



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANA CLAUDIA ALCANTARA LEMOS

**SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO  
VEGETAL E ATIVIDADES DE BIOCONTROLE**

Recife  
2020

ANA CLAUDIA ALCANTARA LEMOS

**SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO  
VEGETAL E ATIVIDADES DE BIOCONTROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre(a) em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientador (a): Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

Coorientador (a): Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Recife

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

Lemos, Ana Claudia de Alcantara

Seleção de *Bacillus* spp. Como promotores de crescimento vegetal e atividades de biocontrole / Ana Claudia de Alcantara Lemos. – 2020.

80 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima.

Coorientadora: Janete Magali de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Ácidos orgânicos 2. Agentes antiinfeciosos 3. Plantas- efeito da auxina I. Lima, Gláucia Manoella de Souza (orient.) II. Araújo, Janete Magali de (coorient.) III. Título

546.24

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -022

**ANA CLAUDIA ALCANTARA LEMOS**  
**SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE**  
**CRESCIMENTO VEGETAL E ATIVIDADES DE BIOCONTROLE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em:  
27/02/2020

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 GLAUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA  
Data: 03/02/2023 09:36:45-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Manoella de Souza Lima  
UFPE

Documento assinado digitalmente  
 SUELLEN EMILLIANY FEITOSA MACHADO  
Data: 03/02/2023 23:07:30-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suellen Emilliany Feitosa Machado  
UNINASSAU

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana de Oliveira Franco  
UFRPE

Recife, 27 de fevereiro de 2020.

Dedico à Deus e meus pais, por toda força e incentivos de sempre.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me proporcionar à vida e todas as realizações e aprendizados.

Ao meu pai (*in memoriam*) e minha querida mãe, pelos conselhos, amor e por me fazer acreditar em mim mesma, me proporcionando todo o suporte necessário e me conduzindo ao melhor caminho.

A Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de realização da graduação e mestrado, especialmente à Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima pelos anos de aprendizado, paciência e dedicação que me fizeram crescer como profissional e como ser humano.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, bem como a Profa. Dra. Jaciana Aguiar e Klayton Cabral pela atenção, paciência e cuidado com todos os estudantes.

Aos queridos amigos e profissionais do Laboratório de Genética de Micro-organismos (LABGeM) e da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) por todo suporte e momentos de descontração que levarei sempre comigo, em especial à Amanda Souza, Bruna Kelly, Diego Marques, Luana Farias, Michelle Gomes, Pedro Bomfim e Richardson Silveira, vocês são essenciais.

Ao Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) pelo auxílio no sequenciamento das amostras. Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela disponibilização do MALDI-TOFF bem como ao Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto e seus alunos, a Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia pela ajuda na construção deste trabalho.

À Lucas Lobo, por todo apoio, companheirismo e paciência me incentivando sempre a concluir os meus objetivos, bem como a Simone Lobo, Fabiano Menezes, Mabel e Tibério, pela alegria, compartilhamento e momentos de encorajamento, vocês são especiais.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Suellen Machado, Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco.

Expresso aqui minha gratidão a todos.

## RESUMO

No mercado agrícola existem vários produtos químicos comercializados que estimulam o crescimento das plantas, porém o uso dos mesmos é questionado pelos impactos negativos causados ao meio ambiente, podendo trazer consequências graves não somente à saúde humana. Uma alternativa sustentável é o uso de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), dentre as quais podemos destacar as do gênero *Bacillus*, pela gama de compostos bioativos produzidos. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar cepas de *Bacillus* spp. produtoras de substâncias que promovam o crescimento vegetal e, adicionalmente, possuam atividades de biocontrole. Para isto, doze isolados de *Bacillus* spp. foram analisados quanto a capacidade de produção de mecanismos diretos como a produção de amônia, ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato, dentre outros, e indiretos (atividade de antagonismo, celulases). A produção de AIA foi observada em todas as cepas analisadas (12), 66,6% produzem celulases (8) e 75% exopolissacarídeos (9), 33% apresentaram maiores níveis de solubilização de fosfato (4), bem como destaca-se também a produção de fosfatases (4). Além disto, todas foram capazes de inibir o crescimento de ao menos um fungo fitopatogênico. Também houve inibição contra *Xanthomonas campestris*, destacando-se a linhagem *Bacillus pumilus* UFPEDA- 448. Após análise estatística dos dados foi possível destacar as linhagens *B. subtilis* UFPEDA- 439, *Bacillus* sp. Ar 16 (*B. cereus* 1060B), *Bacillus* sp. UFPEDA- 108 (*B. cereus*), *Bacillus* sp. Ar 29 (*B. cereus* 1062B) como melhores produtoras de mecanismos para promoção de crescimento vegetal. As cepas *Bacillus* sp. Ar 16 (*B. cereus* 1060B), *B. cereus* UFPEDA- 108, *Bacillus* sp. Ar 29 (*B. cereus* 1062B) foram selecionadas para quantificação de ácidos orgânicos, evidenciando-se a produção de AIA, ácido cítrico e ácido acético. Realizou-se também a identificação de quatro cepas de *Bacillus* sp. (*Brevibacillus parabrevis* UFPEDA- 462 e *B. cereus* UFPEDA- 1060B, UFPEDA- 1061B, UFPEDA- 1062B), bem como por taxonomia polifásica (*B. cereus* UFPEDA- 1060B). Os resultados demonstraram o potencial biotecnológico pelas cepas estudadas para a agroindústria, sendo necessários testes *in vivo* para viabilização das mesmas.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos; Atividade antimicrobiana; Auxina

## ABSTRACT

In the agricultural market, there are several commercialized chemical products that stimulate the growth of plants, however their use is questioned by the negative impacts caused to the environment, which can bring serious consequences not only to human health. A sustainable alternative is the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), among which we can highlight those of the genus *Bacillus*, due to the range of bioactive compounds produced. Given the above, the present study aimed to select strains of *Bacillus* spp. producers of substances that promote plant growth and, in addition, have biocontrol activities. For this, twelve isolates of *Bacillus* spp. were analyzed for the production capacity of direct mechanisms such as the production of ammonia, indolacetic acid (IAA), phosphate solubilization, among others, and indirect (antagonistic activity, cellulases). IAA production was observed in all strains analyzed (12), 66.6% produced cellulases (8) and 75% exopolysaccharides (9), 33% had higher levels of phosphate solubilization (4), as well as standing out also the production of phosphatases (4). In addition, all were able to inhibit the growth of at least one phytopathogenic fungus. There was also inhibition against *Xanthomonas campestris*, especially the strain *Bacillus pumilus* UFPEDA- 448. After statistical analysis of the data, it was possible to highlight the lines *B. subtilis* UFPEDA- 439, *Bacillus* sp. Ar 16 (*B. cereus* 1060B), *Bacillus* sp. UFPEDA-108 (*B. cereus*), *Bacillus* sp. Ar 29 (*B. cereus* 1062B) as the best producers of mechanisms for promoting plant growth. The *Bacillus* sp. Ar 16 (*B. cereus* 1060B), *B. cereus* UFPEDA-108, *Bacillus* sp. Ar 29 (*B. cereus* 1062B) were selected for the quantification of organic acids, showing the production of IAA, citric acid and acetic acid. Four strains of *Bacillus* sp. (*Brevibacillus parabrevis* UFPEDA- 462 and *B. cereus* UFPEDA-1060B, UFPEDA-1061B, UFPEDA-1062B), as well as by polyphasic taxonomy (*B. cereus* UFPEDA-1060B). The results demonstrated the biotechnological potential of the strains studied for the agribusiness, requiring in vivo tests to make them viable.

Keywords: Organic acids; Antimicrobial activity; Auxin

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Mecanismos diretos e indiretos propostos por Rizobactérias Promotoras de Crescimento Plantas.....	19
Figura 2 — Estrutura química dos hormônios vegetais.....	22
Figura 3 — Árvore filogenética relativa ao gene 16S rRNA de <i>Bacillus</i> sp. Ar16 ( <i>Bacillus cereus</i> 1060B) e sequências de referência de NCBI. Árvore construída usando o método neighbor- joining com 1000 bootstraps.....	42
Figura 4 — Resultados após 24, 48 e 72 horas de cultivo detectando a presença de AIA por isolados bacterianos <i>Bacillus cereus</i> UFPEDA- 108 a <i>Brevibacillus parabrevis</i> UFPEDA- 462 em triplicata. Amostras representadas pela letra “x” indicam resultado negativo em uma das triplicatas.....	45
Figura 5 — Presença de AIA por isolados bacterianos <i>B. amyloliquefaciens</i> UFPEDA - 485 a <i>B. cereus</i> Ar 29 (UFPEDA 1062B) em meio LB suplementado com 5mM de L-triptofano após cultivo por 24, 48 e 72 horas e adição do reagente de Salkowski na proporção de 1:4 v/v. C+: Controle positivo.....	45
Figura 6 — Níveis de produção de AIA em após crescimento das linhagens de <i>Bacillus</i> sp. em 24, 48 e 72 horas em meio LB. Controle positivo <i>P. agglomerans</i> representado pelo código “C + 774”.....	46
Figura 7 — Detecção da produção de amônia após crescimento dos microorganismos em água peptonada por 48 horas. É possível exemplificar a mudança de coloração nas amostras <i>B. cereus</i> UFPEDA - 108 a <i>B. amyloliquefaciens</i> UFPEDA 485 em quadruplicada.....	48
Figura 8 — Níveis de amônia estabelecidos em D.O de 450 nm após incubação das amostras por 48 h e adição do reagente de Nessler.....	48
Figura 9 — Placas contendo meio CMC após inoculação e crescimento das linhagens testadas de <i>Bacillus</i> sp.. Após serem submetidas ao vapor de iodo, é possível observar os halos indicando atividade celulolítica.....	51
Figura 10 — Formação de halo indicando a produção de EPS nas linhagens testadas após 48 h de crescimento.....	52
Figura 11 — Destaque para a substância mucoide ao redor do disco de papel após 48 horas de crescimento.....	53

Figura 12 — Confirmação através da inoculação da substância mucoide em etanol P.A. Na base de cada tubo de ensaio é possível observar a presença de um precipitado confirmando a produção de EPS. ....	53
Figura 13 — Análise qualitativa da solubilização de fosfato evidenciada pela presença da coloração amarela nas amostras de <i>Bacillus</i> sp.....	55
Figura 14 — Níveis de pH do meio NBRIP líquido observados após 168 horas de cultivo. O declínio do pH propõe a liberação de ácidos orgânicos pelos micro-organismos.....	57
Figura 15 — Produção de fosfatases após 48 horas de incubação evidenciados pela cor rósea apresentada. Amostras correspondentes as linhagens <i>B. cereus</i> UFPEDA- 108, <i>B. cereus</i> Ar16 (UFPEDA 1060B), <i>B. cereus</i> (UFPEDA 1060B), <i>B. cereus</i> Ar18 (UFPEDA 1061B) e <i>B. cereus</i> Ar29 (UFPEDA 1062B).....	58
Figura 16 — Representação gráfica a partir dos dados de cada cepa analisada neste estudo. Neste é possível observar que quanto mais o vértice está distante do ponto central, mas promissora é a cepa em relação aos testes realizados. ....	64
Figura 17 — Produção de ácidos orgânicos pelas linhagens de <i>Bacillus cereus</i> Ar16 (UFPEDA- 1060B), <i>B. cereus</i> Ar29 (UFPEDA- 1062B) e <i>B. cereus</i> UFPEDA- 108, neste é possível destacar a alta produção de ácido indolacético pelas três linhagens estudadas. ....	65
Figura 18 — Picos apresentados no cromatograma a partir da análise em CLAE detectando a produção de ácido indolacético em “A” o qual corresponde ao micro- organismo <i>Bacillus cereus</i> Ar16 (UFPEDA- 1060B) em comparação ao padrão de AIA comercial injetado em “B”. ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Relação das linhagens de <i>Bacillus</i> sp. pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos (UFPEDA). .....	30
Tabela 2 — Micro-organismos fitopatogênicos teste.....	36
Tabela 3 — Resultados das provas bioquímicas realizadas com todas as linhagens de <i>Bacillus</i> . M: Manitol; Ci: Citrato; Ca: Catalase; O/F Oxidação/Fermentação, V: Voges- Proskauer; Fe: Fenilalanina; H: Hidrólise do amido; 7% e 5%: NaCl; Mo: Motilidade; +: Positivo. ....	40
Tabela 4 — Linhagem mais próxima a cepa de <i>Bacillus</i> sp. Ar16 (UFPEDA-1060B) após sequenciamento do gene 16S rRNA e análise no GenBank.....	42
Tabela 5 — Identificação por MALDI-TOFF dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. pertencentes à Coleção de Micro-organismos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) indicando seus respectivos scores.....	43
Tabela 6 — Índice Celulolítico (IC) das linhagens de <i>Bacillus</i> sp. testadas, calculado com base na razão entre o diâmetro da colônia e diâmetro do halo.	50
Tabela 7 — Média dos halos (mm) obtidos em relação a formação de EPS com base na razão entre o diâmetro do papel de filtro inoculado com a suspensão bacteriana e o halo formado após crescimento em 48 h. ....	52
Tabela 8 — Análise quantitativa da solubilização de fosfato em D.O de 420 nm. ....	56
Tabela 9 — Atividade antimicrobiana frente a fungos fitopatogênicos do tomateiro após 6 dias de incubação. Média de inibição obtida a partir da média de três repetições e cálculo através da fórmula: (controle- tratamento) / controle x 100. Resultados expressos em (%) (YUAN et al., 2012). ....	60
Tabela 10 — Atividade antimicrobiana de <i>Bacillus</i> e <i>X. campestris</i> após 48 horas de cultivo. Média dos halos obtida após subtração do diâmetro dos halos e da colônia. Média de três repetições. ....	62

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
3.1	AMEAÇAS À AGRICULTURA .....	17
3.2	ALTERNATIVAS PARA DIMINUIÇÃO DO USO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL .....	17
3.3	<i>Bacillus</i> spp. COMO PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL....	20
3.4	MECANISMOS EMPREGADOS.....	22
<b>3.4.1</b>	<b>Reguladores de crescimento (ácido indolacético/ AIA)</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Produção de amônia</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Produção de celulasas</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Exopolissacarídeos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Controle biológico</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4.6</b>	<b>Solubilização de fosfato</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1	MICRO-ORGANISMOS .....	30
4.2	Identificação bioquímica.....	30
4.3	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO (DNA) E AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16SrRNA.....	31
<b>4.3.1</b>	<b>Purificação e sequenciamento do DNA</b> .....	<b>32</b>
4.4	IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA POR <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> (MALDI-TOFF) ...	32
4.5	SELEÇÃO DO MICRO-ORGANISMO COM CARACTERÍSTICAS DE PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL E BIOCONTROLE DE FUNGOS E BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS .....	33
<b>4.5.1</b>	<b>Produção de ácido indolacético (AIA):</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Avaliação da produção de amônia</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Produção de celulasas</b> .....	<b>34</b>

4.5.4	Produção de Exopolissacarídeos .....	35
4.5.5	Detecção da solubilização de fosfato inorgânico.....	35
4.5.6	Ensaio de biocontrole para fungos e bactérias fitopatogênicas....	36
4.5.7	Detecção da produção de fosfatases .....	37
4.5.8	Identificação e quantificação de ácidos orgânicos .....	38
4.6	TESTE ESTATÍSTICO PARA SELEÇÃO DA(S) LINHAGENS(NS) COM MAIOR POTENCIAL EM PROMOVER O CRESCIMENTO VEGETAL ....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
5.1	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i> spp. ....	40
5.1.2	Identificação bioquímica e morfológica .....	40
5.1.2	Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) e amplificação do gene 16SrRNA.....	42
5.1.3	Identificação proteômica por espectrometria de massa (MALDI- TOFF)     43	
5.2	PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA) .....	44
5.3	PRODUÇÃO DE AMÔNIA .....	47
5.4	PRODUÇÃO DE CELULASES .....	49
5.5	PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS.....	51
5.6	SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO.....	54
5.7	PRODUÇÃO DE FOSFATASES.....	58
5.8	ENSAIOS DE BIOCONTROLE UTILIZANDO FUNGOS.....	59
5.9	ENSAIOS DE BIOCONTROLE UTILIZANCO BACTÉRIAS.....	61
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA SELEÇÃO DA (S) LINHAGEM (NS) COM MAIOR POTENCIAL PROMOVER O CRESCIMENTO VEGETAL .	63
5.11	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	65
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>68</b>
	<b>PESPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a produção mundial de alimentos de origem agrícola dobre até 2050, e de modo a acompanhar esta demanda e também reduzir a necessidade do uso de fertilizantes químicos convencionais e pesticidas, alternativas ao uso de agroquímicos tem sido alvo de diversas pesquisas. Entre elas, destaca-se o estudo para exploração das variadas interações mutualísticas entre o microbioma das raízes das plantas e da rizosfera (IGIEHON; BABALOLA, 2017).

A rizosfera representa uma interface existente no eixo solo-raiz das plantas. As rizobactérias presentes neste habitat são muito utilizadas como biofertilizantes uma vez que favorecem o desenvolvimento vegetal por meio da produção de diversas substâncias reguladoras de crescimento (fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas), competição e supressão de fitopatógenos, além de auxiliar na disponibilização de nutrientes na rizosfera. Por esta capacidade, essas bactérias também são denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Estas devem ser capazes de proteger a planta hospedeira de patógenos e colonizar a planta de forma eficiente (BABALOLA, 2010).

Vários representantes microbianos têm sido citados como RPCPs entre eles podemos citar os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. As bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se pela produção de alguns fitohormônios como: Ácido indolacético, ácido indolbutírico, citocininas, giberelinas. Em adição, os mesmos apresentam efeito inibidor contra alguns patógenos de cultura de tomate (*Solanum lycopersicum*) (AJILOGBA et al., 2013; MA et al., 2015).

Outras características que permitem selecionar as RPCP com potencial de favorecer o crescimento das plantas são a capacidade e a eficiência dos micro-organismos em solubilizar diferentes fosfatos, competir por ferro e fixar nitrogênio estimulando as plantas na absorção de nutrientes (AJILOGBA et al., 2013).

Os benefícios econômicos com o uso dessas bactérias estão diretamente relacionados com a promoção do crescimento vegetal com a finalidade de aumentar a produção agrícola. As bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente utilizadas no controle biológico de pragas por não poluírem o meio ambiente e não causarem danos à saúde do aplicador como os

defensivos químicos (BABALOLA, 2017). Dessa forma, representam uma alternativa sustentável que visa contribuir para a manutenção do equilíbrio biológico e permitir o aumento da produção agrícola sem danos ao meio ambiente.

Neste sentido, a seleção de *Bacillus* spp. que apresentem um ou mais mecanismos que auxiliem o desenvolvimento de culturas vegetais são de grande importância para a agricultura, por apresentar capacidade de auxiliar no desenvolvimento de plantas, seja pela produção de diversas substâncias reguladoras de crescimento que competem e suprimem os fitopatógenos e também auxiliam na disponibilização de nutrientes na rizosfera (BABALOLA, 2010), sugerindo o grande potencial biotecnológico das linhagens estudadas neste trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e selecionar cepas de *Bacillus* sp. produtoras de substâncias que possam promover o crescimento vegetal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar identificação taxonômica das linhagens de *Bacillus* spp.;
- b) Avaliar a produção das principais substâncias que estimulam o crescimento vegetal, como: Ácido-3-indolacético, amônia, celulasas, exopolissacarídeos e solubilização de fosfato.
- c) Investigar atividades de antagonismo frente a bactérias e fungos fitopatogênicos;
- d) Analisar estatisticamente os resultados;
- e) Realizar identificação e quantificação de ácidos orgânicos.

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 AMEAÇAS À AGRICULTURA**

Ameaças ao cultivo alimentos por fungos, bactérias ou insetos podem causar grandes perdas econômicas (PÉREZ-GARCÍA, 2011). Como relata o Anuário 2019-2020 da revista Hortifrut Brasil, além de questões climáticas, doenças contribuíram para um rendimento menor da produção neste período de 2018/2019 (HFBRASIL, 2020).

