

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

KAUANE CHICORA

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E
TOLERANTES A ESTRESSE HÍDRICO EM SOLOS DOS CAMPOS GERAIS DO
PARANÁ (BRASIL)

PONTA GROSSA

2024

KAUANE CHICORA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E
TOLERANTES A ESTRESSE HÍDRICO EM SOLOS DOS CAMPOS GERAIS DO
PARANÁ (BRASIL)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração de Caracterização da Biodiversidade).

Orientadora: Prof^a. Dra. Jesiane S. da Silva Batista

PONTA GROSSA

2024

Chicora, Kauane

C533 Bioprospecção de bactérias solubilizadoras de fosfato e tolerantes a estresse hídrico em solos dos Campos Gerais do Paraná (Brasil) / Kauane Chicora. Ponta Grossa, 2024.
77 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jesiane Stefânia da Silva Batista.

1. Estresse osmótico. 2. Rizosfera. 3. Campos nativos. 4. Diversidade. I. Batista, Jesiane Stefânia da Silva. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.T.

CDD: 574.87



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

*Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta
Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e
Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)*



PPG - Biologia Evolutiva

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2024

Ata referente a Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata Kauane Chicora. Aos vinte dias do mês de setembro, sob a presidência da Profa Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da defesa de Dissertação de Mestrado da aluna, **Kauane Chicora** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, constituída pela Dra. Milena Serenato Klepa (membro titular), Dr. Luiz Ricardo Olchanheski (membro titular) e Dr. Rafael Bertoni da Silveira (membro suplente), atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e à candidata das normas que regem a defesa de Dissertação. A seguir a candidata passou a defesa da sua Dissertação intitulada: “Caracterização de mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas por rizobactérias isoladas de solos dos Campos Gerais do Paraná (Brasil)”. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou a candidata **APROVADA**.

Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: Caracterização de mecanismos envolvidos na promoção do crescimento de plantas por rizobactérias sob estresse osmótico.

Ponta Grossa, 20 de setembro de 2024.

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br **MILENA SERENATO KLEPA**
Data: 23/09/2024 10:12:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br **LUIZ RICARDO OLCHANHESKI**
Data: 07/10/2024 22:35:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br **JESIANE STEFANIA DA SILVA BATISTA**
Data: 08/10/2024 16:29:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e Nossa Senhora, por serem meu porto seguro e minha fonte de força e esperança em todos os momentos. A Suas presenças me guiaram e sustentaram ao longo desta jornada, e sou profundamente grata por cada conquista alcançada e sei que sem vocês não seria nada.

Aos meus pais, Ana Maria e Ivo, e minha irmã Yasmin que sempre acreditaram em mim, ofereceram seu apoio incondicional e me ensinaram o valor da perseverança e do trabalho duro. A vocês, minha eterna gratidão pelo amor e dedicação que me impulsionaram a seguir em frente. Vocês são meus maiores exemplos na vida e eu jamais teria chegado até aqui sem vocês. Muito obrigada por tudo! Amo vocês!

Ao meu namorado Ryan, pelo carinho, paciência, ajuda em feriados, fim de semana, altas horas da noite, amor e compreensão em todos os momentos desafiadores. Seu apoio e incentivo foram essenciais para que eu conseguisse manter o equilíbrio e concluir esta etapa da minha vida. Meu amor, muito obrigada por ser meu ponto de paz e alegria!

Agradeço profundamente à mulher incrível e inspiração que é minha orientadora, Jesiane, minha segunda mãe. Obrigada pela orientação, sabedoria e incentivo ao longo deste trabalho. Sua dedicação, carinho, paciência e conhecimento foram fundamentais para deixar tudo mais leve, mesmo em momentos onde tudo estava desmoronando. Jamais vou esquecer de tudo que fez por mim e espero ser esse exemplo de pessoa para alguém um dia.

Aos meus amigos de laboratório, Joyce, Lilyan, Thiago, Fátima e Rosana que esteve comigo no início, obrigada por fazerem parte desta jornada, compartilhando momentos de desafios e, principalmente, companheirismo. Em especial, agradeço à Letícia, por seu apoio constante, amizade sincera e ajuda incansável em todos os momentos. Foi muito mais leve a caminhada ao lado de vocês.

A todos os meus amigos que, de diferentes formas, me apoiaram ao longo da trajetória, meu sincero agradecimento. Cada palavra de incentivo e gesto de amizade fez toda a diferença nesta caminhada em especial a Lethicia e Gabriel que sempre se fazem presente e me incentivam.

Aos representantes de minha banca avaliadora, sou grata pela disponibilidade e por aceitarem fazer parte deste momento com sugestões, que enriquecem este trabalho e me ajudaram a evoluir.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao PPG Biologia Evolutiva pela grande oportunidade de realizar essa pesquisa, meus professores durante esses anos, a Embrapa Soja, a UEL, ao Laboratório de Genética e Evolução, ao LABMOM, ao Laboratório de Microbiologia, ao Prof^o Dr^o Rafael Bertoni, a Prof^a Dr^a Elisete Rodrigues, Prof^o Dr^o Ricardo Olchanheski e a Prof^a Dr^a Carolina Weigert Galvão, por todos os equipamentos e reagentes cedidos, pelos experimentos e análises realizadas.

Por fim, agradeço a todos que estiveram em minha caminhada e que contribuíram de alguma forma para o enriquecimento deste trabalho e para minha formação.

RESUMO

A rizosfera é a região do solo em íntimo contato com as raízes das plantas, caracterizada por possuir intensa atividade microbiana devido à presença de exsudatos radiculares. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) desempenham um papel crucial na promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal, por meio de diversos mecanismos como a solubilização de fósforo (P), produção de hormônios vegetais, fixação de nitrogênio, proteção contra fitopatógenos e por mediar resistência a estresses bióticos e abióticos. No atual cenário de emergências climáticas, isolar e caracterizar RPCP capazes de manter suas atividades promotoras do crescimento mesmo em condições de estresses abióticos, em especial hídrico e osmótico, consolida-se como importante estratégia tecnológica. O objetivo deste trabalho foi a caracterização dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas por rizobactérias isoladas de milho (*Zea mays*), cultivado em três solos de Campos Nativos com diferentes históricos de uso (área de preservação, área de restauração e área agrícola). Foram selecionadas 40 estirpes que destacaram-se por possuírem eficiência no crescimento em meio contendo sorbitol juntamente com a presença de halos de solubilização de P no menor período de tempo e crescimento em meio com baixa atividade de água. Dos isolados identificados, destacaram-se os gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*, com maior número de representantes. A capacidade de produção de sideróforos foi detectada em 26 destes isolados. A solubilização de P foi avaliada em meio líquido + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, onde as estirpes de *Pseudomonas* se destacaram, com índices de solubilização entre 149,3 a 204,2 mg/L após 72 horas de incubação. A tolerância ao estresse osmótico foi avaliada pela razão do crescimento bacteriano em diferentes concentrações de PEG 6000 (11%; 21% e 26%), onde os maiores valores foram observados na concentração de 11% de PEG 6000. Além disso, a produção de ácido indolacético (AIA) foi verificada em 36 das 40 estirpes, indicando o potencial dessas bactérias em promover o crescimento vegetal, mesmo em condições de estresse osmótico. Por fim, 33 isolados produziram exopolissacarídeos (EPS) e apenas um isolado não produziu biofilme em meio TSB. Com base nas análises fenotípicas, foram selecionados isolados para ensaio em casa de vegetação (experimento em andamento). Ainda, estes dados nos permitem inferir o potencial biotecnológico de bactérias nativas para a promoção do crescimento vegetal, que possuem relevância reconhecida para utilização tanto em agroecossistemas como para estratégias ativas de restauração ecológica.

Palavras-chave: Estresse osmótico; rizosfera; Campos Nativos; diversidade.

ABSTRACT

The rhizosphere is the region of soil in close contact with plant roots, characterized by intense microbial activity due to the presence of root exudates. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) play a crucial role in enhancing plant growth and development through various mechanisms, such as phosphorus (P) solubilization, production of plant hormones, nitrogen fixation, protection against phytopathogens, and mediation of resistance to biotic and abiotic stresses. In the context of climate emergencies, isolating and characterizing PGPR capable of maintaining growth-promoting activities under abiotic stress conditions, particularly water and osmotic stress, has become an essential technological strategy. The objective of this study was to characterize the mechanisms involved in plant growth promotion by rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays*) cultivated in three native grassland soils with different land-use histories (preservation area, restoration area, and agricultural area). Forty strains were selected for their efficiency in growing in sorbitol-containing medium, along with the presence of P-solubilization halos in the shortest time and tolerance to osmotic stress. Among the identified isolates, the genera *Pseudomonas* and *Enterobacter* were prominent, with the highest number of representatives. Siderophore production was detected in 26 of these isolates. Phosphorus solubilization was evaluated in liquid medium + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, where *Pseudomonas* strains stood out, with solubilization indices ranging from 149.3 to 204.2 mg/L after 72 hours of incubation. Osmotic stress tolerance was assessed by measuring bacterial growth at different concentrations of PEG 6000 (11%, 21%, and 26%), with the highest values observed at 11% PEG 6000. Additionally, indole-3-acetic acid (IAA) production was detected in 36 of the 40 strains, indicating the potential of these bacteria to promote plant growth even under osmotic stress conditions. Furthermore, 33 isolates produced exopolysaccharides (EPS), and only one isolate did not produce biofilm in TSB medium. Based on phenotypic analyses, isolates were selected for greenhouse experiments (ongoing). These findings underscore the biotechnological potential of native bacteria for plant growth promotion, highlighting their relevance for use in both agroecosystems and active ecological restoration strategies.

Keywords: Osmotic stress; rhizosphere; Native Fields; diversity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de solubilização/mineralização de fosfato que podem ser desempenhados por RPCP.....	15
Figura 2. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais. As estirpes estão separadas por gêneros. Barras amarelas indicam estirpes produtoras de sideróforos e barras azuis indicam resultado negativo.	41
Figura 3. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de AlPO_4 , mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais. O resultado do teste de Tukey está representado pelas letras acima das barras.	42
Figura 4. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de FePO_4 , mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais.	43
Figura 5. Atividade da enzima fosfatase ácida produzida por BSP isoladas da rizosfera de milho.....	43
Figura 6. Índices de formação de biofilme (BI) em meio TSB e produção de EPS por rizobactérias isoladas em rizosfera de milho cultivado em diferentes solos dos Campos Gerais do Paraná.	44
Figura 7. Produção de AIA (ug/ml) em TSB+triptofano, produzido por rizobactérias isoladas dos Campos Gerais.	45
Figura 8. Valores de AIA (ug) produzidos pelos isolados dos Campos Gerais, sob condições de estresse osmótico gerado por PEG 11%, 21 e 26%.	47
Figura 9. Crescimento bacteriano em PEG 11%, 21% e 26% após 48 horas de crescimento.	48
Figura 10. Valores de BI dos isolados dos Campos Gerais em estresse induzido por PEG 11%, 21% e 26% e meio controle.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação molecular baseada em sequencias parciais do gene 16S rDNA de bactérias rizosféricas.....	38
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 INTERAÇÃO PLANTA-MICRORGANISMOS	11
2.2 A RIZOSFERA COMO HABITAT MICROBIANO	11
2.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCP)	12
2.3.1 Diversidade Genética De RPCP	13
2.4 DIVERSIDADE FUNCIONAL DE RPCP	14
2.4.1 Solubilização E Mineralização De P	14
2.4.2 Produção De Sideróforos	16
2.4.3 Síntese De Compostos Indólicos	16
2.4.4 Produção De Substâncias Poliméricas Extracelulares E Biofilme	17
3 JUSTIFICATIVA	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5 MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1 CARACTERÍSTICAS DAS ÁREAS DE COLETA DO SOLO	22
5.2 OBTENÇÃO DE SOLO DA RIZOSFERA DE MILHO (<i>ZEAMAYS</i>).....	22
5.3 ISOLAMENTO INICIAL DE BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS.....	23
5.4 SELEÇÃO QUALITATIVA DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E TOLERANTES AO ESTRESSE OSMÓTICO.....	23
5.5 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS.....	24
5.5.1 Extração Do DNA Total, Sequenciamento Do Gene 16S Dnar E Identificação Molecular Dos Isolados	24
5.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS	25
5.6.1 Quantificação Da Solubilização De Ca_3PO_4	25
5.6.2 Produção De Sideróforos.....	26
5.6.3 Produção De Biofilme E EPS.....	26
5.6.4 Quantificação Da Solubilização De Fosfato De Ferro E Alumínio.....	27
5.6.5 Atividade Da Enzima Fosfatase Ácida Em Cultivos Isolados	27
5.6.6 Respostas À Tolerância Ao Estresse Osmótico Induzido Por Polietilenoglicol (PEG) ..	28
5.6.7 Análise Estatística Das Variáveis Fenotípicas	29

6 DIVERSIDADE E ATIVIDADE PROMOTORA DO CRESCIMENTO DO MILHO (ZEA MAYS) DE RIZOBACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO	30
6.1 INTRODUÇÃO.....	31
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
6.2.1 Obtenção De Solo Rizosférico De Milho (<i>Zea Mays</i>).....	32
6.2.2 Isolamento e triagem das BSP resistentes a estresse osmótico	33
6.2.3 Identificação Molecular Dos Isolados	34
6.2.4 Quantificação Da Solubilização De Fosfato De $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Dos Isolados	34
6.2.5 Produção De Sideróforos.....	35
6.2.6 Produção De Biofilme E EPS.....	35
6.2.7 Determinação De P Disponível Em Meios De Cultura Líquidos Com $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ E FePO_4 E Atividade Da Enzima Fosfatase.....	35
6.2.8 Respostas À Tolerância Ao Estresse Osmótico Induzido Por Polietilenoglicol (PEG) ..	36
6.2.9 Análise Estatística Das Variáveis Fenotípicas	36
6.3 RESULTADOS	36
6.3.1 Obtenção De BSP A Partir Da Rizosfera Do Milho.....	36
6.3.2 Identificação Molecular Dos Isolados	37
6.3.3 Produção De Sideróforos E Quantificação Da Solubilização De Fosfato.....	39
6.3.4 Solubilização De AlPO_4 , FePO_4 E Atividade Da Enzima Fosfatase.....	42
6.3.5 Produção EPS E Biofilme	44
6.3.6 Produção De AIA	44
6.3.7 Efeitos Do Estresse Osmótico No Crescimento, Produção De AIA E Biofilme.....	45
6.4 DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	55
MATERIAL SUPLEMENTAR	63
7 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A rizosfera é a parte do solo que é diretamente influenciada pelas raízes das plantas, podendo variar em tamanho, espessura e extensão (Orozco-Mosqueda et al., 2022). O metabolismo das plantas afeta a região da rizosfera por meio da secreção de fotossintatos na forma de exsudatos radiculares (Sharma et al., 2021), que desencadeiam diferentes tipos de interações bioquímicas com os microrganismos presentes nesta região (Caraciolo; Terenzi, 2021).

