram o parasitismo de escleródios de *S. sclerotiorum* por estirpes de *Trichoderma* a produção das enzimas de degradação da parede celular (CWDEs) lipase, NAGase, β -1,3-glucanase, β -glucosidase e proteases. Enzimas essas que poderiam futuramente ser estudadas nessas estirpes de *Bacillus* que apresentaram o comportamento de rompimento da parede celular, extravasamento e adesão e colonização de bactérias ao tecido fúngico, uma vez que não foram grandes produtoras de quitinase.

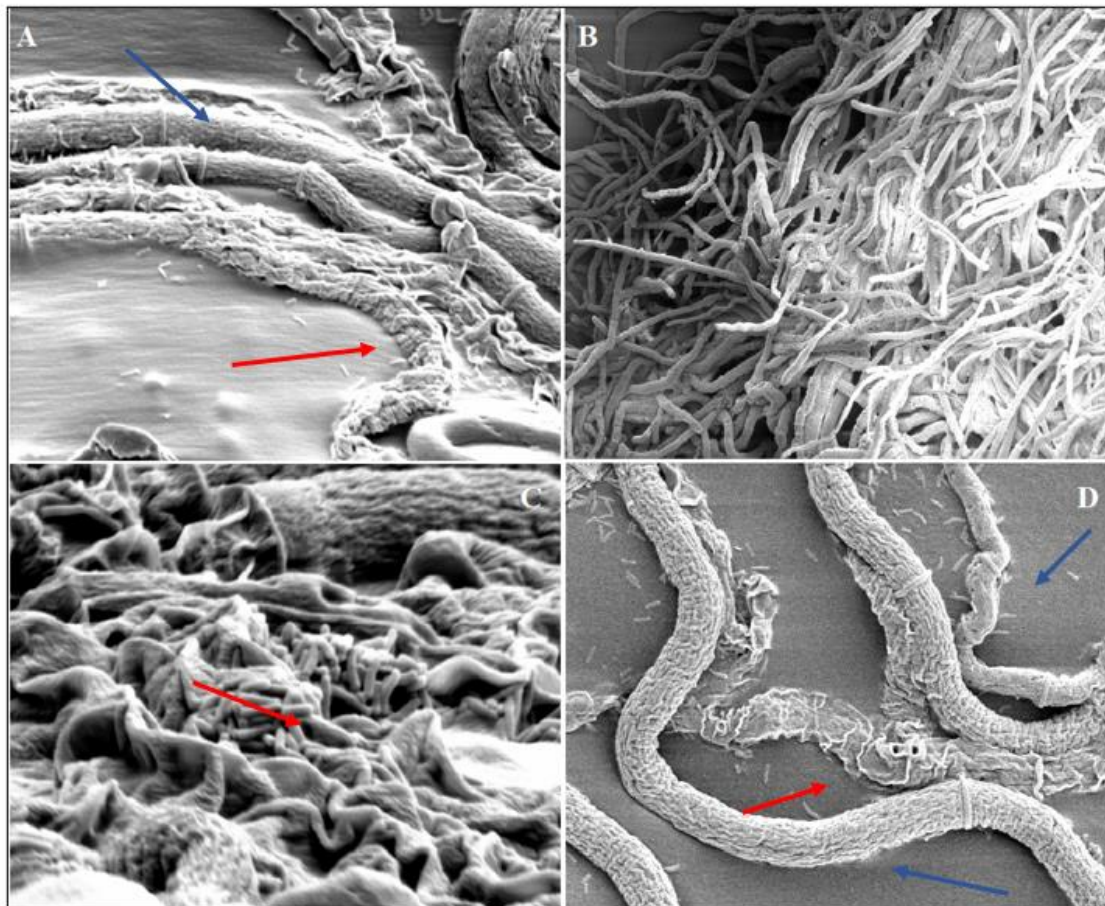


Figura 10: A, C e D: Hifas fúngicas de *S. sclerotiorum* degradadas pela bactéria S204 (setas vermelhas) ao lado de hifas saudáveis (setas azuis). B: Controle não inoculado com bactéria.

4. CONCLUSÕES

O ensaio de pareamento fúngico foi fundamental para identificação das estirpes com alto potencial de controle de microrganismos antagônicos como *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Genes que codificam a produção de lipopeptídeos foram identificados nas cepas de *Bacillus* analisadas. A Bacilomicina foi o composto fúngico de maior ocorrência nas estirpes analisadas, e a análise de componentes principais (ACP) mostrou, que a substância está diretamente relacionada ao controle dos patógenos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Compostos orgânicos voláteis com atividade antifúngica foram identificados nas cepas testadas. As quatro cepas responderam diferentemente a *S. sclerotiorum* em termos de produção de COV, indicando variabilidade na resposta de resistência das cepas de *Bacillus*. Além disso, vários compostos com capacidade inibitória contra *S. sclerotiorum* foram identificados. Uma produção particularmente alta de tais compostos foi detectada na linhagem 2785, indicando a possibilidade de um melhor desempenho desta linhagem no controle biológico mediado por compostos voláteis.

O alto potencial biotecnológico das cepas 204 e 2785 foi confirmado por se destacarem no controle dos patógenos em estudo, com diferentes formas de ação, como lipopeptídeos e produção de COVs. O potencial dessas linhagens para o controle biológico de fitopatógenos é promissor, de modo que podem ser testadas em ecossistemas agrícolas.

5. Referências Bibliográficas

- ALMONEAFY, A. A. et al. Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis*, v. 63, n. 2, p. 59–70, jun. 2014.
- Alves, E. (2004). Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura. UFLA/FAEPE, Lavras.
- ANDERSEN, R. A. et al. Structure-Antifungal Activity Relationships among Volatile C6 and C9 Aliphatic Aldehydes, Ketones, and Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* v. 42, n. 7, p. 1563–1568, 1 jul. 1994.
- ARGUELLES-ARIAS, A. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, v. 8, n. 1, p. 63, 2009.
- ATHUKORALA, S. N. P.; FERNANDO, W. G. D.; RASHID, KHALID. Y. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 55, n. 9, p. 1021–1032, set. 2009.
- BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 84, p. 11–18, 2009.
- BOSSOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. (1998). *Electron Microscopy* (2nd ed.). Jones and Bartlett Publishers, Boston
- CHAVES-LÓPEZ, C. et al. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 2, p. 487–499, 25 jun. 2015.
- CHEN, X. H. et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth–promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 9, p. 1007–1014, 19 ago. 2007.
- CHOWDHURY, S. P. et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 28 jul. 2015.
- COSTA, F. S. S. et al. *Bacillus thuringiensis* Effect on the Vegetative Development of Cotton Plants and the Biocontrol of *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, v. 10, n. 12, p. 1889, 29 nov. 2020.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 4, p. 847–867, 1 dez. 2000.

DIMKIĆ, I. et al. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 117, p. 101754, jan. 2022.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 22, n. 2, p. 107–149, mar. 2003.

DUNLAP, C. A. et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and “*Bacillus oryzicola*” are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 3, p. 1212–1217, 1 mar. 2016.

FALARDEAU, J. et al. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, v. 39, n. 7, p. 869–878, jul. 2013.

FARZAND, A. et al. Marker assisted detection and LC-MS analysis of antimicrobial compounds in different *Bacillus* strains and their antifungal effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, v. 133, p. 91-102. 2019.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 337-359. 2005.

FERNANDO, W. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, n. 5, p. 955-964. 2005.

GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. et al. Relating starter cultures to volatile profile and potential markers in green Spanish-style table olives by compositional data analysis. *Food Microbiology*, v. 94, 103659. 2021.

GERALDINE, A. M. et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, v. 67, n. 3, p. 308–316, 1 dez. 2013.

GU, Q. et al. Bacillomycin D Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Is Involved in the Antagonistic Interaction with the Plant-Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 19, 21 jul. 2017.

GROSCH, R. et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani*: complex interaction of biocontrol strains, pathogen and indigenous microbial community in the rhizosphere of lettuce shown by molecular methods. *Plant and Soil*, v. 361, n. 1-2, p. 343–357, 2 maio 2012.

Jl, C. et al. Genomic Analysis Reveals Potential Mechanisms Underlying Promotion of Tomato Plant Growth and Antagonism of Soilborne Pathogens by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13. *Microbiology Spectrum*, v. 9, n. 3, 22 dez. 2021.

KAWAGOE, Y. et al. Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in Arabidopsis plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 460, n. 4, p. 1015–1020, maio 2015.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 541–556, out. 2009.

LUO, L. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, v. 259, p. 127016, jun. 2022.

MONNERAT, R. G. et al. Characterization of brasilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatallis*. *Biological Control*. v. 41. p. 291-295, 2007.

MONTALVÃO, S. C. L. et al. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* With *Bacillus* spp. Strains. *Journal of Agricultural Science*, v. 13, n. 9, p. p1, 15 ago. 2021.

MORA, I.; JORDI CABREFIGA; EMILIO MONTESINOS SEGUÍ. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLOS ONE*, v. 10, n. 5, p. e0127738–e0127738, 29 maio 2015.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. Biosurfactants. *Research Trends and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 34. 2014.

NGALIMAT, M. S. et al. A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, v. 9, n. 3, p. 614, 17 mar. 2021.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 115–125, mar. 2008.

PANTH, M.; HASSLER, S. C.; BAYSAL-GUREL, F. Methods for Management of Soilborne Diseases in Crop Production. *Agriculture*, v. 10, n. 1, p. 16, 11 jan. 2020.

SILVA, L. R. et al. Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. *Biological control*, v. 147. 2020.

SUN, J. et al. Knockout of *rapC* Improves the Bacillomycin D Yield Based on De Novo Genome Sequencing of *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 17, p. 4422–4430, 12 abr. 2018.

TAPI, A. et al. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 5, p. 1521–1531, 3 set. 2009.

TOURE, Y. et al. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of applied microbiology*. v. 96, p. 1151-1160. 2004.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, n. 1, p. 453–483, set. 1998.

XU, Z. et al. Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Antifungal Activity and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 3, p. 808–815, 16 nov. 2012.

YADAV, A. N. et al. Plant growth promoting bacteria: Biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. *Advances in Biotechnology and Microbiology*, v5, n. 5, p. 1-16, 1 jan. 2017.

YU, S.-M.; OH, B.-T.; LEE, Y. H. Biocontrol of green and blue molds in postharvest satsuma mandarin using *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36. *Biocontrol Science and Technology*, v. 22, n. 10, p. 1181–1197, out. 2012.

YUAN, J. et al. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 16, p. 5942–5944, 8 jun. 2012.

ZHANG, X. et al. Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atropheus* CAB-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 21, p. 9525–9534, 7 set. 2013.

ZHANG, D. et al. Mechanism of a Volatile Organic Compound (6-Methyl-2-Heptanone) Emitted From *Bacillus subtilis* ZD01 Against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in microbiology*, v. 12. 2022.

ZHENG, M. et al. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, v. 65, n. 2, p. 200-206. 2013

ZENG, Q. et al. Organization, evolution and function of fengycin biosynthesis gene clusters in the *Bacillus amyloliquefaciens* group. *Phytopathology Research*, v. 3, n. 1, 9 nov. 2021.

6. Apêndice

Apêndice 1. Identificação e quantidades (média $\pm$ SEM) de compostos orgânicos voláteis de diferentes grupos determinadas por análise cromatográfica (ng/72 h).