Ao longo dos anos, a prática agrícola tem-se intensificado com o aumento populacional, portanto, os produtores tornaram-se cada vez mais dependentes dos produtos químicos (PÉREZ-GARCÍA, 2011). De acordo com a Agência Nacional das Águas (ANA, 2019), há três anos o Brasil possui o título de maior consumidor de agrotóxicos do mundo e sua utilização tem sido impulsionada ao longo dos últimos 40 anos representando cerca de 700% do aumento. O demasiado uso destas substâncias traz consequências não apenas para a saúde do ser humano, mas também para o meio ambiente (EMBRAPA, 2018).

Resíduos de agrotóxicos podem impedir a exportação de produtos, uma vez que países importadores podem não permitir a entrada, em seus portos, de produtos agrícolas brasileiros com níveis de resíduos de agrotóxicos acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) permitidos internacionalmente. A União Europeia acompanha as exportações brasileiras e, quando um problema é identificado, o governo brasileiro é prontamente informado, que busca soluções conjuntamente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) e o Ministério das Relações Exteriores (MRE) (TREVISAN; BAPTISTA, 2007). Além disto, muitos países têm adotado práticas mais sustentáveis para substituir o uso de agroquímicos ou simplesmente baniram alguns ainda comercializados no Brasil, tornando o mercado externo mais restritivo a exportação (REDE BRASIL ATUAL, 2018).

#### **3.2 ALTERNATIVAS PARA DIMINUIÇÃO DO USO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL**

Devido a diferentes fatores que ameaçam a agricultura, a saúde humana e o meio ambiente, como diminuição da fertilidade solo, biodiversidade, eutrofização de corpos hídricos, dentre outros, pesquisas

estão sendo realizadas buscando alternativas que envolvam soluções ecológicas e mais baratas (CAMPOS et al., 2014; RAI, 2017). Uma proposta eficaz para redução do uso de agroquímicos é a formulação de biofertilizantes, bioestimulantes e substâncias biocontroladoras produzidas por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (NINGTHOUJAM et al., 2009; BABALOA, 2010).

Uma combinação de micro-organismos vivos, que pode ser inoculadas em sementes, na planta e no solo aumentando a disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos denomina-se biofertilizantes. Classificam-se como bioestimuladores, micro-organismos aptos a produzir fitohormônios (auxinas, citocininas, dentre outros). Já o controle de patógenos pode ser realizado por um biocontrolador através da produção de antibióticos, cianeto de hidrogênio (HCN) e enzimas hidrolizantes da parede celular fúngica (FERREIRA et al., 2019).

Rizobactérias podem ser encontradas na rizosfera, que representa a interface entre a raiz da planta e o solo adjacente. Estima-se que neste local contenha  $10^{11}$  células microbianas por grama de raiz além de mais de 30.000 espécies procarióticas (BERENDSEN et al., 2012).

De acordo com a literatura, algumas RPCP são capazes de desempenhar atividades como promotores de crescimento de plantas através do aumento do comprimento das raízes, peso seco e úmido, área foliar, germinação de sementes e altura, rendimento e o estado nutricional (RUSSO et al., 2018).

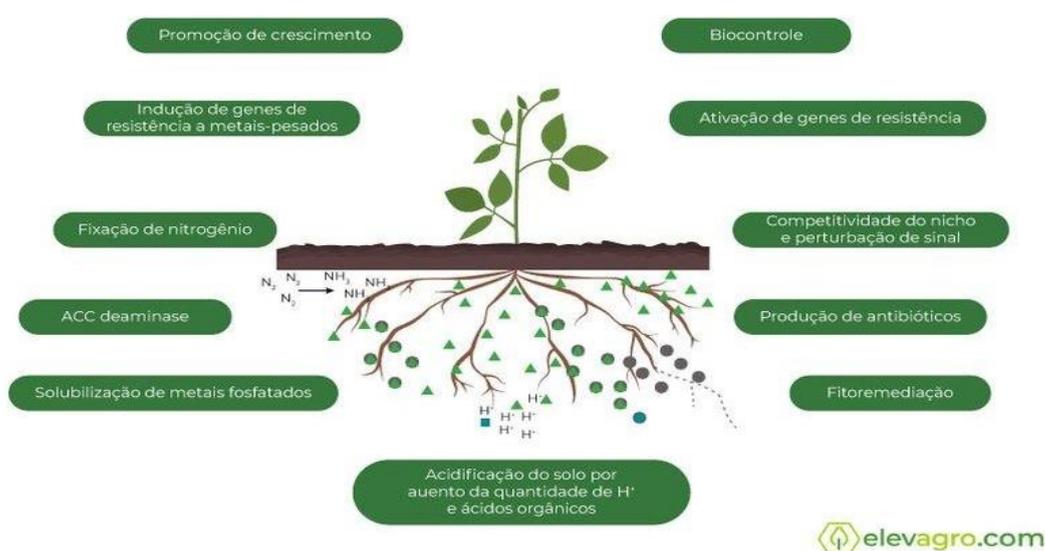
A disponibilidade de minerais e ações de fitohormônios que estimulam o crescimento e desenvolvimento de plantas bem como a maximização do fornecimento de nutrientes e regulação de hormônios vegetais como ácido indoleacético (AIA), giberelinas, ácido abscísico e ácido jasmônico pode ser realizado por micro-organismos rizosféricos e endofíticos tornando tais compostos mais acessíveis à planta (PRASAD et al., 2014; DA SILVA et al., 2018).

Segundo Dutta e Podile (2010), estes mecanismos podem ser incentivados diante da colonização de bactérias pela exsudação de água, enzimas, íons, mucilagem e uma gama de metabólitos primários e secundários contendo carbono, por parte das plantas, e que podem ser utilizados por tais

micro-organismos. Sendo assim, a densidade populacional de bactérias tende a ser mil vezes maior na rizosfera do que no solo (GLICK, 2014). A aplicação de agentes microbianos em partes da planta ou a inoculação em sementes tem sido descrito como atividades promissoras em culturas de arroz, trigo, beterraba sacarina, algodão e milho (TABASSUM et al., 2017).

Os mecanismos promovidos pelas RPCP podem ser classificados como diretos e indiretos, os quais agem de forma positiva assegurando o crescimento vegetal. De forma direta, a absorção de nutrientes essenciais por intermédio da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos bem como a modulação dos níveis hormonais através da síntese de ácido-3-indolacético (AIA), giberelinas, citocininas, óxido nítrico e poliaminas. De modo indireto, a produção de fito-hormônios relacionados ao estresse, como ácido abscísico, ácido jasmônico e cadaverina, ou catabolismo do etileno, relacionado com produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC deaminase), mesmo quando ocorre supressão do fitopatógeno (GHYSELINCK et al. 2013; DA SILVA et al., 2018). Estes mecanismos são demonstrados na Figura 1.

Figura 1 — Mecanismos diretos e indiretos propostos por Rizobactérias Promotoras de Crescimento Plantas.



Fonte: ELEVAGRO (2020).

O crescimento vegetal também pode ser estimulado pelo aumento dos níveis de fósforo (P) disponíveis para a planta (onde a limitação deste interfere

na fertilidade do solo, bem como crescimento e rendimento), e esse aumento é promovido pelos micro-organismos que podem atuar como biofertilizantes eficientes. O fósforo é um nutriente essencial para a planta, pois, está envolvido em atividades de divisão celular, desenvolvimento, fotossíntese, metabolismo de açúcar, transporte de nutrientes, transmissão genética e regulação metabólica (BABALOA, 2010).

Assim, o favorecimento de uma planta sadia e com bom desenvolvimento (promovido pelo aumento da disponibilidade e assimilação de nutrientes) além da supressão de fitopatógenos são benefícios proporcionados pelas RPCP (SINGH et al., 2011; VAFADAR et al., 2014).

Do ponto de vista econômico, a estimativa da participação no mercado para tais agentes microbianos é de US\$ 1, 66 bilhões até 2022 (TIMMUSK et al., 2017), com taxa de crescimento de 15% ao ano (TABASSUM et al., 2017). Misturas prontas para o mercado já têm sido relatadas por suas eficácias utilizando tanto bactérias como fungos ou ambos, como exemplo, misturas de *Bacillus amyloliquefaciens* com *Trichoderma virens* e *Trichoderma* sp. com *Bradyrhizobium* (BACKER et al., 2018).

De acordo com a literatura, os micro-organismos que possuem pelo menos uma particularidade que estimula o desenvolvimento de plantas pode pertencer a vários gêneros (PRASAD et al., 2015; DA SILVA et al., 2018). Entre eles podem ser citados: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoeae*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* e *Zoogloea* (BABALOA, 2010; PÉREZ-GARCÍA, 2011).

### 3.3 *Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL

*Bacillus* spp. pertencentes à família Bacillaceae são bactérias gram-positivas em forma de bastonete, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas encontradas predominantemente no solo e apresentam extrema importância para processos farmacêuticos, agrícolas e industriais na fabricação de pesticidas anti-microbianos, fungicidas e fertilizantes, devido a suas características fisiológicas e sua capacidade de produção de antibióticos, enzimas e outros compostos bioativos. Além disso, são facilmente cultivados

em meios de cultura de baixo custo, e possuem crescimento rápido, o que facilita a produção de biomassa em fermentadores industriais (LANNA FILHO, 2010). Também se destacam pela capacidade de produção de endósporos que apresentam extrema resistência a condições ambientais adversas, inclusive a baixas e altas temperaturas, radiação, dessecação e produtos químicos (BARON, 1996; PÉREZ-GARCÍA, 2011; MADIGAN, 2016).

Como RCPC, membros do gênero *Bacillus* tem sido relatado na literatura pela inibição da síntese de etileno, produção de sideróforos, antibióticos, fixação de nitrogênio mecanismos para solubilização de fosfatos, dentre outros (VAFADAR et al., 2014). Deste modo, *Bacillus* são descritos como produtores de compostos aromáticos, hormônios vegetais, diversas enzimas que estão relacionadas ao metabolismo dos fenilpropanóides, além de lipopeptídeos e polissacarídeos (EK-RAMOS et al., 2019). Efeitos benéficos destas atividades têm sido relatados em culturas de importância econômica como batata e cebola (VAFADAR et al., 2014). Conforme enfatizado por Reinhold-Hurek e Hurek (2011), bem como Frank et al., (2017) dentre as bactérias Gram-positivas, *Bacillus* spp. têm se destacado na produção de metabólitos de forma abundante.

Uma gama de formulações tem sido preparada e comercializada utilizando este gênero, pois, para atividades de controle biológico, *Bacillus* tornam-se bons candidatos, atuando como antagonistas. O antagonismo é sucedido pela produção de inúmeros polipeptídeos com ação antimicrobiana, como a mersacidina, micosubilitina, iturina, bacilomicina, fengicina, bacilicina e surfactina (ZOUARI et al., 2016; CARRER FILHO et al., 2015). Estes caracterizam-se por baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além da considerável atividade inibitória em vírus, bactérias, fungos, mosquitos e oomicetos. A atuação sinérgica entre os diferentes polipeptídeos potencializa suas respectivas atividades (ROMERO et al., 2007).

A utilização de micro-organismos adaptados às condições do solo do Brasil que atuem como promotores do crescimento vegetal e agentes de biocontrole apresentam-se como uma opção viável de aplicação na agricultura para que ocorra diminuição da dependência do uso de agrotóxicos, visando uma tendência para desenvolvimento da agricultura sustentável (CAMPOS, 2014). E por agricultura sustentável, podemos atribuir o uso restrito de

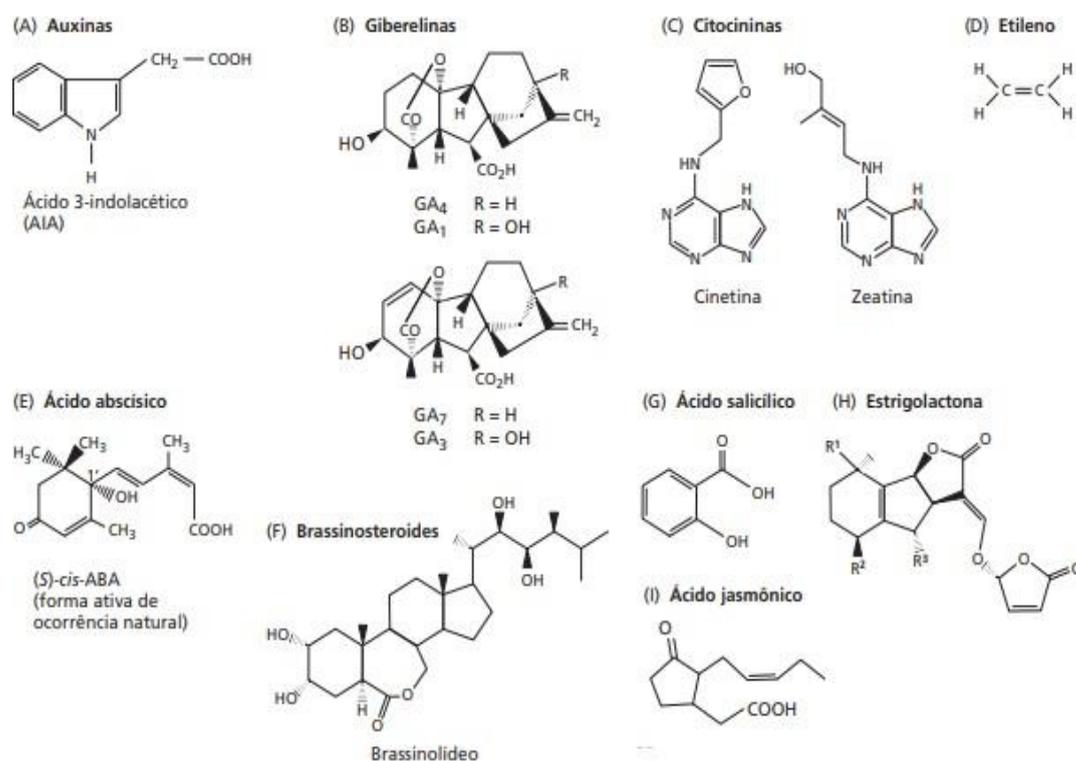
produtos químicos e dependência de controle biológico de pragas e fertilizantes orgânicos como meio essencial para manter a saúde do ecossistema e produtividade das lavouras (PRASAD et al., 2015).

### 3.4 MECANISMOS EMPREGADOS

#### 3.4.1 Reguladores de crescimento (ácido indolacético/ AIA)

Auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno, jasmonatos, dentre outros são os principais hormônios que regulam o desenvolvimento vegetal (TAIZ et al., 2017). Destes, destaca-se o AIA por ser mais abundante e atuando no aumento da divisão e diferenciação celular. O mesmo é produzido em diferentes partes da planta como, folhas, caules e sementes através da reação de transaminação e descarboxilação do triptofano, considerado precursor deste fitohormônio em bactérias, também pode encontrar-se em exsudados radiculares (KAUR et al., 2016). Estima-se que que 80% das bactérias rizosféricas produzem AIA (NAVEED et al., 2015). Exemplos de hormônios de vegetais podem ser demonstrados na Figura 2.

Figura 2 — Estrutura química dos hormônios vegetais.



Fonte: TAIZ et al., 2017.

As plantas são capazes de sintetizar auxinas, porém também respondem positivamente a aplicação exógena no decorrer de seu crescimento (NAVEED et al., 2015).

Existem diferentes mecanismos para produção de AIA, como mencionado anteriormente, estima-se que cinco vias metabólicas possam estar envolvidas na sua síntese, sendo elas: Indole-3-acetonitrila (IAN), Indole-3-acetamida (IAM), Triptamina (TAM), Triptofano oxidase de cadeia lateral (TSO) e Indole-3-piruvato (IPyA). Destas a via Indol-3-piruvato é a mais elucidada, a qual, o gene *ipdC* que codifica a enzima indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC) ativa a biossíntese do ácido-3-indolacético (LIN et al., 2015). Membros do gênero *Bacillus*, *Pantoea agglomerans*, *Burkholderia phytofirmans*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae*, dentre outros podem produzir AIA (TABASSUM et al., 2017).

### **3.4.2 Produção de amônia**

O nitrogênio (N) é um macronutriente indispensável a todos os seres vivos em quantidades elevadas, visto que constitui os ácidos nucléicos, proteínas (compreende 60% ou mais do N presente em células microbianas e vegetais) e demais constituintes celulares (VIEIRA, 2017).

Na natureza, o nitrogênio pode ser encontrado na forma de amônia (NH<sub>3</sub>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou em gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) (VIEIRA, 2017). Para a sua absorção por parte das plantas o mesmo precisa ser fixado, ou seja, absorvido e combinado em compostos orgânicos (TORTORA, et al., 2012).

Com um número diversificado de processos de transformação, o ciclo biogeoquímico do nitrogênio possui a habilidade de utilizar NH<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio, apesar de outros conseguirem utilizar NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ou aminoácidos como exemplo de fontes orgânicas de nitrogênio. No entanto, não é conhecido nenhum eucarioto que consegue utilizar o N<sub>2</sub> diretamente como fonte de nitrogênio, sendo papel apenas dos chamados “procariotos fixadores de nitrogênio” (MADIGAN et al., 2016).

Nos sistemas naturais, bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser de vida livre ou viver em simbiose com o vegetal, formando os chamados “nódulos radiculares”. No entanto, as bactérias de vida livre podem ser encontradas em grande densidade populacional na rizosfera. Como exemplo, as que realizam a desnitrificação transformando nitrato e outras substâncias em gás nitrogênio

são *Pseudomonas*, *Bacillus* spp., *Paracoccus denitrificans* e outros (TORTORA, et al., 2012).

Reações de oxidação-redução são estimuladas a partir das transformações do N, a partir das quais micro-organismos adquirem energia para atividades relacionadas ao seu metabolismo. O N é fundamental na nutrição mineral de plantas, assim, seu papel para altas produtividades é essencial. No entanto, a eficiência de assimilação de N por parte das plantas não é elevada, grande parte deste elemento é perdido no ambiente. Até 2050, de acordo com o crescimento populacional que pode chegar a 9,1 bilhões, a demanda por alimentos deve aumentar em 70%, então preocupações com estas perdas tem tomado maiores proporções (VIEIRA, 2017).

Como mencionado anteriormente, o nitrogênio não é assimilado diretamente pelas plantas, assim, fertilizantes agrícolas podem ser aplicados, que são compostos de nitrogênio fixados industrialmente por processos físico-químicos (TORTORA et al., 2012). Porém, um grande desafio na utilização de fertilizantes agrícolas nitrogenados é na baixa eficiência de sua assimilação pelas plantas, chegando a cerca de 30-40%. Isto acontece porque ocorre transformações deste elemento no solo, e o mesmo pode ser perdido para o ambiente por intermédio da amônia que é extremamente volátil, ou até mesmo lixiviação do nitrato e emissão de  $N_2$ ,  $N_2O$  e de outros óxidos de nitrogênio (VIEIRA, 2017).

Deste modo, impactos ambientais podem ser atribuídos a acidificação, eutrofização e aquecimento global prejudicando os ecossistemas como um todo. Impactos na saúde humana também podem ser observados tendo como exemplo, o câncer e problemas respiratórios a partir da contaminação de corpos hídricos com nitrato. Além disso, o processo de transformação de  $N_2$  em amônia em sistemas industriais envolve a queima de combustíveis fósseis (VIEIRA, 2017).

Uma das alternativas sustentáveis preferem mais nitrato para a utilização de fertilizantes industriais é a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio que substitui 100% a utilização de fertilizantes nitrogenados. No Brasil, esta utilização é descrita como bem-sucedida, associação destas bactérias com leguminosas e não leguminosas como, soja, milho, cana de

açúcar como sucesso de adubação nitrogenada, arroz é bem conhecido (VIEIRA, 2017).

### **3.4.3 Produção de celulases**

Micro-organismos heterotróficos do solo são bem representados e grandes populações compostos por bactérias aeróbias e anaeróbias, fungos e actinobactérias, os quais, possuem a capacidade de degradar o polissacarídeo celulose (DIONÍSIO et al., 2016), presentes na cutícula e parede celular vegetal (primária e secundária) (TAIZ et al., 2017). Estes micro-organismos celulolíticos, podem decompor a celulose como forma de obtenção de fonte de carbono e energia (DIONÍSIO et al., 2016).