Este microbioma (conjunto de microrganismos que habitam um ambiente específico) é diverso e pode ser composto por centenas de espécies diferentes de microrganismos (Pollak; Cordero, 2020). Muitos são benéficos para as plantas como é o caso das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP). As RPCP contemplam variados grupos taxonômicos com ampla diversidade genética e funcional, capazes de colonizar a rizosfera de uma determinada planta hospedeira e melhorar seu desenvolvimento e produtividade (Orozco-Mosqueda et al., 2022).

As RPCP podem contribuir para a nutrição vegetal e aliviar os efeitos de estresses causados por agentes bióticos e abióticos e, indiretamente, melhorar a fertilidade e qualidade do solo, substituindo parcialmente a demanda por fertilizantes químicos, que apresentam vários impactos negativos à sustentabilidade, estabilidade e preservação de ecossistemas (Hakim et al., 2021). Sobretudo, em atual cenário de emergências climáticas, torna-se necessário isolar e caracterizar microrganismos que tenham a capacidade de manter suas atividades promotoras do crescimento mesmo em condições de estresses abióticos (Bittencourt et al., 2023).

Recentemente, estudos destacaram elevada tolerância a estresses abióticos e a eficiência na solubilização de fosfato *in vitro* de estirpes de *Paraburkholderia* isoladas de nódulos de plantas nativas do Parque Estadual de Vila Velha e Parque Estadual do Guartelá, com índices equivalentes às estirpes elite para o processo em questão (Protachevicz et al., 2023; Nascimento et al., 2024). Esses estudos apontam que comunidades microbianas dos Campos Gerais do Paraná- Brasil, abrigam promissores modelos evolutivos e biotecnológicos de RPCP multifuncionais, porém pouco explorados e estudados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTERAÇÃO PLANTA-MICRORGANISMOS

A planta e sua comunidade microbiana associada (microbiota) constituem uma unidade ecológica única denominada holobionte. Por esse ponto de vista, os hospedeiros vegetais dependem da atividade biológica da sua microbiota para a realização de parte de suas funções ecológicas e, em contrapartida, provém fotossintatos em suas imediações, estruturando habitats favoráveis à colonização microbiana, como a filosfera (superfície vegetal), endosfera (interior vegetal) e rizosfera (Trivedi et al., 2020; Vandenkoornhuyse et al., 2015b; Xiong; Lu, 2022).

Esses (micro)habitats abrigam distintas comunidades de microrganismos taxonomicamente variados, tais como arqueas, bactérias, fungos e protistas (Hassani; Durán; Hacquard, 2018; Xiong; Lu, 2022) provenientes de várias fontes, como solo, ar e até mesmo de outros organismos próximos como animais, insetos e plantas (Omae; Tsuda, 2022). Com base na sua interação com o hospedeiro vegetal, esses microrganismos podem apresentar interação benéfica (importante para seu desenvolvimento), prejudicial (patogênica) ou neutra durante a coabitação (Glick, 2012a). Comunidades microbianas que se associam a determinada planta são moldadas por meio de quatro processos principais: seleção, diversificação, dispersão e deriva ecológica (Fitzpatrick et al., 2020).

Cada comunidade possui um período de associação distinto, que varia de interações curtas a interações definitivas e de longo prazo. As interações de longo prazo formam o que se define como microbioma central ou microbiota total associada à planta (Santoyo, 2022). O potencial de contribuição ao crescimento e desenvolvimento das plantas por RPCP é de fundamental importância, especialmente em caso de estresse abiótico, fornecendo suporte e aptidão ao hospedeiro (Oleńska et al., 2020a).

2.2 A RIZOSFERA COMO HABITAT MICROBIANO

O solo é dos ambientes com maior riqueza e abundância microbiana da biosfera. Muitas iniciativas já foram conduzidas no sentido de estimar a abundância absoluta de microrganismos no solo e mostram resultados contrastantes, visto que as partículas do solo conferem vasto número de microhabitats. A variação biogeográfica e temporal nos fatores físicos e químicos, também influenciam na dinâmica das comunidades microbianas (Howe; Smith, 2021). Grande parte dos microrganismos do solo não são cultiváveis em condições laboratoriais e estratégias moleculares podem não representar de forma acurada a estrutura de uma comunidade microbiana por conta de vieses metodológicos (Lahlali et al., 2021).

No entanto, é unânime a constatação de que as bactérias são organismos abundantes e geneticamente diversos no solo; um grama de solo pode possuir de 10^8 a 10^{10} células bacterianas (Zhang et al., 2017a).

Quando estruturas reprodutivas vegetais atingem o solo, o desenvolvimento do sistema radicular cria novos nichos ecológicos: a superfície das raízes (rizoplane) e seu solo associado (rizosfera) são referidos por muitos autores como complexos e diversos ecossistemas terrestres. Esses microhabitats são enriquecidos pela liberação de exsudatos radiculares (ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, metabólitos secundários, dentre outros) que conferem condições para a proliferação de microrganismos específicos e a estruturação diferencial de comunidades microbianas competentes, resultando em uma zona de elevada atividade metabólica; esse é o “efeito rizosférico” (Berendsen; Pieterse; Bakker, 2012; Olanrewaju; Glick; Babalola, 2017; Pascale et al., 2020). O número de bactérias na rizosfera pode ser dez vezes maior do que o solo não rizosférico (Berendsen; Pieterse; Bakker, 2012) e apresentar riqueza diferenciada (Grover et al., 2021).

O microbioma da rizosfera atua na mediação da resistência da planta a seus patógenos e desempenha um papel fundamental no crescimento das plantas, na germinação das sementes, na nutrição e no desenvolvimento das plantas nas mais diversas condições ambientais, tanto nos ecossistemas geridos como nos naturais (Compant; Clément; Sessitsch, 2010; Pérez-Jaramillo; Mendes; Raaijmakers, 2016). Isso porque a comunidade microbiana estruturada nessa região por meio do efeito rizosférico desempenha naturalmente atividades biológicas que culminam na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas bactérias são coletivamente denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (Olanrewaju; Glick; Babalola, 2017).

2.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCP)

As RPCPs são capazes de estimular o crescimento e o desenvolvimento das plantas por mecanismos que podem ser diretos e/ou indiretos (Glick, 2012a). Mecanismos diretos se referem às características bacterianas que resultam na promoção direta do crescimento das plantas, por meio da síntese de compostos responsáveis por modular o desenvolvimento da planta hospedeira e a facilitação na aquisição de nutrientes, principalmente de nitrogênio (N) e de fósforo (P); Os mecanismos indiretos referem-se às características que inibem a colonização de um ou mais organismos fitopatogênicos, tanto fungos quanto bactérias (Bittencourt et al., 2023).

Segundo Glick (2020), as RPCP podem desencadear diversas melhorias no desenvolvimento vegetal como (1) aumento da biomassa; (2) aumento do teor de nutrientes como N, P ou ferro (Fe) nas plantas; (3) maior comprimento da raiz e/ou parte aérea; (4) melhor germinação de sementes; (5) plantas com maior resistência a doenças; (6) maior tolerância a diversos estresses ambientais; (7) aumento na produção de metabólitos secundários úteis; e (8) plantas mais nutridas.

Assim, as bactérias são essenciais para a capacidade de resiliência de espécies vegetais na natureza. Além disso, apresentam um notável potencial biotecnológico, podendo ser empregadas em inoculantes para promover biofertilização, fitoestimulação e biocontrole na agricultura e silvicultura, auxiliando na produção e sustentabilidade agrícola, florestal e recuperação ambiental (Bloemberg; Lugtenberg, 2001; Lucy; Reed; R. Glick, 2004) com grande potencial de complementar ou substituir métodos tradicionais de fertilização mineral e defensivos químicos.

Dentre as atividades promotoras do crescimento de plantas que constituem os mecanismos diretos desempenhados por tais bactérias, podemos destacar: solubilização de P, produção de fitohormônios, síntese de exopolissacarídeos e biofilme, produção de sideróforos e produção de ACC-desaminase.

2.3.1 Diversidade Genética De RPCP

A diversidade genética de RPCP pode variar de acordo com a planta hospedeira, condições edáficas, uso do solo, coordenadas geográficas, dentre outros fatores (Chukwuneme et al., 2020; Finn; Yu; Penton, 2020).

As RPCP mais conhecidas pertencem a gêneros como: *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus/Priestia*, *Paraburkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, entre outros (Klepa et al., 2022; Numan et al., 2018; Protachevich et al., 2023). O gênero *Pseudomonas*, composto por bacilos Gram-negativos, usualmente destaca-se em estudos com RPCP pois estão presentes em uma ampla gama de ambientes, são constantemente relatados em estudos baseados em rizosfera de diferentes plantas hospedeiras e apresentam uma grande versatilidade metabólica (Zboralski; Fillion, 2020).

A análise da diversidade genética de RPCP normalmente inicia-se com a obtenção das sequências nucleotídicas do gene 16S DNAr, que codifica um RNA ribossomal componente da subunidade menor do ribossomo (Silveira; Freitas, 2007). O gene 16S DNAr geralmente é considerado um excelente marcador filogenético, pois é onipresente em procariotos.

Geralmente em cópia única por genoma, apresentam um papel metabólico-chave e seu tamanho (1500 pares de bases) é ideal para a aplicação em diversas técnicas moleculares. Além disso, a sequência é conservada permitindo a utilização de iniciadores universais, porém contém sítios variáveis o suficiente para revelar relações filogenéticas (Combrink et al., 2023; Liu et al., 2022; Yang et al., 2024)

Cabe salientar que é necessário ter cautela no uso desse marcador para delineamento de espécies bacterianas. Análises comparativas vêm demonstrando o restrito poder de resolução do 16S DNAr a nível de espécie e sua limitação em análises filogenéticas de organismos relacionados. A conservação do 16S DNAr pode inclusive resultar em elevadas porcentagens de identidade nucleotídica entre espécies diferentes que sejam evolutivamente relacionadas (Reis Junior; Reis; Teixeira, 2006).

Inclusive, esse problema pode ser observado em bactérias do gênero *Pseudomonas*. Apesar de ser um dos gêneros bacterianos mais estudados, com grande quantidade de sequências depositadas em bancos de dados públicos, a dificuldade em segregar as espécies de relevância ecológica e biotecnológica das espécies comensais e patogênicas é frequentemente relatada (Palleroni, 2010). A utilização de ferramentas baseadas em filogenia do gene 16S DNAr resultou na reclassificação de vários grupos de *Pseudomonas*, inclusive para novos gêneros (Lalucat et al., 2022). De fato, a filogenômica parece ter papel insubstituível no delineamento taxonômico de bactérias da família Pseudomonadaceae (Lalucat et al., 2022; Özen; Ussery, 2012).

2.4 DIVERSIDADE FUNCIONAL DE RPCP

2.4.1 Solubilização E Mineralização De P

O P é um macronutriente vital para plantas, desempenhando funções essenciais no metabolismo, divisão celular, geração de energia, ativação de enzimas e na formação de moléculas biológicas cruciais, como ATP e ácidos nucleicos (Etesami; Jeong; Glick, 2021). Sua deficiência ao início do ciclo vegetativo pode causar danos irreversíveis ao crescimento vegetal.

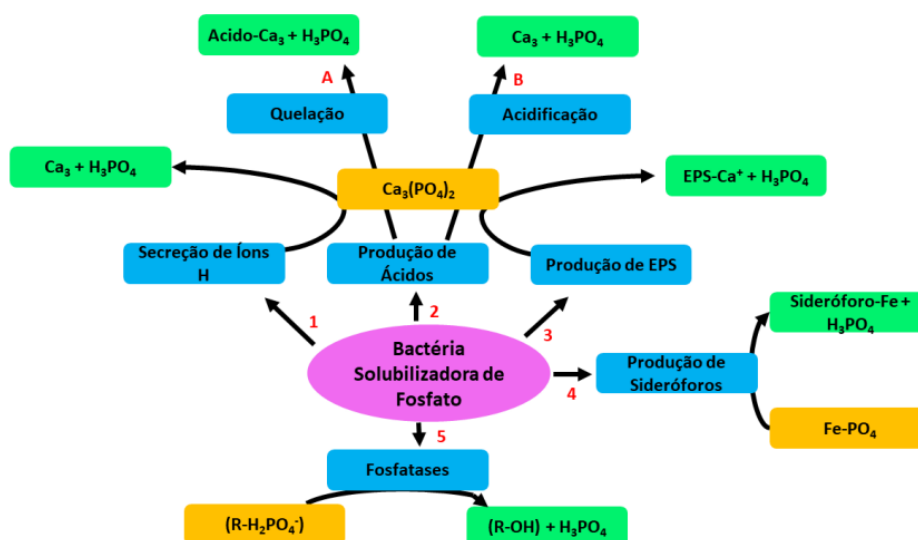
Os valores de P presente na camada superficial do solo geralmente variam de 50 a 3.000 mg.kg⁻¹, dos quais apenas 0,1% está acessível para absorção pelas plantas. Isso ocorre devido à precipitação com cátions no solo, imobilização e adsorção (Rawat et al., 2020a).

Algumas RPCPs são capazes de secretar ácidos orgânicos, produzir enzimas (como fosfatases e fitases), e quelantes de íons (como sideróforos), que auxiliam na biodisponibilidade de P para as plantas (Rawat et al., 2020a; Tomer; Suyal; Goel, 2017). Muitas dessas bactérias

também possuem a capacidade de promover o crescimento radicular, permitindo assim maior exploração do solo e absorção de P, proporcionando maior interceptação radicular (Chaves; Zucareli; De Oliveira Junior, 2013).

Entre os microrganismos, as bactérias desempenham um papel importante no ciclo biogeoquímico do P. O fósforo encontra-se no solo em duas formas: o fósforo orgânico, derivado da decomposição da matéria orgânica, e fósforo inorgânico, originado de rochas (Nascimento et al., 2024). As bactérias solubilizam os fosfatos inorgânicos e mineralizam os fosfatos orgânicos do solo por diversos mecanismos, disponibilizando o P de forma eficiente (Figura 1).

Figura 1. Mecanismos de solubilização/mineralização de fósforo que podem ser desempenhados por RPCP.



Fonte: Nascimento (2022).

A solubilização de P inorgânico pelas bactérias pode ocorrer por: (i) redução do pH, (ii) aumento da quelatação de cátions ligados ao fósforo, (iii) competição com o fósforo por sítios de adsorção no solo e (iv) formação de complexos solúveis com íons metálicos como Ca, Al, Fe (Sharma et al., 2021).

A mineralização do P acontece devido a ação de numerosos organismos saprófitos que realizam a liberação de ortofosfato radical da estrutura de carbono liberando o fósforo do P orgânico através de ações enzimáticas. As principais enzimas que auxiliam nesse processo são fosfatases inespecíficas, fitases e fosfonatases (Nascimento et al., 2024; Pezoa Maldonado, 2021).