Composto	Kovats	Fungo	2785	2785 + fungo	49	49 + fungo	50	50 + fungo	204	204 + fungo
Acetoina	711	0.520 $\pm$ 0.165	1.065 $\pm$ 0.345	1.240 $\pm$ 0.302	4.682 $\pm$ 2.085	0.400 $\pm$ 0.049	0.437 $\pm$ 0.084	1.387 $\pm$ 0.475	0.491 $\pm$ 0.220	0.697 $\pm$ 0.162
2-Methyl butanol*	733	0.406 $\pm$ 0.038	-	1.788 $\pm$ 0.481	0.042 $\pm$ 0.011	0.692 $\pm$ 0.677	0.004 $\pm$ 0.004	0.210 $\pm$ 0.086	0.523 $\pm$ 0.234	0.345 $\pm$ 0.107
2-Methyl pentanol*	755	0.047 $\pm$ 0.009	-	0.579 $\pm$ 0.191	0.020 $\pm$ 0.006	0.104 $\pm$ 0.043	0.002 $\pm$ 0.002	0.268 $\pm$ 0.118	0.082 $\pm$ 0.037	0.042 $\pm$ 0.007
3-Hydroxy-2-pentanone*	802	0.199 $\pm$ 0.092	1.019 $\pm$ 0.317	1.175 $\pm$ 0.246	1.536 $\pm$ 0.195	0.944 $\pm$ 0.240	1.092 $\pm$ 0.410	0.598 $\pm$ 0.177	1.079 $\pm$ 0.483	0.994 $\pm$ 0.090
2-Hydroxy-3-pentanone*	810	-	0.787 $\pm$ 0.253	0.483 $\pm$ 0.243	0.110 $\pm$ 0.050	0.051 $\pm$ 0.011	0.060 $\pm$ 0.021	0.044 $\pm$ 0.014	0.033 $\pm$ 0.015	0.079 $\pm$ 0.027
Methyl 2-methyl-3-oxobutanoate*	849	-	20.815 $\pm$ 9.437	41.077 $\pm$ 5.057	8.832 $\pm$ 2.385	5.923 $\pm$ 0.935	7.348 $\pm$ 4.977	4.599 $\pm$ 1.770	2.339 $\pm$ 1.046	2.586 $\pm$ 0.719
5-Methyl hexanone*	862	-	0.166 $\pm$ 0.064	0.292 $\pm$ 0.036	0.379 $\pm$ 0.173	0.187 $\pm$ 0.019	0.183 $\pm$ 0.118	0.075 $\pm$ 0.046	0.136 $\pm$ 0.061	0.104 $\pm$ 0.034
Hexanol	865	0.224 $\pm$ 0.040	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Heptanone	891	0.183 $\pm$ 0.036	2.567 $\pm$ 1.058	3.990 $\pm$ 0.819	4.869 $\pm$ 2.145	1.552 $\pm$ 0.359	1.870 $\pm$ 1.427	0.956 $\pm$ 0.389	0.842 $\pm$ 0.376	0.595 $\pm$ 0.092
1,2 Dimethylpropyl acetate*	895	-	0.252 $\pm$ 0.061	0.361 $\pm$ 0.030	0.393 $\pm$ 0.169	0.194 $\pm$ 0.035	0.201 $\pm$ 0.130	0.324 $\pm$ 0.194	0.339 $\pm$ 0.152	0.378 $\pm$ 0.089
Nonano	900	0.247 $\pm$ 0.076	-	0.397 $\pm$ 0.090	0.423 $\pm$ 0.218	0.200 $\pm$ 0.055	0.428 $\pm$ 0.348	0.091 $\pm$ 0.022	0.103 $\pm$ 0.046	0.143 $\pm$ 0.032
2-Heptanol	902	-	0.144 $\pm$ 0.043	0.139 $\pm$ 0.022	0.181 $\pm$ 0.076	0.139 $\pm$ 0.055	0.142 $\pm$ 0.098	0.059 $\pm$ 0.018	0.184 $\pm$ 0.082	0.069 $\pm$ 0.048
Heptanal	905	0.114 $\pm$ 0.015	0.139 $\pm$ 0.078	0.137 $\pm$ 0.055	0.120 $\pm$ 0.117	0.040 $\pm$ 0.008	0.045 $\pm$ 0.040	0.021 $\pm$ 0.007	0.054 $\pm$ 0.024	0.102 $\pm$ 0.038
2,5-Dimethylpyrazine*	910	2.775 $\pm$ 0.568	1.430 $\pm$ 0.403	2.535 $\pm$ 0.534	2.846 $\pm$ 1.638	1.499 $\pm$ 0.410	0.864 $\pm$ 0.379	0.941 $\pm$ 0.194	1.792 $\pm$ 0.801	1.773 $\pm$ 0.125

α -Pinene	939	0.557 $\pm$ 0.351	-	0.325 $\pm$ 0.138	0.430 $\pm$ 0.168	0.098 $\pm$ 0.031	0.086 $\pm$ 0.030	0.208 $\pm$ 0.075	0.920 $\pm$ 0.411	0.770 $\pm$ 0.260
Methyl 2-methylpentanoate*	941	-	0.084 $\pm$ 0.035	0.326 $\pm$ 0.107	-	1.106 $\pm$ 0.304	0.326 $\pm$ 0.171	0.383 $\pm$ 0.183	0.706 $\pm$ 0.316	-
Butoxy 2-propanol*	845	0.086 $\pm$ 0.027	-	-	-	-	-	-	-	0.308 $\pm$ 0.257
Unknown 1	952	-	0.101 $\pm$ 0.036	0.063 $\pm$ 0.035	1.032 $\pm$ 0.574	0.392 $\pm$ 0.056	0.418 $\pm$ 0.434	0.174 $\pm$ 0.172	0.078 $\pm$ 0.035	0.217 $\pm$ 0.031
Unknown 2	957	-	0.093 $\pm$ 0.027	0.163 $\pm$ 0.019	0.152 $\pm$ 0.063	0.031 $\pm$ 0.014	0.103 $\pm$ 0.054	0.195 $\pm$ 0.207	0.074 $\pm$ 0.033	0.024 $\pm$ 0.014
6-Methyl-2-heptanone*	959	0.090 $\pm$ 0.035	0.747 $\pm$ 0.197	0.897 $\pm$ 0.119	1.787 $\pm$ 0.450	0.917 $\pm$ 0.361	1.297 $\pm$ 0.780	1.260 $\pm$ 0.709	1.042 $\pm$ 0.466	0.142 $\pm$ 0.090
Benzaldehyde	963	1.621 $\pm$ 0.476	1.733 $\pm$ 0.777	4.379 $\pm$ 1.095	3.123 $\pm$ 1.406	3.288 $\pm$ 1.433	0.958 $\pm$ 0.549	1.389 $\pm$ 1.239	0.415 $\pm$ 0.185	2.145 $\pm$ 0.628
5-Methyl-2-heptanone*	969	-	0.806 $\pm$ 0.285	1.511 $\pm$ 0.501	0.394 $\pm$ 0.178	0.473 $\pm$ 0.142	0.039 $\pm$ 0.033	0.206 $\pm$ 0.138	0.341 $\pm$ 0.152	1.418 $\pm$ 0.684
B-Pinene	980	0.506 $\pm$ 0.063	-	0.079 $\pm$ 0.070	0.857 $\pm$ 0.124	0.380 $\pm$ 0.085	0.403 $\pm$ 0.203	0.273 $\pm$ 0.109	0.464 $\pm$ 0.208	0.381 $\pm$ 0.035
1,1 -Ethanodiol dipropionate? *	982	-	0.410 $\pm$ 0.108	0.432 $\pm$ 0.106	0.367 $\pm$ 0.403	0.038 $\pm$ 0.042	0.611 $\pm$ 0.630	0.365 $\pm$ 0.042	-	-
1-Octen-3-ol	983	0.627 $\pm$ 0.183	0.090 $\pm$ 0.027	0.431 $\pm$ 0.085	0.456 $\pm$ 0.349	0.485 $\pm$ 0.079	0.459 $\pm$ 0.330	0.085 $\pm$ 0.069	0.097 $\pm$ 0.043	0.194 $\pm$ 0.019
6-Methyl-5-hepten-2-one	990	0.235 $\pm$ 0.105	0.302 $\pm$ 0.106	0.716 $\pm$ 0.141	0.613 $\pm$ 0.274	0.701 $\pm$ 0.148	0.221 $\pm$ 0.081	0.895 $\pm$ 0.330	0.362 $\pm$ 0.162	0.463 $\pm$ 0.077
2-Octanone	993	-	0.664 $\pm$ 0.171	0.672 $\pm$ 0.181	0.526 $\pm$ 0.099	0.329 $\pm$ 0.045	0.684 $\pm$ 0.382	0.317 $\pm$ 0.085	0.257 $\pm$ 0.115	0.325 $\pm$ 0.061
2-Ethyl-5-methyl-pyrazine*	1001	0.442 $\pm$ 0.074	0.067 $\pm$ 0.024	0.108 $\pm$ 0.019	0.170 $\pm$ 0.059	0.142 $\pm$ 0.045	0.059 $\pm$ 0.027	0.059 $\pm$ 0.014	0.065 $\pm$ 0.029	0.139 $\pm$ 0.071
Trimethylpyrazine*	1002	0.395 $\pm$ 0.183	0.629 $\pm$ 0.125	1.078 $\pm$ 0.191	1.949 $\pm$ 1.001	1.120 $\pm$ 0.271	0.793 $\pm$ 0.432	0.490 $\pm$ 0.137	0.795 $\pm$ 0.356	0.747 $\pm$ 0.060
Octanal	1004	0.122 $\pm$ 0.129	0.264 $\pm$ 0.107	0.396 $\pm$ 0.138	0.334 $\pm$ 0.124	0.081 $\pm$ 0.089	0.247 $\pm$ 0.080	0.222 $\pm$ 0.072	0.214 $\pm$ 0.096	0.391 $\pm$ 0.051
3-Carene	1011	2.275 $\pm$ 1.533	1.148 $\pm$ 0.758	1.670 $\pm$ 0.968	0.102 $\pm$ 0.051	0.101 $\pm$ 0.042	0.401 $\pm$ 0.190	0.330 $\pm$ 0.102	0.749 $\pm$ 0.335	1.382 $\pm$ 0.728
2-Acetylthiazole*	1020	0.192 $\pm$ 0.011	0.150 $\pm$ 0.057	0.153 $\pm$ 0.046	0.326 $\pm$ 0.163	0.157 $\pm$ 0.027	0.117 $\pm$ 0.062	0.066 $\pm$ 0.021	0.096 $\pm$ 0.043	0.103 $\pm$ 0.020
Butanoate butan-3-one-2-ily*	1028	-	1.148 $\pm$ 0.264	1.438 $\pm$ 0.249	2.126 $\pm$ 0.653	0.872 $\pm$ 0.131	0.618 $\pm$ 0.356	0.422 $\pm$ 0.181	1.524 $\pm$ 0.681	1.203 $\pm$ 0.078

2-Ethyl-hexan-1-ol	1031	-	0.105 ± 0.047	0.170 ± 0.049	3.063 ± 1.186	0.354 ± 0.246	0.884 ± 0.915	0.392 ± 0.180	0.066 ± 0.030	0.133 ± 0.040
Limonene	1033	0.118 ± 0.037	1.278 ± 0.404	1.692 ± 0.361	-	1.311 ± 0.379	1.565 ± 0.509	0.864 ± 0.338	1.672 ± 0.748	2.237 ± 0.444
Benzylalcohol	1038	0.399 ± 0.082	0.506 ± 0.154	1.583 ± 0.446	0.695 ± 0.209	1.598 ± 0.392	0.349 ± 0.140	0.816 ± 0.393	0.703 ± 0.314	1.700 ± 0.128
Phenylacetaldehyde	1047	0.466 ± 0.067	0.279 ± 0.069	0.330 ± 0.043	0.997 ± 0.371	0.536 ± 0.106	0.509 ± 0.182	0.268 ± 0.049	0.325 ± 0.146	0.411 ± 0.034
6-Methyl octanone*	1059	-	0.575 ± 0.110	0.668 ± 0.086	1.240 ± 0.482	0.566 ± 0.066	0.969 ± 0.622	0.375 ± 0.193	0.449 ± 0.201	0.669 ± 0.159
Unknown 3	1062	-	0.164 ± 0.058	0.182 ± 0.031	-	0.179 ± 0.028	0.186 ± 0.090	0.095 ± 0.035	0.126 ± 0.056	0.041 ± 0.028
Acetylpyrrole*	1064	-	0.050 ± 0.025	0.112 ± 0.081	-	-	0.179 ± 0.128	0.071 ± 0.014	0.144 ± 0.064	0.115 ± 0.046
Acetophenone*	1069	-	0.262 ± 0.074	0.416 ± 0.068	0.571 ± 0.210	0.491 ± 0.098	0.259 ± 0.091	0.201 ± 0.064	0.186 ± 0.083	0.365 ± 0.045
2-nonanol	1072	-	0.121 ± 0.029	0.093 ± 0.071	-	0.033 ± 0.016	0.042 ± 0.044	0.011 ± 0.012	0.054 ± 0.024	0.037 ± 0.022
Octanol	1074	0.346 ± 0.114	0.336 ± 0.108	0.472 ± 0.071	-	0.616 ± 0.098	0.383 ± 0.172	0.253 ± 0.072	0.633 ± 0.283	0.598 ± 0.084
Unknown 4	1078		0.284 ± 0.068	0.387 ± 0.089	0.546 ± 0.167	0.522 ± 0.067	0.307 ± 0.115	0.258 ± 0.079	0.342 ± 0.153	0.459 ± 0.071
2,5-Dimethyl-3-ethylpyrazine*	1080	0.278 ± 0.123	-	0.173 ± 0.070	0.565 ± 0.391	0.228 ± 0.049	0.067 ± 0.021	0.149 ± 0.047	0.118 ± 0.053	0.135 ± 0.029
2-Nonanone	1093	0.177 ± 0.134	1.891 ± 0.523	1.809 ± 0.334	3.411 ± 1.146	1.242 ± 0.150	1.585 ± 0.763	0.542 ± 0.233	0.81 ± 0.363	0.820 ± 0.137
Linalool	1100	0.519 ± 0.282	1.801 ± 0.599	0.708 ± 0.143	0.239 ± 0.066	0.323 ± 0.045	0.884 ± 0.505	0.464 ± 0.120	0.103 ± 0.046	0.471 ± 0.066
Nonanal	1105	1.374 ± 0.407	0.760 ± 0.206	1.514 ± 0.331	3.328 ± 1.733	1.539 ± 0.224	1.636 ± 0.555	1.124 ± 0.188	1.558 ± 0.697	1.717 ± 0.232
Phenylethyl alcohol	1116	-	0.258 ± 0.055	0.360 ± 0.065	1.049 ± 0.591	0.524 ± 0.158	0.337 ± 0.246	0.260 ± 0.112	0.393 ± 0.176	0.353 ± 0.036
α-Isophorone	1118	0.130 ± 0.050	-	0.107 ± 0.022	-	0.178 ± 0.127	0.720 ± 0.371	0.231 ± 0.136	0.417 ± 0.186	0.447 ± 0.110
2-Methylbutanoic anhydride*	1121	-	0.450 ± 0.105	0.457 ± 0.112	-	0.081 ± 0.022	0.094 ± 0.057	0.074 ± 0.031	-	0.120 ± 0.033
4-acetyl-1-methylcyclohexene*	1147	0.380 ± 0.364	0.916 ± 0.143	1.186 ± 0.237	1.797 ± 0.542	3.413 ± 0.581	0.344 ± 0.190	0.669 ± 0.299	0.216 ± 0.097	0.593 ± 0.065