Do ponto de vista comercial, as bactérias tem ganhado destaque pela grande produção de enzimas, devido as suas características fisiológicas como a existência de complexos multienzimáticos, elevada taxa de crescimento e estabilidade em condições adversas (LADEIRA et al., 2015).

A atividade celulolítica compõe um dos mecanismos indiretos que promovem o crescimento vegetal (TAIZ et al., 2017) já que facilitam a decomposição de substratos residuais de culturas vegetais, favorecendo a ciclagem de nutrientes (SINDHU, 2001; HAMEEDA, 2006). Três principais grupos de celulases são descritos como participantes da hidrólise, são eles: endoglucanases, betaglucosidase, cellobiohydrolase ou hexoglucanase (DIONÍSIO et al., 2016).

Conforme aborda Vimal et al., (2016), ao longo dos anos bactérias com atividades celulolíticas têm sido isoladas e caracterizadas permitindo a aquisição por intermédio de diversas fontes como solos, matéria orgânica, materiais vegetais em decomposição, dentre outros. *Cellulomonas* e *Bacillus* sp. (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. parabrevis*, *B. cereus*, dentre outros) têm sido reportados pela produção de diversas enzimas extracelulares capazes de hidrolisar polissacarídeos, os quais incluem a celulase (LADEIRA et al., 2015; DIONÍSIO et al., 2016).

### **3.4.4 Exopolissacarídeos**

Dentre os benefícios de utilização de micro-organismos rizosféricos também podemos incluir a capacidade de produção de exopolissacarídeos extracelulares (EPS), que são polímeros extracelulares de alto peso molecular sendo sintetizados durante o metabolismo microbiano e são secretados no

ambiente (SILAMBARANSSAM et al., 2019) como resposta ao estresse fisiológico, os quais participam do desenvolvimento do biofilme (MARSAVI; VISSCHER; MARTINEZ, 2010). Sua composição é essencialmente de monossacarídeos e determinados elementos não- carboidratos como: acetato, ácidos húmicos, ácidos nucleicos, fosfolipídios, glicoproteínas, proteínas e succinato (SILAMBARANSSAM et al., 2019).

EPS estão associados também a produção e manutenção de biofilme, estes polissacarídeos de superfícies facilitam a ligação dos micro-organismos a superfícies sólidas (MADIGAN et al., 2016), inclusive a plantas, permitindo a sua colonização. Além disso, polímeros extracelulares produzidos por micro-organismos podem ligar-se a cátions, como por exemplo  $\text{Na}^+$ , diminuindo a absorção desta molécula por parte das plantas, evitando assim, o estresse salino (GEDDIE et al., 1993).

Conforme Liu et al., (2016), muitos micro-organismos endofíticos como bactérias e fungos são reportados como ótimos produtores de EPS. A aptidão de colonização bacteriana a superfícies como as raízes de plantas possui várias vantagens, plantas estão naturalmente expostas a condições do meio ambiente, como por exemplo, o estresse hídrico que pode alterar as propriedades físico-químicas e biológicas do solo, tornando-o um ambiente instável para as culturas bem como para a atividade microbiana, uma vez que, o suprimento de água adequado regula a produção e o consumo de polissacarídeos por parte das bactérias, o qual influencia indiretamente na estrutura do solo. Além disto, EPS podem proteger os micro-organismos de altas temperaturas e radiação ultravioleta (LIU et al., 2016).

Como promotores de crescimento vegetal, tais micro-organismos podem ainda otimizar a permeabilidade do solo ao manter sua agregação, permitindo o acúmulo de água na rizosfera, promovendo o aumento da absorção de nutriente e proteção consequentemente protegendo o vegetal do estresse hídrico (SANDHYA et al., 2009).

Como enfatizam Ibrahim et al., (2016) dentre os *Bacillus*, várias cepas de *B. subtilis* têm sido documentadas pela produção de exopolissacarídeos e diversos produtos do metabolismo secundário. Além de membros do gênero *Bacillus*, EPS têm sido encontrados em biofilmes formados por *Paenibacillus*

(MARSAVI; VISSCHER; MARTINEZ, 2010), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, dentre outros (MORIKAWA et al., 2006; RYDER et al., 2007).

### 3.4.5 Controle biológico

Cerca de 2,5 milhões de toneladas de agroquímicos são utilizados em todo o mundo, e só no Brasil, o consumo anual supera 300 mil toneladas. A estimativa de consumo destes superou 700% nos últimos quarenta anos, já a área de atividades agrícolas aumentou cerca de 78% neste mesmo período de tempo (EMBRAPA, 2019).

Além de fertilizantes industriais, pesticidas químicos também podem ser evitados com alternativas sustentáveis através das atividades antagônicas aos patógenos de culturas vegetais, sendo um método indireto proposto por micro-organismos rizosféricos. Estes, podem diminuir ou erradicar a incidência de fitopatologias por fungos e bactérias (FERREIRA et al., 2019). Além disso, preserva os ecossistemas naturais e seus recursos, e traz resultados positivos na qualidade da lavoura (EMBRAPA, 2019).

Tais agentes sustentáveis podem ser atribuídos ao termo “controle biológico”, que tem como princípio o controle de pragas de forma natural por agentes biológicos, sem trazer riscos à saúde da população, aos alimentos e ao ambiente (EMBRAPA, 2019).

Segundo Beneduzi et al., (2012) rizobactérias possuem essas atribuições por diferentes mecanismos como: produção de enzimas hidrolíticas, produção de antibióticos e sideróforos, competição por nutrientes, modulação dos níveis de etileno propiciado por infecção patogênica.

Numerosos gêneros têm sido exemplificados como bons antagonistas a fitopatógenos como *Agrobacterium radiobacter* contra a galha causada por *Agrobacterium tumefaciens* (AGEITEC, 2019), além de outros gêneros como: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Coniothyrium*, *Serratia*. (FERREIRA et al., 2019) *Paenibacillus*, *Trichoderma*, *Bacillus* são relatados como micro-organismos com atividade antagônica satisfatória tanto em condições de campo como em laboratório (PANE et al., 2012)

Ademais, como destaca Fira et al., (2018), *Bacillus* contam com 5 a 8% do seu genoma para síntese de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas. Dentre as principais moléculas bioativas podem ser destacadas

peptídeos e lipopeptídeos de origem não ribossômica, além de policetídeos, bacteriocinas e sideróforos. Tais lipopeptídeos contam com um aparato complexo de biossíntese catalisada por sintetases peptídicas não ribossômicas (NRPSs), bem como complexos enzimáticos modulares, que conferem atividades inibitórias frente a fitopatógenos.

Dessa forma, *Bacillus* são potenciais micro-organismos que podem ser utilizados para atividades de biocontrole, por mecanismos como antibiose peptídeos antimicrobianos, ou até mesmo por induzir respostas de defesa por parte da planta em situações de disputa por nutrientes e espaço (SOLANKI et al., 2013). Portanto, *Bacillus* podem ser considerados ótimos biopesticidas (SHAFI et al., 2017).

#### **3.4.6 Solubilização de fosfato**

O fósforo (P) é um dos elementos químicos de suma importância na composição celular, o mesmo é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídeos, e comumente é disponibilizado para a célula como fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) (MADIGAN et al., 2016). Porém, a forma pela qual é disponibilizado (fosfato insolúvel) nem sempre é assimilável pelos seres vivos, sendo assim, o papel dos micro-organismos fundamental para converter este elemento em formas assimiláveis (TORTORA et al., 2012).

Formas insolúveis podem ser encontradas na forma de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ ), fosfato ferroso ( $\text{Fe}_3\text{PO}_4$ ) e fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ) que podem ser convertidos por micro-organismos solubilizadores de fosfato na sua forma solúvel (P) (SHARMA et al., 2013).

Diferentes mecanismos são relatados para que a atividade de solubilização possa ocorrer, são eles: A liberação de enzimas extracelulares, como as fosfatases que solubilizam o fosfato orgânico; liberação de ácidos orgânicos; transportadores de fosfatos na membrana plasmática: sideróforos prótons, íons hidroxila, prótons e  $\text{CO}_2$ ; bem como liberação de P conforme o substrato seja degradado, ou seja, mineralização biológica de P (SHARMA et al., 2013; TAIZ et al., 2017).

O P é um macronutriente de maior limitação especificamente para os vegetais, uma das causas é a baixa disponibilidade no solo da maior parte do planeta, onde a maior parte é fixada ou o próprio solo sofreu um processo de

desgaste. A grande limitação de utilizar fertilizantes industriais é a fonte de obtenção do fosfato, o fosfato de rocha, o qual é um recurso natural limitado.

Além disso, mesmo com a utilização de fertilizantes químicos, o fósforo torna-se fixo ou sofre processo de lixiviação para corpos hídricos superficiais e subterrâneos causando danos ao meio ambiente (KOCHIAN, 2012). Exemplos de bactérias com esta capacidade de solubilização são gêneros como: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, dentre outros (FERREIRA et al., 2019).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram selecionadas 12 linhagens de *Bacillus* spp. isoladas, preservadas em óleo mineral pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos (UFPEDA) do Departamento de Antibióticos (Tabela 1).

Tabela 1 — Relação das linhagens de *Bacillus* sp. pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos (UFPEDA).

Micro-organismos	Registro
<i>Bacillus</i> sp.	UFPEDA - 108
<i>Bacillus subtilis</i>	UFPEDA- 404
<i>Bacillus subtilis</i>	UFPEDA- 434
<i>Bacillus subtilis</i>	UFPEDA- 439
<i>Bacillus pumilus</i>	UFPEDA- 444
<i>Bacillus pumilus</i>	UFPEDA- 445
<i>Bacillus pumilus</i>	UFPEDA- 448
<i>Bacillus</i> sp.	UFPEDA- 462
<i>Bacillus amylolequefaciens</i>	UFPEDA- 485
<i>Bacillus</i> sp. Ar16	UFPEDA- 1060B
<i>Bacillus</i> sp. Ar18	UFPEDA- 1061B
<i>Bacillus</i> sp. Ar29	UFPEDA- 1062B

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

As linhagens foram reativadas em Caldo Nutritivo (CN) as quais foram incubadas por 24 horas a 37° C e 150 rpm em mesa agitadora. Após este período, as mesmas foram semeadas e isoladas em placa de Ágar nutritivo (AN) para serem mantidas em geladeira a 10°C.

### 4.2 Identificação bioquímica

A identificação através de provas bioquímicas foi realizada de acordo com Koneman e Allen (2008) e De Vos e Garrity (2009). Os isolados foram cultivados a 37 °C por 24 horas e posteriormente, submetidos aos testes de coloração de Gram, e em condições de incubação a 37° C realizou-se os testes

de catalase, citrato, oxidação-fermentação, Voges- Proskauer, manitol, fenilalanina, arabinose, tolerância ao NaCl, indol e motilidade (SIM).

#### 4.3 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO (DNA) E AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16SrRNA

A extração de DNA total foi realizada segundo a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001) com adaptações. Após cultivo de células por 6-16 horas em caldo Luria-Bertani (LB), a 37° C e 150 rpm em mesa agitadora, 1,5 mL de cada amostra foi centrifugada a 10 000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. A massa celular foi ressuspensa em TEG (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, glicose 50 mM) ao qual foram adicionados lisozima (4 mg.L<sup>-1</sup>), solução de RNase (20 mg/mL). As amostras foram incubadas em banho maria a 37° C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se SDS (Solução de dodecilsulfato de sódio 10%) e proteinase K (150 µg/ mL). As amostras foram incubadas novamente ao banho maria por 15 minutos a 65° C.

Após esse período, as mesmas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo novo e esterilizado. Posteriormente, foi adicionado clorofil 24:1 v/v (clorofórmio + álcool isoamílico). A amostra foi centrifugada a 6.000 rpm por 3 minutos e a fase aquosa resultante foi transferida para outro microtubo. Em seguida adicionou-se lentamente acetato de sódio 3 M, pH 5,2. Logo após 0,6 V de isopropanol (P.A) foram adicionados homogeneizando o conteúdo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol (70%) e centrifugados por 3 minutos a 10.000 rpm. Foi descartado o sobrenadante e após a secagem do pellet, foi incorporado tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando tampão de amostra e o DNA extraído.

Posteriormente, realizou-se a amplificação do gene 16S rRNA pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando oligonucleotídeos universais para Eubacteria 27F (5'-11GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT- 3'), fazendo uso de, para cada reação: DNA (40 ng), tampão (10x), Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (50 mM), Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (DNTp - 10 mM), Oligonucleotídeos

diretos (Oligo<sub>d</sub>) e reversos (Oligo<sub>r</sub>) (25pmol/L) água destilada esterilizada e Taq DNA polimerase (50 U/ µL, 500 U). As condições utilizadas no termociclador para amplificação foram: Desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 52 °C por 45 segundos, extensão a 72 ° C por 2 minutos e extensão final a 72 ° C por 5 minutos.

#### 4.3.1 Purificação e sequenciamento do DNA

Após a amplificação do gene 16S, para a purificação do produto de PCR utilizou-se o GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) seguindo a orientação do fabricante, com o seguinte procedimento: Em uma coluna, o produto de PCR foi adicionado ao buffer de ligação (1:1 v/v). A amostra foi centrifugada por 60 segundos, posteriormente a mesma foi submetida ao *wash buffer* (concentrado). Centrifugou-se em dois ciclos de 60 segundos e após estes procedimentos adicionou-se tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH: 8,5), deixando por 2 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a concentração da amostra foi quantificada utilizando o NanoDrop.

Após a quantificação da concentração da amostra, realizou-se o sequenciamento da mesma no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH/ UFPE) para a realização do sequenciamento. A sequência foi comparada com as sequências do Genbank, utilizando o software *Blast do National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). O alinhamento da sequência foi realizado com software Clustal W e a árvore filogenética construída utilizando Mega 6.0. A topologia foi avaliada pela análise de bootstrap.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA POR *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOFF)

A identificação proteômica foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), utilizando o espectrômetro de massa para ionização de proteínas ribossomais e estruturais a partir das bactérias cultivadas em ágar LB por 24 horas e incubadas a 30 °C, pela técnica de MALDI-TOF MS, de acordo com Lima-Neto et al. (2014), com modificações.

Fragmento de células (cerca de 50 µg) foram diretamente transferidos do meio de cultura para os anéis (*spots*) da placa em metal polido (Polished Steel Target, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) do equipamento (MALDI-

TOF MS Autoflex III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) em quadruplicata. Imediatamente, foi adicionado sobre dois spots com as amostras de bactérias 0,5 µL de ácido fórmico a 70% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 1 µL da solução matrix ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (75 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em etanol/água/acetone nitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA]) e levemente misturado. Para os outros dois spots, a adição da solução matrix foi realizada sem tratamento prévio com ácido fórmico.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 300 tiros de laser acumulados por perfil e 8 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 2.400 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos foi exportada ao software MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) onde as identificações finais foram baseadas através da presença ou ausência de cada pico no espectro.

#### 4.5 SELEÇÃO DO MICRO-ORGANISMO COM CARACTERÍSTICAS DE PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL E BIOCONTROLE DE FUNGOS E BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

##### 4.5.1 Produção de ácido indolacético (AIA):

A análise da produção e concentração de ácido indolacético foi realizada seguindo a metodologia descrita por Ali et al. (2009) e Lins (2014) com algumas modificações.

Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de Caldo Luria Bertani (LB) e cultivados a 37 °C por 24 horas. Em seguida, preparou-se uma suspensão  $10^8$  UFC/mL com solução salina (0,9%) e densidade ótica (D.O) analisada em espectrofotômetro. Posteriormente, inoculou-se 1 µL da mesma em 1 mL de caldo LB suplementado com 5 mM de L-triptofano, os quais foram cultivados no escuro a 37 °C e 120 rpm. Após 24, 48 e 72 horas todas as amostras foram centrifugadas em microtubos e ao sobrenadante adicionou-se o reagente de Salkowski ( $\text{FeCl}_3$  0,02 mol/L e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10,8 mol/L) na proporção de 1:4 v/v (MARCHIORO, 2005).

As amostras foram mantidas no escuro durante 30 minutos e em seguida realizou-se a leitura qualitativa pela observação da mudança de coloração e leitura quantitativa em D.O de 530 nm em espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e uma curva-padrão foi construída em concentrações conhecidas de AIA comercial (Vetec): 0,625; 1,25; 2,5; 10,5; 20,0; 40,0; 80,0; 160 µg/mL. Como controle positivo, utilizou-se a linhagem *Pantoea agglomerans* UFPEDA- 774, e como controle negativo, apenas o meio de cultura suplementado com L-triptofano na mesma concentração sem crescimento microbiano.

#### **4.5.2 Avaliação da produção de amônia**

A avaliação da produção de amônia foi realizada segundo a metodologia descrita por Cappuccino e Sherman (1992), Lins (2014). Inicialmente, culturas foram ajustadas a uma concentração de  $10^8$  UFC/mL (conforme descrito anteriormente) e 4 µL da suspensão foram inoculados em 4 mL de água peptonada, em triplicata e incubadas a 28 °C por 48 horas.

Após a incubação, 1 mL de cada cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos em microtubos com capacidade de 2.0 µl, 50 µl do reagente de Nessler foram adicionados em cada microtubo. Após a adição do reagente, o desenvolvimento de uma cor amarela indica baixa produção de amônia e uma coloração marrom indica alta produção (DEY et al. 2004). Os níveis de amônia produzidos foram mensurados em D.O de 450 nm em espectrofotômetro. Como controle positivo, foi utilizado a linhagem *P. agglomerans* UFPEDA- 774 e como controle negativo, apenas o meio de cultura com a adição do reagente de Nessler. Para quantificação da amônia produzida, realizou-se uma curva-padrão com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL.

#### **4.5.3 Produção de celulasas**

A investigação da produção de celulasas seguiu a metodologia descrita por Kasana et al. (2008), desta maneira, 5 µL de uma suspensão contendo  $10^8$  UFC/mL foram inoculadas, em quadruplicata, no meio carboxymethyl cellulose (CMC) composto por 0,2%  $\text{NaNO}_3$ ; 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,05%  $\text{MgSO}_4$ ; 0,05%  $\text{KCl}$ ; 0,2% sal de carboxymethyl cellulose; 0,02% peptona bacteriológica; 1,7% ágar. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas e

reveladas utilizando iodo P.A na tampa da placa de Petri por 5 minutos. O índice celulolítico (IC) foi calculado com base na razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (TEATHER and WOOD, 1982).

#### **4.5.4 Produção de Exopolissacarídeos**

As amostras foram previamente cultivadas em meio AN por 24 horas a 37°C. Posteriormente, realizou-se o ajuste de concentração a  $10^8$  UFC/mL a partir de uma suspensão preparada com solução salina (0,9%) e ajustada em espectrofotômetro.

Logo após, cada suspensão com o respectivo micro-organismo foi inoculada em discos de papel (5 mm de diâmetro) esterilizados e dispostos no meio de cultura (2% extrato de levedura; 1,5%  $K_2HPO_4$ ; 0,02%  $MgSO_4$ ; 0,0015%  $MnSO_4$ ; 0,0015%  $FeSO_4$ ; 0,003%  $CaCl_2$ ; 0,0015%  $NaCl$ ; 1,5% ágar) modificado com adição de 10% de sacarose em placas de Petri, e pH ajustado a 7,5. Em seguida incubou-se as placas por 48 horas a 37 °C, e a produção de exopolissacarídeos (EPS) foi analisada através da observação de um halomucoide ao redor de cada disco de papel.

A confirmação foi realizada através da adição de uma alçada da substância mucoide presente no halo em 2 mL de etanol absoluto P.A, deste modo, a formação de um precipitado confirma a presença de exopolissacarídeos (PAULO et al., 2012).

#### **4.5.5 Detecção da solubilização de fosfato inorgânico**

Alíquotas de 100 µl de cada linhagem de *Bacillus* spp. com concentração previamente ajustada a  $10^8$  UFC/mL foram inoculadas em 10 mL de meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999) e incubados a 28 °C.