2.4.2 Produção De Sideróforos

O Fe é um micronutriente essencial para a maior parte dos organismos vivos e encontra-se na natureza essencialmente como Fe^{3+} , na forma de sais e hidróxidos de baixa solubilidade, formas que não são facilmente assimiláveis pelas plantas (Benite; Machado; Machado, 2002; Joshi et al., 2023).

O Fe tem a capacidade de aceitar e doar elétrons, e variar entre a forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}). Para que o Fe do solo possa ser assimilado, algumas bactérias secretam compostos conhecidos como sideróforos. São moléculas de baixo peso molecular, variando tipicamente de 500-1500 daltons, que sequestram Fe^{3+} na presença de outros íons metálicos do ambiente, para reduzi-lo à Fe^{2+} (Deb; Tatung, 2024; Joshi et al., 2023).

As bactérias produtoras de sideróforo atuam na promoção de crescimento vegetal de forma indireta, possibilitando a resistência contra patógenos. Como o mecanismo para produção de sideróforos é realizado somente sob condições de baixa disponibilidade de Fe no solo, os microrganismos capazes de produzi-los possuem vantagem sobre os demais, podendo inibir patógenos por antagonismo microbiano (Vieira Junior et al., 2013)(Aguado-Santacruz et al., 2012). Os mecanismos diretos incluem fornecimento de Fe para a planta hospedeira além de constituem importante mecanismo de solubilização de P (Figura 1).

Para Benite *et al.* (2002) a captação de ferro mediada por sideróforos ocorre após os processos químicos de: (1) quelação seletiva de Fe^{3+} ; (2) reconhecimento molecular do complexo sideróforo- Fe^{3+} ; (3) transporte de Fe complexado pela membrana celular; (4) deposição do Fe em um sítio apropriado na célula (superfície ou interior celular).

2.4.3 Síntese De Compostos Indólicos

Os microrganismos benéficos promovem o crescimento das plantas principalmente pela produção ou modulação de complexos hormônios vegetais. As auxinas influenciam na divisão, no crescimento e na diferenciação celular e estão envolvidas em muitos processos de desenvolvimento fisiológico vegetal, controlar o alongamento das raízes e aumentar o desenvolvimento de pelos radiculares e das raízes laterais (Di et al., 2016b; Florentino et al., 2017).

Ainda, tem ação integrada com vias sinalizadoras de diferentes fitormônios, influenciando em vários processos como: crescimento e formação de raízes, direção de crescimento, arquitetura radicular, dominância apical, abscisão de órgãos, desenvolvimento de flores e frutos e diferenciação celular (Jordán; Casaretto, 2006). As plantas possuem três tipos

de auxinas: ácido indol acético (AIA), ácido 4 cloroindólico e ácido fenilindólico; destes, sendo o AIA o mais abundante e estudado (Di et al., 2016b).

RPCP também possuem capacidade de sintetizar AIA, majoritariamente utilizando triptofano exsudado pelas raízes do hospedeiro como precursor (Khan et al., 2020). Porém, a biossíntese microbiana de AIA pode ser classificada em vias dependentes de triptofano e independentes de triptofano (Tang et al., 2023).

A produção de AIA pelas RPCP pode alterar os reservatórios de auxina das plantas, aumentando o crescimento das raízes e o nível de exsudados radiculares disponíveis para absorção pelas plantas (Joshi et al., 2023; Olanrewaju; Glick; Babalola, 2017).

De fato, todos os processos desde a iniciação até o alongamento das raízes são regulados pela biossíntese e sinalização das auxinas. Isso permite às plantas uma maior permeabilidade de água e de nutrientes (Orhan, 2016) tornando maior a tolerância ao estresse hídrico e osmótico, pois a área de exploração das raízes torna-se maior. Apresenta também uma diminuição da pressão da parede, síntese de proteínas, retardo na abscisão foliar e induz a floração e a frutificação (Mohite, 2013).

Mesmo que as auxinas produzidas por microrganismos estimulem uma maior absorção de água e nutrientes pela alteração na morfologia e comprimento das raízes, quando produzidas em altas concentrações podem exercer atividade inibitória para o alongamento das raízes e crescimento das plantas, sendo a implicação prejudicial durante períodos de seca. Porém a alta produção de auxinas quando combinada da produção de ACC-deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato) pelas RPCP pode evitar essa complicação (Grover et al., 2021; Naing; Maung; Kim, 2021).

2.4.4 Produção De Substâncias Poliméricas Extracelulares E Biofilme

Uma ampla variedade de biopolímeros são produzidos por microrganismos em condições naturais, dentre os quais destacam-se os exopolissacarídeos (EPS). Os EPS são polímeros de alto peso molecular, compostos por diferentes monossacarídeos solúveis em água, que podem estar associados com outros polímeros como lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas, excretados na parte externa de suas paredes celulares (Sharma et al., 2021). De acordo com as condições ambientais e disponibilidade de nutrientes, diferentes bactérias podem produzir EPS com variações em sua composição bioquímica (Naseem et al., 2018).

Para as RPCP, o EPS é um importante fator de sinalização com a planta hospedeira e colonização da rizosfera e rizoplane (Santaella et al., 2008). Além disso, os EPS formam

camadas negativamente carregadas que conseguem agregar partículas de argila por pontes de hidrogênio, adsorção de anions, forças de Van der Waals e pontes catiônicas; a formação de tais microagregados e posterior adesão em macroagregados confere mais saúde ao solo especialmente pela maior capacidade de retenção de água e nutrientes (Dar et al., 2021).

Cerca de 97% do peso do EPS é representado por moléculas de água agregadas à matriz polimérica, garantindo a proteção da bactéria em condições de estresse hídrico pela manutenção de um microambiente hidratado (Ghosh; Gupta; Mohapatra, 2019).

Ainda, desempenham papéis essenciais na degradação de compostos, oferecem proteção contra estresse osmótico e contribuem para a tolerância de micro-organismos a agentes ambientais. (Roper et al., 2007). A produção de EPS por RPCP, como *Pseudomonas spp.*, é relevante para a sobrevivência vegetal em ambientes estressantes, como a desidratação e o estresse salino (Sandhya; Ali, 2015).

Diversos trabalhos descrevem RPCPs produtoras de EPSs como tolerantes e resistentes ao estresse hídrico, osmótico e salino melhorando o crescimento das culturas sob essas condições. Como por exemplo, Nadeem *et al.* (2020) que relataram uma melhora no crescimento e fisiologia do milho sob estresse osmótico induzido por PEG utilizando uma estirpe da espécie *Bacillus velezensis* que possui atividade de ACC-desaminase, capacidade de produção de EPS na presença de PEG, produção de sideróforos e capacidade de solubilização de fosfato.

Outra característica importante da produção de EPSs por RPCP é sua atuação na formação de biofilme, em conjunto dos flagelos e lipopolissacarídeos (LPSs) (Bogino et al., 2013); são eles que proporcionam a forma arquitetônica dos biofilmes e garantem a estabilidade de sua estrutura tridimensional. Biofilmes são agregados de células estruturalmente complexos, de uma única ou de múltiplas espécies microbianas, aderidas a um substrato biótico ou abiótico (Ghosh; Gupta; Mohapatra, 2019). Os biofilmes podem se formar em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos (Heindl et al., 2014).

Para que a formação de biofilme aconteça vários mecanismos e mudanças fenotípicas estão envolvidos. Segundo Heindl *et al.* (2014), inicialmente acontece a repressão da motilidade flagelar com a desaceleração rotacional, devido ao contato com a superfície que permite a estabilização e fixação pelas adesinas; então as células individuais começam a se agregar formando microcolônias submersas pela matriz que posteriormente geram o biofilme mais complexo. A microcolônia (biofilme menos complexo e com número menor de células) é a unidade básica de crescimento de um biofilme, e está presente em quase todos os ambientes naturais (Seneviratne et al., 2010).

Na configuração de biofilme, as colônias bacterianas têm a capacidade de se comunicar quimicamente umas com as outras através da percepção de quorum, funcionando como uma única unidade (Seneviratne et al., 2010). Assim, as RPCP na configuração de biofilme possuem uma maior proteção individual e possibilitam maior proteção às plantas, pois diminuem os efeitos deletérios. Principalmente, inibindo os organismos competidores e funcionando como uma barreira para fitopatógenos, além de possibilitar maior aquisição de nutrientes e respostas mais rápidas a adaptação a condições ambientais em mudança (Boari et al., 2009; Bogino et al., 2013; Gupta et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Qualquer alteração adversa na fisiologia da planta devido a um fator externo que modifique seu equilíbrio pode ser definida como estresse (Bittencourt et al., 2023). RPCP podem contribuir para a nutrição vegetal e aliviar os efeitos de estresses causados por agentes bióticos e abióticos e, indiretamente, melhorar a fertilidade e qualidade do solo (Chukwuneme et al., 2020).

É importante salientar que diversas espécies bacterianas podem desempenhar uma dada atividade promotora do crescimento comum, ou seja, possuem redundância funcional. Além disso, uma mesma bactéria pode desempenhar diversas atividades, sendo considerada multifuncional. Nas duas situações, deve-se levar em consideração que as comunidades bióticas do solo constituem um sistema altamente dinâmico no qual diferentes grupos taxonômicos podem desempenhar funções semelhantes sob diferentes condições ambientais (Banerjee et al., 2016).

No atual cenário de mudanças climáticas, torna-se necessário isolar e caracterizar microrganismos que tenham a capacidade de manter suas atividades promotoras do crescimento mesmo em condições de estresses abióticos, em especial hídrico e osmótico. Durante períodos de seca, as plantas fecham os estômatos para evitar a perda de água e isso acaba afetando a entrada de CO₂ e a fotossíntese. Desta forma, o crescimento e sua capacidade de se defender e se recuperar são impactadas negativamente (Bittencourt et al., 2023).

Além de sua já consolidada relevância para agroecossistemas, a inoculação de RPCP tolerantes a estresses abióticos pode dar suporte ao desenvolvimento de estratégias de monitoramento e regeneração de ecossistemas terrestres degradados. Essa relação planta-microrganismos pode proporcionar uma melhor adaptação as espécies vegetais, nativas e endêmicas, preservando a sua existência em ecossistemas naturais.

O sucesso de um processo de bioprospecção depende muito do planejamento das etapas envolvidas no isolamento. Para tanto, associar o efeito rizosférico de uma dada espécie vegetal com estratégias de seleção e cultivo podem permitir mais eficiência no processo de busca por rizobactérias ecologicamente competentes (ou seja, capazes de colonizar o rizoplane/rizosfera de uma espécie de interesse) e eficientes. Nesse sentido, o milho é consolidado como importante modelo vegetal por representar um cultivo agrícola de relevância global, com diversidade genética e fenotípicas únicas (Peiffer et al., 2013).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar, genotípica e fenotipicamente, bactérias isoladas da rizosfera do milho (*Zea mays*) cultivado em solos com diferentes históricos de uso.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar o conceito de efeito rizosférico para enriquecimento da rizosfera do milho, utilizando solos com diferentes históricos de uso;
- Implementar estratégia de isolamento de RPCP com capacidade solubilização de fosfato concomitante à tolerância a estresse osmótico;
- Identificar o gênero das estirpes selecionadas por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA;
- Quantificar a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos e mineralização de fosfatos orgânicos;
- Avaliar a tolerância dos isolados, produção de biofilme e AIA frente à condição de estresse osmótico induzido por polietilenoglicol (PEG);
- Identificar a produção de EPS e sideróforos pelas bactérias isoladas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS ÁREAS DE COLETA DO SOLO

Foram coletados solos em três regiões inseridas no Bioma Mata Atlântica, de fitofisionomia campestre (Campos Nativos) com diferentes históricos de usos, localizadas nos Campos Gerais no Paraná, município de Ponta Grossa. A região tem predomínio de Cambissolo e Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 2018) e, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, apresenta clima do tipo Cfa (subtropical úmido quente), com influência indireta do clima Cfb (temperado sempre úmido). As coletas dos solos foram realizadas em 2022, no mês de agosto, que é considerado o mês mais seco na região, com precipitação média entre 50 e 90 mm (INPE, 2023). Cada amostra foi constituída por 15 subamostras de solo, coletadas a uma profundidade de 0-20 cm em sistema de “zigue-zague”, por uma área de cerca de 1 ha. As subamostras foram peneiradas e homogeneizadas em betoneira para compor cada amostra composta.

O primeiro ponto de coleta foi uma área pertencente à Fazenda Escola Campão da Onça em Ponta Grossa, PR (25,09576°S, 50,04426°O) que passa por restauração ecológica passiva desde 2017. O segundo ponto de coleta se trata da Fazenda Modelo da Embrapa em Ponta Grossa, PR (25,15820°S, 50,07272°O), estabelecida em 1912, utilizada para experimentação agrícola e aclimatação de culturas. A área selecionada tem longo histórico de rotação milho/feijão/aveia/soja/aveia/soja/milho e sem histórico de uso de inoculantes biológicos. A terceira amostra foi coletada em área com vegetação nativa pertencente ao Parque Nacional dos Campos Gerais, em zona de transição Campos Naturais-Floresta Ombrófila Mista (25,14615°S, 49,95519°O) (autorização MMA/IMCBio/Sisbio 81846-1).

5.2 OBTENÇÃO DE SOLO DA RIZOSFERA DE MILHO (*ZEA MAYS*)

As características físicas, químicas e de biondicadores dos solos foram analisadas. Os solos das áreas descritas acima foram alocados em vasos de 5 litros, em quintuplicata. Em cada vaso, foram introduzidas três sementes da cultivar PRE22S18 TP2 (Sempre AgTech LTDA) de milho. Estes vasos foram mantidos em casa de vegetação da UEPG, por um período de 40 dias, com temperatura de 24 a 27 °C, luz natural, fotoperíodo de 12h e irrigação regulada de 250 mL a cada intervalo de 48 horas. Não foi realizada correção do pH ou fertilização nos solos.

Após o período de 40 dias, os vasos foram desmontados e as plantas de milho foram transferidas para o Laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As raízes foram vigorosamente agitadas e solo rizosférico foi coletado por remoção manual, com o auxílio de espátulas metálicas esterilizadas.

5.3 ISOLAMENTO INICIAL DE BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS

Amostras de 1g de solos rizosféricos de cada tratamento foram pesados e transferidos para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Essas amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vortex (TECNAL) por 30 segundos e incubadas por 15 minutos a uma agitação constante de 120 rpm, temperatura de 28°C. Após a incubação, realizou-se a diluição seriada até a concentração 10^{-5} .

As suspensões de solo foram inoculadas em meio Tryptone Soya ágar (TSA, Himedia) a 10% e incubadas a 28°C por 24 e 48 horas. Após determinação do número de unidades formadoras de colônia em cada tratamento, realizou-se o isolamento das colônias isoladas, transferindo-as para novas placas contendo meio TSA 10% e incubadas nas condições previamente estabelecidas.