4-acetyl-1-methylcyclohexene*	1157	-	0.771 ± 0.133	0.707 ± 0.137	1.400 ± 0.412	1.145 ± 0.140	0.377 ± 0.181	0.322 ± 0.142	0.190 ± 0.085	0.427 ± 0.086
6- Methyl nonanone*		-	0.947 ± 0.172	0.759 ± 0.138	1.579 ± 0.488	0.748 ± 0.077	0.717 ± 0.368	0.333 ± 0.179	0.410 ± 0.183	0.488 ± 0.089
5- Methyl nonanone*	1166	-	1.096 ± 0.209	0.912 ± 0.148	1.471 ± 0.467	0.735 ± 0.091	1.063 ± 0.545	0.492 ± 0.214	0.511 ± 0.228	0.593 ± 0.098
(E)-2-Nonenal	1168	0.150 ± 0.106	-	-	0.122 ± 0.065	0.179 ± 0.019	0.177 ± 0.109	0.199 ± 0.141	0.178 ± 0.079	0.232 ± 0.057
2-Decanol	1169	-	0.327 ± 0.072	0.271 ± 0.062	0.174 ± 0.121	-	-	-	-	-
(E)-2-Decen-1-ol	1173	-	0.619 ± 0.127	0.605 ± 0.130	0.861 ± 0.278	0.485 ± 0.058	0.936 ± 0.457	0.488 ± 0.279	0.481 ± 0.215	0.716 ± 0.119
2-Decanone	1194	-	0.475 ± 0.086	0.718 ± 0.343	0.604 ± 0.258	0.156 ± 0.023	0.384 ± 0.209	0.192 ± 0.111	0.235 ± 0.105	0.198 ± 0.034
Nonanol	1198	0.351 ± 0.262	-	0.329 ± 0.132	0.171 ± 0.043	0.124 ± 0.017	0.144 ± 0.069	0.154 ± 0.125	0.117 ± 0.052	0.189 ± 0.044
Octan-2-ol	1202	-	0.384 ± 0.144	0.778 ± 0.256	0.318 ± 0.177	0.137 ± 0.080	0.317 ± 0.245	0.555 ± 0.562	0.088 ± 0.039	0.257 ± 0.128
Decanal	1207	0.940 ± 0.249	1.165 ± 0.263	0.319 ± 0.145	1.630 ± 0.576	0.940 ± 0.222	1.437 ± 0.438	0.941 ± 0.314	1.017 ± 0.455	1.002 ± 0.238
Benzothiazole	1227	0.146 ± 0.089	0.153 ± 0.049	0.144 ± 0.036	0.317 ± 0.099	0.169 ± 0.031	0.397 ± 0.271	0.309 ± 0.248	0.128 ± 0.057	0.200 ± 0.049
Unknown 5	1261	-	2.086 ± 0.263	1.742 ± 0.371	4.099 ± 1.475	3.549 ± 0.408	1.496 ± 0.846	0.928 ± 0.641	1.821 ± 0.814	2.089 ± 0.465
Unknown 6	1265	-	0.617 ± 0.112	0.616 ± 0.103	0.965 ± 0.394	1.170 ± 0.183	0.485 ± 0.232	0.218 ± 0.069	0.609 ± 0.273	0.828 ± 0.160
Unknown 7	1268	-	0.234 ± 0.042	0.286 ± 0.050	0.196 ± 0.074	0.227 ± 0.016	0.593 ± 0.379	0.441 ± 0.343	0.187 ± 0.084	0.548 ± 0.230
2-Undecanone	1295	0.293 ± 0.144	3.560 ± 0.521	2.951 ± 0.497	5.008 ± 1.396	2.092 ± 0.272	1.823 ± 0.741	0.884 ± 0.455	1.618 ± 0.724	1.534 ± 0.153
Tridecane	1300	0.560 ± 0.356	1.019 ± 0.219	0.853 ± 0.179	2.176 ± 0.826	0.927 ± 0.249	1.667 ± 1.083	1.090 ± 0.812	0.394 ± 0.176	0.753 ± 0.180
Undecanal	1308	0.244 ± 0.140	0.226 ± 0.059	0.212 ± 0.063	0.513 ± 0.205	0.261 ± 0.083	0.664 ± 0.433	0.365 ± 0.246	0.290 ± 0.130	0.282 ± 0.062
6- Methyl decanone*	1361	-	2.161 ± 0.326	1.703 ± 0.321	3.490 ± 1.028	1.414 ± 0.188	1.269 ± 0.564	0.527 ± 0.246	1.183 ± 0.529	1.124 ± 0.145
5- Methyl decanone*	1369	-	1.625 ± 0.281	1.316 ± 0.225	1.926 ± 0.561	0.941 ± 0.132	1.086 ± 0.535	0.584 ± 0.338	0.741 ± 0.331	0.811 ± 0.095

Undecanol	1375	-	0.460 ± 0.101	0.356 ± 0.060	-	0.551 ± 0.125	0.626 ± 0.316	0.137 ± 0.074	0.321 ± 0.143	0.444 ± 0.101
2-Dodecanone	1396	-	0.737 ± 0.124	0.695 ± 0.125	0.646 ± 0.198	0.312 ± 0.083	0.455 ± 0.235	0.317 ± 0.233	0.253 ± 0.113	0.390 ± 0.122
Tetradecane	1400	0.231 ± 0.147	0.312 ± 0.087	0.273 ± 0.075	1.084 ± 0.426	0.514 ± 0.195	0.683 ± 0.399	0.437 ± 0.300	0.133 ± 0.060	0.381 ± 0.122
2-Dodecanol	1403	-	0.012 ± 0.013	-	-	-	-	-	0.075 ± 0.033	-
Dodecanal	1411	-	0.198 ± 0.051	0.153 ± 0.039	0.497 ± 0.188	0.230 ± 0.102	0.360 ± 0.173	0.202 ± 0.107	0.141 ± 0.063	0.349 ± 0.147
Methyl 9-oxononanoate*	1437	-	0.098 ± 0.022	0.120 ± 0.025	0.134 ± 0.055	0.140 ± 0.057	0.127 ± 0.049	0.084 ± 0.059	0.061 ± 0.027	0.150 ± 0.063
Geranylacetone	1456	0.233 ± 0.076	0.442 ± 0.103	0.377 ± 0.065	1.085 ± 0.298	0.583 ± 0.154	0.664 ± 0.275	0.317 ± 0.170	0.219 ± 0.098	0.319 ± 0.120
β-Farnesene	1460	0.085 ± 0.048	-	0.175 ± 0.057	-	0.430 ± 0.070	0.434 ± 0.233	0.212 ± 0.092	0.255 ± 0.114	0.342 ± 0.061
6- Methyl dodecanone*	1462	-	0.615 ± 0.096	0.616 ± 0.089	0.174 ± 0.057	0.117 ± 0.038	0.110 ± 0.038	0.073 ± 0.033	0.044 ± 0.020	0.121 ± 0.042
Dodecanol	1477	0.180 ± 0.081	-	0.199 ± 0.030	0.379 ± 0.162	0.338 ± 0.086	0.229 ± 0.078	0.128 ± 0.029	0.126 ± 0.056	0.223 ± 0.058
2-Tridecanone*	1495	-	2.979 ± 0.374	2.740 ± 0.509	2.744 ± 0.706	1.450 ± 0.222	1.319 ± 0.446	0.517 ± 0.183	0.870 ± 0.389	0.852 ± 0.073
2-Tridecanol*	1504	-	0.690 ± 0.113	0.549 ± 0.112	0.687 ± 0.148	0.295 ± 0.047	0.214 ± 0.089	0.131 ± 0.049	0.217 ± 0.097	0.248 ± 0.037
Dodecanal	1512	-	0.097 ± 0.025	0.078 ± 0.016	0.319 ± 0.182	0.244 ± 0.079	0.228 ± 0.119	0.053 ± 0.013	0.105 ± 0.047	0.140 ± 0.040
6-Methyl dodecanone*	1563	-	0.448 ± 0.074	0.381 ± 0.091	1.305 ± 0.345	0.929 ± 0.168	0.653 ± 0.237	0.363 ± 0.078	0.230 ± 0.103	0.415 ± 0.086
5-Methyl dodecanone*	1571	-	0.798 ± 0.112	0.665 ± 0.149	1.697 ± 0.462	1.729 ± 0.153	0.731 ± 0.308	0.329 ± 0.122	0.636 ± 0.284	0.777 ± 0.232
Tridecanol*	1577	-	0.167 ± 0.042	0.100 ± 0.023	0.145 ± 0.043	0.141 ± 0.030	0.149 ± 0.077	0.046 ± 0.010	0.061 ± 0.027	0.195 ± 0.080
2-Tetradecanone*	1596	-	0.222 ± 0.047	0.198 ± 0.038	-	0.073 ± 0.012	0.148 ± 0.068	0.037 ± 0.017	0.079 ± 0.036	0.117 ± 0.061
Hexadecane	1599	0.178 ± 0.099	0.167 ± 0.050	0.172 ± 0.039	0.274 ± 0.100	0.139 ± 0.057	0.171 ± 0.053	0.074 ± 0.026	0.123 ± 0.055	0.271 ± 0.092
Tetradecanal	1615	0.123 ± 0.069	0.152 ± 0.047	0.118 ± 0.030	0.176 ± 0.080	0.098 ± 0.015	0.139 ± 0.052	0.055 ± 0.012	0.077 ± 0.035	0.181 ± 0.053