Após 168 horas, 1 mL do inóculo foi centrifugado a 10.000 rpm por cinco minutos. Em seguida, 29 µl do sobrenadante foram transferidos para poços nas placas de microtitulação contendo 114 µL de água destilada e 57 µL do reagente vanado-molibdico (5% molibdato de amônio + 0,25% de vanadato de amônio na proporção de 1:1 v/v). Observou-se a mudança colorimétrica do meio com coloração esbranquiçada para amarelo em amostras positivas e realizou-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nm (BARTON, 1948; MALAVOLTA et al., 1997).

Os experimentos foram realizados em triplicata e a linhagem *P. agglomerans* UFPEDA 774 foi utilizada como controle positivo. Uma curva padrão foi construída com concentrações de 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 e 10 mg/mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

#### 4.5.6 Ensaios de biocontrole para fungos e bactérias fitopatogênicas

Para os ensaios de biocontrole foram utilizados micro-organismos fitopatogênicos de culturas agrícolas pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos (UFPEDA) do Departamento de Antibióticos e da Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 2).

Tabela 2 — Micro-organismos fitopatogênicos teste.

	Micro-organismos
Fungos	<i>Colletotrichum sp.</i> (UFPEDA - 2420)
	<i>Colletotrichum atramentarium</i> (URM - 2597)
	<i>Fusarium oxysporum</i> (URM -4117)
	<i>Fusarium oxysporum</i> (URM -5283)
	<i>Fusarium solani</i> (URM 5903)
Bactérias	<i>Xanthomonas campestris</i> (UFPEDA - 585)

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A atividade antimicrobiana utilizando fungos será verificada pelo teste de antagonismo direto, de acordo com Rocha et al., (2017) e Chen et al., (2019):

Inicialmente os fungos foram cultivados em placa de Petri com meio BDA (batata dextrose ágar), com pH ajustado a 6.0, por 4-6 dias a 30 °C. Em seguida um *plug* do micélio foi retirado e inoculado em uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) com meio BDA nas mesmas condições do cultivo inicial. Em seguida, 2 µL de suspensão bacteriana de *Bacillus* spp. (as cepas foram cultivadas a 30 °C por 24 horas em meio BDA, com pH ajustado a 6.0) definida a  $10^8$  UFC/mL foram inoculadas a 25 mm do centro da placa onde o *plug* do micélio estava inserido. As amostras em triplicata foram cultivadas por 6 dias em estufa de 30 °C. Subsequentemente, a porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi calculada.

A atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp. contra *X. campestris* foi determinada pelo método de difusão em ágar. Assim, uma suspensão de células bacterianas de *X. campestris*, cultivada em meio YMA por 24 horas a 30 °C, foi preparada com água destilada esterilizada em uma concentração celular equivalente ao padrão número 5 da escala de McFarland (em torno de  $10^9$  células/mL). Em seguida, inoculou-se 100 µL desta suspensão em placas de Petri esterilizadas e sobre essa suspensão foi adicionado 10 mL de meio YMA ainda liquefeito, numa proporção de 1% v/v em relação à suspensão.

Após a solidificação do meio YMA, uma alíquota de 1 µL de cada cultura de *Bacillus*, crescido em Caldo nutriente (CN) por 24 horas a 37°C, foi adicionado em três pontos na superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas, para que os *Bacillus* spp. obtivessem crescimento antes da *X. campestris*. Após esse período, as placas foram deixadas por mais 24 horas a 30 °C, temperatura ideal de crescimento da *X. campestris*. A leitura dos resultados foi feita medindo-se o diâmetro total do halo de inibição menos o diâmetro da colônia dos *Bacillus* spp. Este procedimento foi realizado em triplicata e o resultado, equivalente à média dos três valores obtidos, foi expresso em atividade antimicrobiana (mm) (MONTEIRO, 2002).

#### **4.5.7 Detecção da produção de fosfatases**

A produção de fosfatases das cepas de *Bacillus* foi observada por meio da metodologia de Romeiro (2007), Ribeiro et. al (2012) e Lins (2014). Uma solução a 0,5% de difosfato de fenolftaleína foi preparada e esterilizada por

filtração em membrana (0,22 µm). Dois mililitros desta solução foram adicionados a cada 100 mL de meio de cultura Trypticase soy agar (TSA) ainda liquefeito e mantido a 50 °C. O meio de cultura foi homogeneizado e vertido em placas de Petri. Os isolados bacterianos foram inoculados em quatro pontos da superfície do meio, seguido de incubação por 24-48 horas a 28 °C.

Para revelação, gotas de hidróxido de amônio (8,4%) foram depositadas na tampa da placa de Petri e a leitura foi efetuada após 15 minutos. A evidenciação da produção de fosfatases se deu pela formação de uma zona rosa ao redor das colônias.

#### **4.5.8 Identificação e quantificação de ácidos orgânicos**

Para a detecção de ácido indolacético (AIA), os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo dez mililitros (mL) de Caldo Luria Bertani (LB) e cultivados a 37°C por 24 horas. Em seguida, preparou-se uma suspensão 10<sup>8</sup> UFC/ mL com solução salina (0,9%) e densidade ótica (D.O) analisada em espectrofotômetro, posteriormente, inoculou-se 100 µL da mesma em 10 mL de caldo LB suplementado com 5 mM de L-triptofano, os quais foram cultivados no escuro a 37°C e 120 rpm por 72 horas (ALI et al., 2009; Lins, 2014).

Para a detecção dos demais ácidos (acético, butírico, cítrico, láctico), alíquotas de 100 µL das suspensões de cada linhagem de *Bacillus* spp. com concentração previamente ajustada a 10<sup>8</sup> UFC/mL foram inoculadas em 10 mL de meio NBRIP e incubados a 28°C por 168 horas (NAUTIYAL,1999).

Decorrido o tempos de cultivo mencionados todas as amostras foram filtradas, e a determinação dos ácidos orgânicos foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), equipado com uma bomba quaternária, acoplado a um sistema degaseificador (DGU-20A5r), com um forno para controlar a temperatura da coluna, esta fixada em 28 °C, e um injetor automático (20 µL injeção), com um detector por arranjo de diodos (SPD-M20A), trabalhando em uma faixa que vai de 190-800nm. O software utilizado foi o LC-Solutions fabricado pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan). A coluna usada no método foi de troca iônica de 300mm x 7,8mm x 9 µm

(Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, USA). A eluição foi feita isocraticamente com fase móvel composta de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mM, com fluxo de 0,6 mL/min.

Para a determinação das concentrações de ácidos, uma curva padrão foi construída relacionando as concentrações individuais padrões de cada ácido com as áreas de picos geradas pelo equipamento.

#### 4.6 TESTE ESTATÍSTICO PARA SELEÇÃO DA(S) LINHAGENS(NS) COM MAIOR POTENCIAL EM PROMOVER O CRESCIMENTO VEGETAL

A investigação foi realizada utilizando Gráfico em Radar do Microsoft Office Excel 10 relacionando a produção de AIA, amônia, celulases, exopolissacarídeos, solubilização de fosfato, atividade antimicrobiana e produção de fosfatases.

O mesmo tendo como objetivo selecionar as cepas com maior potencial em promover o crescimento vegetal por estes mecanismos para extração e identificação de ácidos orgânicos e posterior realização do teste de germinação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Bacillus* spp.

#### 5.1.2 Identificação bioquímica e morfológica

Diante dos resultados de coloração de Gram, foi possível observar que todos os *Bacillus* spp. deste estudo (12) são caracterizados como Gram positivos. E acordo com as características de cada teste proposto, para as provas bioquímicas, podemos observar os seguintes resultados na Tabela 3:

Tabela 3 — Resultados das provas bioquímicas realizadas com todas as linhagens de *Bacillus*. M: Manitol; Ci: Citrato; Ca: Catalase; O/F Oxidação/ Fermentação, V: Voges-Proskauer; Fe: Fenilalanina; H: Hidrólise do amido; 7% e 5%: NaCl; Mo: Motilidade; +: Positivo.

Bactérias	M	Ci	Ca	O/F	V	Fe	H	7 %	5 %	I	Mo
<i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 108	-	-	+	+	+	-	-	*	+	-	+
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 404	+	+	+	+	+	-	+	+	*	-	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 434	+	+	+	+	+	-	+	+	*	-	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 439	+	+	+	+	+	-	+	+	*	-	-
<i>B. pumillus</i> UFPEDA 444	+	-	+	+	-	-	-	+	*	-	-
<i>B. pumillus</i> UFPEDA 445	+	-	+	+	-	-	-	+	*	-	-
<i>B. pumillus</i> UFPEDA 448	+	-	+	+	+	-	+	+	*	-	-
<i>B. pumillus</i> UFPEDA 462	+	-	+	+	+	-	-	*	+	-	-
<i>B. amylolequefaciens</i> UFPEDA 485	+	-	+	+	+	-	+	+	*	-	-
<i>Bacillus</i> sp. Ar 16 (UFPEDA	-	-	+	+	+	-	+	*	+	-	+

---

1060B)												
<i>Bacillus sp. Ar</i>	-	-	+	+	+	-	+	*	+	-	+	
18 (UFPEDA												
1061B)												
<i>Bacillus sp. Ar</i>	-	-	+	+	+	-	+	*	+	-	+	
29 (UFPEDA												
1062B)												

---

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

As provas bioquímicas constituem um método que contribui para identificação de micro-organismos. A forma pela qual é possível identificá-las tem como o resultado das variadas vias metabólicas para obtenção de energia e específicas enzimas que degradam substratos para obtenção de energia. Sendo assim, o resultado visual de cada teste é de extrema importância para identificação (LEAL et al., 2016).

Diante dos resultados apresentados na Tabela 1, é possível observar que a porcentagem de similaridade das cepas analisadas com o perfil bioquímico apresentado no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (DEVOS; GARRITY, 2009), apontou valores de 73% e 90,9%.

Existe uma variedade de espécies dentro do gênero *Bacillus*, e apesar das técnicas de identificação estarem acessíveis há muito tempo (LOGAN et al., 1984; ASH et al., 1981), sua identificação ainda é questionada devido às suas peculiaridades fenotípicas e genéticas diversas. Assim, nas três últimas décadas, o sistema de classificação tem sido revisado. Espécies têm sido consideradas como Gram positivas e algumas como Gram negativas (STAROSTIN et al., 2015).

É possível citar como exemplos o isolamento de algumas espécies em gêneros recentes, como: *Aneurinibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, dentre outros. Além disto, *Bacillus cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* são muito similares geneticamente, diferindo pela sua patogênese. Outro destaque importante é a similaridade entre *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *B. amyloliquefacienes*, *B. licheniformis*, dentre outros. Portanto, a identificação por provas bioquímicas e moleculares torna-se de suma importância (STAROSTIN et al., 2015).

### 5.1.2 Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) e amplificação do gene 16SrRNA

A partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foi possível identificar, até o momento, a cepa *Bacillus* sp. Ar 16. Através do grau de similaridade, a mesma caracteriza-se como *Bacillus cereus*, como é possível observar na Tabela 4:

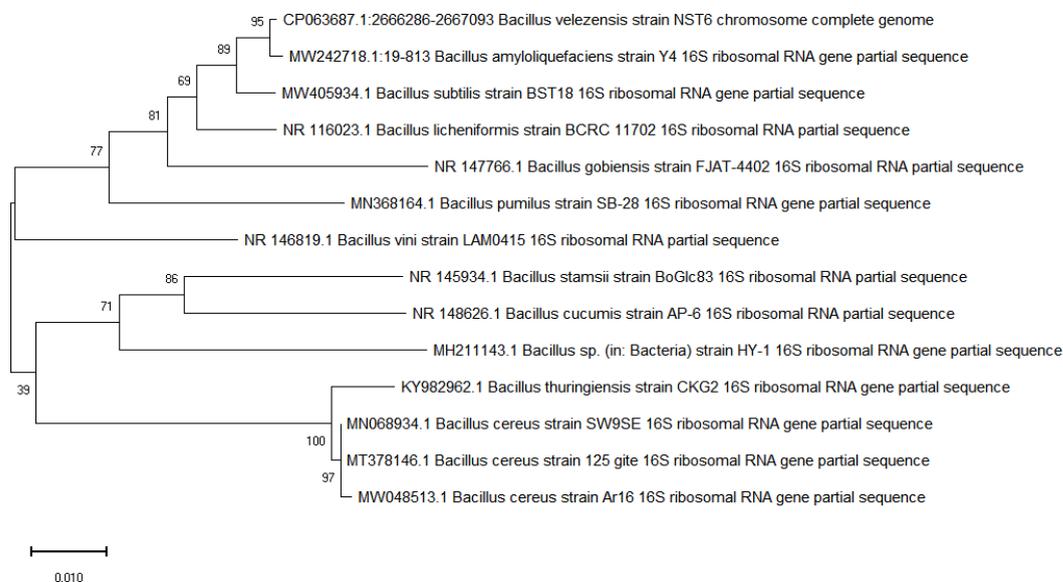
Tabela 4 — Linhagem mais próxima a cepa de *Bacillus* sp. Ar16 (UFPEDA- 1060B) após sequenciamento do gene 16S rRNA e análise no GenBank.

Micro-organismo	Linhagem mais próxima	Similaridade	Pares de base (pb)
<i>Bacillus</i> sp. Ar16 (UFPEDA 1060B)	<i>Bacillus cereus</i>	99,86%	1.432

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Deste modo, a partir dos dados obtidos e análise de sequências depositadas no *GenBank* (sequência de 1432 bp foi enviada ao GenBank e atribuído um número de acesso -MW048513), foi possível a construção da árvore filogenética, como demonstra a Figura 3.

Figura 3 — Árvore filogenética relativa ao gene 16S rRNA de *Bacillus* sp. Ar16 (*Bacillus cereus* 1060B) e sequências de referência de NCBI. Árvore



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Para o sistema de agrupamento de micro-organismos, de forma filogenética e taxonômica, faz-se necessária a investigação de sequências

compostas por macromoléculas conservadas de determinados genes, como por exemplo, o RNA ribossomal, mais especificamente a região 16S, este sendo bastante conservado em bactérias, constituindo uma ferramenta de referência para identificação (LANGE et al, 2011).

Kavamura et al. (2013) realizaram isolamento de micro-organismos da rizosfera de *Cereus jamaracu*, e ao utilizar o método de identificação utilizando a região 16S rRNA, obteve o resultado de dez isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, bem como a espécie *B. cereus*. Ribeiro et al., (2011), utilizando a região 16S identificou 9 espécies de *Bacillus* associados a *Araucaria angustifolia*.

### 5.1.3 Identificação proteômica por espectrometria de massa (MALDI-TOFF)

Ao comparar a lista de picos ao software MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) de acordo com a biblioteca de dados de perfis proteicos com espectros de referência, o qual mostra isolados que podem estar relacionados estritamente, foi possível identificar corretamente até o momento 4 cepas deste estudo. Estes com scores entre 1,81 a 2,25, de modo preciso, indicando a confiabilidade da análise, pois, segundo Patel et al. (2013), quanto maior o score, mais confiável se torna o resultado. Estes scores são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 — Identificação por MALDI-TOFF dos isolados de *Bacillus* spp. pertencentes à Coleção de Micro-organismos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) indicando seus respectivos scores.

Micro-organismos	Identificação	Score
<i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 108	<i>Bacillus cereus</i>	2,12
<i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 462	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	2,25
<i>Bacillus</i> sp. Ar 16 (UFPEDA 1060B)	<i>Bacillus cereus</i>	1,90
<i>Bacillus</i> sp. Ar 18 (UFPEDA 1061B)	<i>Bacillus cereus</i>	1,81
<i>Bacillus</i> sp. Ar 29 (UFPEDA	<i>Bacillus</i>	1,97

---

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

O uso do MALDI- TOFF ou ionização por dessorção a laser assistida por matriz, em inglês MALDI (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization), utilizando a detecção por um analisador do tipo tempo de vôo, TOFF (Time of Flight) (NANOCELL, 2013), tem se tornado um método conhecido e de uso frequente em laboratórios de pesquisa e clínicos (CAPUTO et al., 2018) por permitir a identificação de perfis proteicos e peptídicos a partir de células microbianas de modo eficaz e rápido (quando comparado aos métodos convencionais de provas bioquímicas e etc.), pelo qual, os níveis de gênero, espécie e subespécie podem ser identificados (KLIEM; SAUER, 2012).

Starostin et al. (2015) em seu estudo propuseram identificação por MALDI-TOFF e análise filogenética molecular identificando, assim, cepas de *Bacillus pumillus* e *B. altitudinis*.

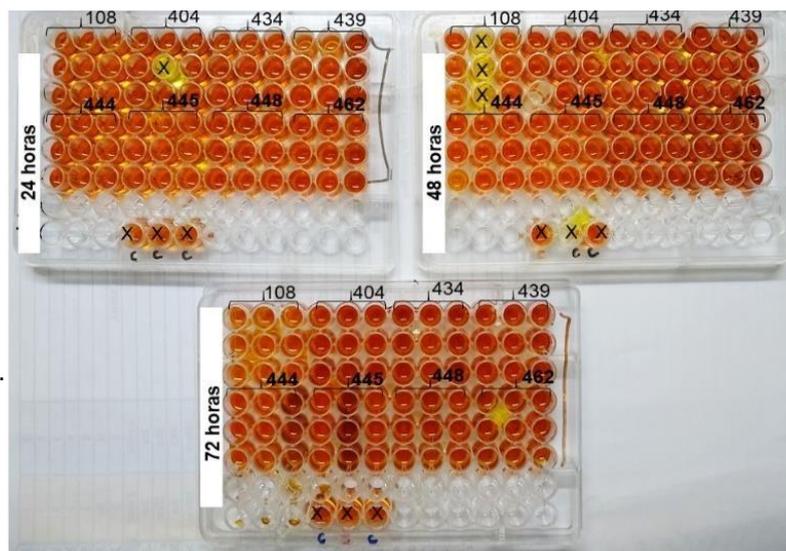
Pauker et al. (2018) também utilizaram esta técnica para identificação específica de cepas de *Bacillus anthracis* em relação a seus gêneros estritamente relacionados obtendo valores de score entre 2,33 e 2,55.

Ulrich et al. (2019) utilizaram o MALDI-TOFF como alternativa rápida para identificação de micro-organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos, utilizando 121 cepas pertencentes a *Bacillus* spp. e *Bacillus cereus*, obtendo um resultado satisfatório de identificação de 99,1%.

## 5.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA)

Auxinas e outras biomoléculas são produzidas por micro-organismos quando há metabolização de nutrientes e produção de metabólitos secundários em condições aeróbicas e anaeróbicas (DO PRADO et al., 2019). A produção de AIA pode ser observada qualitativamente pela predominância de uma coloração avermelhada nas amostras após 24, 48 e 72 horas de cultivo, indicando a produção da auxina (Figuras 4 e 5).

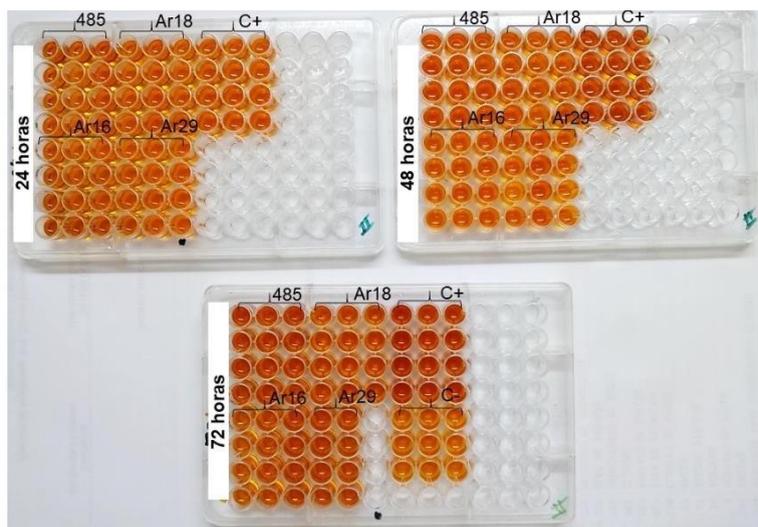
Figura 4 — Resultados após 24, 48 e 72 horas de cultivo detectando a presença de AIA por isolados bacterianos *Bacillus cereus* UFPEDA- 108 a *Brevibacillus parabrevis* UFPEDA- 462 em triplicata. Amostras representadas pela letra “x” indicam resultado negativo em uma das triplicatas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Assim, na presença do precursor L-triptofano a 5mM, as cepas de *Bacillus* foram capazes de sintetizar ácido indolacético. Como demonstrado anteriormente e na Figura 5.