5.4 SELEÇÃO QUALITATIVA DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E TOLERANTES AO ESTRESSE OSMÓTICO

Os isolados obtidos passaram por uma dupla triagem, para seleção de microrganismos capazes de solubilizar fosfato inorgânico e crescer em condições de baixa atividade de água (estresse osmótico).

Cada isolado foi inoculado em meio de fosfato do *National Botanical Research Institute* (NBRIP): 10 g/L glicose, 5 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,25 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g/L de KCl, 0,1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, acrescido de $Ca_3(PO_4)_2$ a uma concentração de 5 g/L. As placas de Petri foram incubadas a 28°C por 72 horas em câmara de crescimento BOD (Logen Scientific). Microrganismos foram considerados solubilizadores de fosfatos inorgânicos se geraram um halo transparente ao redor de suas colônias durante o período de incubação.

Simultaneamente, realizou-se o cultivo dos mesmos isolados em meio TSA 10% contendo 28,5% de sorbitol, resultando em um valor de 0,963 de atividade de água (A_w). Após 24 e 48h de incubação, foram identificados os isolados capazes de manter o crescimento em menor A_w .

5.5 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS

Para a execução dos experimentos sequenciais, foram selecionados quarenta isolados rizosféricos que demonstraram desempenho destacado nos ensaios qualitativos de solubilização de fosfato e resistência ao estresse ósmótico.

5.5.1 Extração Do DNA Total, Sequenciamento Do Gene 16S Dna_r E Identificação Molecular Dos Isolados

O DNA total das quarenta bactérias selecionadas, crescidas em meio de cultivo TSB líquido, foi extraído utilizando GenElute Bacterial Genomic DNA Kits (SIGMA-ALDRICH) e seguindo instruções do fabricante. A integridade do DNA total foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 1%.

Para amplificação do gene 16S Dna_r, o DNA total de cada estirpe bacteriana foi utilizado como molde e a reação se deu através dos indicadores universais fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG *et al.*, 1991). Para realizar a reação foi utilizado o mix contendo: 35,5 µL de água ultrapura estéril; 3,0 µL de dNTPs contendo 1,5 mmol de cada nucleotídeo; 5,0 µL de tampão 10X (500 mM KCL; 200mM Tris-HCL, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl (50mmol/L); 1,5 µL de cada um dos iniciadores (10pmol/µL); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/ 0,2 µL) e 2,0 µL de DNA (50ng/µL), em um volume final de 50 µL. A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão por 5 minutos. Os produtos de PCR (aproximadamente 1500pb) foram purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Para o sequenciamento, os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma nova amplificação, a qual consistiu na adição de 3 µL de DNA (15µgmL⁻¹), 1,3 µL de BigDye (compatível com o sequenciador ABI3500XL, Applied Biosystems), 1 µL de iniciador (3,2 pmol), 2,5 µL de tampão 10x (500 mM KCl; 200mM Tris-HCl, pH 8,4) e 12,2 µL de H₂O ultrapura estéril, totalizando um volume de 20µL por reação. Para sequenciamento do gene 16S Dna_r, foram utilizados os iniciadores 362f e 786f (Menna *et al.*, 2006).

As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 96° C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 96° C por 15 s, 50° C por 15 s e 60° C por 4 min em termociclador (MJ Research Inc. PTC200). Depois de amplificadas, as amostras foram precipitadas (Menna *et al.*, 2006). e submetidas ao sequenciamento em ABI 3500XL (Applied Biosystems).

As sequências de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram analisadas com o programa Geneious v.7.1 (Biomatters). As sequências consenso geradas pelo alinhamento dos produtos de sequenciamento obtidos com os iniciadores 362f e 786f foram utilizadas para busca no banco de dados “rRNA/ITS” do NCBI, utilizando a ferramenta BlastN.

5.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS

Todos os ensaios fenotípicos descritos a seguir foram realizados em triplicata, com exceção da produção de biofilme, que foi conduzida em quintuplicata.

5.6.1 Quantificação Da Solubilização De Ca_3PO_4

A quantificação dos níveis de fósforo solúvel foi avaliada para os 40 isolados identificados, utilizando o método colorimétrico de Murphy & Rylei (1962), com o meio de cultivo líquido NBRIP enriquecido com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a 5 g/L como a única fonte de fósforo (MARRA et al., 2012). O ajuste de pH para 7,0 precedeu a esterilização. Em um erlenmeyer, adicionou-se 50 mL de meio NBRIP líquido + $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, sendo inoculado com 0,5 mL de pré-inóculo bacteriano com densidade ótica de 630 nm (DO_{630}) ajustada entre 0,7 – 0,9.

Os cultivos foram incubados a 28°C por 96 horas sob agitação de 120 rpm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4500 xg por 10 minutos e filtradas em papel Whatman nº 42. Alíquotas de 0,5 mL do filtrado foram misturadas com 5 mL de água ultrapura e 1 mL de solução MIX (125 mL de ácido sulfúrico (12%), 75 mL de ácido ascórbico (0,099 M), 37,5 mL de molibdato de amônio (0,03 M) e 12,5 mL da solução de tartarato de antimônio-potássio (0,75 g em 100 mL) (Murphy e Riley., 1962). Como branco, utilizou-se 0,5 mL do meio NBRIP acrescido de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sem inóculo, 1 mL da solução MIX e 5 mL de água ultrapura. Após 20 minutos da adição do MIX, a intensidade da cor azul foi aferida em espectrofotômetro (Thermoscientific GENESYS 50) a 880 nm. Para cálculo da quantidade de P solubilizada, utilizou-se uma curva padrão baseada em gradiente de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em oito concentrações: 1,2 mg/L, 2,4 mg/L, 4,8 mg/L, 6,0 mg/L, 8,0 mg/L, 10 mg/L, 12 mg/L e 14 mg/L.

Todos os materiais utilizados para esta análise eram novos ou foram submetidos a banho ácido clorídrico (HCL) e água destilada (1:1) e esterilizados em autoclave, visando evitar contaminação com P residual.

5.6.2 Produção De Sideróforos

Para a detecção da produção de sideróforos pelos 40 isolados, foi utilizada a estratégia de “overlaid CAS” ou O-CAS (Pérez-Miranda et al., 2007), que consiste na sobreposição de solução de cromoazurol S (CAS) em cultivos já crescidos. Aliquotas de 5 μ L de cada pré-inóculo foram depositadas em pontos distintos em meio TSA, seguido de incubação a 28°C por 48 horas em câmara BOD (Logen Scientific).

A solução CAS foi preparada de acordo com Pérez-Miranda *et al.* (2007), agindo como revelador. Para um litro de solução foram utilizados: 60,5 mg de CAS; 72,9 mg de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA); 30,24 g de Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanossulfônico) (PIPES); e 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mM HCl; Agarose (0,9%, p/v), utilizada como agente gelificante e pH ajustado em 6,8.

A detecção de sideróforos foi obtida após a aplicação de 15 mL solução sobre os cultivos. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos. Em seguida foi realizada a observação das placas e aquelas que apresentaram uma mudança de cor, em formato de halos no meio sobreposto, foram consideradas positivas para produção de sideróforo. As colorações observadas variaram de azul para roxo, indicando a presença de sideróforos do tipo catecol, ou de azul para laranja/amarelo, denotando a produção de hidroxamatos por microorganismos (Pérez-Miranda et al., 2007). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, sendo sempre incluída uma placa controle contendo uma bactéria anteriormente relatada como produtora de sideróforo.

5.6.3 Produção De Biofilme E EPS

O teste de formação de biofilme foi realizado seguindo a metodologia proposta por O'Toole e Kolter (1998). A cada poço de microplacas de poliestireno (com 96 poços) foram adicionados 180 μ L de meio de cultivo TSA (Himedia) acrescido de 20 μ L de pré-inóculo bacteriano com DO_{630} ajustada entre 0,5 a 0,6. As placas foram vedadas com plástico filme e incubadas a 28°C por 72 horas em câmara BOD (Logen Scientific).

Após o período de incubação, a DO_{630} dos cultivos foi determinada usando uma leitora de microplacas (Synergy H1 BioTek). Os poços foram lavados com 200 μ L de PBS (solução salina tamponada com fosfato) e corados por 15 minutos com 200 μ L de solução de 0,1% cristal violeta em etanol a 5%. Os poços foram então lavados com água e o corante retido foi ressuspensão com 200 μ L de solução etanol:acetona (80:20 v/v). Após a incubação (temperatura ambiente por 30 minutos), foi determinada a DO_{570} com a utilização da leitora de microplacas.

A quantidade de biofilme produzido foi estimada conforme LUCERO *et al.* (2020) determinando o Índice de Formação de Biofilme (BI) pela seguinte fórmula: $BI = DO_{570} / DO_{630}$.

Para observar a produção de EPS dos quarenta isolados, utilizou-se metodologia descrita por Paulo *et al.* (2012). Em placas de Petri contendo o meio de cultura acrescido de sacarose 10% (extrato de levedura 20,0 g/L; K_2HPO_4 15,0 g/L; 0,2 g/L $MgSO_4$; 0,015 g/L $MnSO_4$; 0,015 g/L $FeSO_4$; 0,03 g/L $CaCl_2$; 0,015 g/L NaCl e 15,0 g/L Ágar), foram depositados discos de papel filtro de 5 cm de diâmetro inoculados com 3 μ L de pré-inóculo de cada isolado, seguido de incubação por 4 dias a 28°C em BOD. A produção de EPS foi então avaliada com base na formação de uma colônia mucóide ao redor dos discos. A produção deste biopolímero pelos isolados foi confirmado pela mistura de uma porção da substância mucóide em 2 mL de álcool absoluto (Paulo *et al.*, 2012).

5.6.4 Quantificação Da Solubilização De Fosfato De Ferro E Alumínio

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, foram selecionadas oito estirpes para os ensaios de solubilização de fosfato de ferro ($FePO_4$), fosfato de alumínio ($AlPO_4$) e mineralização de P pela atividade da enzima fosfatase ácida.

A quantificação da solubilização de $FePO_4$ e $AlPO_4$ *in vitro* baseou-se no método colorimétrico de Murphy & Riley (1962), o mesmo utilizado para quantificação da solubilização de $Ca_3(PO_4)_2$, conforme descrito no item 5.6.1.1.

5.6.5 Atividade Da Enzima Fosfatase Ácida Em Cultivos Isolados

Para a determinação de atividade da enzima fosfatase, utilizou-se a técnica desenvolvida por Tabatabai e Bremner (1969) que envolve a quantificação do p-nitrofenol (p-NP) liberado a partir da hidrólise do substrato p-nitrofenil fosfato (p-NPP) pela fosfatase presente no solo. Foram realizadas alterações para adaptar a técnica para realiação em meio com culturas, seguindo os seguintes passos: 2mL de cada um dos cultivos ($DO_{630}=0,7-0,8$) foram submetidos a incubação a 37 °C após o acréscimo de 0,48 mL de tampão (1,21g TRIS; 1,16g de ácido Maleico; 1,40g de ácido cítrico; 0,63g de ácido Bórico; completar para 500 mL com água) com pH ajustado em 6,5, e 0,12 mL de solução aquosa de p-nitrofenil fosfato 0,05M. Após o período de incubação foram adicionados 0,12 mL de $CaCl_2$ a 0,5 M e 0,48 mL de NaOH a 0,5M para interromper a reação e desenvolver a cor.

A absorbância do filtrado foi medida a 400 nm em espectrofotômetro e cada estirpe possuía um meio como branco. A concentração de p-nitrofenol liberado, proporcional à atividade da fosfatase, foi determinada utilizando uma curva padrão de p-nitrofenol composta

por 5 pontos. Para obter a atividade enzimática em µg de p-NP liberado por grama de solo por hora, um fator de correção foi empregado após os cálculos da curva, seguindo a fórmula abaixo:

$$FCU = \frac{(Volume\ amostra) + (Volume\ da\ solução\ tampão) + (Volume\ do\ substrato)}{(Volume\ amostra) \times (Tempo\ de\ incubação\ (hora)) \times (Gramas\ da\ amostra)}$$

5.6.6 Respostas À Tolerância Ao Estresse Osmótico Induzido Por Polietilenoglicol (PEG)

5.6.6.1 Tolerância a condições de estresse osmótico induzido por polietilenoglicol (PEG)

Para avaliar o efeito do estresse osmótico, ao meio de cultivo TSA (Himedia) foi adicionado PEG 6000 nas concentrações 11%, 21% e 26%, resultando nos potenciais osmóticos (A_w) de 0,15, 0,49 e 0,73 MPa, respectivamente. Como controle, utilizou-se o meio sem PEG. As bactérias foram cultivadas a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm por 48 horas. Após 24 e 48h de incubação, uma alíquota de 1000 µL de cultura foi coletada e o crescimento foi avaliado por absorbância ($D.O_{630nm}$).

5.6.6.2 Análise quantitativa da produção de compostos indólicos em condições de estresse osmótico induzido por PEG

Para os ensaio de quantificação de compostos indólicos, 0,3 mL do pré-inóculo foi inoculado em 30 mL de meio líquido TSA com L-triptofano ($100\ \mu g \cdot mL^{-1}$), em três repetições biológicas. Para avaliar o efeito do estresse osmótico na síntese de compostos indólicos, aos meios de cultivo TSB + triptofano foi adicionado polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) nas seguintes concentrações: 11%, 21% e 26 ($0,380\ A_w$; $0,727\ A_w$ e $0,899\ A_w$). Como controle, utilizou-se o meio sem PEG. As bactérias foram cultivadas a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm por 48 horas. Após 24 e 48h de incubação, uma alíquota de 1000 µL de cultura foi coletada e o crescimento foi avaliado por absorbância ($D.O_{630nm}$).

A quantificação da produção de compostos indólicos seguiu o método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). As culturas foram centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos, em seguida a 250 µL dos sobrenadantes foram acrescentados 1000 µL do reagente Salkowski (30 mL de ácido sulfúrico; 50 mL de água destilada; 1 mL de cloreto de ferro 0,5 M) (Gordon & Weber, 1951).

Após incubação por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (modelo Thermoscientific GENESYS 50), no comprimento de onda de 530 nm. Para estimativa da quantidade de compostos indólicos foi construída uma

curva de calibração com concentrações crescentes de AIA sintético (SIGMA) de 0 a 100 µg.mL⁻¹, composta por 8 pontos. E os dados foram então obtidos utilizando a equação da reta expressa como:

$$y = a + b \cdot x$$

onde y é a variável dependente e x é a variável independente. A reação com o reagente de Salkowski resulta em uma coloração amarelada para ausência de AIA e rosa avermelhado para a presença de AIA.