Dihydro metihyljasmonate *	1660	0.290 ± 0.125	0.393 ± 0.094	0.403 ± 0.057	0.112 ± 0.029	0.057 ± 0.024	0.360 ± 0.118	0.070 ± 0.032	0.087 ± 0.039	0.468 ± 0.175
5- Methyl tetradecanone*	1662	-	0.009 ± 0.010	0.078 ± 0.013	0.633 ± 0.215	0.507 ± 0.126	0.086 ± 0.050	0.153 ± 0.083	0.101 ± 0.045	0.144 ± 0.056
Tetradecanol	1679	-	1.035 ± 0.413	0.824 ± 0.247	0.615 ± 0.354	0.999 ± 0.778	0.786 ± 0.414	0.205 ± 0.127	0.100 ± 0.045	0.385 ± 0.069
Heptadecane	1700	-	0.487 ± 0.169	0.139 ± 0.080	-	0.096 ± 0.034	0.244 ± 0.095	0.099 ± 0.051	0.186 ± 0.083	0.511 ± 0.172
Octadecane	1800	-	0.760 ± 0.269	0.561 ± 0.128	1.354 ± 0.462	0.911 ± 0.218	0.450 ± 0.095	0.487 ± 0.136	0.585 ± 0.262	0.604 ± 0.112
Hexadecanal	1820	-	0.332 ± 0.099	0.733 ± 0.428	-	0.127 ± 0.041	0.120 ± 0.031	0.062 ± 0.025	0.093 ± 0.041	0.418 ± 0.254
Isopropyl meristate	1830	0.179 ± 0.060	0.217 ± 0.064	0.192 ± 0.037	-	0.259 ± 0.070	0.197 ± 0.079	0.114 ± 0.051	0.044 ± 0.020	0.245 ± 0.094
Hexadecanol	1884	0.420 ± 0.088	0.658 ± 0.269	0.434 ± 0.074	2.980 ± 1.191	2.200 ± 0.584	1.116 ± 0.486	0.869 ± 0.418	0.437 ± 0.195	0.673 ± 0.188
Nonadecane	1900	-	0.375 ± 0.132	0.313 ± 0.090	0.502 ± 0.132	0.359 ± 0.101	0.261 ± 0.096	0.176 ± 0.087	0.128 ± 0.057	0.623 ± 0.434
Methyl hexadecanoate	1931	1.750 ± 0.386	1.473 ± 0.218	1.735 ± 0.597	4.416 ± 1.014	3.378 ± 0.396	2.381 ± 0.804	1.666 ± 0.698	1.307 ± 0.585	1.968 ± 0.329
Pimaradiene*	1955	4.370 ± 1.031	-	1.369 ± 0.434	0.177 ± 0.078	3.844 ± 0.374	-	3.712 ± 0.448	0.134 ± 0.060	0.395 ± 0.179
Eicosane	2001	-	0.758 ± 0.191	0.860 ± 0.211	0.358 ± 0.170	-	0.321 ± 0.136	0.530 ± 0.288	0.305 ± 0.136	0.513 ± 0.212
Isopropyl palmitate*	2028	-	0.091 ± 0.045	0.278 ± 0.053	1.621 ± 0.729	1.166 ± 0.281	0.570 ± 0.427	0.237 ± 0.069	0.328 ± 0.147	0.361 ± 0.153
Octadecanol	2087	-	0.468 ± 0.124	0.484 ± 0.110	0.634 ± 0.175	0.441 ± 0.169	0.298 ± 0.174	0.287 ± 0.119	0.181 ± 0.081	0.444 ± 0.091
Heneicosane	2101	-	0.463 ± 0.143	0.797 ± 0.425	-	-	0.314 ± 0.258	0.312 ± 0.132	0.136 ± 0.061	0.330 ± 0.039
Methyl 16 methylheptadecanoate*	2123	0.355 ± 0.082	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl octadecanoate	2131	-	0.379 ± 0.081	0.374 ± 0.067	0.905 ± 0.291	0.778 ± 0.122	0.405 ± 0.193	0.266 ± 0.084	0.273 ± 0.122	0.405 ± 0.042
Docosane	2201	-	0.896 ± 0.253	1.181 ± 0.369	-	-	0.301 ± 0.141	0.584 ± 0.584	0.456 ± 0.204	0.677 ± 0.140
Undecyl benzoate*	2208	-	0.530 ± 0.137	0.592 ± 0.118	-	-	0.025 ± 0.027	0.161 ± 0.146	0.210 ± 0.094	0.450 ± 0.140

Eicosanol	2300	-	0.120 ± 0.027	0.180 ± 0.056	-	-	-	-	0.108 ± 0.048	0.179 ± 0.038
-----------	------	---	------------------	------------------	---	---	---	---	------------------	------------------

*Composto identificado provisoriamente. **SEM: Erro padrão da Média

Capítulo 2. EFEITO DE BACTÉRIAS COM ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE GRANDES CULTURAS E SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO EM SOJA

RESUMO

Estresses abióticos tem se tornado cada vez mais frequentes no processo de produção agrícola brasileiro. O estresse salino ocorre em grandes áreas em todo o mundo, incluindo o Brasil. O uso de microrganismos com atividade promotora de crescimento tem apresentado resultados interessantes mitigando o efeito desse estresse na planta. O objetivo deste trabalho foi identificar características relacionadas a promoção de crescimento vegetal em estirpes de *Bacillus* spp. selecionadas previamente (204, 2785 e 2791) visando verificar os efeitos na qualidade fisiológica de sementes de grandes culturas e os efeitos do estresse salino em plantas de soja tratadas com essas bactérias. As bactérias foram testadas *in vitro* quanto a sua capacidade de produção de AIA, solubilização de fosfato e crescimento em condições de estresse (temperatura e salinidade) e resistência a metais pesados (Cadmio (Cd), Mercúrio (Hg) e Cobalto (Co)). Testou-se os efeitos dessas bactérias na germinação das sementes de soja, trigo, algodão e grão de bico e em sementes de soja sob condições de estresse salino induzidos por NaCl. Além disso, verificou-se o efeito das bactérias em condição de casa de vegetação sob concentração de NaCl na água de irrigação em diferentes concentrações. Nos resultados *in vitro* foi observado que 2 estirpes apresentaram resultados positivos de solubilização, todas produziram AIA e todas cresceram na condição de 7,5% de salinidade a 30 °C. No ensaio de tratamento de sementes de grandes culturas foram observados resultados significativos principalmente para a variável comprimento de raiz, não sendo observados diferença para as demais variáveis. Com exceção para o grão de bico onde as sementes utilizadas demonstraram baixo potencial germinativo, nessas condições o tratamento bacteriano influenciou na germinação elevando-a em 12% em relação ao controle. Para a soja em condições de salinidade as bactérias 204 e 2785 induziram respostas nas características morfológicas das plântulas de soja. Houve melhora nas variáveis analisadas relacionadas ao comprimento e massa seca de raiz, em casa de vegetação observou-se também a manutenção dos teores de clorofila total.

Palavras-chave: *Bacillus*, controle biológico, metais pesados, stress, salinidade.

ABSTRACT

Abiotic stresses have become increasingly frequent in the Brazilian agricultural production process. Salt stress occurs in large areas around the world, including Brazil. The use of microorganisms with growth-promoting activity has shown interesting results mitigating the effect of this stress on the plant. The objective of this work was to identify characteristics related to the promotion of plant growth in strains of *Bacillus* spp. previously selected (204, 2785 and 2791) aiming to verify the effects on the physiological quality of seeds from large crops and the effects of saline stress on soybean plants treated with these bacteria. The bacteria were tested in vitro for their ability to produce IAA, phosphate solubilization and growth under stress conditions (temperature and salinity) and resistance to heavy metals (Cadmium (Cd), Mercury (Hg) and Cobalt (Co)). . The effects of these bacteria on the germination of soybean, wheat, cotton and chickpea seeds and on soybean seeds under conditions of saline stress induced by NaCl were tested. Furthermore, the effect of bacteria was verified in greenhouse conditions under NaCl concentration in irrigation water at different concentrations. In the in vitro results, it was observed that 2 strains showed positive solubilization results, all produced IAA and all grew under conditions of 7.5% salinity at 30 °C. In the seed treatment trial for large crops, significant results were observed mainly for the root length variable, with no differences being observed for the other variables. With the exception of chickpeas where the seeds used demonstrated low germination potential, under these conditions the bacterial treatment influenced germination, increasing it by 12% in relation to the control. For soybeans under salinity conditions, bacteria 204 and 2785 induced responses in the morphological characteristics of soybean seedlings. There was an improvement in the analyzed variables related to root length and dry mass; in a greenhouse, the maintenance of total chlorophyll levels was also observed.

Key words: *Bacillus*, biological control, heavy metals, stress, salinity.

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de sementes com microrganismos promotores de crescimento de plantas tem se tornado realidade no Brasil onde há uma demanda crescente por tecnologias sustentáveis que possam reduzir os custos de produção e aumentar a produtividade e rentabilidade do agronegócio (Gomes et al., 2016). O Brasil é um dos principais produtores e exportadores mundiais de produtos agrícolas, principalmente grãos, para consumo humano e animal. Na safra 2022/2023 houve quebra de recorde de produção de grãos totalizando 322,8 milhões de toneladas em uma área plantada de 78,5 milhões de hectares (CONAB 2023).

Estresses abióticos como o hídrico e o salino tem se tornado cada vez mais frequentes no processo de produção vegetal. O estresse hídrico através da redução da incidência e extensão dos períodos sem chuvas pode afetar o desenvolvimento das culturas, reduzir a produtividade e sua qualidade nutricional (Silva et al. 2021). Já a salinidade ocorre por conta do acúmulo de sais mais solúveis que o gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), nos horizontes ou camadas do perfil de solo (Ribeiro et al. 2016) em quantidades que interferem o desenvolvimento da maioria dos vegetais, que se expressa em uma condutividade do solo em alguma época do ano entre 4 e 7 dS m^{-1} (Manzato et al. 2002).

A salinidade no solo pode ser de origem natural, devido os processos de gênese dos solos, ou oriunda da ação humana, como o desmatamento e substituição de vegetação nativa por culturas perenes ou anuais, resultado das práticas de irrigação e drenagem inadequadas em solos com tendência ao acúmulo de sais, principalmente em climas áridos e semiáridos (Manzato et al. 2002; Ribeiro et al. 2016, Silva et al. 2021).

De acordo com estimativas recentes, em escala global, mais de 1.100 milhões de hectares (1.128 Mha) de terra são afetados pela salinidade (Wicke et al. 2011; Akhtar et al. 2015). No Brasil, as principais áreas salinas encontram-se na região nordeste, principalmente localizadas sob clima semiárido, que abrange 11% do território brasileiro (Ribeiro et al. 2016, Silva et al. 2021). A região delimitada possui potencial agrícola, porém, é afetada por longos períodos de seca, escassez de água, chuvas irregulares, altas taxas de evapotranspiração e salinidade de seus mananciais (Holanda et al. 2016; Silva et al. 2021), nessas áreas as culturas crescem sob condição de irrigação, o que favorece a salinização secundária do solo, que afeta mundialmente 20% das áreas irrigadas (Glick et al. 2007; Bhise e Dandge, 2019).

Problemas de toxicidade surgem quando os íons na água de irrigação ou no solo se acumulam excessivamente no tecido da planta, causando estresse hídrico e oxidativo,

desequilíbrios nutricionais, desbalanceamento osmótico celular, toxicidade iônica, desorganização da membrana, redução da divisão e expansão celular e interrupção de processos metabólicos essenciais, de tal forma que causam interferem diretamente no rendimento, resultando em danos visíveis nas plantas (Dias et al. 2016; Wani et al. 2020; Sousa et al. 2022).

Em sementes, os efeitos da salinidade podem afetar os processos metabólicos iniciais da cultura como a germinação, desenvolvimento radicular inicial e emergência das plântulas, prejudicando ainda mais as sementes de menor vigor (Nóbrega et al. 2021), criando uma pressão osmótica (OP) que impede a absorção de água ou pelos efeitos tóxicos dos íons sódio e cloreto na semente em germinação (Soltani et al. 2006).

No entanto, dados da literatura comprovam que a salinidade afeta negativamente o processo de germinação em várias plantas de interesse alimentar como em arroz (Xu et al. 2011), trigo (Akbarimoghaddam et al. 2011), milho (Carpýcý et al. 2009; Khodarahmpour et al. 2012) e brássicas (Ibrar et al. 2003; Ulfat et al. 2007).

O manejo do estresse abiótico em plantas ocorre principalmente por meio de programas de melhoramento genético, que possui elevado custo e necessita de longos prazos até a obtenção de produtos que possam estar disponíveis aos produtores. Apesar de haver plantas com algum nível de tolerância a salinidade, essa é uma característica genética variável entre espécies. O manejo de solos salinos visando a sua recuperação passa ainda por práticas culturais, químicas e biológicas. Contudo, as práticas mais comuns de recuperação estão além das condições financeiras da maioria dos agricultores (Manzato et al. 2002), levando muitas vezes ao abandono das áreas agrícolas por conta da salinidade causando problemas ambientais e sociais como os citados por Silva et al. (2021).

Do ponto de vista biológico, a seleção e introdução de microrganismos adaptados que possuem tolerância ao ambiente salino pode induzir respostas das plantas ao estresse biótico e abiótico, incluindo a seca e/ou salinidade tornando-se uma alternativa viável de manejo integrado principalmente a curto prazo. Dentre os microrganismos avaliados visando o manejo do estresse hídrico/salino em plantas as bactérias são os mais estudados.

Estudos apresentam resultados positivos da inoculação de bactérias em várias culturas agrícolas como tomate (Zuluaga et al. 2021), pepino (Kang et al. 2015), cana de açúcar (Rosa et al. 2022), pastagens (Guimarães et al. 2023). Bactérias do gênero *Bacillus* vem sendo estudadas com diversos fins, dentre eles encontra-se a mitigação do estresse salino nas culturas agrícolas como o trigo (Egamberdieva 2009; Ansari et al. 2019), arroz (Nautiyal et al. 2013; Kumar et al. 2021), milho (Li e Jiang, 2017, Ferreira et al. 2018; Ali et al. 2022), soja, (Yasmin

et al. 2020), algodão (Yao et al. 2010), sorgo (Santana et al. 2020), dentre outras culturas (Bhise e Dandge, 2019).