Figura 5 — Presença de AIA por isolados bacterianos *B. amyloliquefaciens* UFPEDA - 485 a *B. cereus* Ar 29 (UFPEDA 1062B) em meio LB suplementado com 5mM de L-triptofano após cultivo por 24, 48 e 72 horas e adição do reagente de Salkowski na proporção de 1:4 v/v. C+: Controle positivo.

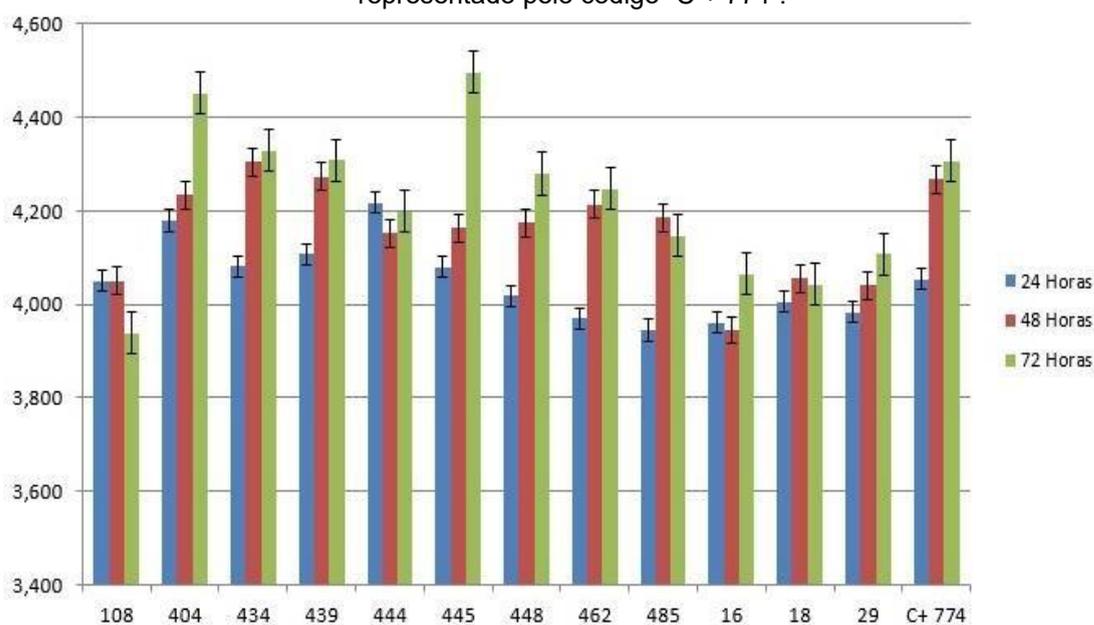


Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Quantitativamente foi possível observar os níveis de AIA produzidos em 24, 48 e 72 horas de cultivo, baseado nos valores de absorvância medidos em D.O 530 nm. Previamente, uma curva padrão de AIA comercial (Vetec) nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 10,5; 20,0; 40,0; 80,0; 160  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , originou a equação:  $y = 70.322x - 3.9259$ , com  $R^2 = 0,9991$ .

Em 24 horas, as linhagens *Bacillus subtilis* UFPEDA 404 e *Bacillus pumilus* UFPEDA- 444 sobressaíram ao controle positivo (*Pantoea agglomerans* UFPEDA- 774), apresentando uma produção de 4,179 e 4,217  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  respectivamente. No entanto, com 48 horas de cultivo, observa-se uma maior produção de auxina por parte de 76,9% dos isolados. Em 72 horas, destaca-se a produção do hormônio vegetal em *B. subtilis* UFPEDA- 404 e *B. pumillus* UFPEDA- 445, atingindo valores maiores que o controle positivo, contando com 4,452 e 4,496  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 6).

Figura 6 — Níveis de produção de AIA em após crescimento das linhagens de *Bacillus* sp. em 24, 48 e 72 horas em meio LB. Controle positivo *P. agglomerans* representado pelo código “C + 774”.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Níveis de AIA produzidos podem ser influenciados pela expressão de genes envolvidos na biossíntese do triptofano (*trp*) e do AIA (*iaaH*, *iaaM*, por exemplo) e também por fatores ambientais (SPAEPEN et al., 2007; BATISTA, 2017).

Desta forma, a atividade metabólica e densidade populacional elevada de bactérias se relacionam ao crescimento bacteriano, uma vez que, os mesmos estão conectados a fase estacionária (propícia a produção de AIA) da curva de crescimento. Logo, há sinalização molecular por parte das bactérias facilitando sua adesão as raízes e adaptação, e sinalização do vegetal através da produção de exsudados que auxiliam na colonização (SPAEPEN et al., 2007).

Produção de auxina por membros do gênero *Bacillus* sp. e *Brevibacillus* sp. Já tem sido relatado em diversos estudos, como abordam Kaur et al. (2016) e Ferreira et al. (2019).

Ahmed et al. (2010) obtiveram uma maior produção de auxina por *Bacillus* spp. quando o tempo de incubação aumentou (a partir de 48 horas). Lastochkina et al. (2017) demonstraram a produção de  $5,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA proveniente de uma cepa de *B. subtilis* 10-4 cultivada nas mesmas condições deste estudo (Caldo Luria- Bertani suplementado com  $1 \text{ mg/mL}^{-1}$  de triptofano). Já Ahmad (2008), menciona resultados similares, com produção de  $7,1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ , enquanto que Kauar et al., (2016) considera bons níveis de produção como de 5 a  $13 \mu\text{g.mL}^{-1}$  nas RPCP testadas em seu estudo.

Mumtaz et al., (2017) também mencionaram a produção de auxinas por membros do gênero *Bacillus*, afirmando que os níveis de hormônios vegetais produzidos podem ser influenciados também pelas concentrações de L-triptofano disponíveis no meio de cultivo bacteriano que em maiores quantidades, podem produzir níveis mais elevados da auxina. Além disto, as condições do meio de cultura, estágio de desenvolvimento e disponibilidade de nutrientes também podem influenciar (KAVAMURA et al., 2013).

### 5.3 PRODUÇÃO DE AMÔNIA

Neste estudo, a produção de amônia foi detectada em todas as amostras. Qualitativamente é possível observar que há produção de amônia pela predominância da cor amarela após as amostras serem tratadas com o reagente de Nessler, como observa-se na Figura 7:

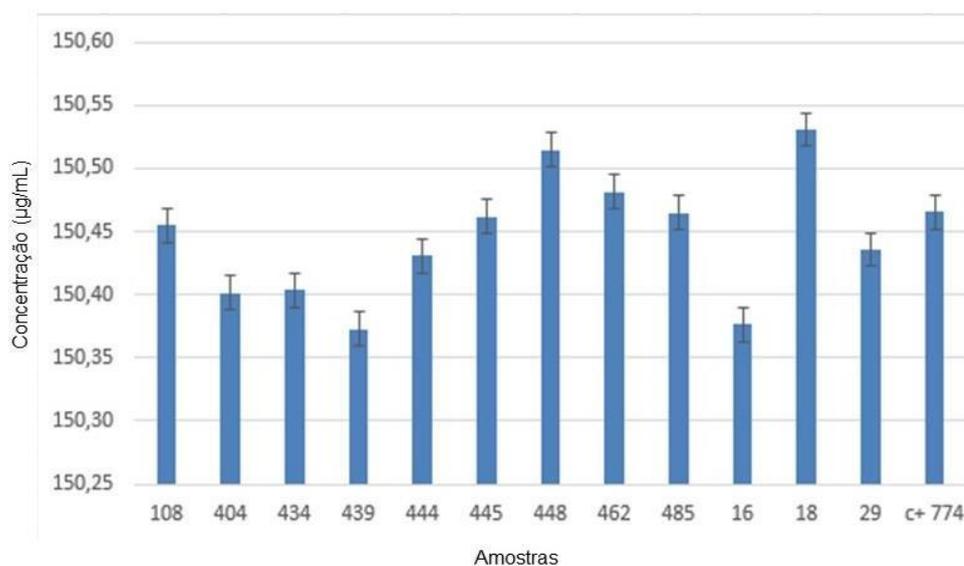
Figura 7 — Detecção da produção de amônia após crescimento dos micro-organismos em água peptonada por 48 horas. É possível exemplificar a mudança de coloração nas amostras *B. cereus* UFPEDA - 108 a *B. amyloliquefaciens* UFPEDA 485 em quadruplicada.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os níveis produzidos foram quantificados utilizando espectrofotômetro em D.O de 450 nm ,e a partir da análise do padrão sulfato de amônio foi elaborada curva padrão com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , a equação da reta:  $y = 143,59x - 147,33$ ,  $R^2 = 0,9797$  (Figura 8).

Figura 8 — Níveis de amônia estabelecidos em D.O de 450 nm após incubação das amostras por 48 h e adição do reagente de Nessler.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Valores de produção de amônia variaram entre 150,37  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para a linhagem *B. subtilis* UFPEDA- 439 e 150,53  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para a linhagem *B. cereus* Ar18 (UFPEDA 1061B), destacando-se pela maior produção dentre os testados.

A produção de compostos voláteis, especificamente a produção de amônia já foi verificada em *Bacillus* como afirmam Banerjee (2010), Kavamura et al. (2013) e Radhakrishnan (2017), constituindo um método indireto de controle de crescimento vegetal, já que interfere em ciclos metabólicos de patógenos (NAIN et al., 2012).

Alguns estudos sugerem o uso de *Bacillus* na fixação simbiótica de nitrogênio em leguminosas e plantas não leguminosas, uma vez que, a fixação de nitrogênio por intermédio dos mesmos oferece o suprimento de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) adequado à planta de forma direta (ALOO et al., 2018) e a obtenção de carbono fixado através dos exsudados radiculares, constituindo uma troca benéfica entre bactérias e plantas, trazendo resultados positivos para a agricultura (GOVINDASAMY et al., 2010).

Bai et al. (2003) aborda o uso de *Bacillus* spp. isolados de nódulos radiculares de soja no aumento do crescimento de plantas. Além disso, há sugestões do uso combinado de espécies de *Bacillus* com outros micro-organismos por alguns autores que afirmam uma eficiência na fixação de  $\text{N}_2$  quando inoculados em diversas plantas, a exemplo: *B. megaterium* e *Azospirillum lipoferum* como alternativa no melhoramento do aporte de nitrogênio e fósforo em culturas de trigo (EL-KOMY, 2005), a associação com *Rhizobium* em plantações de feijão (KORI et al., 2017).

#### 5.4 PRODUÇÃO DE CELULASES

A capacidade de degradar celulases foi observada em 66,6% das amostras testadas, das quais, 50% apresentaram Índice Celulolítico (IC)  $\geq 4,0$  mm, destacando-se a linhagem *B. cereus* Ar18 (UFPEDA 1061B) que demonstrou IC de 11,66 mm. Valores obtidos a partir da hidrólise celulolítica através o do diâmetro do halo podem pressupor o rendimento da enzima e auxiliar no mecanismo de busca pelos micro-organismos que atuam na degradação da celulose (TEN et al., 2004). Dessa forma, considera-se: (-) ausência de produção, IC < 2 (+),  $2 \leq \text{IC} < 3$  (++) ,  $3 \leq \text{IC} < 4$  (+++), IC  $\geq 4$  (++++ ) (KAVAMURA et al., 2013) (Tabela 6).

Tabela 6 — Índice Celulolítico (IC) das linhagens de *Bacillus* sp. testadas, calculado com base na razão entre o diâmetro da colônia e diâmetro do halo.

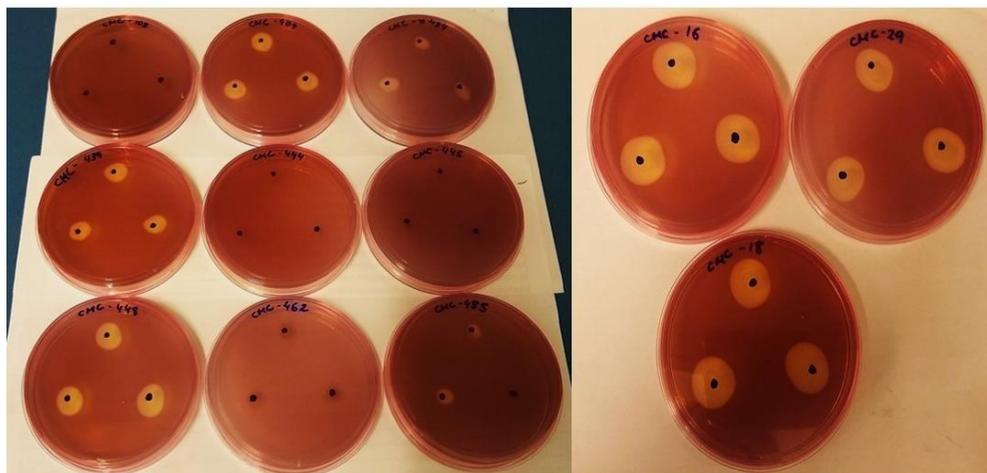
Linhagens-teste	Índice celulolítico (mm)
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA-108	-
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA-404	6
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA -434	4
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA- 439	4,33
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA- 444	-
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA- 445	-
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA- 448	7
<i>Brevibacillus parabrevis</i> UFPEDA-462	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> UFPEDA-485	3
<i>Bacillus cereus</i> Ar16 (UFPEDA – 1060B)	11,33
<i>Bacillus cereus</i> Ar18 (UFPEDA 1061B)	11,66
<i>Bacillus cereus</i> Ar29 (UFPEDA 1062B)	10,66

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com Vimal et al., (2016), *Bacillus* spp. e fungos são os micro-organismos que produzem celulasas de valor econômico elevado, por serem considerados maiores produtores. No entanto, bactérias por possuírem ciclo de crescimento rápido, apresentam um potencial a mais para a produção industrial de celulasas, além de serem encontradas em uma ampla gama de habitats.

Vários métodos têm sido reportados para uso de derivados de celulose solúveis que serão prontamente degradados, como carboximetilcelulose (CMC). Desta maneira, na pesquisa de bactérias e fungos, frequentemente usa-se placas de ágar contendo como substrato CMC (JOHNSEN; KRAUSE, 2014), como pode ser observado na Figura 9:

Figura 9 — Placas contendo meio CMC após inoculação e crescimento das linhagens testadas de *Bacillus* sp.. Após serem submetidas ao vapor de iodo, é possível observar os halos indicando atividade celulolítica.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Em um estudo realizado por Vimel et al. (2016) com objetivo de isolar e identificar a degradação da celulose, foi possível destacar a atividade de membros do gênero *Bacillus* isolados de resíduos da indústria de papel. Thomas et al. (2018) demonstraram a indução e a otimização da produção de celulases, no qual uma cepa de *Bacillus* sp. apresentou um alto IC no valor de 7,89.

Behera et al. (2017) reportaram a produção de celulases por *Bacillus* spp. isolados de um manguezal (*Rhizophora mucronata*) na Índia. Castro (2014) relata que dentre os 62% dos isolados bacterianos provenientes de um manguezal brasileiro, *Bacillus* spp. apresentou maior atividade endoglucanásica relacionando a produção celulolítica.

A importância da análise de celulases por micro-organismos permite a identificação de agentes de biocontrole contra fungos fitopatogênicos que possuem celulase em suas paredes além de resíduos vegetais (SINDHU, 2001; HAMEEDA, 2006).

### 5.5 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

Dentre as linhagens em teste, 75% foram capazes de produzir exopolissacarídeos, como demonstrado na Tabela 6, destacando-se a linhagem *B. subtilis* UFPEDA- 439, que com base na razão do disco embebido com a suspensão de células e o halo formado, demonstrou um resultado de 26,33 mm. Desta forma, para caracterização da produção (-) ausência de

produção, halo  $\leq 10$  mm (+), 10-14 mm (++) e  $\geq 14$  (+++) (KAVAMURA et al., 2013), como demonstra a Tabela 7.

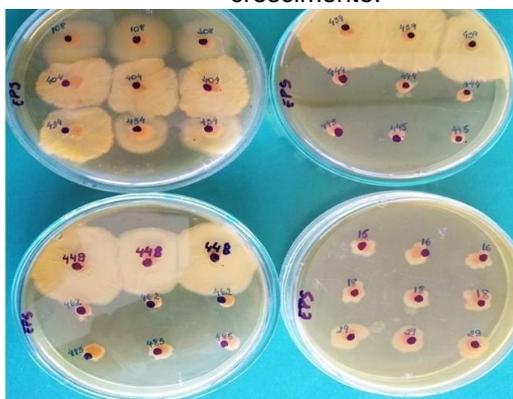
Tabela 7 — Média dos halos (mm) obtidos em relação a formação de EPS com base na razão entre o diâmetro do papel de filtro inoculado com a suspensão bacteriana e o halo formado após crescimento em 48 h.

<b>Linhagens-teste</b>	<b>Media dos halos (mm)</b>
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA-108	17
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA- 404	17,33
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA- 434	15,66
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA- 439	26,33
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA-444	-
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA-445	-
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA-448	7
<i>B. parabrevis</i> UFPEDA- 462	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> UFPEDA- 485	2
<i>Bacillus cereus</i> Ar16 (UFPEDA – 1060B)	14
<i>Bacillus cereus</i> Ar18 (UFPEDA – 1061B)	12,66
<i>Bacillus cereus</i> Ar29 (UFPEDA – 1062B)	12

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

É possível observar cada halo com formação de uma substância mucóide nas linhagens testadas, indicando a presença de exopolissacarídeos na Figura 10 após incubação de 48h a 37°C.

Figura 10 — Formação de halo indicando a produção de EPS nas linhagens testadas após 48 h de crescimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A substância mucoide pode ser observada em destaque na Figura 11.

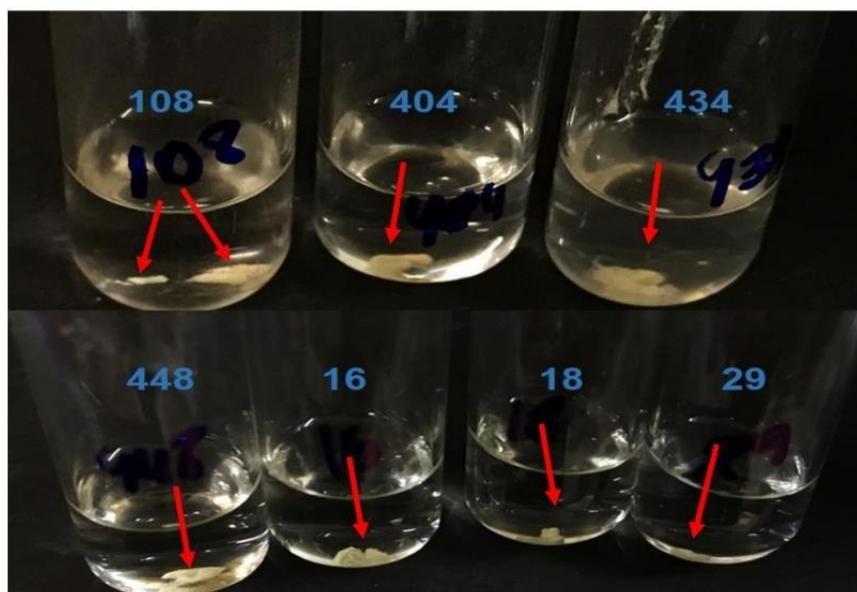
Figura 11 — Destaque para a substância mucoide ao redor do disco de papel após 48 horas de crescimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Uma alçada da substância mucoide foi inoculada em 2 mL de etanol absoluto P.A, a formação de um precipitado indicou a presença de EPS (Figura 12).