5.6.6.3 Produção de Biofilme em condições de estresse osmótico induzido por PEG

O teste de formação de biofilme foi realizado seguindo a metodologia proposta por O'Toole e Kolter (1998). Para avaliar a formação de biofilme foram utilizados os meios de cultivo TSA (controle) e TSA+PEG nas concentrações 11%, 21% e 26%. A cada poço de microplacas de poliestireno (com 96 poços) foram adicionados 180 µl dos respectivos meios de cultivo acrescidos de 20 µl de pré-inóculo bacteriano com DO₆₃₀ ajustada entre 0,5 a 0,6. As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas em câmara BOD (Logen Scientific).

As demais etapas da metodologia foram realizadas como descrito anteriormente (item 5.6.1.3).

5.6.7 Análise Estatística Das Variáveis Fenotípicas

Para os dados quantitativos de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio, atividade da fosfatase, biofilme e dados de biomassa os dados foram submetidos a teste de normalidade e homogeneidade de variância de Shapiro-Wilk e o teste de Levene e estatisticamente utilizando ANOVA e diferenças foram analisadas utilizando o teste post-hoc de Tukey com $p \leq 0.05$. Todas essas análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem de programação R no ambiente RStudio (versão 3.2.4).

Para a produção de ácidos orgânicos, todos os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância utilizando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, respectivamente. Em seguida, os dados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA unidirecional e o teste post-hoc de Tukey com $p \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Rstudio (versão 2.3).

6 DIVERSIDADE E ATIVIDADE PROMOTORA DO CRESCIMENTO DO MILHO (ZEA MAYS) DE RIZOBACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

Resumo

Devido a situações de emergência climática atual, a intensificação de estresses como salinidade e deficiência hídrica, causam as plantas um grande desafio. A plasticidade fenotípica de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) sob essas condições é fundamental para sua sobrevivência e função. O objetivo deste estudo foi o isolamento e a caracterização de rizobactérias solubilizadoras de fosfato e tolerantes a estresse osmótico, de milho (*Zea mays*) em solos com diferentes históricos de uso dos Campos Gerais, Paraná. Um total de 179 estirpes apresentaram a dupla característica, com maior frequência de isolados oriundos de solos agrícolas. Um total de 40 estirpes foram selecionadas e caracterizadas com base na produção de biofilme, exopolissacarídeos (EPS), ácido indolacético (AIA), sideróforos e na capacidade de solubilizar diferentes fontes de fósforo. O DNA dos 40 isolados foi amplificado e sequenciado para o gene 16S DNAr que revelou a predominância do gênero *Pseudomonas* (42%). Outros gêneros identificados incluíram *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Priestia*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Rhodococcus*, *Lecrercia*, *Cedecea*, *Burkholderia* e *Microbacterium*. Entre os oito melhores solubilizadores de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, o gênero *Pseudomonas* apresentou destaque (embora o desempenho variou amplamente entre as estirpes), com seis estirpes e índices de solubilização superiores a 100 mg.L^{-1} após 72 horas de cultivo, das quais, cinco foram capazes de produzir sideróforos. Todos os oito isolados selecionados mostraram solubilização de AlPO_4 , com *Pseudomonas* sp. P.C.G 13.33 e P.C.G 92.22 apresentando os maiores índices. Para FePO_4 , apenas quatro estirpes foram positivas, com destaque para *Enterobacter* sp. A.A 15.28. A atividade da enzima fosfatase ácida foi detectada em todas as estirpes, e os maiores valores foram alcançados por *Pseudomonas* sp. F.E 59.4 e P.C.G 92.22. Além de *Pseudomonas*, isolados do gênero *Enterobacter* também se destacaram pela solubilização de diversas fontes de P, inclusive FePO_4 , e pela produção de EPS e a estirpe *Microbacterium* sp. A.A 42.29 que esteve entre maiores solubilizadoras de fosfato $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e AlPO_4 , com produção de sideróforos e ácido indolacético (AIA) e robustez em condições de estresse osmótico. Os resultados demonstraram gêneros que possuem potencial para promover o crescimento de plantas em condições adversas sugerindo que podem ser utilizados em estratégias de manejo sustentável do solo e na mitigação dos efeitos das mudanças climáticas. Embora os resultados *in vitro* sejam promissores, a eficácia das estirpes selecionadas está sendo validada em condições *in vivo*.

Palavras-chave: Solubilização de P, estresse osmótico, Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.

6.1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um macronutriente vital para o crescimento e desenvolvimento das plantas e, apesar dos índices de P na maioria dos solos serem geralmente elevados (de 50 a 3.000 mg/l), apenas cerca de 0,1% encontra-se em formas assimiláveis pelas plantas (Rawat et al., 2020b)

As plantas absorvem o P solúvel (Sarikhani; Aliasgharzad; Khoshru, 2020), principalmente, na forma de íon ortofosfato (H_2PO_4^- e HPO_4^{2-}) (Pereira *et al.*, 2021). Porém, essa molécula possui natureza altamente reativa, que a torna propensa a adsorção em superfícies minerais, precipitação em alguns sais (Ca, Fe, Al e Mn) e imobilização em fósforo orgânico (De Zutter et al., 2022). Isso, faz com que grande parte do P seja retido e sua disponibilidade para a absorção pelas raízes, seja pequena.

As plantas formam uma entidade ecológica com seu microbioma, um holobionte, e contam de sua comunidade microbiana para funções e habilidades específicas (Vandenkoornhuyse et al., 2015a), inclusive no que diz respeito à aquisição de P. As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) contemplam variados grupos taxonômicos, com ampla diversidade genética e funcional, e são capazes de aumentar o crescimento e a produtividade vegetal (Etesami; Maheshwari, 2018; Oleńska et al., 2020b).

As RPCP solubilizam os fosfatos inorgânicos e mineralizam os fosfatos orgânicos do solo por meio de diversos mecanismos. Essas atividades microbiológicas podem envolver a produção de enzimas fosfatase, liberação de ácidos orgânicos com baixo peso molecular, liberação de íons H^+ , quelação e acidificação (Glick, 2012b; Nascimento et al., 2024), que convertem o P do solo em formas solúveis, tornando-o acessível às plantas ao longo do tempo. Outra contribuição para absorção de P é a capacidade rizobacteriana de promover o crescimento radicular, permitindo assim, uma maior exploração do solo e absorção de P pelas raízes (Chaves; Zucareli; De Oliveira Junior, 2013).

Visto que o P é um nutriente limitante para culturas agrícolas, o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso excessivo de fertilizantes fosfatados é essencial. As bactérias solubilizadoras de P (BSP) consolidam-se como importantes RPCP de aplicação biotecnológica, sendo base do desenvolvimento de inoculantes agrícolas que melhoram a aquisição de P, de forma mais econômica e sustentável (De Oliveira-Paiva et al., 2024). Contudo, as estratégias mais adotadas para isolamento e prospecção *in vitro* de BSP muitas vezes não são correspondentes aos resultados em casa de vegetação ou experimentos de campo. Dentre os principais fatores para tal inconsistência estão a não-consideração de fenótipos

relacionados ao estabelecimento e persistência das estirpes no solo (Amaya-Gómez et al., 2020) e falta de competência rizosférica das bactérias inoculadas (De Zutter et al., 2022).

Além disso, as alterações climáticas e o aumento das influências ambientais causadas pela ação humana tornam as condições cada vez mais imprevisíveis.

Considerando que o ambiente rizosférico é crucial na garantia dos benefícios oriundos da interação planta-microrganismos, no qual grande parte dos mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento vegetal são desempenhados pela microbiota (De Zutter et al., 2022; Lucero et al., 2022), utilizamos nesse estudo uma estratégia de seleção de BSP a partir de rizosferas de milho (*Zea mays*) cultivado em três solos de Campos Naturais com diferentes históricos de uso. Além disso, as BSP foram também triadas quanto à capacidade de tolerância a estresse osmótico, condição usualmente presente em solos brasileiros, antes de serem caracterizadas fenotípica e geneticamente.

Pois, compreender e explorar o potencial biotecnológico das bactérias solubilizadoras de fósforo (BSP) não apenas oferece uma alternativa sustentável ao uso de fertilizantes químicos, mas também contribui para a preservação da saúde dos solos e o fortalecimento da resiliência agrícola frente às mudanças climáticas. Além disso, reforça a importância da biodiversidade microbiana em ecossistemas naturais e restaurados, beneficiando tanto o manejo agrícola quanto a recuperação de áreas degradadas. Este estudo visa ampliar o conhecimento sobre a interação planta-microrganismo, selecionando e caracterizando estirpes capazes de promover o crescimento vegetal em condições adversas, apontando caminhos para práticas agrícolas mais sustentáveis e alinhadas com os desafios ambientais contemporâneos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Obtenção De Solo Rizosférico De Milho (*Zea Mays*)

Foram coletados solos em três regiões inseridas no Bioma Mata Atlântica, de fitofisionomia campestre (Campos Nativos) com diferentes históricos de usos, localizadas nos Campos Gerais no Paraná, município de Ponta Grossa. A região tem predomínio de Cambissolo e Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 2018) e, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, apresenta clima do tipo Cfa (subtropical úmido quente), com influência indireta do clima Cfb (temperado sempre úmido). As coletas dos solos foram realizadas em 2022, no mês de agosto, que é considerado o mês mais seco na região, com precipitação média entre 50 e 90 mm (INPE, 2023). Cada amostra foi constituída por 15 subamostras de solo, coletadas a uma profundidade de 0-20 cm em sistema de “zigue-zague”, por uma área de cerca

de 1 ha. As subamostras foram peneiradas e homogeneizadas em betoneira para compor cada amostra composta.

Uma área pertencente à Fazenda Escola Campão da Onça em Ponta Grossa, PR (25,09576°S, 50,04426°O), em processo de restauração ecológica passiva desde 2022. Um segundo solo pertencente a Fazenda Modelo da Embrapa em Ponta Grossa, PR (25,15820°S, 50,07272°O), utilizada para experimentação agrícola e aclimação de culturas sem histórico de uso de inoculantes biológicos. E a terceira amostra foi coletada em área com vegetação nativa pertencente ao Parque Nacional dos Campos Gerais, em zona de transição Campos Naturais-Floresta Ombrófila Mista (25,14615°S, 49,95519°O) (autorização MMA/IMCBio/Sisbio 81846-1).

Os solos de cada uma das áreas descritas foram alocados em vasos de com três sementes de milho e permaneceram em casa de vegetação por quarenta dias. Não foi realizada qualquer correção ou fertilização nos solos. Após o período de quarenta dias, os vasos foram desmontados e as plantas de milho foram transferidas para o laboratório. As raízes foram vigorosamente agitadas e solo rizosférico foi coletado por remoção manual com auxílio de uma espátula metálica.

6.2.2 Isolamento e triagem das BSP resistentes a estresse osmótico

Amostras de 1g solos rizosféricos de cada tratamento foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de solução salina estéril e diluídos seriadamente até 10^{-5} . As suspensões foram inoculadas em meio Tryptone Soya ágar (TSA, Himedia) a 10% e incubadas a 28°C por 24/48 horas. Após determinação do número de unidades formadoras de colônia em cada tratamento, realizou-se o isolamento das colônias, transferindo-as para novas placas contendo meio TSA 10% e incubadas nas condições previamente estabelecidas.

Os isolados obtidos passaram por uma dupla triagem, para seleção de microrganismos capazes de solubilizar fosfato inorgânico e crescer em condições de baixa atividade de água (estresse osmótico). Cada isolado foi inoculado em meio NBRIP sólido (Nautiyal, 1999), acrescido de $5 \text{ g.L}^{-1} \text{ Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. As placas de Petri foram incubadas a 28°C por 72 horas. Isolados classificados como BSP geraram um halo transparente ao redor de suas colônias durante o período de incubação. Simultaneamente, realizou-se o cultivo dos mesmos isolados em meio TSA 10% contendo 28,5% de sorbitol, resultando em um valor de 0,963 de atividade de água (A_w). Após 24/48 horas de incubação, foram identificados os isolados capazes de manter o crescimento em menor A_w .

6.2.3 Identificação Molecular Dos Isolados

Foram selecionados quarenta isolados rizosféricos que demonstraram desempenho destacado nos ensaios qualitativos de solubilização de fosfato e resistência ao estresse ósmótico. O DNA total dos isolados foi extraído (GenElute Bacterial Genomic DNA Kits, Sigma-Aldrich) e utilizado como molde para amplificação do gene 16S DNAr. A reação se deu através dos indicadores universais fD1 (5`-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`) e rD1 (5-AAGGAGGTGATCCAGCC-3`) (WEISBURG *et al.*, 1991).

Para o sequenciamento, os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma nova amplificação, utilizando os iniciadores 362f e 786f (Menna *et al.*, 2006). As amostras foram precipitadas (Menna *et al.*, 2006) e submetidas ao sequenciamento em ABI 3500XL (Applied Biosystems).

As sequências de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram analisadas com o programa Geneious v.7.1 (Biomatters). Foram utilizadas as sequencias consenso, geradas pelo alinhamento dos produtos de sequenciamento obtidos com os iniciadores 362f e 786f, para busca no banco de dados “rRNA/ITS” do NCBI, através da ferramenta BlastN.

1.2.4 Quantificação Da Solubilização De Fosfato De $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Dos Isolados

A quantificação dos níveis de fósforo solúvel foi avaliada para os quarenta isolados identificados, utilizando o método colorimétrico de Murpy & Riley (1962), empregando meio de cultivo líquido NBRIP enriquecido com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a 5 g/L como a única fonte de fósforo.

Os cultivos foram incubados a 28°C por 96 horas sob agitação de 120 rpm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4500 xg por 10 minutos e filtradas em papel Whatman nº 42. Alíquotas de 0,5 mL do filtrado foram misturadas com 5 mL de água ultrapura e 1 mL de solução MIX (125 mL de ácido sulfúrico (12%), 75 mL de ácido ascórbico (0,099 M), 37,5 mL de molibdato de amônio (0,03 M) e 12,5 mL da solução de tartarato de antimônio-potássio (0,275g em 100 mL de água) (Murphy e Riley, 1962). Como branco, utilizou-se 0,5 mL do meio NBRIP acrescido de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sem inóculo, 1 mL da solução MIX e 5 mL de água ultrapura. Após 20 minutos da adição do MIX, a intensidade da cor azul foi aferida em espectrofotômetro (Thermoscientific GENESYS 50) a 880 nm. Para cálculo da quantidade de P solubilizada, utilizou-se uma curva padrão baseada em gradiente de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).

6.2.5 Produção De Sideróforos

Para a detecção da produção de sideróforos pelos isolados, foi utilizada a estratégia de “overlaid CAS” ou O-CAS (Pérez-Miranda et al., 2007), que consiste na sobreposição de solução de cromoazurol S (CAS) em cultivos já crescidos. Alíquotas de de cada pré-inóculo foram depositadas em pontos distintos em meio TSA, seguido de incubação a 28°C por 48 horas. A solução CAS (Pérez-Miranda et al., 2007) foi utilizada como revelador pela aplicação sobre os cultivos. Após 60 minutos, colônias produtoras de sideróforos apresentavam mudança na coloração dos halos, com cores variando entre laranja/amarelo.