A pesquisa busca encontrar os microrganismos mais responsivos para cada cultura, muitas vezes havendo variações dentro da mesma espécie vegetal, de cultivar para cultivar. As bactérias com atividade promotora de crescimento podem induzir respostas que provocam alterações morfológicas na arquitetura da planta, induzindo o crescimento radicular ou de parte aérea por meio de hormônios vegetais como o ácido indol acético (IAA), ácido giberélico (GA), ácido abscísico (ABA), citocinina, produção de exopolissacarídeos, osmorregulação, sinalização por meio de espécies reativas de oxigênio (ERO), indução de tolerância sistêmica (IST), produção de grandes cadeias de polissacarídeos extracelulares (EPS) e regulação transcricional de genes de resposta ao estresse (Zia et al., 2021). Além disso, algumas bactérias possuem a capacidade de produzir enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminase, enzima responsável por degradar o ACC, o precursor do etileno em plantas, evitando assim aumentos excessivos na síntese de etileno sob várias condições de estresse, incluindo o estresse salino (Orozco-Mosqueda et al. 2020), melhorar a nutrição da planta através da fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e síntese de sideróforos (Etesami e Beattie 2017; Etesami 2018; Bhise e Dandge, 2019), regular enzimas de defesa da planta visando proteção contra o estresse oxidativo (Islam et al. 2016 ; Qin et al. 2016; Bhise e Dandge, 2019).

Apesar da extensa literatura a respeito da utilidade de numerosos microrganismos benéficos para a agricultura, poucos são utilizados no tratamento de sementes (O'Callaghan, 2016), o que reflete a necessidade de pesquisa e desenvolvimento na área. A avaliação da resposta de sementes e mudas ao estresse abiótico proporciona uma compreensão aprimorada das estratégias empregadas pelas sementes para garantir a germinação e o estabelecimento das plantas.

Em condições *in vitro* o cloreto de Sódio (NaCl) é comumente utilizado como agente osmótico para simular condições de estresse salino (Soares et al. 2015). Trabalhos têm sido conduzidos utilizando soluções com diferentes potenciais osmóticos para umedecer substratos, visando simular condições de baixa disponibilidade de água no solo ou salinidade (Braccini et al. 1998), visando elucidar as estratégias possíveis de serem adotadas para manter a germinação e estabelecimento de sementes e mudas nessas condições críticas (Sartori et al. 2022).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade de promoção de crescimento das bactérias selecionadas, bem como seus efeitos na qualidade fisiológica de

sementes de grandes culturas (trigo, milho, soja, algodão e grão de bico) e em sementes de soja sob condições de estresse salino.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1 Origem e Preparo e Seleção das estirpes de *Bacillus* spp.

As estirpes de *Bacillus* foram obtidas a partir da Coleção de Bactérias de Invertebrados pertencente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/DF. As estirpes bacterianas foram reativadas em meio Embrapa líquido (MONNERAT et al., 2007) a 30°C, por 72 horas a 200 rpm.

Inicialmente foram avaliadas 300 estirpes de *Bacillus* quanto as suas atividades de antagonismo a fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*) (Santos et al. 2023). Dentre estas, 3 estirpes 2785 (90 e 82 %), 2791 (75 e 50%) e 204 (85 e 75% de inibição aos patógenos) que se destacaram pela inibição dos respectivos patógenos foram selecionadas para este trabalho.

Buscou-se identificar nessas estirpes a presença de características relacionadas a promoção de crescimento vegetal como a produção de AIA, solubilização de fosfato, crescimento sob condições de estresse (temperatura e salinidade) e resistência a metais pesados. Além disso, avaliar o efeito dessas estirpes na qualidade fisiológica de sementes de trigo, milho, soja e algodão e em sementes de soja sob condições de estresse salino *in vitro*.

2.2 Detecção *in vitro* de solubilização de fosfato

Foi adotado o meio NBRIP (Nautiyal, 1999) sólido nos ensaios de solubilização. Vinte ml do meio foram vertidos em placas de petri estéreis e descartáveis, três dias após esse processo as bactérias foram inoculadas (20 µl) em quatro pontos equidistantes da placa e mantidas em câmara de incubação por 7 dias a 28 ° C ± 2 ° C. As avaliações da detecção de solubilização de fosfato foram realizadas de maneira visual aos 7 dias após a incubação. As bactérias que apresentarem um halo transparente ao redor da colônia foram avaliadas como positivas para solubilização enquanto as demais foram avaliadas como negativas.

2.3 Detecção e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA)

Foram utilizados 100 µL do cultivo bacteriano dos isolados para inocular 15 mL de meio DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986) suplementado com L-Triptofano na concentração final de 600 µg mL⁻¹. Os erlenmeyers foram incubados sob agitação contínua de 200 rpm a 28°C por 72 horas. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm por 3 minutos. A produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Gordon, Weber (1950) onde 500 µL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio pequenos e adicionado 1 mL do reagente de Salkowski (1 ml de 0,5 M FeCl₃ em 50 ml de ácido perclórico (HClO₄) 35%)

previamente preparado. As análises foram realizadas em triplicata e as amostras mantidas no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente para posterior leitura.

A leitura da absorbância foi realizada em equipamento espectrofotômetro com um comprimento de onda de 530 nm. A quantificação de AIA foi avaliada utilizando uma curva de calibração de AIA sintético (Sigma) nas concentrações de 0; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 µg mL⁻¹.

2.4 Avaliação biológica em condições de estresse

A capacidade de crescimento dos isolados bacterianos de crescer sob condições de estresse foi avaliada. Para isso, os isolados bacterianos tiveram 20µL inoculados em meio EMBRAPA sólido sob diferentes concentrações de NaCl e temperaturas de incubação. Foram testadas as seguintes temperaturas, 30 °C e 45 °C. A tolerância dos isolados ao NaCl foi determinada cultivando-os em meio EMBRAPA sólido suplementado com NaCl (5, 7,5 e 10% p/v), o pH foi mantido em 6,8. O experimento foi avaliado após 48 h de incubação. Qualquer crescimento bacteriano indicou a capacidade das cepas de tolerar diferentes estresses abiótico (Cherif-Silini et al. 2019; Boulahouat et al. 2022).

2.5 Estudo de resistência aos metais Cádmio, Mercúrio e Cobalto em diferentes concentrações adicionados ao meio Embrapa sólido.

Utilizou-se o método descrito por Boulahouat et al. (2022) com adaptações visando avaliar a resistência das estirpes testadas a metais pesados, dentre eles, cádmio, cobalto e mercúrio. Suplementou-se o meio EMBRAPA sólido, descrito anteriormente, com sais metálicos Cloreto de cobalto (CoCl₂), Nitrato De Cádmio (Cd (NO₃)₂) e Cloreto de Mercúrio (HgCl₂) um por vez, nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 ppm (mg/L). As placas foram incubadas por 48 h a 28 ° C ± 2 ° C e observadas quanto ao crescimento.

2.6 Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de grandes culturas tratadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal

Este ensaio foi conduzido no laboratório de tecnologia de sementes da Universidade de Brasília (DF). As sementes foram submetidas ao teste de germinação e de crescimento de plântulas.

O ensaio foi realizado com 50 sementes por tratamento e quatro repetições em delineamento experimental inteiramente casualizados. Foram utilizadas sementes de soja (DM

82I78 IPRO), de algodão (TMG44), de trigo (BRS264), e Grão-de-bico (Aleppo), obtidas no comércio local. As sementes foram sanitizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% (2 minutos) e em álcool 70% (1 minuto), posteriormente lavadas em água destilada e colocadas para secar sobre papel filtro, após a secagem as sementes foram tratadas com a suspensão bacteriana das estirpes na quantidade de 4 ml kg⁻¹ de semente e padronizadas para a concentração de 1,6 .10⁷ UFC ml⁻¹. Após o tratamento com as bactérias, as sementes foram novamente postas para secar em ambiente estéril pelo período de 2 h antes do início da montagem do experimento. As sementes foram distribuídas entre 3 folhas de papel germitest, umidificados com volume de solução com 2,5 vezes o peso do substrato seco de água. Os rolos confeccionados foram mantidos em câmara incubadora tipo BOD à temperatura de 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12h. A contagem da germinação foi realizada ao 7º dia e expressa em porcentagem, com o registro da porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas (BRASIL, 2009).

2.7 Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com bactérias sob condições salinas

Este ensaio seguiu os mesmos métodos descritos anteriormente. As sementes foram submetidas ao teste de germinação e de crescimento de plântulas, sob condições de estresse salino.

As concentrações de NaCl utilizadas descritas na Tabela 1, foram calculadas por meio da curva de calibração estabelecida por Braccini et al. (1996), ou seja, $yos = 0,194699 + 0,750394 C$, em que: yos = potencial osmótico (bar); e C = concentração (g L⁻¹).

Tabela 1. Quantidade de NaCl utilizada para o preparo das soluções nos diferentes níveis de potencial osmótico.

Níveis de potencial osmótico (MPa)*	NaCl (g. L ⁻¹ de água)	mmol de NaCl
0	0	0
-0.1	1.6	27
-0.2	2.9	49
-0.4	5.6	95
-0.6	8.3	142

* 1 MPa = 10 bar; 1 bar = 0,987 atm.

O ensaio foi realizado com 50 sementes por tratamento e quatro repetições em delineamento experimental inteiramente casualizados. As sementes de soja da variedade DM 82I78 IPRO foram obtidas no comércio local e sanitizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% (2 minutos) e em álcool 70% (1 minuto), posteriormente lavadas em água destilada e colocadas para secar sobre papel filtro, após a secagem as sementes foram tratadas com a suspensão bacteriana das estirpes na quantidade de 4 ml kg⁻¹ de semente e padronizadas para a concentração de 1,6 .10⁷ UFC ml⁻¹. Após o tratamento com as bactérias, as sementes foram novamente postas para secar em ambiente estéril pelo período de 2 h antes do início da montagem do experimento. As sementes foram distribuídas entre 3 folhas de papel germitest, umidificados com volume de solução composta por cada concentração salina, com 2,5 vezes o peso do substrato seco de água. Os rolos confeccionados foram mantidos em câmara incubadora tipo BOD à temperatura de 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12h. A contagem da germinação foi realizada ao 7º dia e expressa em porcentagem, com o registro da porcentagem de plântulas normais, anormais e sementes mortas (BRASIL, 2009).

Utilizou-se o ensaio de germinação para a avaliação das variáveis comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, e as massas secas correspondentes. Foram utilizadas 25 plântulas por repetição selecionadas ao acaso, totalizando 100 plântulas. As avaliações do comprimento da raiz primária e do hipocótilo das plântulas, em centímetros, foram realizadas apenas nas plântulas consideradas normais. Após a avaliação do comprimento das plântulas, descartou-se os cotilédones e seccionou-se os eixos embrionários em cada parte correspondente, colocando-os em sacos de papel identificados e levados para estufa de secagem com circulação forçada de ar, regulada a 70° C, por 72 horas. Após esse período, as amostras foram pesadas em balança analítica, obtendo-se, então, a massa seca de raiz e da parte aérea.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial (3x5), 3 bactérias (2785, 2791, 204) X 4 potenciais osmóticos induzidos por Cloreto de Sódio (NaCl) (-0,1 MPa, -0,2 MPa, -0,4 Mpa e -0,6 Mpa), mais um tratamento controle (0,0 Mpa) que consistiu no uso de água destilada e não inoculado, com quatro repetições, que consistiram nas subamostras dos testes.

2.8 Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com bactérias sob condições salinas em casa de vegetação.

Em casa de vegetação, procedeu-se o experimento apenas com 2 bactérias (2785 e 204). As sementes foram sanitizadas e tratadas conforme descrito anteriormente e semeadas na profundidade de 2 cm, em bandejas com capacidade de 2 litros contendo areia previamente

esterilizada por 2h a 120 °C. Foram semeadas 50 sementes por bandeja, 10 dias após o plantio, iniciou-se a irrigação com as diferentes doses de salinidade descritas no item 2.6. Quinze dias após o início da irrigação com doses salinas 10 plantas aleatórias por bandeja foram retiradas para a avaliação das características morfométricas das plantas e o teor de clorofila total calculados conforme descrito por Lichtenthaler (1987), os resultados obtidos foram expressos em mg.mL^{-1} . O experimento foi montado em delineamento de blocos ao acaso em ensaio fatorial (2×5), 2 bactérias (2785 e 204) X 4 potenciais osmóticos induzidos por Cloreto de Sódio (NaCl) (-0,1 MPa, -0,2 MPa, -0,4 Mpa e -0,6 Mpa), mais um tratamento controle (0,0 Mpa) que consistiu no uso de água destilada e não inoculado, com três repetições.