Figura 12 — Confirmação através da inoculação da substância mucoide em etanol P.A. Na base de cada tubo de ensaio é possível observar a presença de um precipitado confirmando a produção de



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com Deka et al. (2019), EPS produzidos por cepas de *Bacillus* têm sido alvo de diversas pesquisas por sua aplicabilidade ambiental. Assim, a identificação de isolados de *Bacillus*, e a prospecção de novas macromoléculas pode trazer à tona benefícios relacionados a questões ambientais.

Nadeem et al. (2016) constataram que cepas de *Bacillus* produtoras de exopolissacarídeos foram capazes de tolerar altas concentrações de sódio ao serem inoculadas juntamente a culturas de pepino para o melhoramento da tolerância a salinidade do mesmo. Como já mencionado, os EPS também possuem atividade de redução da disponibilidade de sódio ( $\text{Na}^+$ ) a ser absorvido pelas plantas.

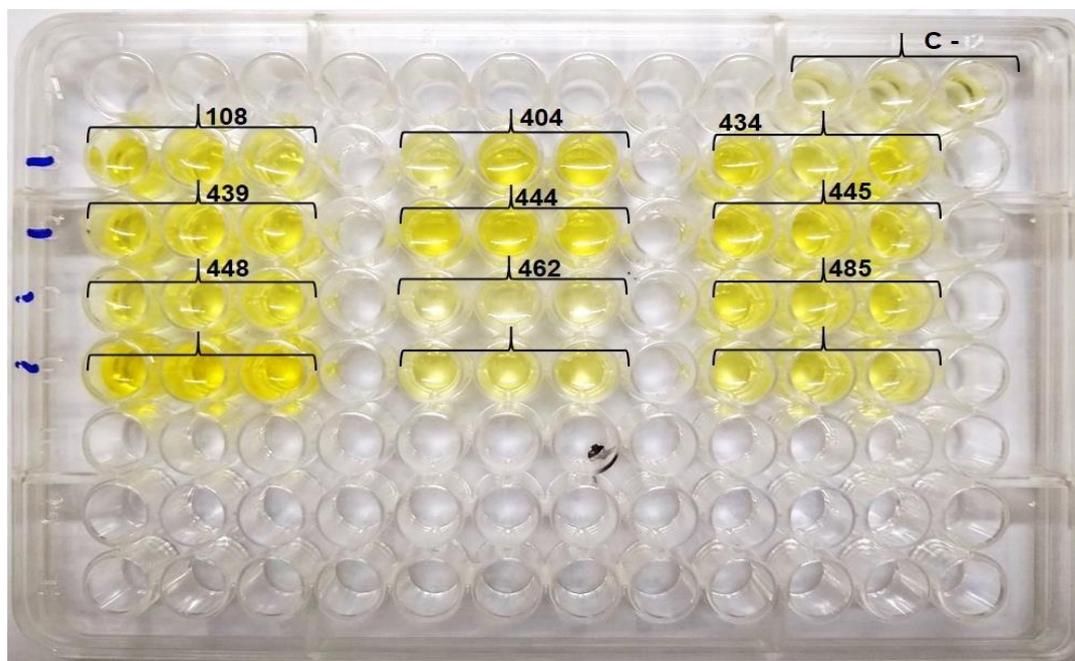
Deka et al. (2019) relatam alta capacidade de produção de EPS por *B. amyloliquefaciens* p16 e esta característica permite também a tolerância do mesmo a acidez presente no solo de Assam, Índia. O mesmo também melhorou a agregação do solo após a inoculação. Isfahani et al., (2018) relatam pela primeira vez a capacidade de *B. aerius* (isolado do distrito rural de Roudasht, em Isfahan, Irã) produtores de EPS isolados de solos hipersalinos com alta taxa de tolerância e possíveis candidatos para aplicações agrícolas.

EPS produzidos por micro-organismos e que contribuem para diminuição do estresse hídrico e aumento do crescimento em culturas de soja, milho e trigo é observado com sucesso, sendo esta atividade de grande base de estudos para tratamento de culturas agrícolas tropicais em regiões com escassez de água ou baixos níveis de chuva e plantas sensíveis a estas condições (EMBRAPA, 2017). Além disso, atributos conferidos pelo tratamento com bactérias produtoras de exopolissacarídeos incluem a proteção contra baixas temperaturas que possam permitir o congelamento da planta, bem como proteção a outros micro-organismos, e reserva de carbono (SILVI et al., 2013).

## 5.6 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

A capacidade de solubilização de fosfato foi observada em 100% das amostras testadas neste estudo, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 — Análise qualitativa da solubilização de fosfato evidenciada pela presença da coloração amarela nas amostras de *Bacillus* sp.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com Nautiyal (1999), nem sempre os micro-organismos quando submetidos a testes em meio sólido para solubilização de fosfato, o fazem. Muitos podem não produzir nenhum halo, porém em meio líquido, os mesmos podem solubilizar e apresentar resultados confiáveis pela capacidade de solubilizar vários tipos de fosfatos inorgânicos insolúveis e reduzir vários ácidos inorgânicos em meio NBRIP, o qual é descrito como mais eficiente. Sendo assim, todos os isolados foram verificados quanto a solubilização de fosfato no meio NBRIP, com fonte de fosfato o  $\text{CaHPO}_4$ .

Os níveis de fosfato solubilizado foram quantificados utilizando espectrofotômetro em D.O de 420 nm e, a análise do padrão a partir da construção da curva padrão do fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) nas concentrações de .0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 e 10 mg/mL, a equação da reta:  $y = 0,0099x + 0,0637$ ,  $R^2 = 0,9928$  foi construída.

É possível observar que 67% das amostras apresentaram valores entre 0,063- 0,367 mg/mL, ao passo que, 33% demonstraram índices de solubilização entre 0,405 – 0,880 mg/mL. De acordo com Kavamura et al., (2013) podemos considerar a produção como <0,05 mg (baixa solubilização),

0,05- 0,1 (média solubilização), 0,101-0,5 (alta solubilização), >0,501 (elevada solubilização) (Tabela 8).

Tabela 8 — Análise quantitativa da solubilização de fosfato em D.O de 420 nm.

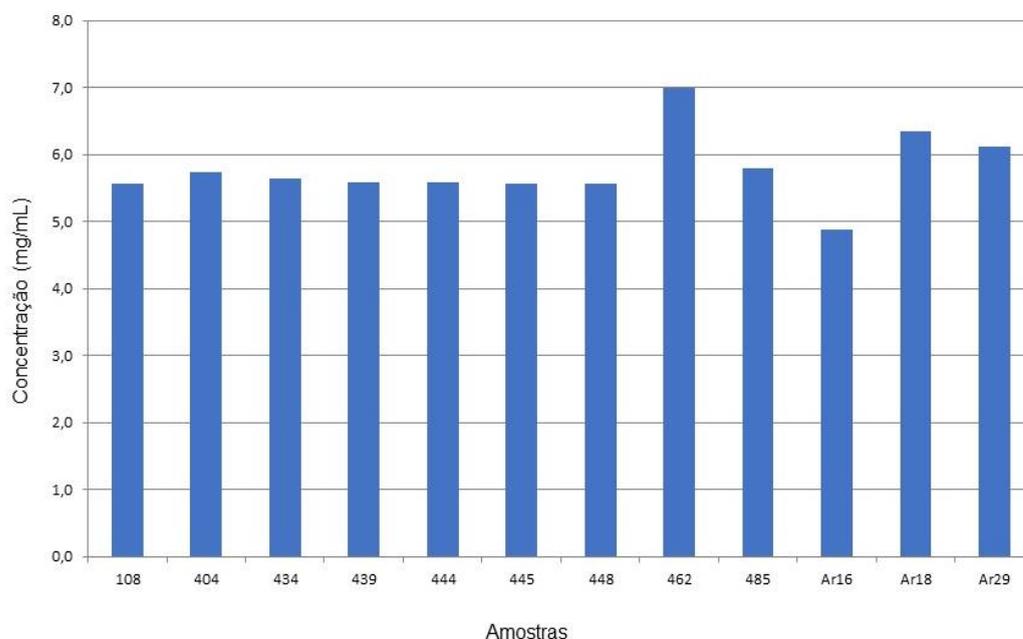
<b>Linhagens-teste</b>	<b>Y (mg/mL)</b>
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA-108	0,405
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA -404	0,334
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA-434	0,411
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA-439	0,373
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA-444	0,485
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA-445	0,376
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA-448	0,248
<i>B. parabrevis</i> UFPEDA-462	0,063
<i>B. amyloliquefaciens</i> UFPEDA-485	0,301
<i>Bacillus cereus</i> Ar16 (UFPEDA – 1060B)	0,880
<i>Bacillus cereus</i> Ar18 (UFPEDA – 1061B)	0,179
<i>Bacillus cereus</i> Ar29 (UFPEDA – 1062B)	0,235

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com Sharma et al. (2013) a solubilização de fosfato inorgânico ocorre com a síntese de ácidos orgânicos. Assim, o declínio do pH, podendo ocorrer o aumento da quelação de cátions ligados ao fósforo (P) e a formação de complexos solúveis com íons metálicos libera o P.

No tempo 0 de cultivo, o pH do meio foi ajustado para 7,0. Após 168 horas de cultivo, podemos observar na Figura 14 que 75% das linhagens apresentaram faixa de pH entre 4,9- 5,8 (destacando-se a linhagem *B. Cereus* Ar16 (UFPEDA – 1060B) com o menor nível de pH – 4,9), ao passo que, 25% apresentaram faixa de pH de 6,1-7,0, como demonstra a Figura 14.

Figura 14 — Níveis de pH do meio NBRIP líquido observados após 168 horas de cultivo. O declínio do pH propõe a liberação de ácidos orgânicos pelos



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com Rodrigues et al., (2015), comumente os solos possuem escassez de alguns elementos químicos importantes para atividades agrícolas como nitrogênio (N), potássio (K), e fósforo (P) ou até mesmo podem não estar disponíveis para uso das culturas vegetais. Assim, rizobactérias com capacidade de solubilização de fosfato podem atuar para a produção de bioinoculantes, uma vez que substituem o uso de fertilizantes químicos.

Kavamura et al. (2012) identificaram e caracterizaram bactérias provenientes de cactos do Brasil para promoção de crescimento vegetal, desta forma, puderam observar que 6% das cepas pertencentes a *Pantoea* sp, *Enterobacter* sp. apresentaram solubilização maior que  $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$  caracterizando uma máxima solubilização, já as cepas de *Bacillus* apresentaram uma solubilização mediana entre 29 a  $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$ .

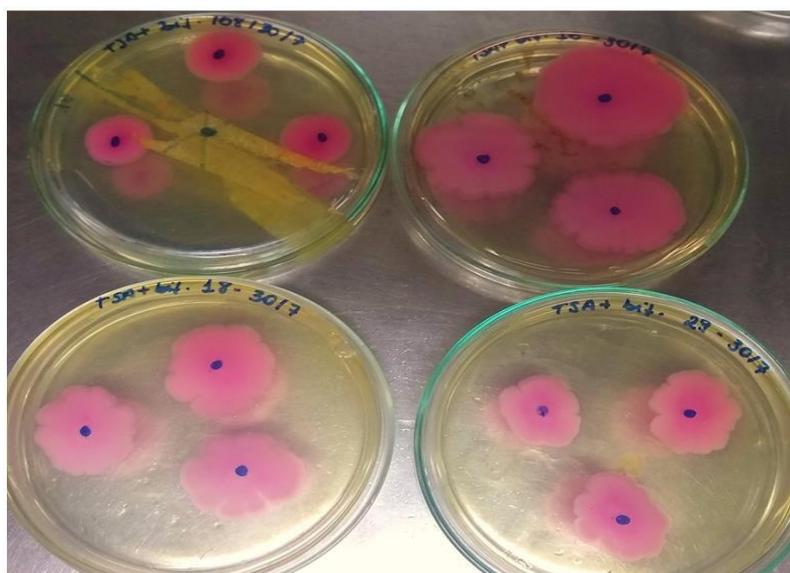
Montaldo (2016) realizou o isolamento de rizobactérias da cana de açúcar de usinas sucroalcooleiras e ao analisar a solubilização de fosfatos inorgânicos (P-Ca) observou que *B. subtilis* produz elevada taxa de solubilização ( $>501 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ).

Verma et al. (2018) isolaram espécies de *Bacillus* provenientes de fontes termais das regiões de Leh e Ladak (Índia) e observaram que, quanto a solubilização de fosfato, *Bacillus* sp. BHUJPH2, *B. licheniformis* BHUJP-H3 apresentaram respectivamente as taxas de solubilização de  $63,14 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ,  $1,42,14 \mu\text{g/mL}^{-1}$  e  $22,48 \mu\text{g/mL}^{-1}$  em 6 dias de incubação.

### 5.7 PRODUÇÃO DE FOSFATASES

No presente estudo, 58% das amostras possuíam a habilidade de produzir fosfatases após 48 horas de incubação (*Bacillus* sp. UFPEDA- 108, *Bacillus subtilis* UFPEDA- 404, *B. subtilis* UFPEDA- 434, *B. pumillus* UFPEDA- 439, *B. cereus* Ar 16 (UFPEDA 1060B), *B. cereus* Ar18 (UFPEDA 1061B) e *B. cereus* Ar29 (UFPEDA 1062B). Desta forma, pode ser demonstrado a alta capacidade dessas linhagens para tornar o fósforo (P) disponível (Ribeiro, 2010), como demonstra a Figura 15.

Figura 15 — Produção de fosfatases após 48 horas de incubação evidenciados pela cor rósea apresentada. Amostras correspondentes as linhagens *B. cereus* UFPEDA- 108, *B. cereus* Ar16 (UFPEDA 1060B), *B. cereus* (UFPEDA 1060B), *B. cereus* Ar18 (UFPEDA 1061B) e *B. cereus* Ar29 (UFPEDA 1062B).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Ribeiro et al., (2011) ao realizar isolamento de rizobactérias da *Araucaria angustifolia* detectou a produção de fosfatases em 85% dos isolados testados (96) os quais incluem *B. subtilis*. Araújo et al., (2012) também

demonstraram a produção de fosfatases de forma eficaz por cepas de *Bacillus* sp., para promoção de crescimento de *Brachiaria brizantha*.

A importância do reconhecimento de micro-organismos com atividade de conversão de elementos químicos através de ácidos orgânicos ou fosfatases (MOREIRA; ARAÚJO, 2013) de forma que os torne disponíveis para as plantas são bons exemplos de agentes promotores de crescimento vegetal, a exemplo da conversão de compostos fosfatados insolúveis em solúveis por intermédio de mineralização do fósforo orgânico bem como de rações de solubilização de fosfato inorgânico (NAHAS, 2002). E como enfatizado por Ribeiro et al. (2011) a principal forma de encontrar fosfatases no solo é por intermédio de micro-organismos.

#### 5.8 ENSAIOS DE BIOCONTROLE UTILIZANDO FUNGOS

Para a atividade de antagonismo frente a fungos fitopatogênicos do tomateiro, em ensaio de placa de Petri, 100% das linhagens de *Bacillus* foram capazes de apresentar atividade de inibição para ao menos uma linhagem fúngica em maior ou menor grau.

Contudo, 17% das linhagens de *Bacillus* conseguiram inibir o crescimento do micélio fúngico em mais de 80% para *F. solani* (URM – 5903), *F. oxysporum* (URM - 4117), *F. oxysporum* (URM – 5283), destacando-se *B. cereus* Ar16 (UFPEDA 1060B). Já para *C. atramentarium* (URM- 2597) e *Colletotrichum* sp. (UFPEDA- 2420), a maior porcentagem de antagonismo foi observada em valor superior a 70% para algumas espécies de *Bacillus* spp. deste estudo como demonstra a Tabela 9.

Tabela 9 — Atividade antimicrobiana frente a fungos fitopatogênicos do tomateiro após 6 dias de incubação. Média de inibição obtida a partir da média de três repetições e cálculo através da fórmula: (controle- tratamento) / controle x 100. Resultados expressos em (%) (YUAN et al., 2012).

Micro-organismos	C. <i>atramentarium</i> URM 2597	F. <i>solani</i> UR M 590 3	F. <i>oxysporum</i> URM 4117	F. <i>oxysporum</i> URM 5283	<i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2420
<i>B. cereus</i> UFPEDA 108	15	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 404	72	64	44	69	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 434	75	84	63,3	63,3	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 439	75	73,3	81,1	81,1	-
<i>B. pumillus</i> UFPEDA 444	-	-	19	10	-
<i>B. pumillus</i> UFPEDA 445	65	31,3	69	85	-
<i>B. pumillus</i> UFPEDA 448	73,3	74,1	41	57	-
<i>Brevibacillus parabrevis</i> sp. UFPEDA 462	-	49,3	-	-	-
<i>B. amylolequefaciens</i> UFPEDA 485	-	51	35,4	35,4	4,4
<i>B. cereus</i> Ar16 (UFPEDA 1060B)	12,5	-	-	88,2	75,5
<i>B. cereus</i> Ar18 (UFPEDA 1061B)	54,5	-	14,2	-	-
<i>B. cereus</i> Ar29 (UFPEDA 1062B)	64	-	29	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A predominância de fungos fitopatogênicos como os do gênero *Fusarium* traz consequências econômicas, como perda da produtividade por causar a chamada “murcha do *Fusarium*” e danos à saúde do hospedeiro, o tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) (ROCHA et al., 2017). O mesmo é capaz de hospedar-se no sistema vascular da planta, ou mais especificamente o xilema prejudicando o transporte de água para a parte aérea, e consequente danos às raízes, caule e folhas culminando na morte da planta (SEMINIS, 2017).

Adicionalmente, é relatado os danos causados por *Colletotricum* sp. que ocasionam podridões e lesões em toda a planta, principalmente nas raízes e partes aéreas, ocorrendo comumente em Solanáceas, onde a fitopatologia pode ser identificada também como “antracnose” (AGROLINK, 2019).

Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha et al., (2017), os quais testaram diferentes cepas de *Bacillus* em ensaio de placa de Petri para atividade de antagonismo frente à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (Fol) raças 1, 2 e 3, onde algumas cepas conseguiram máxima inibição do crescimento fúngico.

Chen et al. (2019) relataram que *Bacillus velezensis* LDO2 foi capaz de inibir diversos micro-organismos fitopatogênicos incluindo *Fusarium oxysporum* em pelo menos 79,74%. Sawant et al., (2015) identificaram *Bacillus* spp. como potenciais agentes de biocontrole da antracnose em uvas na Índia, a qual é causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, além de também inibir doenças como míldio e do oídio.

*Bacillus* spp. são relatados como produtores de diversos metabólitos antimicrobianos e lipopeptídeos com atividade antimicrobiana, este último podendo desintegrar componentes intracelulares bem como ácidos nucleicos e mitocôndrias fúngicas. Portanto, o bloqueio, a formação de aberturas na parede celular e membrana celular fúngica são mecanismos utilizados por micro-organismos que culminam a morte do fungo (ZHAO et al., 2013).

## 5.9 ENSAIOS DE BIOCONTROLE UTILIZANDO BACTÉRIAS

Após 48 horas de incubação de *X. campestris* com as cepas de *Bacillus* spp., foi possível observar que 100% das linhagens testadas foram capazes de inibir o crescimento fúngico. Todavia, a partir da análise dos halos de inibição, notou-se algumas diferenças. Por exemplo, 33% dos *Bacillus* foram

capazes de apresentar atividade de antagonismo com halos de apresentar atividade de antagonismo com halos entre 3 a 3,66 mm de diâmetro, 42% expressaram halos de 6 a 9,33 mm, ao passo que foi verificado em 25% dos *Bacillus* spp. formaram halos de 10,33 a 14 mm, destacando-se a linhagem *Bacillus pumilus* UFPEDA 439 como demonstra a Tabela 10.

Tabela 10 — Atividade antimicrobiana de *Bacillus* e *X. campestris* após 48 horas de cultivo. Média dos halos obtida após subtração do diâmetro dos halos e da colônia. Média de três repetições.