6.2.6 Produção De Biofilme E EPS

O teste de formação de biofilme foi realizado segundo a metodologia proposta por O'Toole & Kolter (1998). A quantidade de biofilme produzido foi estimada conforme Lucero *et al.* (2020) determinando o Índice de Formação de Biofilme (BI) pela seguinte fórmula: $BI = DO_{570} / DO_{630}$.

Para observar a produção de EPS, utilizou-se metodologia descrita por Paulo *et al.*, (2012) em placas de Petri contendo o meio de cultura acrescido de sacarose 10%. Foram depositados sob o meio discos de papel filtro de 5 cm de diâmetro inoculados com 3 µL de pré-inóculo de cada isolado, seguido de incubação por 4 dias 28°C. A produção de EPS foi então avaliada com base na formação de uma colônia mucoide ao redor dos discos e confirmado pela mistura de uma porção da substância mucoide em álcool absoluto (Paulo *et al.*, 2012).

6.2.7 Determinação De P Disponível Em Meios De Cultura Líquidos Com $Al(H_2PO_4)_3$ E $FePO_4$ E Atividade Da Enzima Fosfatase.

Com base nos resultados anteriores, oito isolados foram selecionados para avaliação da capacidade em solubilizar outras fontes de P e mineralização de fosfato orgânico pela atividade da enzima fosfatase ácida.

Para solubilização de $Al(H_2PO_4)_3$ e $FePO_4$, utilizou-se o método do fosfomolibdato (Marra *et al.*, 2012), conforme previamente descrito.

A atividade da enzima fosfatase foi baseada na metodologia descrita por Tabatabai e Bremner (1969) com a substituição de solo por 2 mL de culturas crescidas em meio TSB 100%. As amostras foram incubadas com p-nitrofenil fosfato (pNPP) e subsequentemente realizou-se a medida através da leitura da absorbância em DO_{400} do p-nitrofenol (pNP) liberado. A curva padrão foi baseada em concentrações crescentes de p-nitrofenol, para calcular a quantidade de pNP liberado em cada amostra.

6.2.8 Respostas À Tolerância Ao Estresse Osmótico Induzido Por Polietilenoglicol (PEG)

Para avaliar o efeito do estresse osmótico no crescimento, produção de AIA e biofilme dos quarenta isolados da rizosfera de milho, ao meio de cultivo TSA (Himedia) foi adicionado PEG 6000 nas concentrações 11%, 21% e 26%, resultando nos potenciais osmóticos (A_w) de 0,15, 0,49 e 0,73 MPa, respectivamente. Como controle, utilizou-se o meio sem PEG.

Para avaliação do efeito no crescimento microbiano, as bactérias foram cultivadas a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm por 48 horas nos meios de cultivo descritos. Após 24 e 48h de incubação, uma alíquota de 1000 µL de cultura foi coletada e o crescimento foi avaliado por absorbância ($D.O_{630nm}$).

Para avaliar o efeito do estresse osmótico na síntese de compostos indólicos, seguiu-se o método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951), conforme descrito anteriormente.

O teste de formação de biofilme foi realizado seguindo a metodologia proposta por O'Toole e Kolter (1998), mediante crescimento dos isolados em microplacas nas condições acima descritas.

6.2.9 Análise Estatística Das Variáveis Fenotípicas

Para todos os dados quantitativos, os valores foram submetidos a teste de normalidade e homogeneidade de variância de Shapiro-Wilk e teste de Levene e estatisticamente utilizando ANOVA e diferenças foram analisadas utilizando o teste post-hoc de Tukey com $p \leq 0.05$. Todas essas análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem de programação R no ambiente RStudio (versão 3.2.4).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Obtenção De BSP A Partir Da Rizosfera Do Milho

Um total de 7.056 unidades formadoras de colônias (UFCs) foram isoladas das rizosferas de milho, com maior proporção correspondente às plantas crescidas em solo de área agrícola (41,41%) e o menor número no solo de origem florestal (25,02%). Dentre os isolados de solo agrícola, 16,1% solubilizaram $Ca_3(PO_4)_2$ em meio sólido, 8,2% foram capazes de crescer em reduzida A_w e 4,7% foram positivos em ambos os testes. Já o solo oriundo da área em restauração apresentou o menor percentual em relação ao número de colônias crescidas sob estresse osmótico (0,9%) e número de colônias eficientes em ambos os testes (0,8%). O solo da região de vegetação nativa apresentou a menor porcentagem de isolados solubilizadores (4,1%),

sendo 2,1 % resistentes a estresse osmótico e 1,5% solubilizadores e tolerantes a estresse osmótico.

No total, 179 isolados das três origens foram positivos em ambas as etapas de triagem. A partir destes, foram selecionados quarenta isolados que apresentaram índices de solubilização satisfatórios e maior eficiência de crescimento em meio com baixa A_w quando comparado à condição controle (sem sorbitol). As características morfológicas das colônias e microscopia também foram consideradas, visando excluir/evitar grupos clonais. Ao todo, foram selecionados 11 isolados do solo de preservação, 18 da área agrícola e 11 do solo de restauração (Tabela 1).

6.3.2 Identificação Molecular Dos Isolados

O DNA total dos 40 isolados foi utilizado para amplificação e sequenciamento do gene ribossomal 16S DNAr (Tabela 1). Apesar de apresentar os dados de espécies com a maior pontuação, é importante ressaltar que essa estratégia não permite a identificação em nível de espécie, devendo ser posteriormente associada à uma análise filogenética para maior definição taxonômica. Contudo, o gene 16S DNAr é um excelente marcador para gêneros bacterianos.

Dentre as bactérias identificadas, o gênero *Pseudomonas* destacou-se, totalizando 17 (42%) dos isolados rizosféricos selecionados (Tabela 1). Cabe salientar que nenhum meio de cultivo ou estratégia de isolamento adotada foi direcionada a bactérias do gênero. Dentre os isolados do gênero, seis apresentaram os maiores índices de identidade nucleotídica com a espécie *P. tolaasii*.

Tabela 1. Identificação molecular baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA de bactérias rizosféricas.

Origem ¹	Isolado	Identificação NCBI/Blast ²	Identidade (%)	Tamanho (pb)
Gênero <i>Pseudomonas</i>				
P.C.G	49.12	<i>P. baetica</i> a390 (NR_116899.1)	99,54	1080
P.C.G	86.5	<i>P. baetica</i> a390 (NR_116899.1)	99,45	1459
P.C.G	97.07	<i>P. baetica</i> a390 (NR_116899.1)	99,54	1081
F.E	102.28	<i>P. baetica</i> a390 (NR_116899.1)	99,45	1080
A.A	35.12	<i>P. glycinae</i> MS586 (NR_179889.1)	99,91	1085
A.A	38.12	<i>P. glycinae</i> MS586 (NR_179889.1)	99,45	1080
A.A	82.13-2	<i>P. glycinae</i> MS586 (NR_179889.1)	99,86	1461
P.C.G	92.22	<i>P. glycinae</i> MS586 (NR_179889.1)	99,26	1078
P.C.G	92.11	<i>P. koreensis</i> Ps 9-14 (NR_025228.1)	99,79	1398
P.C.G	13.33	<i>P. tolaasii</i> LMG 2342 (NR_041799.1)	99,71	1448
P.C.G	12.4-2	<i>P. tolaasii</i> LMG 2342 (NR_041799.1)	99,79	1447
A.A	20.7-3	<i>P. tolaasii</i> LMG 2342 (NR_041799.1)	99,72	1078
P.C.G	49.7	<i>P. tolaasii</i> LMG 2342 (NR_041799.1)	99,72	1457
P.C.G	97.9-1	<i>P. tolaasii</i> LMG 2342 (NR_041799.1)	99,65	1440
P.C.G	97.10	<i>P. tolaasii</i> LMG 2342 (NR_041799.1)	97,11	1398
F.E	59.4	<i>P. veronii</i> CIP 104663 (NR_028706.1)	99,72	721
F.E	90.07	<i>P. zeiradicis</i> PI116 (NR_181890.1)	99,08	1308
Gênero <i>Enterobacter</i>				
A.A	15.22	<i>E. mori</i> YIM Hb-3 (NR_146667.2)	98,36	731
A.A	15.28	<i>E. mori</i> YIM Hb-3 (NR_146667.2)	98,8	1083
A.A	15.24	<i>E. mori</i> YIM Hb-3 (NR_146667.2)	98,61	1068
A.A	39.40	<i>E. mori</i> YIM Hb-3 (NR_146667.2)	99,52	1045
A.A	43.30	<i>E. mori</i> YIM Hb-3 (NR_146667.2)	99,52	1052
F.E	56.17	<i>E. ludwigii</i> EN-119 (NR_042349.1)	99,18	1468
F.E	56.33	<i>E. ludwigii</i> EN-119 (NR_042349.1)	99,66	1463
Gêneros <i>Priestia</i> e <i>Bacillus</i>				
F.E	76.32	<i>B. aerophilus</i> 28K (NR_042339.1)	99,72	1084
A.A	34.04	<i>B. wiedmannii</i> FSL W8-0169 (NR_152692.1)	99,48	1139
F.E	65.22	<i>B. zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372 (NR_148786.1)	99,73	1472
A.A	111.3	<i>P. aryabhattai</i> B8W22 (NR_115953.1)	99,86	1466
A.A	115.32	<i>P. aryabhattai</i> B8W22 (NR_115953.1)	99,86	1481
F.E	PR 31	<i>P. aryabhattai</i> B8W22 (NR_115953.1)	99,79	1439
F.E	PR03	<i>P. aryabhattai</i> B8W22 (NR_115953.1)	99,8	1476
Demais gêneros				
A.A	35.02	<i>Achromobacter deleyi</i> LMG 3458 (NR_152014.1)	99,72	1435
A.A	39.1	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD (NR_074687.1)	99,51	1443

A.A	38.22	<i>Cedecea lapagei</i>	99,44	706
A.A	36.14	<i>Leclercia adecarboxylata</i> LMG 2803 (NR_117405.1)	99,71	1049
A.A	42.29	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	100	704
F.E	53.7	<i>Pantoea agglomerans</i> NCTC9381 (NR_114735.1)	98,38	1426
A.A	137.36	<i>Rhodococcus qingshengii</i> CCM 4446 (NR_145886.1)	99,85	1399
P.C.G	5.04	<i>Rhodococcus qingshengii</i> CCM 4446 (NR_145886.1)	100	1059

¹ P.C.G.: área de preservação; A.A.: área agrícola; F.E.: área de restauração

² O nome da espécie e número de acesso são relativos aos maiores valores de *score* após busca no bando de dados rRNA/ITS via NCBI/Blast.

Outras sete estirpes (17,5%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Enterobacter*, com maior identidade com as espécies *E. mori* e *E. ludwigii*. Outro destaque foi para a espécie *Priestia aryabhatai* (anteriormente *Bacillus*), que apresentou elevada identidade nucleotídica com quatro estirpes do presente estudo.

6.3.3 Produção De Sideróforos E Quantificação Da Solubilização De Fosfato

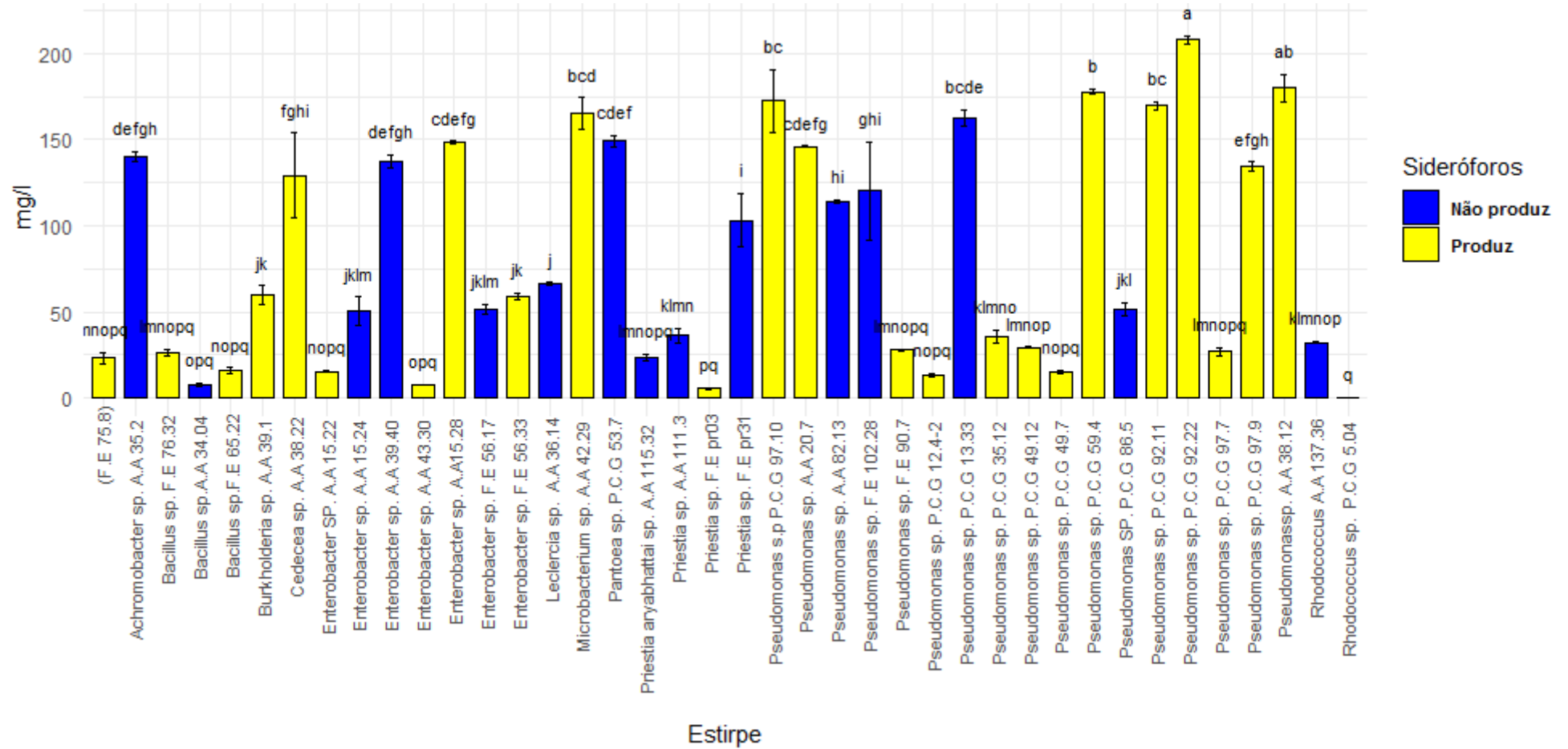
Os ensaios no meio TSB-CAS apresentaram a formação de halo amarelo/laranja que indica a produção de sideróforos do tipo hidroxamato e carboxilato em 65% das estirpes analisadas (Figura 1). Entre os isolados que mais solubilizaram P apenas as estirpes *Pseudomonas* sp. P.C.G 13.33 e *Pantoea* sp. F.E. 53.7 não apresentaram produção de sideróforos (Figura 1).