2.9 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância e de regressão pelo programa estatístico AgroEstat (Barbosa, Maldonado Junior 2015), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott&Knott ao nível de 5% de significância. As pressuposições de normalidade e homogeneidade de variância dos dados obtidos foram avaliadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e de Hartley, não sendo necessária a transformação dos dados. A análise de regressão teve os modelos polinomiais escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes e com melhor ajuste dos coeficientes de determinação (R^2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quantitativos e qualitativos das estirpes avaliadas são apresentados na Tabela 2. Das três estirpes testadas 2 apresentaram resultado positivo para solubilização de fosfato em placa com meio NBRIP aos 7 dias (2785 e 2791). Todas as estirpes avaliadas produziram AIA quando suplementadas com triptofano, variando de 5,75 a 8,55 µg/ml. Enquanto para o crescimento sob condições de estresse (salino e temperatura), todas as estirpes apresentaram crescimento a 45 °C, exceto a estirpe 2785. O teor de NaCl de 10% inibiu o desenvolvimento de todas as estirpes avaliadas independentemente da temperatura. Ayaz et al. (2022) testaram 18 estirpes de *Bacillus* spp. sob condições de estresse salino nas concentrações de NaCl (1–18%), a partir disso os autores selecionaram três estirpes que apresentaram crescimento positivo a 10% de salinidade e duas estirpes com crescimento positivo a 18% de salinidade, selecionando-as para ensaios posteriores em plantas de trigo.

Tabela 2. Solubilização de fosfato, produção de AIA e crescimento em condição de estresse para as estirpes avaliadas.

Estirpe	Solubilização de Fosfato	Produção de AIA (µg/ml)	Crescimento em estresse salino (%p/v NaCl) e Temperatura (°C)							
			30 ° C				45 °C			
			0	5	7.5	10	0	5	7.5	10
-	-	-	0	5	7.5	10	0	5	7.5	10
204	-	6,25 ± 0,4	+	+	+	-	+	+	+	-
2785	+	8,55 ± 0,6	+	+	+	-	+	+	-	-
2791	+	5,75 ± 0,2	+	+	+	-	+	+	+	-

+ : Crescimento positivo. - : Sem crescimento.

Almoneafy (2014) analisando a produção de AIA por estirpes de *Bacillus* spp. relatou que quatro estirpes demonstraram uma alta capacidade de produzir AIA, com sua produção variando de 44,25 µg/ml de a 59,56 µg/ml e relacionou essa alta produção a um alto potencial para promover o crescimento de plantas. Os valores obtidos pelos autores citados foram bastante superiores aos encontrados nesse experimento, indicando que apesar de serem produtoras de AIA, essa não é a principal característica das estirpes selecionadas do ponto de vista da promoção de crescimento vegetal.

Gupta et al. (2021) avaliaram o crescimento de estirpes de *Bacillus* em diferentes concentrações salinas (NaCl) até o limite de 3% (p/v) em meio Nutrient Broth e verificaram

que houve redução das contagens de UFCs acima dessa concentração. Enquanto neste trabalho, foi possível identificar estirpes com resistência a salinidade em até 7,5%.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para o estudo de resistência a metais pesados pelas estirpes testadas. Foi observado que o metal pesado mais limitante foi o mercúrio (Hg), onde não houve crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas. Para os metais Cadmio e Cobalto houve crescimento até certa concentração. Nenhuma bactéria apresentou crescimento nas concentrações mais altas de 500 ou 100 mg/L destes elementos.

Tabela 3. Resistência das estirpes 204, 2785 e 2791 aos metais Cádmio, Mercúrio e Cobalto em mg/L adicionados ao meio Embrapa sólido.

Estirpe	Resistência a Metais Pesados (mg/L)											
	Cádmio (Cd)				Mercúrio (Hg)				Cobalto (Co)			
	100	250	500	1000	100	250	500	1000	100	250	500	1000
204	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2785	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2791	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

+ : Crescimento positivo. - : Sem crescimento.

Diferentemente dos dados obtidos nesse trabalho em que Hg foi o metal mais limitante ao crescimento das estirpes de *Bacillus*, Boulahouat et al. (2022) observou, nas mesmas concentrações testadas, que o Cd foi o metal mais tóxico para o crescimento de estirpes bacterianas. Knežević et al. (2021) relataram que a aplicação do inóculo da cultura BM1 (*Bacillus pseudomycolides*) em sementes de alfafa, possuía tolerância ao Cromo (Cr) a 0,11 mM L⁻¹, não apresentando inibição de crescimento, indicando a estirpe para uso na fitorremediação de solos contaminados.

O estudo das atividades bioquímicas das bactérias é de grande importância, principalmente em condições de estresse como as apresentadas neste trabalho, visando entender como ocorre o processo de promoção de crescimento vegetal visando a seleção de novas cepas com potencial para se tornarem bioprodutos.

Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de grandes culturas tratadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal

Os resultados do efeito da inoculação das bactérias em sementes de soja, trigo, algodão e grão de bico não demonstraram grandes efeitos positivos ou negativos em comparação ao

controle para a variável germinação, nivelando os tratamentos com base no potencial genético das sementes, uma vez que todos os materiais apresentaram alta germinação, próximo ou superior a 80%, com exceção para o grão de bico, onde observou-se que as sementes utilizadas possuíam baixo potencial germinativo. Dessa forma, e nessas condições, destacou-se o tratamento com a bactéria 2791, apresentando resultados de germinação 12% superiores ao controle e redução do número de sementes anormais (Tabela 4).

Apesar de todos as estirpes testadas apresentaram capacidade de produzir auxinas, alguns autores têm atribuído efeitos significativos na germinação de sementes a alta produção de auxinas, alta taxa de solubilização de fosfato e atividade da ACC desaminase (Mahdi et al. 2020; Pandey e Gupta, 2020; Brahim et al. 2022; Fiodor et al. 2022)

Tabela 4. Efeitos da inoculação das bactérias (204, 2785 e 2791) na qualidade fisiológica de sementes de soja, trigo, algodão e grão de bico.

Bactérias	SOJA			TRIGO			ALGODÃO			GRÃO DE BICO		
	Germinação (%)	Sementes Anormais (%)	Sementes Mortas (%)	Germinação (%)	Sementes Anormais (%)	Sementes Mortas (%)	Germinação (%)	Sementes Anormais (%)	Sementes Mortas (%)	Germinação (%)	Sementes Anormais (%)	Sementes Mortas (%)
2785	80,5 a	15,0 a	4,5 a	85,0 b	4,5 a	10,5 b	90,5 a	5,5 a	4,0 a	45,5 b	37,5 b	17,0 a
Controle	74,0 a	18,0 a	8,0 a	91,0 a	6,5 b	2,5 a	92 a	6,5 a	1,5 a	50,0 b	35,0 b	15,0 a
204	80,5 a	12,0 a	7,5 a	83,5 b	7,0 b	9,5 b	88 a	4,5 a	7,5 b	34,0 c	44,0 b	21,5 a
2791	75,0 a	17,75 a	7,25 a	91,0 a	5,25 a	3,75 a	86,5 b	8,5 a	5,0 b	62,0 a	25,0 a	13,0 a

Procedeu-se o estudo apenas as culturas soja, trigo e algodão visando avaliar as características morfométricas das sementes quando inoculadas com as bactérias 204, 2785 e 2791. Para cada cultura ao menos uma bactéria diferiu estatisticamente do controle para a variável Comprimento de Raiz. Para a soja destacaram-se as estirpes 2785 e 2791, para o trigo 2785 e para o algodão a bactéria 2791, proporcionou maior comprimento de raiz. A variável comprimento de parte aérea não foi influenciada significativamente pelos tratamentos.

Tabela 5. Efeitos da inoculação das bactérias (204, 2785 e 2791) nas variáveis morfométricas de sementes de soja, trigo e algodão.

Bactérias	SOJA		TRIGO		ALGODÃO	
	Comprimento Raiz (cm)	Comprimento Parte Aérea (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Comprimento Parte Aérea (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Comprimento Parte Aérea (cm)
2785	19,34 a	10,68 a	16,93 a	10,06 b	12,90 b	5,0 a
Controle	16,35 b	9,56 a	15,10 b	12,50 a	11,0 b	5,50 a
204	18,47 a	11,50 a	11,16 c	10,69 b	6,75 c	5,58 a
2791	18,40 a	9,93 a	10,86 c	10,10 b	13,18 a	5,65 a

Os dados obtidos se assemelham com outros disponíveis na literatura para variadas culturas, Murali et al. (2021) observaram que o tratamento de sementes de milho com bactérias da espécie *B. amyloliquefaciens* aumentou a germinação e o vigor em comparação ao tratamento controle. Lastochkina et al. (2021) relataram que o tratamento de sementes com estirpes de *B. subtilis* melhorou a germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão comum). Knežević et al. (2021) relataram supressão a patógenos fúngicos, aumento no comprimento de raízes e parte aérea de 12,36% e 21,43% com a aplicação do inóculo da cultura BM1, de *B. pseudomycooides*, em sementes de alfafa.

Miljaković et al. (2022) relataram que o tratamento de sementes de soja com uma estirpe de *B. megaterium*, melhorou significativamente todos os parâmetros; germinação final, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, massa seca da raiz e índice de vigor das plântulas em testes de germinação, frio e envelhecimento acelerado, em comparação ao controle.

Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal sob condições salinas

Com relação ao ensaio de qualidade fisiológica de sementes de soja submetidas a estresse salino o comportamento observado para a variável germinação de maneira geral seguiu o que é apresentado na Figura 1.

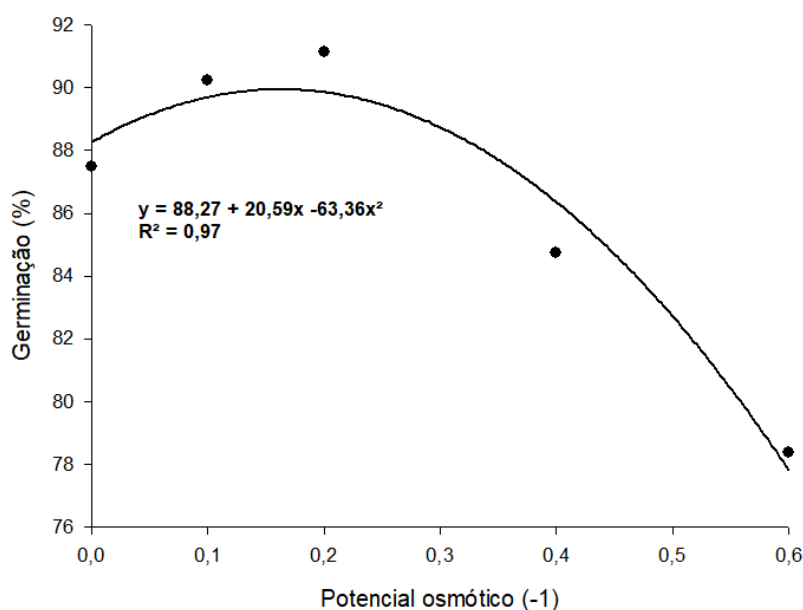


Figura 1. Curva geral e equação de regressão da germinação obtida aos 7 dias em sementes de soja, submetidas a diferentes níveis de potencial osmótico, em soluções de NaCl.

Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado para as condições em estudo uma vez que também é observado na literatura e em campo, principalmente em solos que apresentam altos teores de sais, onde a baixa disponibilidade de água é limitante para a germinação das sementes de diversas culturas (Soares et al. 2015). Kaveh et al. (2011) encontraram uma correlação negativa significativa entre a salinidade e a taxa e porcentagem de germinação. A redução na germinação das sementes sob estresse hídrico, ou seja, sob baixos potenciais hídricos, se deve à redução na disponibilidade de água necessária para a ativação e manutenção do metabolismo das sementes (Bewley et al. 2013; Soares, 2015).

De certa forma esse é um comportamento esperado para essa variável nas condições testadas, porém, como mostrado na Figura 2 foi observado variações nos resultados encontrados de acordo com as diferentes bactérias utilizadas, diferenciando estatisticamente ($P > 0,05$) do tratamento controle. As bactérias 2785 e 204 apresentaram resultados superiores ao controle enquanto a bactéria 2791 apresentou resultados de germinação inferior ao controle nas condições descritas.