<b>Linhagens-teste</b>	<b>Halos de inibição (mm)</b>
<i>Bacillus cereus</i> UFPEDA-108	3,66
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA -404	10,33
<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA-434	7,66
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA-439	14
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA-444	9,33
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA-445	3,66
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA-448	11,6
<i>B. parabrevis</i> sp. UFPEDA- 462	3
<i>B. amyloliquefaciens</i> UFPEDA-485	3,33
<i>Bacillus cereus</i> Ar16 (UFPEDA – 1060B)	6
<i>Bacillus cereus</i> Ar18 (UFPEDA 1061B)	6,66
<i>Bacillus cereus</i> Ar29 (UFPEDA 1062B)	6,66

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são importantes causadoras de doenças em diferentes culturas agrícolas como tomate, frutos cítricos, mandioca, maracujá, arroz, dentre outros, em todos os continentes causando cerca de 350 enfermidades diferentes. Características fisiológicas próprias como propagação ágil, manuseio, perda de culturas e uso de químicos dificultam o controle por parte dos produtores. Sendo assim, tem se buscado cada vez mais alternativas sustentáveis (MARIN et al., 2019).

De acordo com Shafi et al. (2017), *Bacillus* spp. podem ser relatados como agentes de biocontrole com uma ampla faixa de ação contra fitopatógenos. Suas atribuições como promotores de crescimento vegetal

podem incluir a indução de resistência sistêmica e síntese de compostos secundários antimicrobianos como antibióticos, lipopeptídeos e enzimas. Além disso, a competição por macro e micronutrientes e habitat pode induzir uma competição com micro-organismos patogênicos.

Xie et al. (2016) demonstraram que isolados de *Bacillus* spp. da Malásia e Tibet foram capazes de inibir o crescimento de *X. oryzae* pv. *oryzae* através de compostos voláteis, destacando a atividade de *B. cereus*, o qual apresentou uma taxa de inibição de 37,5%.

Chandrasekaran et al. (2016) inocularam cepas de *B. subtilis* CBR05 em sementes de tomateiro os quais foram posteriormente expostos a *X. campestris* pv. *versicatoria* (XCV) e, através da atividade enzimática de  $\beta$ -1,3 glucanase e fenilalanina amônia liase culminou na inibição da XCV.

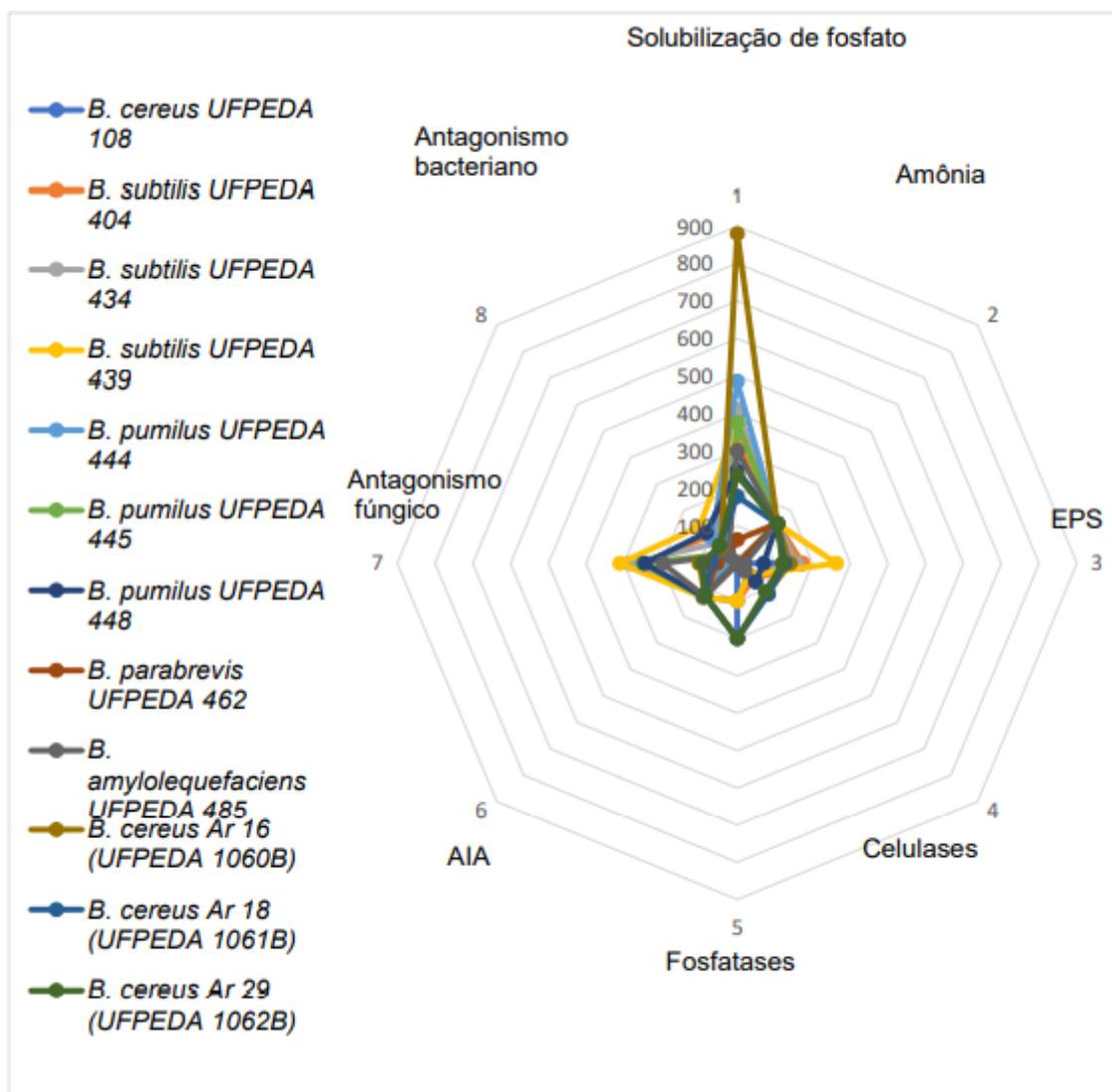
De acordo com Marin et al. (2019), dentre diversos gêneros bacterianos promotores de crescimento vegetal, *Bacillus* e *Pseudomonas* tem ganhado bastante atenção como eficazes contra diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*.

#### 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA SELEÇÃO DA (S) LINHAGEM (NS) COM MAIOR POTENCIAL PROMOVER O CRESCIMENTO VEGETAL

Com base nos dados apresentados de todos os micro-organismos analisados frente à produção de AIA, amônia, celulases, exopolissacarídeos, fosfatases, ensaios de biocontrole com fungos e bactérias fitopatogênicas, solubilização de fosfato foi possível analisar os dados por meio do Gráfico em Radar plotado no Microsoft Office Excel do Windows 10, como demonstra a Figura 16.

Figura 16 — Representação gráfica a partir dos dados de cada cepa analisada neste estudo.

Neste é possível observar que quanto mais o vértice está distante do ponto central, mas promissora é a cepa em relação aos testes realizados.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Analisando as variáveis quantitativas obtidas, é possível observar que todas as linhagens foram representativas, porém, destacando-se as linhagens *B. subtilis* UFPEDA 439, *B. cereus* Ar 16 (UFPEDA 1060B), as quais apresentam maiores distâncias do vértice em relação ao eixo central do gráfico.

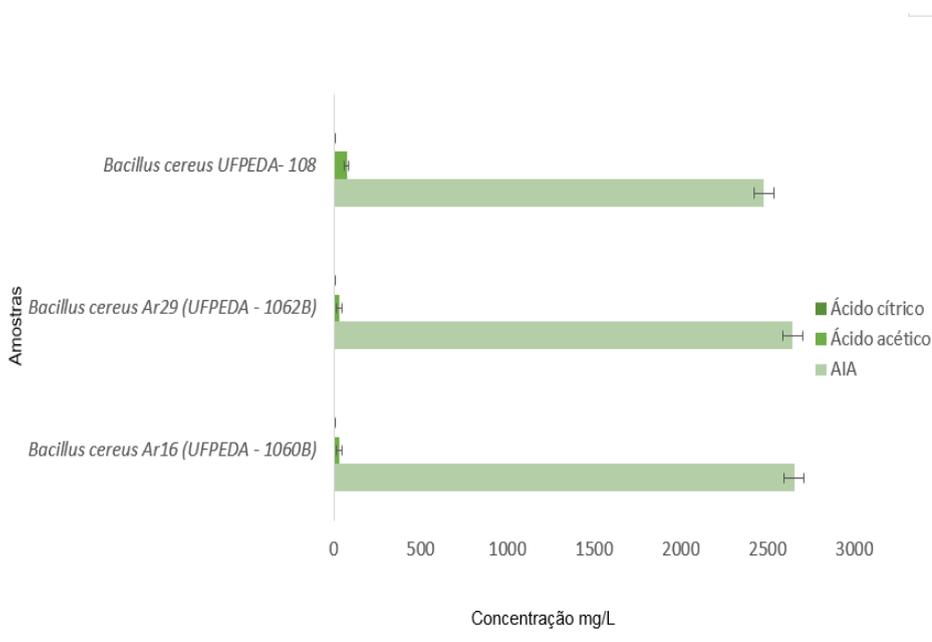
Porém, a identificação molecular e bioquímica da cepa *B. cereus* Ar 16 (UFPEDA- 1060B) já foi realizada e confirmada quando ao seu gênero e espécie. Desta forma, esta cepa juntamente com a *B. cereus* UFPEDA 108 e *B. cereus* Ar 29 (UFPEDA- 1062B) foram analisadas quanto a produção e identificação de ácidos orgânicos.

### 5.11 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Através da análise cromatográfica, pesquisou-se a produção dos seguintes ácidos: Acético, indolacético, butírico, cítrico e láctico. Destes, foi possível realizar a identificação e quantificação do ácido acético, ácido indolacético e cítrico pelas cepas de *B. cereus* Ar 16 (UFPEDA 1060B), *B. cereus* UFPEDA 108 e *B. cereus* Ar29 (UFPEDA- 1062B).

Destaca-se a produção do AIA por todos os micro-organismos analisados em relação aos demais ácidos em evidência a cepa *B. cereus* Ar 16 (UFPEDA 1060B) com produção de 2653,32 mg/L, confirmando a capacidade de produção utilizando o precursor L-triptofano (5Mm). Em relação ao ácido acético, foi possível observar uma predominância na produção de 74,11 mg/L por *B. cereus* UFPEDA 108. Neste mesmo estudo foi possível destacar que houve síntese de ácido cítrico com valores de 5.11, 4.83, 3.93 mg/L produzidos pelas linhagens *B. cereus* Ar 16 (UFPEDA 1060B), *B. cereus* UFPEDA 108 e *B. cereus* Ar29 (UFPEDA- 1062B), respectivamente como demonstra a Figura 17.

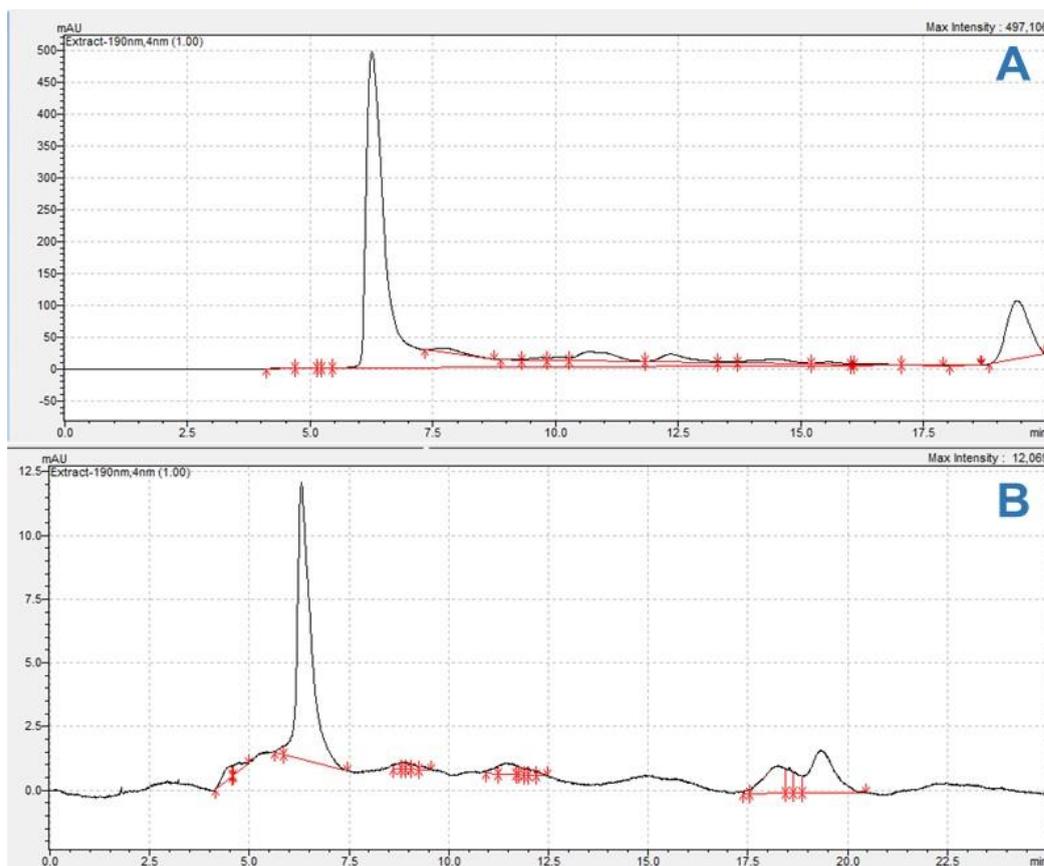
Figura 17 — Produção de ácidos orgânicos pelas linhagens de *Bacillus cereus* Ar16 (UFPEDA- 1060B), *B. cereus* Ar29 (UFPEDA- 1062B) e *B. cereus* UFPEDA- 108, neste é possível destacar a alta produção de ácido indolacético pelas três linhagens estudadas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Em adição, observar-se também as áreas de picos geradas pelo padrão utilizado de ácido indolacético, com tempo de retenção de 6,2, bem como a área de pico gerada a partir da amostra *B. cereus* Ar16, com tempo de

Figura 18 — Picos apresentados no cromatograma a partir da análise em CLAE detectando a produção de ácido indolacético em “A” o qual corresponde ao micro-organismo *Bacillus cereus* Ar16 (UFPEDA- 1060B) em comparação



retenção também em 6,2 (UFPEDA- 1060B) na Figura 18:

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com Ali et al., (2009) frequentemente há uma maior produção de hormônios fitoestimuladores produzidos por linhagens de *Bacillus sp.* rizosféricos, os quais respondem bem quando há o precursor L-triptofano, o qual faz parte dos exsudados produzidos por raízes de plantas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Shazhad et al. (2017), que identificou a produção de ácido cítrico em cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 isolados da semente de arroz, as quais produziram ácido acético e cítrico com concentração de  $0,560 \pm 0,0819$  mg/L e  $0,393 \pm 0,0251$  mg/L.

Ahmed e Hasnain (2010) também detectaram por CLAE a produção de AIA em cepas de *Bacillus* sp. rizosféricos com produção ótima a 37°C e na presença de L-triptofano como precursor.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O uso intensivo de agroquímicos em larga escala no Brasil, reforça o destino incorreto dos mesmos e os efeitos que podem causar não apenas na saúde humana, mas em todo o ecossistema. Portanto, a busca por alternativas sustentáveis, por alimentos mais saudáveis e sobretudo, leis mais rígidas em relação ao uso de agroquímicos podem contribuir significativamente para a agricultura e economia de diversos países, fornecendo inúmeros benefícios de forma positiva.
- Realizou-se de forma rápida e com sucesso a identificação, através de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI- TOFF), das cepas *Bacillus* sp. UFPEDA 462 (*Brevibacillus parabrevis*) e *Bacillus* sp. Ar16 (UFPEDA 1060B), *Bacillus* sp. Ar18 (UFPEDA 1061B), *Bacillus* sp. Ar29 (UFPEDA 1062B), *Bacillus* sp. UFPEDA 108, foram identificadas como *Bacillus cereus*. Apenas de através extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) e amplificação do gene 16S rRNA, foi possível confirmar a identificação de *Bacillus cereus* Ar16 (*Bacillus cereus*- UFPEDA 1060B).
- Todos as linhagens de *Bacillus* estudadas apresentaram ao menos a produção de três mecanismos diretos e indiretos, características de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), destacando-se as linhagens: *Bacillus subtilis* UFPEDA- 439, *B. cereus* UFPEDA- 1060B, *B. cereus* UFPEDA- 108, *B. cereus* UFPEDA- 1062B como potenciais produtoras.
- A atividade de antagonismo frente a fungos e bactérias fitopatogênicas do tomateiro (*Lycopersicum* sp.) foi observada em 100% das linhagens estudadas em menor ou maior grau, destacando-se várias linhagens frente ao micélio fúngico, sendo *B. pumilus* UFPEDA 439 como melhor resultado frente a bactérias.
- O gráfico em radar demonstrou ser uma ferramenta eficaz para analisar os micro-organismos estudados neste trabalho quanto a seus atributos como candidatos a promotores de crescimento vegetal.
- A identificação e quantificação e ácidos orgânicos produzidos pelas linhagens: *Bacillus cereus* Ar16 (UFPEDA 1060B), *B. cereus* Ar29

(UFPEDA 1062B), *B. cereus* UFPEDA 108 foi realizada com êxito por intermédio de Cromatografia líquida de alta eficiência.

## **PESPECTIVAS**

- Confirmar identificação das demais cepas estudadas via extração de ácido desoxirribonucléico (DNA).
- Realizar testes de germinação e avaliar o desenvolvimento em câmara de crescimento e casa de vegetação para análise *in vivo* do potencial das linhagens escolhidas (isoladas ou associadas) como promotoras de crescimento em tomateiro (*Lycopersicum* sp.).

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, Farah; AHMAD, Iqbal; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological research**, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.
- AHMED, A.; HASNAIN, S. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. **Pure and Applied Chemistry**, 82(1), 313-319. 2010.
- ALI, B., SABRI, A. N., LJUNG, K., & HASNAIN, S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 519, 2009.
- ALOO, B. N.; MAKUMBA, B. A.; MBEGA, E. R. The potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological research**, 2018.
- AJILOGBA, C. F.; BABALOLA, O. O.; AHMAD, F. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. **Studies on Ethno-Medicine**, v. 7, n. 3, p. 205-216, 2013.
- ARAÚJO, FF de; GUABERTO, L. M.; SILVA, IF da. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 521-527, 2012.
- ASH, C., FARROW, J. A., DORSCH, M., STACKEBRANDT, E., & COLLINS, M. D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 343-346, 1991.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 11, p. 1559-1570, 2010.
- BACKER, R., ROKEM, J. S., ILANGUMARAN, G., LAMONT, J., PRASLICKOVA, D., RICCI, E., ... & SMITH, D. L.. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 9, 2018.
- BAI, Yuming; ZHOU, Xiaomin; SMITH, Donald L. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop science**, v. 43, n. 5, p. 1774-1781, 2003.
- BANERJEE, S., PALIT, R., SENGUPTA, C., & STANDING, D. Stress induced phosphate solubilization by 'Arthrobacter' Sp. And 'Bacillus' sp. isolated from tomato rhizosphere. **Australian Journal of crop science**, v. 4, n. 6, p. 378, 2010.
- BARON, S. **Epidemiology - Medical Microbiology**. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- BARTON, Charles J. Photometric analysis of phosphate rock. **Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 1068-1073, 1948.
- BATISTA, Bruna Durante. **Promoção de crescimento vegetal por Bacillus sp. RZ2MS9: dos genes ao campo**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BEHERA, B. C., SETHI, B. K., MISHRA, R. R., DUTTA, S. K., & THATOI, H. N. Microbial cellulases—Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197-210, 2017.
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J; BAKKER, P. A. H .M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

CAMPOS, D. C., ACEVEDO, F., MORALES, E., ARAVENA, J., AMIARD, V., JORQUERA, M. A., ... & RUBILAR, M. Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 2371-2378, 2014.