Nas análises quantitativas realizadas para teste de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, as estirpes *Pseudomonas* sp. P.C.G 97.10, *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.22, *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.11, *Pseudomonas* sp. F.E 59.4, *Microbacterium* sp. A.A 42.29, *Pseudomonas* sp. A.A 38.12, *Enterobacter* sp. A.A 15.28 e *Pseudomonas* sp. A. A 13.33 alcançaram índices de solubilização superiores a 100mg.L^{-1} após 72 horas de cultivo.

O gênero *Pseudomonas* sp. apresentou destaque com 6 (75%) representantes entre as oito maiores solubilizadoras. No entanto, é possível observar que elevadas taxas de solubilização e a produção de sideróforos *in vitro* não são características do gênero, visto que outros isolados de *Pseudomonas* sp. tiveram desempenhos significativamente inferiores (Figura 5). O mesmo foi observado entre os isolados dos gêneros *Enterobacter* e *Priestia*.

A estirpe *Rhodococcus* sp. P.C.G. 5.4 apresentou formação de halo na triagem qualitativa, mas não apresentou valores de solubilização detectáveis e/ou produção de sideróforos no tempo estabelecido.

Figura 2. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais. As estirpes estão separadas por gêneros. Barras amarelas indicam estirpes produtoras de sideróforos e barras azuis indicam resultado negativo.



6.3.4 Solubilização De AlPO_4 , FePO_4 E Atividade Da Enzima Fosfatase

A realização dos testes seguintes ocorreu após a seleção das oito estirpes bacterianas que apresentaram maior eficiência no teste de solubilização de Ca_3PO_4 : *Pseudomonas* sp. P.C.G 97.10, *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.22; *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.11, *Pseudomonas* sp. F.E 59.4, *Pseudomonas* sp. A.A 38.12, *Pseudomonas* sp. P.C.G 13.33, *Enterobacter* sp. A.A 15.28 e *Microbacterium* sp. A.A 42.29.

Todas as oito estirpes apresentaram valores detectáveis de AlPO_4 , sendo que as estirpes que mais solubilizaram foram *Pseudomonas* sp. P.C.G 13.33 (7,348 mg.L^{-1}) e *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.22 (7,060 mg.L^{-1}), ambas oriundas do solo de unidade de preservação (Figura 2). Já no teste de solubilização de FePO_4 , apenas 4 estirpes apresentaram valores detectáveis de solubilização com destaque para a estirpe *Enterobacter* sp. A.A 15.28 com 3,376 mg.L^{-1} (Figura 3).

Figura 3. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de AlPO_4 , mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais. O resultado do teste de Tukey está representado pelas letras acima das barras.

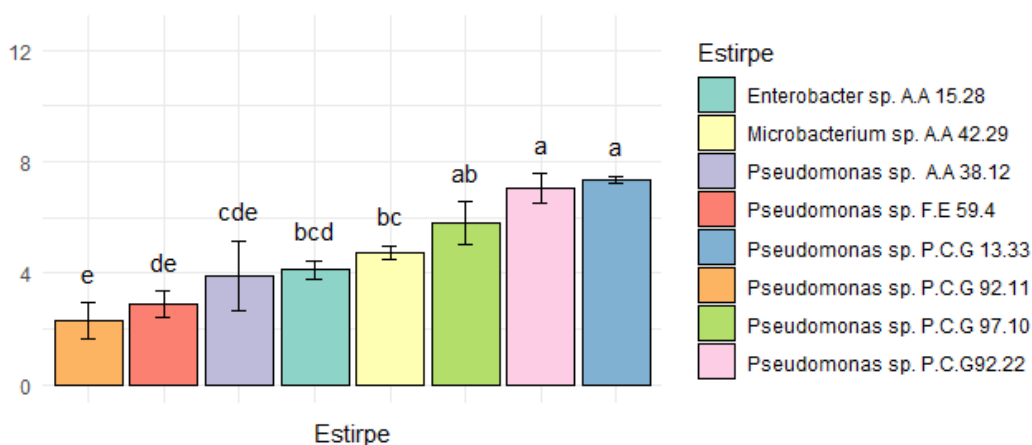
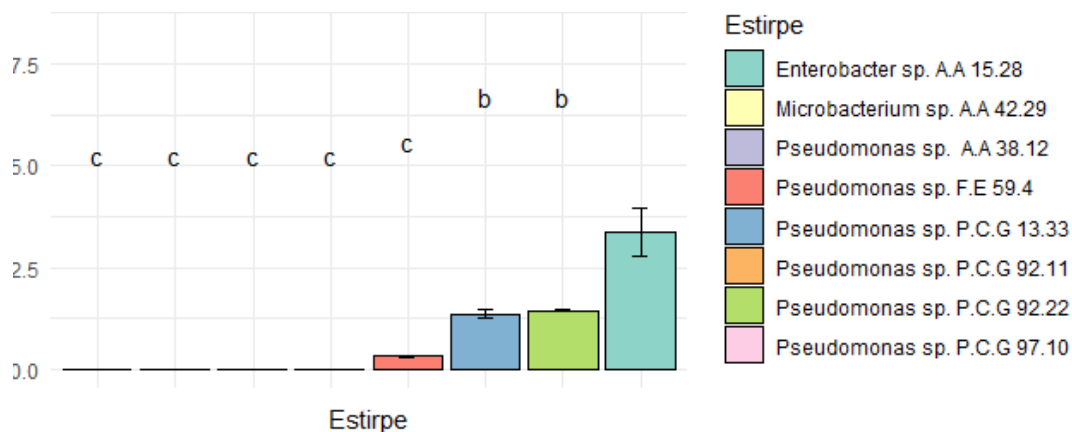
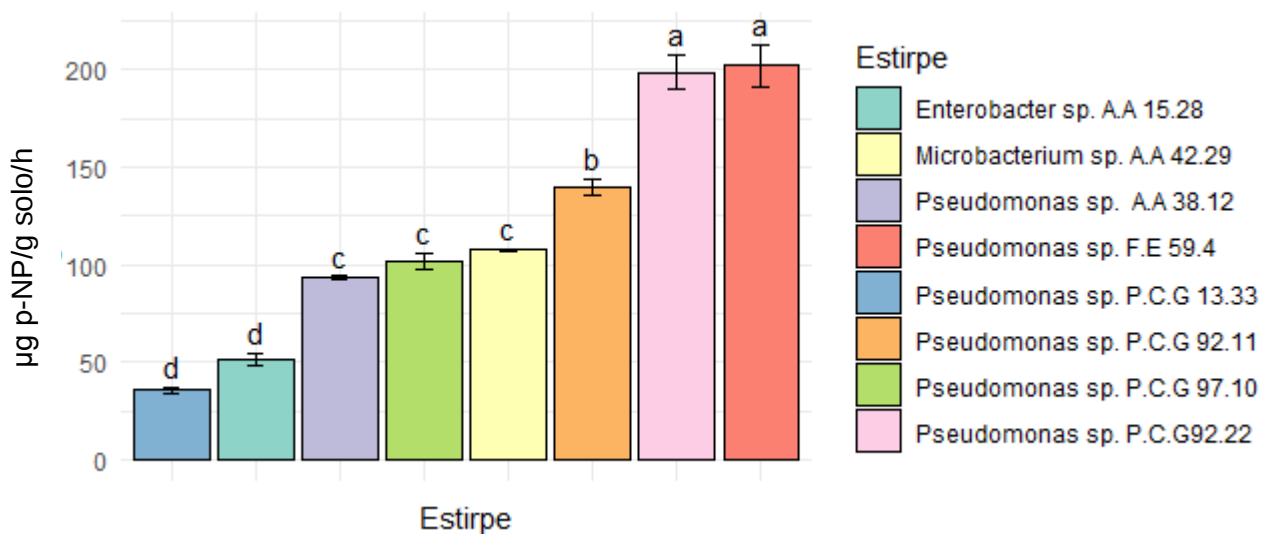


Figura 4. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de FePO_4 , mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais.



A enzima fosfatase ácida teve atividade detectada em todas as oito estirpes testadas isoladamente. Destacaram-se com os maiores valores de $\mu\text{g p-NP/g}$, as estirpes *Pseudomonas* sp. F.E 59.4 (202,219 $\mu\text{g p-NP/g}$) e *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.22 (198,651 $\mu\text{g p-NP/g}$). Os menores valores foram de 35,495 $\mu\text{g p-NP/g}$ e 51,061 $\mu\text{g p-NP/g}$ pertencentes as estirpes *Pseudomonas* sp. P.C.G 13.33 e *Enterobacter* sp. A.A 15.28, respectivamente. As demais estirpes apresentaram valores estatisticamente iguais entre 107,341 e 93,429 $\mu\text{g p-NP/g}$.

Figura 5. Atividade da enzima fosfatase ácida produzida por BSP isoladas da rizosfera de milho.

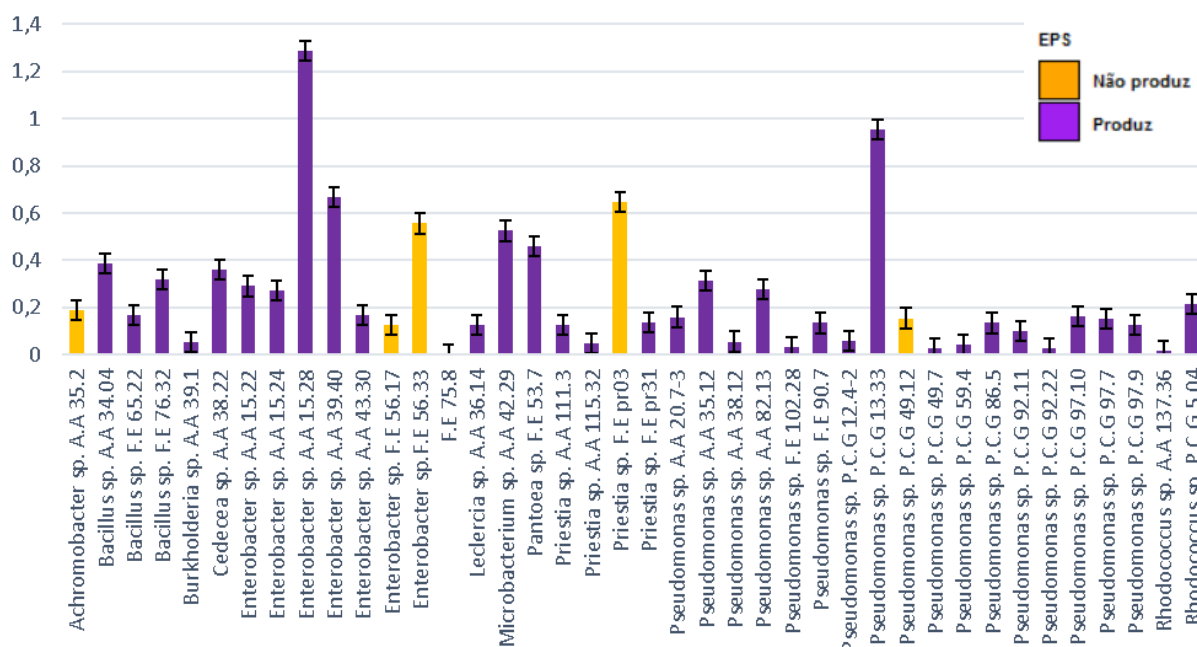


6.3.5 Produção EPS E Biofilme

A produção de EPS foi analisada observando o aparecimento de colônia mucóide ao redor dos círculos de papel filtro e a confirmação foi obtida através do teste de mistura com álcool, onde para os isolados positivos para EPS, a mistura permanecia translúcida e sem homogeneização da colônia com o líquido, enquanto para os resultados negativos para produção de EPS a mistura ficava turva e a colônia era homogeneizada. Dentre os sete isolados que apresentaram resultado negativo para produção de EPS, apenas a estirpe *Microbacterium* sp. A.A 49.29 também foi negativa para a produção de biofilme.

Dos 40 isolados analisados quanto a produção de biofilme, apenas o isolado F.E 75.08 (não identificado) não apresentou formação em meio TSB. Os maiores índices (BI) foram alcançados pelo isolado *Enterobacter* sp. A.A 15.28 com BI = 1,28 (Figura 5).

Figura 6. Índices de formação de biofilme (BI) em meio TSB e produção de EPS por rizobactérias isoladas em rizosfera de milho cultivado em diferentes solos dos Campos Gerais do Paraná.

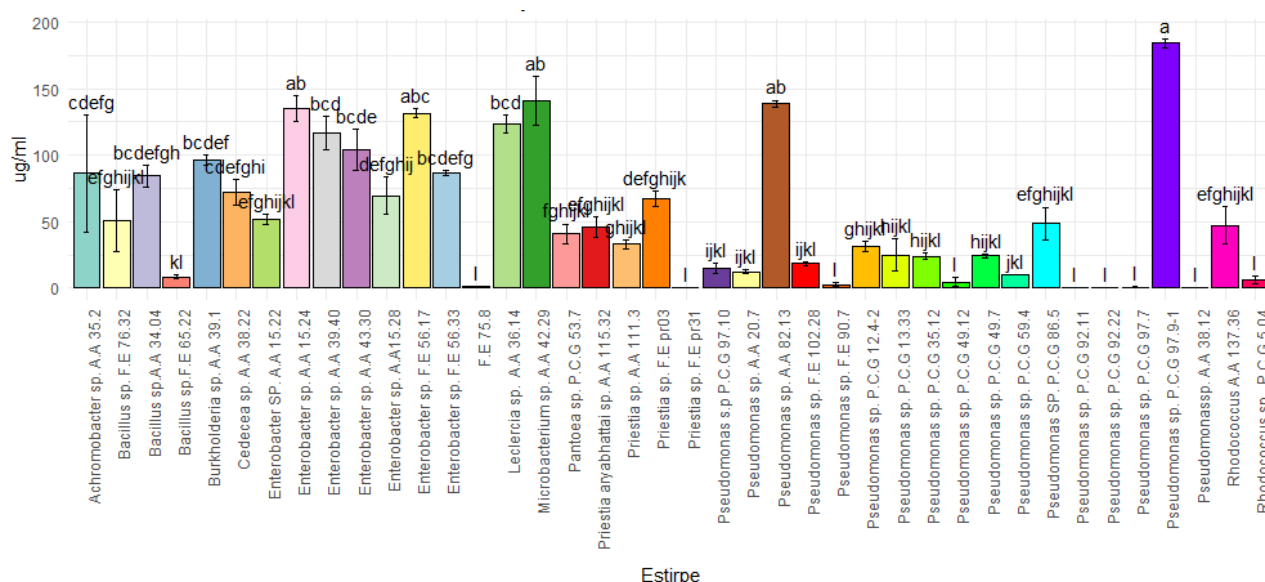


6.3.6 Produção De AIA

Dos 40 isolados analisados quanto à produção de AIA em meio TSB+triptofano, 36 foram considerados positivos, apresentando valores entre 0,64 µg/mL (97.7) e 184,060 µg/mL (*Pseudomonas* sp. P.C.G 97.9-1), seguida de *Microbacterium* sp. A.A 42.29 (140,85 ug/ml), *Enterobacter* sp. A.A 15.24 (134,79 ug/ml) e *Pseudomonas* sp. A.A 82.13 (138,58 ug/ml). Nove estirpes não produziram/produziram pouco AIA detectável em TSB. Entre elas estão três estirpe

de *Pseudomonas* sp. com os maiores índices de solubilização de fosfato, P.C.G 92.22, P.C.G 92.11 e A.A 38.12. As demais estirpes do gênero produziram valores que variaram de 9,85 ug/ml (*Pseudomonas* sp. P.C.G 59.4) e 48,81 ug/ml (*Pseudomonas* sp. P.C.G 86.5). Cabe ressaltar, que todos as estirpes do gênero *Enterobacter* produziram quantidades substanciais de AIA, com valores que ficaram entre 51,729 ug/ml (*Enterobacter* SP. A.A 15.22) e 134,79 ug/ml (*Enterobacter* sp. A.A 15.24).