Diversos trabalhos mostram os resultados benéficos do tratamento de sementes com microrganismos em variadas culturas, melhorando o crescimento das plantas sob condições de estresse salino, como em tomate (Patani et al. 2023) e em *Amaranthus viridis* (Patel et al. 2023),

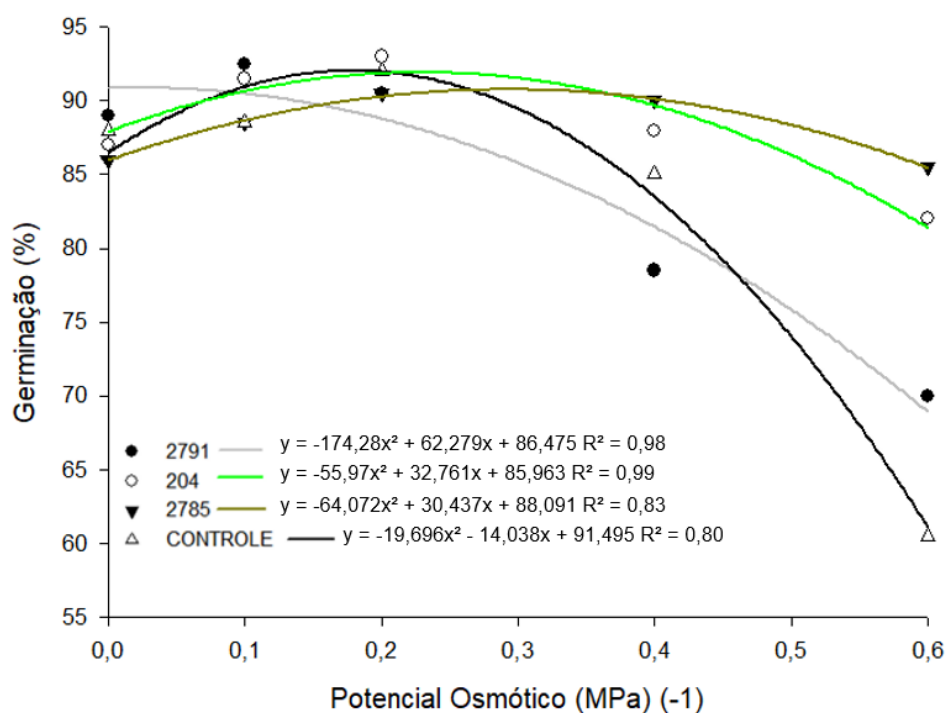


Figura 2. Efeito de potenciais osmóticos em função da germinação de sementes de soja tratadas com bactérias.

Os resultados obtidos demonstraram haver diferença estatística ($P \leq 0,05$) à medida que o potencial osmótico diminuía. A bactéria 2785 se destacou das demais no potencial osmótico -0,4 MPa, as demais bactérias formaram um grupo intermediário e o controle não inoculado foi o pior tratamento nessa concentração. Para o menor potencial osmótico (-0,6 MPa) as bactérias 204 e 2785 se destacaram das demais, enquanto o controle e a bactéria 2791 apresentaram os menores valores de germinação.

A Figura 3 apresenta os resultados dos comprimentos de parte aérea e de raiz além das suas respectivas massas secas. A tabela 4 apresenta as linhas de tendência, equações dos gráficos e os R^2 da Figura 3. É possível observar o mesmo comportamento já relatado para a variável germinação em que os resultados foram inversamente proporcionais à medida em que houve aumento dos teores de salinidade na solução, afetando negativamente as variáveis estudadas.

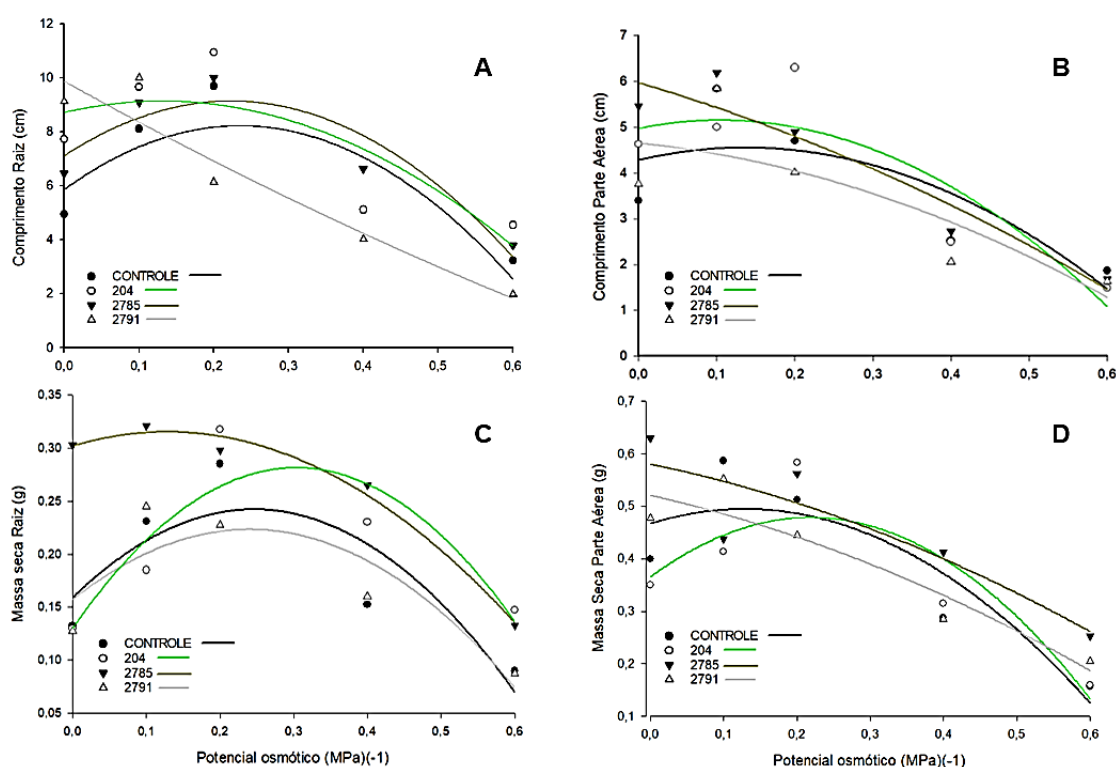


Figura 3. Efeito de potenciais osmóticos em função do comprimento de raiz e de parte aérea de sementes de soja tratadas com bactérias.

Tabela 5. Descrição das linhas de tendência, equações dos gráficos e os R² da Figura 3.

Comprimento de raiz			Comprimento de parte aérea		
	y	R ²	y	R ²	
— Controle	$y = -22,66x^2 + 3,2936x + 8,8899$	0,86*	$y = 5,2745x^2 - 11,239x + 6,566$	0,97 ^{NS}	
— 2791	$y = 3,3521x^2 - 15,418x + 9,8737$	0,91 ^{NS}	$y = 9,931x^2 - 14,385x + 6,555$	0,96 ^{NS}	
— 204	$y = -51,311x^2 + 24,773x + 5,731$	0,68*	$y = -16,96x^2 + 5,6766x + 3,857$	0,79 ^{NS}	
— 2785	$y = -32,787x^2 + 15,259x + 6,303$	0,85*	$y = -1,6087x^2 - 4,8943x + 5,160$	0,84 ^{NS}	
Massa seca raiz			Massa seca parte aérea		
— Controle	$y = -1,3718x^2 + 0,6751x + 0,159$	0,73 ^{NS}	$y = -1,6616x^2 + 0,4273x + 0,467$	0,81 ^{NS}	
— 2791	$y = -1,1473x^2 + 0,5504x + 0,157$	0,76 ^{NS}	$y = -0,4021x^2 - 0,3148x + 0,5207$	0,89 ^{NS}	
— 204	$y = -1,643x^2 + 0,9968x + 0,130$	0,77*	$y = -2,3723x^2 + 1,0364x + 0,365$	0,79 ^{NS}	
— 2785	$y = -0,8064x^2 + 0,2065x + 0,301$	0,98*	$y = -0,4066x^2 - 0,2875x + 0,5801$	0,79 ^{NS}	

*: Significativo a 5%, NS: Não significativo.

Para a todas as variáveis analisadas o comportamento geral foi de queda em função da redução do potencial osmótico e consequente menor disponibilidade de água. Como já foi citado, a presença de altas concentrações de Na⁺ na solução alteram o equilíbrio de íons e a disponibilidade de nutrientes minerais, reduzindo a divisão celular e o desenvolvimento do embrião (Moss e Hoffman 1977, Mer et al. 2000; Soares 2015). Soares et al. (2015) trabalhando com soja também verificou que a massa seca de raiz e o comprimento de plântulas foram reduzidas com a redução no potencial osmótico.

Apesar disso ainda é possível observar algum efeito positivo obtido pelo tratamento de sementes com as bactérias (204 e 2785) principalmente para as variáveis comprimento de raiz e massa seca de raiz. Para as demais assemelharam-se ao controle.

Ayaz et al. (2022) verificaram efeitos semelhantes em plantas de trigo tratadas com *Bacillus* que diferiram do controle em condições normais e de salinidade (200 mmol) nos parâmetros morfológicos avaliados, relatando abrandamento dos efeitos do estresse salino

Para os resultados em casa de vegetação observou-se comportamento semelhante ao obtido *in vitro*. Utilizando-se as bactérias que foram mais eficientes alcançou-se resultados de tolerância a salinidade até níveis de - 0,4 MPa (Tabelas 6, 7 e 8). Resultados bastante satisfatórios do ponto de vista de manejo da salinidade em solos agrícolas.

Tabela 6. Descrição da interação para a variável altura de plantas em função das doses de salinidade em irrigação.

Bactérias	Altura de Plantas (cm)				
	Potencial Osmótico (Mpa) (-1)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,6
204	35,56 aA	34,70 aA	35,10 aA	34,33 aB	31,0 aB
2785	35,03 aA	35,56 aA	34,67 aA	32,13 aB	30,00 aB
Controle	31,53 bA	32,10 bA	32,63 bA	28,26 bB	26,76 aC

Letras minúsculas representam diferença estatística na coluna enquanto letras maiúsculas representam diferença estatística na linha.

Tabela 7. Descrição da interação para a variável comprimento de raiz em função das doses de salinidade em irrigação.

Bactérias	Comprimento de Raiz (cm)				
	Potencial Osmótico (Mpa) (-1)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,6
204	31,30, aA	31,50 aA	27,63 aB	24,43 aC	24,55 bC
2785	31,90 aA	32,00 aA	25,10 aB	26,30 aB	22,73 bC
Controle	21,87 bA	22,50 bA	23,06 bA	20,80 bA	21,50 bA

Letras minúsculas representam diferença estatística na coluna enquanto letras maiúsculas representam diferença estatística na linha.

Tabela 8. Descrição da interação para a variável Clorofila total em função das doses de salinidade em irrigação.

Doses (MPa)/ Bactérias	Clorofila Total (mg mL⁻¹)				
	Potencial Osmótico (Mpa) (-1)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,6
204	3,42 aB	4,53 aB	6,45 aA	4,27 aB	4,08 aB
2785	3,27 aB	3,22 bB	5,01 aA	3,73 bB	3,91 aB
Controle	3,25 aA	3,41 bA	3,37 bA	3,35 bA	3,09 aA

Letras minúsculas representam diferença estatística na coluna enquanto letras maiúsculas representam diferença estatística na linha.

Em soja, Dolatabadian et al. (2011) observaram que o estresse salino diminuiu significativamente o peso da parte aérea e da raiz, a biomassa total, a altura da planta e o número

de folhas. Enquanto em plantas de arroz, foi observado uma redução notável na altura das plantas, no número de perfilhos e no índice de área foliar em plantas cultivadas em solo salino (Hasanuzzaman et al. 2009). Por outro lado, Murali et al. (2021), verificaram que o tratamento de sementes de milho com *Bacillus amyloliquefaciens* (MMR04) melhorou os parâmetros de crescimento das plantas e clorofila total e teor relativo de água em plantas cultivadas sob condições de estresse hídrico severo em comparação com plantas controle (sem inoculação) e verificou ainda que a expressão gênica antioxidante de APX1 e SOD1 aumentou em plantas tratadas com a bactéria.

A diminuição do teor de clorofila sob estresse salino é um fenômeno comumente relatado e, em vários estudos, a concentração de clorofila tem sido usada como um indicador sensível do estado metabólico celular (Chutipaijit et al. 2011; Pahrirar et al. 2015), inibindo o crescimento da planta uma vez que afeta os processos de expansão e divisão celular (Farooq et al., 2012; Nankishore e Farrel, 2016; Murali et al. 2021). Resultados obtidos nesse experimento indicam a manutenção e aumento dos teores de clorofila total em plantas de soja foram maiores nos tratamentos com inoculação bacteriana.

Dame et al. (2021) também relatam que espécies de *Bacillus* podem reduzir os efeitos nocivos da salinidade e da seca nas plantas, alterando a quantidade de enzimas antioxidantes e evitando a peroxidação lipídica. Algo que possivelmente ocorreu nesse trabalho, onde a atividade bacteriana induziu respostas metabólicas como mecanismos antioxidantes, hormônios ou pelo acúmulo de peróxidos lipídicos na presença de dano oxidativo, reduzindo os efeitos da salinidade nas plântulas.

Lastochkina et al. (2021) relataram que o tratamento de sementes com as estirpes 10–4 e 26D de *B. subtilis* proporcionaram crescimento das plantas de feijão sob condições salinas e não salinas, diminuíram os danos oxidativos e osmóticos às células vegetais, uma vez que as inoculações bacterianas reduziram a peroxidação lipídica e o acúmulo de prolina nas plantas sob condições salinidade.

Uma das variadas alternativas ao manejo da salinidade é modificar a comunidade microbiana do solo com a introdução microrganismos adaptados aquela condição. Dessa forma, com base nos resultados apresentados é possível afirmar que as estirpes 204 e 2785 foram capazes de reduzir os efeitos do estresse salino as plântulas de soja na maioria das variáveis analisadas, exercendo efeito protetor as condições de salinidade e possivelmente regulando os mecanismos de defesa em plantas de soja.