CAPPUCCINO, J.C, SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual**. New York: Longman; 1992

CARRER FILHO, R., CARRER FILHO, R., DIANESE, É. D. C., & CUNHA, M. G. D. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, 2015.

CASTRO, R. A., QUECINE, M. C., LACAVALA, P. T., BATISTA, B. D., LUVIZOTTO, D. M., MARCON, J., ... & AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 382, 2014.

CAPUTO, P., DI MARTINO, M. C., PERFETTO, B., LOVINO, F., & DONNARUMMA, G.. Use of MALDI-TOF MS to Discriminate between Biofilm-Producer and Non-Producer Strains of *Staphylococcus epidermidis*. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 8, p. 1695, 2018.

CHANDRASEKARAN, M., BELACHEW, S. T., YOON, E., & CHUN, S. C. Expression of  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Journal of general plant pathology**, v. 83, n. 1, p. 7-13, 2017.  
CHEN, L., SHI, H., HENG, J., WANG, D., & BIAN, K. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. **Microbiological research**, v. 218, p. 41-48, 2019.

DA SILVA, C. F., VITORINO, L. C., SOARES, M. A., & SOUCHIE, E. L. et al. Multifunctional potential of endophytic and rhizospheric microbial isolates associated with *Butiapurpurascens* roots for promoting plant growth. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-18, 2018.

DEKA, P., GOSWAMI, G., DAS, P., GAUTOM, T., CHOWDHURY, N., BORO, R. C., & BAROOAH, M. Bacterial exopolysaccharide promotes acid tolerance in *Bacillus amyloliquefaciens* and improves soil aggregation. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 1, p. 1079-1091, 2019.

De Vos, P., & Garrity, G. M. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer.  
DEY, R. K. K. P., PAL, K. K., BHATT, D. M., & CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 2004, 159.4: 371-394.

DO PRADO, D. Z., OKINO-DELGADO, C. H., ZANUTTO-ELGUI, M. R., DA SILVA, R. B. G., PEREIRA, M. S., JAHN, L., ... & FLEURI, L. F. Screening of *Aspergillus*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains and influence of substrates on auxin and phytases production through solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101165, 2019.

DIONÍSIO, J. A., PIMENTEL, I. C., SIGNOR, D., DE PAULA, A. M., MACEDA, A., & MATANNA, A. L. Guia prático de biologia do solo. **Embrapa Semiárido-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2016.

DUTTA, S., PODILE, A. R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. **Critical reviews in microbiology**, v. 36, n. 3, p. 232-244, 2010.

EK-RAMOS, M. J., GOMEZ-FLORES, R., OROZCO-FLORES, A. A., RODRÍGUEZ-PADILLA, C., GONZÁLES-OCHOA, G., & TAMEZ-GUERRA, P. Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.

EL-KOMY, Hesham. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. **Food technology and biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 19-27, 2005.

FERREIRA, C. M., SOARES, H. M., & SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: an insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. 2019.

FIRA, D., DIMKIĆ, I., BERIĆ, T., LOZO, J., & STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FRANK, A., GUZMÁN, J. S., SHAY, J. Transmission of bacterial endophytes. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 70, 2017.

GARCÍA-FRAILE, P., MENÉNDEZ, E., RIVAS, R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. 2015

GEDDIE, J. L., SUTHERLAND, I. W. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 4, p. 467-472, 1993.

GHYSELINCK, J., VELIVELLI, S. L., HEYLEN, K., O'HERLIHY, E., FRANCO, J., ROJAS, M., ... & PRESTWICH, B. D. Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 2, p. 116-127, 2013.

GLICK, Bernard R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014. GOVINDASAMY, Venkadasamy et al. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In: **Plant growth and health promoting bacteria**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 333-364.

HAMEEDA, B., REDDY, Y. H. K., RUPELA, O. P., KUMAR, G. N., & REDDY, G. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. **Current microbiology**, v. 53, n. 4, p. 298-302, 2006.

IBRAHIM, M. H., CRESS, B. F., LINHARDT, R. J., KOFFAS, M. A., & GROSS, R. A. Draft Genome Sequence of *Bacillus subtilis* Ia1a, a New Strain for Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid and Exopolysaccharide Production. **Genome Announc.**, v. 4, n. 6, p. e01361-16, 2016.

IGIEHON, N. O.; BABALOLA, Olubukola O. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 12, p. 4871-4881, 2017.

ISFAHANI, F. M., TAHMOURESPOUR, A., HOODAJI, M., ATAABADI, M., & MOHAMMADI, A. et al. Characterizing the new bacterial isolates of high yielding exopolysaccharides under hypersaline conditions. **Journal of cleaner production**, v. 185, p. 922-928, 2018.

JOHNSEN, H., KRAUSE, K. Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 1, p. 830-838, 2014.

KAVAMURA, V. N., SANTOS, S. N., DA SILVA, J. L., PARMA, M. M., ÁVILA, L. A., VISCONTI, A., ... & DE MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

KASANA, R. C., SALWAN, R., DHAR, H., DUTT, S., & GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KAUR, H., KAUR, J., GERA, R. Plant growth promoting rhizobacteria: a boon to agriculture. **Int J Cell Sci Biotechnol**, v. 5, p. 17-22, 2016.

KOCHIAN, L. V. Plant nutrition: rooting for more phosphorus. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 466, 2012.

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. **Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. Ed. Médica Panamericana, 2008.

KORIR, H., MUNGAI, N. W., THUITA, M., HAMBIA, Y., & MASSO, C. Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 141, 2017.

LADEIRA, S. A., CRUZ, E., DELATORRE, A. B., BARBOSA, J. B., & LEAL MARTINS, M. L. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic journal of biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 110-115, 2015.

LANGE, C. C., BRITO, M. A., BRITO, J. R., ARCURI, E. F., SOUZA, G. N., MACHADO, M. A., ... & SALIMENA, A. P. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.

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

LASTOCHKINA, O., PUSENKOVA, L., YULDASHEV, R., BABAEV, M., GARİPOVA, S., BLAGOVA, D. Y., ... & ALINIAEIFARD, S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. **Plant physiology and biochemistry**, v. 121, p. 80-88, 2017.

LEAL, M. C., et al. PROVAS BIOQUÍMICAS: ELABORAÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO. **Encontros Universitários da UFC**, v. 1, n. 1, p. 3173.

LIMA-NETO, R., SANTOS, C., LIMA, N., SAMPAIO, P., PAIS, C., & NEVES, R. P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

LIN, G. H., CHANG, C. Y., LIN, H. R. Systematic profiling of indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteria using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 988, p. 53-58, 2015.

LINS, M. R. C. R. **Seleção de actinobactérias da rizosfera da caatinga com potencial para promoção de crescimento vegetal**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

LIU, J., WANG, X., PU, H., LIU, S., KAN, J., & JIN, C. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydrate polymers**, v. 157, p. 1113-1124, 2017.

LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API system. **Microbiology**, v. 130, n. 7, p. 1871-1882, 1984.

MA, X., WANG, X., CHENG, J., NIE, X., YU, X., ZHAO, Y., & WANG, W. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctoniasolanin* tomato. **Biological Control**, v. 90, p. 34-41, 2015.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., & STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 58.

- MARCHIORO, L. E. T. PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E DERIVADOS POR BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO. Dissertação (Dissertação em Microbiologia). UFPR – Curitiba. p, 24. 2005.
- MALAVOLTA, E., VITTI, G. C., OLIVEIRA, S.A. Metodologia para análise de elementos em material vegetal. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**, v. 2, p. 231-308, 1997.
- MARCHIORO, L. E. T. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Dissertação de Mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2005.
- MARIN, V. R., FERRAREZI, J. H., VIEIRA, G., & SASS, D. C. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 72, 2019.
- MARVASI, M., VISSCHER, P. T., MARTINEZ, L. C. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. **FEMS microbiology letters**, v. 313, n. 1, p. 1-9, 2010.
- MONTALDO, Y. C. **Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal**. 2016. 101 f. Tese (Doutorado em Rede Nordeste de Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.
- MONTEIRO, L. Produção de Substâncias biotivas de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Tese de msc. 2002.
- MOREIRA, A. L. L., ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.
- MORIKAWA, M., KAGIHIRO, S., HARUKI, M., TAKANO, K., BRANDA, S., KOLTER, R., & KANAYA, S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces  $\gamma$ -polyglutamate. **Microbiology**, v. 152, n. 9, p. 2801-2807, 2006.
- Mumtaz, M. Z., Ahmad, M., Jamil, M., & Hussain, T. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. **Microbiological research**, v. 202, p. 51-60, 2017.
- NADEEM, S. M., AHMAD, M., NAVEED, M., IMRAN, M., ZAHIR, Z. A., & CROWLEY, D. E. Relationship between in vitro characterization and comparative efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria for improving cucumber salt tolerance. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 4, p. 379-387, 2016.
- NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 267-275, 2002.
- NAIN, L., YADAV, R. C., SAXENA, J. Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi-arid deserts. **Applied soil ecology**, v. 59, p. 124-135, 2012.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170. p. 265- 270, 1999.
- NAVEED, M., QURESHI, M. A., ZAHIR, Z. A., HUSSAIN, M. B., SESSITSCH, A., MITTER, B. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1381-1389, 2015.
- NINGTHOUJAM, S., SANASAM, S., TAMREIHAO, K., & NIMAICH, S. Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens. **African journal of microbiology research**, v. 3, n. 11, p. 737-742, 2009.

- OLANREWAJU, O. S., GLICK, B. R., & BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(11), 197. 2017.
- PANE, C., VILLECCO, D., CAMPANILE, F., & ZACCARDELLI, M. Novel strains of Bacillus, isolated from compost and compost-amended soils, as biological control agents against soil-borne phytopathogenic fungi. **Biocontrol science and technology**, v. 22, n. 12, p. 1373-1388, 2012.
- PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 4, p. 564-572, 2013.
- PAUKER, V. I., THOMA, B. R., GRASS, G., BLEICHERT, P., HANCZARUK, M., ZÖLLER, L., & ZANGE, S. Improved discrimination of Bacillus anthracis from closely related species in the Bacillus cereus sensu lato group based on matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 5, p. e01900-17, 2018.
- PAULO, E. M. VASCONCELOS, M. P., OLIVEIRA, I. S., AFFE, H. M. D. J., NASCIMENTO, R., MELO, I. S. D., ... & ASSIS, S. A. D. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 710-714, 2012.
- 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**, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.
- PRASAD, R., KUMAR, M., VARMA, A. Role of PGPR in soil fertility and plant health. In: **Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants**. Springer International Publishing, 2015. p.247-260.
- RADHAKRISHNAN, R., HASHEM, A., ABD\_ALLAH, E. F. Bacillus: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 667, 2017.
- RAI, A., NABTI, E. Plant Growth-Promoting Bacteria: Importance in Vegetable Production. In: **Microbial Strategies for Vegetable Production**. Springer, Cham, 2017. p. 23-4.
- REINHOLD-HUREK, B., HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.
- RIBEIRO, C. M., CARDOSO, Nogueira, E. J. B. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (Araucaria angustifolia). **Microbiological Research**, v. 167, n. 2, p. 69-78, 2012.
- ROCHA, F. Y. O. OLIVEIRA, C. M., SILVA, P. R. A., MELO, L. H. V., CARMO, M. G. F., & BALDANI, J. I. Taxonomical and functional characterization of Bacillus strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici. **Applied soil ecology**, v. 120, p. 8-19, 2017.
- RODRIGUES, R. B., OZORIO, L. M., PINTO, C. D. L. B., & BRANDÃO, L. E. T. Opção de troca de produto na indústria de fertilizantes. **Revista de Administração**, v. 50, n. 2, p. 129-140, 2015.
- ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- ROMERO, D., VICENTE, A., RAKOTOALY, R. H., DUFOUR, S. E., VEENING, J. W., ARREBOLA, E., ... & PÉREZ-GARCÍA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of Bacillus subtilis toward Podosphaerafusca. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 430-440, 2007.

- RUSSO, M. L., PELIZZA, S. A., VIANNA, M. F., ALLEGRUCCI, N., CABELLO, M. N., TOLEDO, A. V., ... & SCORSETTI, A. C. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. **Journal of King Saud University-Science**, 2018.
- RYDER, C., BYRD, M., WOZNIAK, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 644-648, 2007.
- SAMBROOK, J. R. D. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual. Third edition Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor NY**, p. 17.18-17.22. 2001.
- SANDHYA, V. Z. A. S., GROVER, M., REDDY, G., & VENKATESWARLU, B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. **Biology and fertility of soils**, v. 46, n. 1, p. 17-26, 2009.
- SAWANT, I. S., WADKAR, P. N., RAIGURU, Y. R., MHASKE, N. H., SALUNKHE, V. P., SAWANT, S. D., & UPADHYAY, A. Biocontrol potential of two novel grapevine associated *Bacillus* strains for management of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 7, p. 964-979, 2016.
- SAUER, S., Kliem, M. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 397- 402, 2012.
- 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.
- SHARMA, S. B., SAYYED, R. Z., TRIVEDI, M. H., & GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.
- SHAHZAD, R., KHAN, A. L., BILAL, S., ASAF, S., & LEE, I. J. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **PeerJ**, v. 5, p. e3107, 2017.
- SILAMBARASAN, S., LOGESWARI, P., CORNEJO, P., & KANNAN, V. R. Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 55-62, 2019.
- SINDHU, S. S., DADARWAL, K. R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicer* in chickpea. **Microbiological Research**, v. 156, n. 4, p. 353-358, 2001.
- SINGH, J. S., PANDEY, V. C., SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 140, n. 3-4, p. 339-353, 2011.
- SILVI, S., BARGHINI, P., AQUILANTI, A., JUAREZ-JIMENEZ, B., & FENICE, M. Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 10, 2013.
- SOLANKI, M. K., SINGH, R. K., SRIVASTAVA, S., KUMAR, S., KASHYAP, P. L., & SRIVASTAVA, A. K. Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus* strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 1, p. 82-90, 2015.
- SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J., REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

STAROSTIN, K. V., DEMIDOV, E. A., BRYANSKAYA, A. V., EFIMOV, V. M., ROZANOV, A. S., & PELTEK, S. E. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. **Scientific reports**, v. 5, p. 16989, 2015.

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

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M., & MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEN, L. N., IM, W. T., KIM, M. K., KANG, M. S., & LEE, S. T. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 375-382, 2004.

TEATHER, R. M., WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

THOMAS, L., RAM, H., SINGH, V. P. Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 2, p. 429-442, 2018.

TIMMUSK, S., BEHERS, L., MUTHONI, J., MURAYA, A., & ARONSSON, A. C Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 49, 2017.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia. In: **Microbiologia**. 2012. ULRICH, S., GOTTSCHALK, C., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E., & GAREIS, M. Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. **Food microbiology**, v. 82, p. 75-81, 2019.

VAFADAR, F., AMOOAGHAIE, R., OTROSHY, M. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. **Journal of plant interactions**, v. 9, n. 1, p. 128-136, 2014.

VERMA, J. P., JAISWAL, D. K., KRISHNA, R., PRAKASH, S., YADAV, J., & SINGH, V. et al. Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh Region of India. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

VERMA, S. C., LADHA, J. K., TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

VIEIRA, R. F. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, 2017.

VIMAL, J., VENU, A., JOSEPH, J. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria and optimization of the cellulase production. **Int J Res Biosciences**, v. 5, n. 3, p. 58-67, 2016.

YUAN, J., RAZA, W., SHEN, Q., & HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 16, p. 5942-5944, 2012.

Xie, S., Zang, H., Wu, H., Uddin R. F., & Gao, X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular plant pathology**, 19(1), 49-58.

ZHAO, X., ZHOU, Z. J., HAN, Y., WANG, Z. Z., FAN, J., & XIAO, H. Z Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. **Microbiological research**, v. 168, n. 9, p. 598-606, 2013.

ZOUARI, I., JLAIEL, L., TOUNSI, S., & TRIGUI, M. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. **Biologicalcontrol**, v. 100, p. 54-62,2016.

AGEITEC- Agência Embrapa de informação tecnológica. **Agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_40\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html)>. Acesso em: 03 de maio de 2018.

AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Árvore do conhecimento: Tomate**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tomate/arvore/CONT000fa2gor2u02wx5eo01xezlsfsc150.html>>. Acesso em: 04 de maio de 2018.

AGEITEC. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Árvore do conhecimento: Agricultura e Meio Ambiente - Controle Biológico**. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_2\\_210200792813.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_2_210200792813.html)>. Acesso em: 21 de junho de 2019.

AGROLINK. Problemas: Antracnose. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/problemas/antracnose\\_1940.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/antracnose_1940.html)>. Acesso em: 01 de agosto de 2019.

ANA. **Agência Nacional das Águas: Agrotóxicos violam direito humano à alimentação adequada**. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/noticias-antigas/agrota3xicos-violam-direito-humano-a.2019-03-15.0674600661>>. Acesso em: 03 de junho de 2019.

ELEVAGRO. **Bacillus: Capacidades e benefícios**. Disponível: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/bacillus-capacidades-e-beneficios/>>. Acesso em: 24 de junho de 2020.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Cientistas usam bactérias para ajudar plantas a resistir à seca**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/22885691/cientistas-usam-bacterias-para-ajudar-plantas-a-resistir-a-seca>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Controle biológico**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso em: 07 de julho de 2019.

GLOBO CIÊNCIA. **Amônia é uma das substâncias mais produzidas em todo o mundo**. Disponível em: <[redeglobo.globo.com/globociencia/noticia/2011/07/amonia-e-uma-das-substancias-mais-produzidas-em-todo-o-mundo.html](http://redeglobo.globo.com/globociencia/noticia/2011/07/amonia-e-uma-das-substancias-mais-produzidas-em-todo-o-mundo.html)>. Acesso em: 13 de junho de 2019.

Governo do Brasil. **Superação no campo: Faturamento da agropecuária brasileira bate recorde em 2019**. Disponível em : <https://www.gov.br/pt-br/noticias/financas-impostos-e-gestao-publica/faturamento-da-agropecuaria-brasileira-bate-recorde-em-2019>. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

Hortifruti Brasil – **Anuário 2019- 2020**. Disponível em:

<<https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2019-2020-retrospectiva-2019-perspectivas-2020-dos-hf-s.aspx>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2020.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em:<<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/188#resultado>; <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/19942-em-janeiro-ibge-preve-safra-6-0-inferior-a-de-2017.html>> Acesso em: 04 de maio de 2018.

IBGE. **Agência IBGE de notícias: Em janeiro, IBGE prevê alta de 1,9% na safra de grãos de 2019**. Disponível em: < <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/23774-em-janeiro-ibge-preve-alta-de-1-9-na-safra-de-graos-de-2019>>. Acesso em: 03 de junho de 2019.

NANOCELL. **O Jornal eletrônico do instituto Nanocell: MALDI-TOF: Uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer**. Disponível em:< <https://www.nanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>>. Acesso em: 31 de julho de 2019.

REDE BRASIL ATUAL. **Saiba por que o pacote de veneno é ruim para o Brasil**. Disponível em: < <https://www.redebrasilatual.com.br/ambiente/2018/06/saiba-por-que-o-pacote-do-veneno-e-pessimo-para-o-brasil/>>. Acesso em: 04 de junho de 2019.

SEMINIS. **Diferenças entre as murchas causadas por Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici e Ralstonia solanacearum em tomateiro**. Disponível em: < <https://www.seminis.com.br/diferencas-entre-murchas-causadas-por-fusarium-oxysporum-f-sp-lycopersici-e-ralstonia-solanacearum-em-tomateiro/>>. Acesso em: 01 de agosto de 2019.

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA (SIDRA). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>> . Acesso em : 15 de janeiro de 2020.

TREVISAN, L. R. P.; BAPTISTA, G. C. **Resíduos agrotóxicos podem constituir barreira à exportação**. Disponível em:<<http://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va07-seguranca07.pdf>>. Acesso em: 30 de maio de 2019.