4. CONCLUSÕES

As bactérias testadas apresentaram atividade promotora de crescimento vegetal, crescimento em condições de estresse salino, térmico e resistência a metais pesados *in vitro*.

A inoculação das bactérias testadas em sementes de soja, trigo, algodão e grão de bico, em condições de germinação *in vitro*, não apresentou diferenças significativas com exceção para as sementes de grão de bico, que apresentaram baixo potencial germinativo, onde a estirpe 2791 aumentou a germinação em 12% em relação ao controle e reduziu o número de sementes anormais. O comprimento de raiz foi afetado significativamente pelos tratamentos bacterianos nas diferentes culturas testadas.

As estirpes 2785 e 204 quando inoculadas em sementes de soja demonstraram potencial para mitigar os efeitos decorridos do estresse salino através da melhoria dos parâmetros de crescimento das plantas principalmente crescimento radicular, bem como da manutenção dos teores de clorofila total, podendo ser indicadas para experimentos em áreas com problemas relacionados a salinidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARIMOGHADDAM, H. et al. Salinity effects on seed germination and seedling growth of bread wheat cultivars. *Trakia Journal of Sciences*, v. 9, n. 1, p. 43–50. 2011.
- AKHTAR, S. S.; ANDERSEN, M. N.; LIU, F. Biochar mitigates salinity stress in potato. *Journal of agronomy and crop science*, v. 201, n. 5, p. 368-378. 2015.
- ALI, B. et al. PGPR-mediated salt tolerance in maize by modulating plant physiology, antioxidant defense, compatible solutes accumulation and bio-surfactant producing genes. *Plants*, v. 11, n. 3, p. 345. 2022.
- ALMEIDA, A. M. M. D. et al. Influence of salinity on the development of the banana colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, p. 421-428. 2016.
- ANSARI, F. A.; AHMAD, I.; PICHTEL, J. Growth stimulation and alleviation of salinity stress to wheat by the biofilm forming *Bacillus pumilus* strain FAB10. *Applied soil ecology*, v. 143, p. 45-54. 2019.
- AYAZ, M. et al. Salt tolerant *Bacillus* strains improve plant growth traits and regulation of phytohormones in wheat under salinity stress. *Plants*, v. 11, n. 20, p. 2769. 2022
- BARBOSA, J. C; MALDONADO, JUNIOR, W. AgroEstat - sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Jaboticabal: FCAV/UNESP. 396p. 2015
- BEWLEY, J.D. et al. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd Edition, Springer, New York. 2013.
- BOULAHOUAT, S. et al. Critical Evaluation of Biocontrol Ability of Bayoud Infected Date Palm Phyllospheric *Bacillus* spp. Suggests That *In Vitro* Selection Does Not Guarantee Success in Planta. *Agronomy*, v. 12, n. 10, p. 2403. 2022.
- BHISE, K. K. DANDGE, P. B. Mitigation of salinity stress in plants using plant growth promoting bacteria. *Symbiosis*, v. 79, n. 3, p. 191-204, 2019.

BRACCINI, A. L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietilenoglicol. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 18, n. 1, p. 10-16, 1996.

BRACCINI, A. L. et al. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol na qualidade fisiológica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 33, n. 9, p. 1451-1459. 1998.

BRAHIM, A. H. et al. Biopriming of durum wheat seeds with endophytic diazotrophic bacteria enhances tolerance to Fusarium head blight and salinity. *Microorganisms*, v. 10, n. 5, p. 970. 2022.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

CARPÝCÝ, E. B.; CELÝK, N.; BAYRAM, G. Effects of salt stress on germination of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 19, 2009.

CHERIF-SILINI, H. et al. Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 16, p. 3989, 2019.

CHUTIPAIJIT, S.; CHA-UM, S.; SOMPORNPAILIN, K. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. *indica*. *Australian Journal of Crop Science*, 5(10), 1191-1198. 2011.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. (2023). Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2022/2023. 12º Levantamento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> Acesso em: 10 fevereiro. 2024.

DAME, Z. T.; RAHMAN, M.; ISLAM, T. Bacilli as sources of agrobiotechnology: recent advances and future directions. *Green Chemistry Letters and Reviews*, v. 14, p. 246–271. 2021.

DIAS, N. S. et al. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade. In: *Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados*. INCTSal, p.151-162. 2016.

DOLATABADIAN, A.; SANAVY, S. A. M. M.; GHANATI, F. Effect of salinity on growth, xylem structure and anatomical characteristics of soybean. *Notulae Scientia Biologicae*, v. 3, n. 1, p. 41-45. 2011.

EGAMBERDIEVA, D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 31, n. 4, p. 861-864. 2009.

ETESAMI, H. Can interaction between silicon and plant growth promoting rhizobacteria benefit in alleviating abiotic and biotic stresses in crop plants? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 253, p. 98-112. 2018.

ETESAMI, H.; BEATTIE, G. A. Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions. *Probiotics and plant health*, p. 163-200. 2017.

FAROOQ, M. et al. Drought stress in plants: an overview. In: *Plant responses to drought stress: From Morphological to Molecular Features*, Springer: Berlin, Germany, 2012; p. 1-33. 2012

FERREIRA, N. C. et al. *Bacillus subtilis* improves maize tolerance to salinity. *Ciência Rural*, v. 48, n.8. 2018.

FIODOR, A. et al. Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1142966. 2023.

GOMES, E. A. et al. *Microrganismos promotores do crescimento de plantas*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 51 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 208).

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, v. 26, p. 192-195, 1950.

GUIMARÃES, G. S. et al. (2023). Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria Improves the Sustainability of Tropical Pastures with *Megathyrus maximus*. *Agronomy*, v. 13, n. 3, p. 734. 2023.

GUPTA, A. et al. ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in *Pisum sativum*. *3 Biotech*, v. 11, n. 12, p. 1-17. 2021.

HASANUZZAMAN, M., et al. Performance of four irrigated rice varieties under different levels of salinity stress. *International Journal of Integrative Biology*, v. 6, n. 2, p. 85-90. 2009.

HOLANDA, J.S. et al. Qualidade da água para irrigação. In: Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos aplicados, Cap. 2, INCTSAL, Fortaleza (2016), p. 9-15. 2016.

IBRAR, M. et al. Salt tolerance potential of *Brassica juncea* Linn. Journal of Science and Technology, v. 27, p. 79–84. 2003.

ISLAM F. et al. Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. Plant Growth Regulation, v. 80, p. 23–36. 2016.

KANG, S. M. et al. Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth-promoting microorganisms. Acta Agriculturae Scandinavica, v. 65, n. 1, p. 36-44. 2015.

KAVEH, H. et al. How salinity affect germination and emergence of tomato lines. Journal of Biological and Environmental Sciences, v. 5, n. 15. 2011.

KNEŽEVIĆ, M. M. et al. The ability of a new strain of *Bacillus pseudomycolides* to improve the germination of alfalfa seeds in the presence of fungal infection or chromium. Rhizosphere, v. 18, p. 100353. 2021.

KHODARAHMPOUR, Z.; IFAR, M.; MOTAMED, M. Effects of NaCl salinity on maize (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage. African Journal of Biotechnology, v. 11, p.298–304. 2012.

KUMAR, A. et al. Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPVS11 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress. Microbiological Research, v. 242, p. 126616. 2021.

LASTOCHKINA, O. et al. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages. Journal of Plant Physiology, v. 263, p. 153462. 2021.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L.; DOUCE, R. (Eds.). Methods in enzymology. Bad Honnef: Academic, v.148, p.350-382, 1987.

- MAHDI, I. et al. Plant growth enhancement using rhizospheric halotolerant phosphate solubilizing bacterium *Bacillus licheniformis* QA1 and *Enterobacter asburiae* QF11 isolated from *Chenopodium quinoa* willd. *Microorganisms*, v. 8, n. 6, p. 948. 2020
- MANZATTO, C. V.; FREITAS JUNIOR, E. D.; PERES, J. R. R. Uso agrícola dos solos brasileiros (pp. 13-21). Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2002.
- MER, R. K. et al. Effect of salts on germination of seeds and growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer arietinum* and *Brassica juncea*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, Malden, v. 185, n. 4, p. 209-217, 2000.
- MONNERAT, R. G. et al. Characterization of brasilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatallis*. *Biological Control*. v. 41. p. 291-295, 2007.
- MOSS, D. N.; HOFFMAN, G. J. Analysis of crop salt tolerance data. In: Shain, I.; Shalhevet, J. *Soil salinity under irrigation: process and management*. Berlin: Ecological, 1977. p. 258-271.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, v. 167, n. 3, p. 645-663. 2005
- MURALI, M. et al. Induction of drought tolerance in *Pennisetum glaucum* by ACC deaminase producing PGPR-*Bacillus amyloliquefaciens* through Antioxidant defense system. *Microbiological Research*, v. 253, p. 126891. 2021.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, v. 170, n. 1, p. 265-270. 1999.
- NAUTIYAL, C. S. et al. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 66, p. 1-9. 2013.
- NANKISHORE, A.; FARRELL, A. D. The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal of plant physiology*, v. 202, p. 75-82. 2016.
- NÓBREGA, J. S. et al. Seed Quality and Vigor of Germination of *Moringa oleífera* Lam. in Saline Stress. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 64. 2021.

- O'CALLAGHAN, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 100, n. 13, p. 5729-5746. 2016.
- OROZCO-MOSQUEDA, C. M.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): an efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, v. 235, p. 126439, 2020.
- PANDEY, S.; GUPTA, S. Evaluation of *Pseudomonas* sp. for its multifarious plant growth promoting potential and its ability to alleviate biotic and abiotic stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Scientific Reports*, 10(1), 20951. 2020.
- PATANI, A.; PRAJAPATI, D.; ALI, D. Evaluation of the growth-inducing efficacy of various *Bacillus* species on the salt-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Frontiers in Plant Science*, v. 14, p. 1168155. 2023.
- PATEL, M.; VURUKONDA, S.S.K.P.; PATEL, A. Multi-trait Halotolerant Plant Growth-promoting Bacteria mitigate Induced Salt stress and enhance growth of *Amaranthus Viridis*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 23, p. 1860–1883. 2023.
- QIN, Y.; DRUZHININA, I.S.; PAN, X.; YUAN, Z. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances*, v. 34, p. 1245–1259. 2016.
- RIBEIRO, M. R.; RIBEIRO FILHO, M. R.; JACOMINE, P. K. T. Origem e classificação dos solos afetados por sais. In: GHEYI, H.R. et al. (Eds.), *Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos aplicados*, 2ª ed. Cap. 2, INCTSA, Fortaleza (2016), p. 9-15.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.
- ROSA, P. A. L. et al. Inoculation with plant growth-promoting bacteria to reduce phosphate fertilization requirement and enhance technological quality and yield of sugarcane. *Microorganisms*, v. 10, n. 1, p. 192. 2022.
- SANTANA, S. R. A. et al. Inoculation of plant growth-promoting bacteria attenuates the negative effects of drought on sorghum. *Archives of microbiology*, 202, 1015-1024. 2020

- SANTOS, J. B. et al. Detection and evaluation of volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Bacillus* spp. strains. *Microbiological Research*, v. 275, p. 127465. 2023.
- SOARES, M. M. et al. Estresse hídrico e salino em sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 45, p. 370-378. 2015.
- SARTORI, A. V. D. S. et al. Effect of combined thermal and water stress on germination of wheat seeds. *Revista Ciência Agronômica*, v. 54. 2022.
- SILVA, D. C. et al. Principal component analysis and biophysical parameters in the assessment of soil salinity in the irrigated perimeter of Bahia, Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*, 112, 103580. 2021.
- SOLTANI, A.; GHOLIPOOR, M.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, v. 55n. 1-2, p. 195-200. 2006
- SOUSA, V. F. O. et al. Castor Bean Cake Mitigates Saline Stress in Basil Plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 22, n. 4, p. 3969-3983. 2022.
- ULFAT, M. et al. Appraisal of physiological and biochemical selection criteria for evaluation of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, v. 39, p.1593–1608. 2007.
- WANI, S.H. et al. Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. *Planta*, v. 251, n. 76. 2020.
- WICKE, B. et al. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy & Environmental Science*, v. 4, n. 8, p. 2669-2681. 2011.
- YAO, L. et al. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*, v. 46, n. 1, p. 49-54. 2010
- YASMIN, H. et al. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress. *PLoS One*, v. 15, n. 4. 2020.

ZIA, R. et al. Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. *Microbiological research*, v. 242, 126626. 2021.

ZULUAGA, M. Y. A. et al. Inoculation with plant growth-promoting bacteria alters the rhizosphere functioning of tomato plants. *Applied Soil Ecology*, v. 158, p. 103784. 2021