Figura 7. Produção de AIA (ug/ml) em TSB+triptofano, produzido por rizobactérias isoladas dos Campos Gerais.



6.3.7 Efeitos Do Estresse Osmótico No Crescimento, Produção De AIA E Biofilme

Os quarenta isolados foram analisados quanto à capacidade de crescimento em condições crescentes de estresse osmótico induzido por PEG, a habilidade de produção de AIA e produção de biofilme nas mesmas condições. Ao analisar os dados da razão do crescimento bacteriano (DO na condição de estresse/DO na condição controle) e produção de AIA sob estresse, foi possível perceber que a produção de AIA não teve relação com o crescimento bacteriano, uma vez que, as bactérias que apresentaram maiores valores na razão de crescimento não necessariamente produziram maiores níveis de AIA. Já em relação ao crescimento aquelas que apresentaram valores altos em PEG 11% mantiveram o crescimento elevado em ambas as concentrações.

Todas as estirpes foram capazes de crescer nas condições de estresse osmótico testadas. A estirpe que apresentou destaque de crescimento, de acordo com a razão, foi *Pseudomonas* sp. P.C.G 35.12, com altos índices nas três concentrações de PEG. Em PEG 11% *Pseudomonas* sp. P.C.G 86.5 possuiu a segunda maior razão. Em PEG 21% e 26%, *Pseudomonas* sp. P.C.G 35.12 foi seguida das estirpes *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.22; *Pseudomonas* sp.A.A 38.12; *Pseudomonas* sp. P.C.G 92.11 e *Pseudomonas* sp. P.C.G 97.9.

A produção AIA em diferentes concentrações de PEG, foi distinta não existindo semelhaça entre as maiores produtoras em cada um dos meios. Especificamente as estirpes que apresentaram os maiores valores de AIA na concentração de PEG 11% foram as estirpes *Microbacterium* sp. A.A 42.29 (151,27 ug/ml), *Pseudomonas* sp.A.A 20.7-3 (133,68 ug/ml) e *Enterobacter* sp. F.E 56.17 (128,68 ug/ml). Já na concentração de PEG a 21%, foram as estirpes *Pseudomonas* sp. P.C.G 97.9-1 (126,18 ug/ml), *Microbacterium* sp. A.A 42.29 (101,98 ug/ml) e *Pseudomonas* sp. A.A 20.7 (99,09 ug/ml) e na concentração de 26% foram as etirpes *Pantoea* sp. P.C.G 53.7 (190,76 ug/ml), *Enterobacter* A.A 39.40 (128,24 ug/ml) e *Enterobacter* sp. 56.33 (114,93 ug/ml).

Figura 8. Valores de AIA (ug) produzidos pelos isolados dos Campos Gerais, sob condições de estresse osmótico gerado por PEG 11% ,21 e26%.

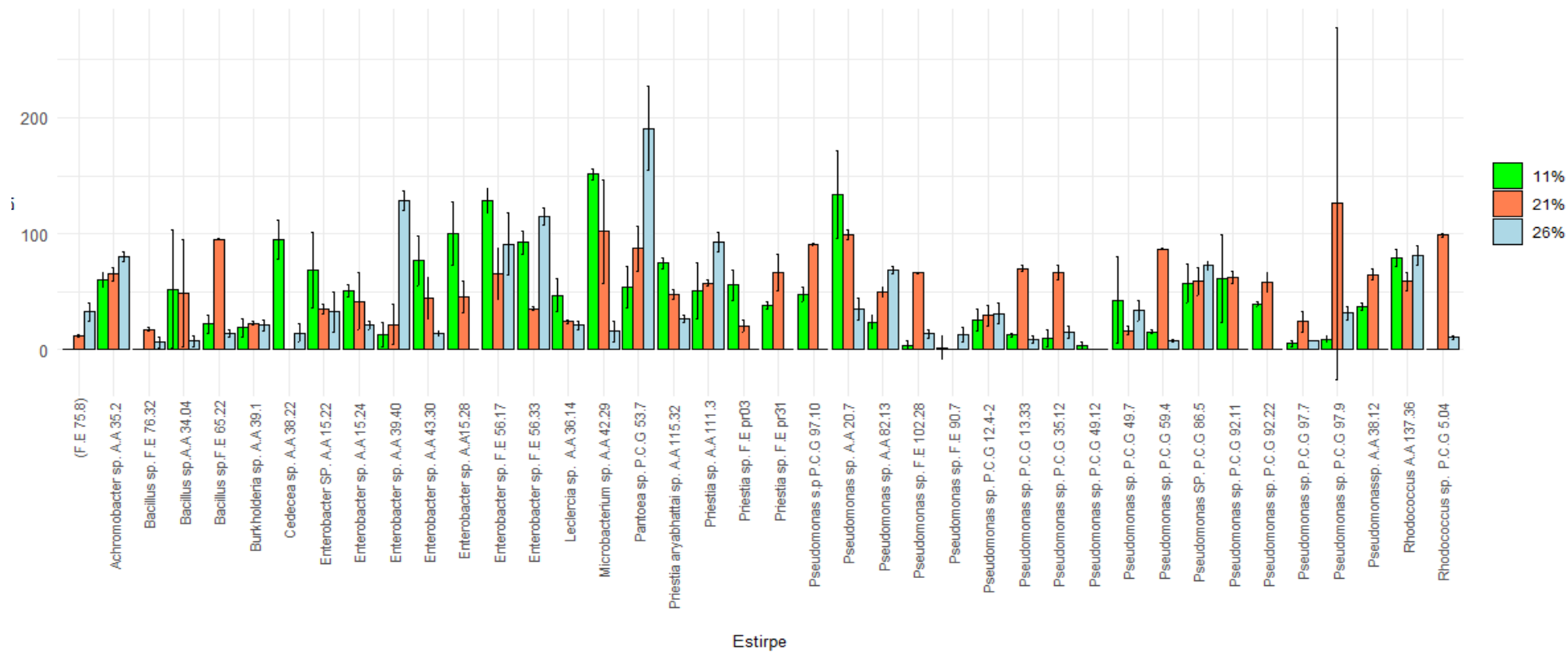
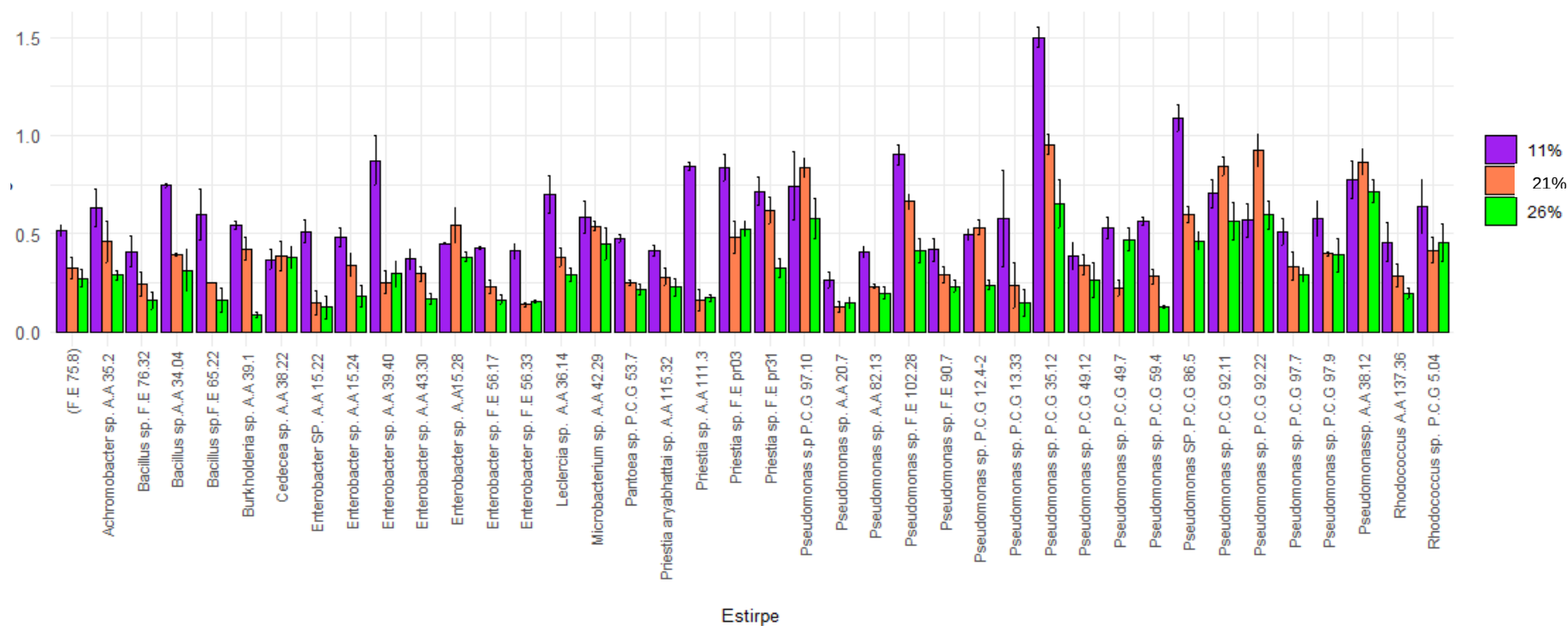


Figura 9. Crescimento bacteriano em PEG 11%, 21% e 26% após 48 horas de crescimento.

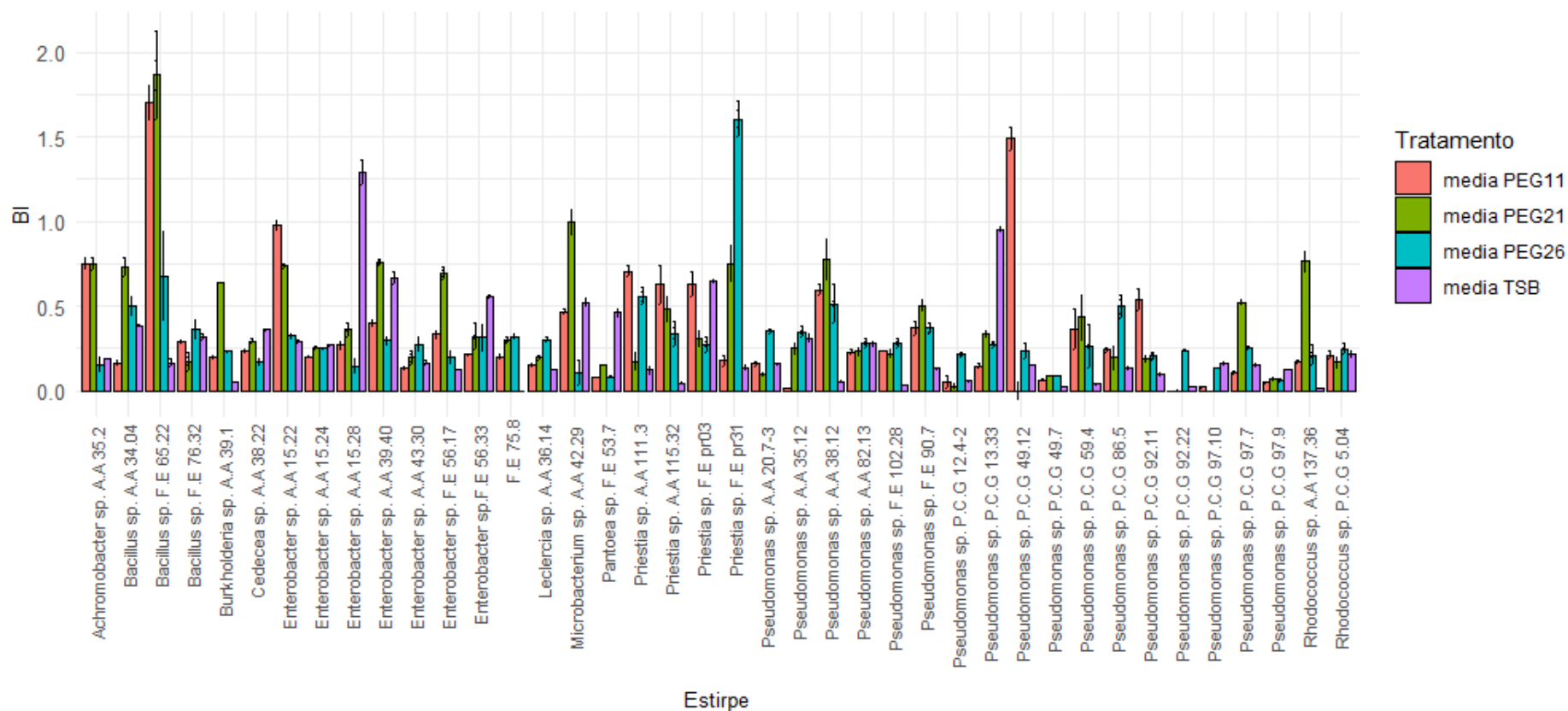


Ao analisar os índices de produção de biofilme (BI) dos 40 isolados nos meios sob três condições estressantes induzida por PEG (11%, 21% e 26%), a estirpe *Enterobacter* sp A.A 15.22 destacou-se, uma vez, que ficou entre os maiores BI nas três concentrações, sendo o maior em 11% e 21% e segundo maior em 26%.

Entre os maiores BI estiveram também as estirpes *Pseudomonas* sp. P.C.G 49.12 e *Enterobacter* sp A.A 15.22 em 11%, *Bacillus* sp. F.E 65.22 e *Microbacterium* sp. A.A 42.29 em 21% e *Priestia* sp. F.E. PR31 em 26%. A estirpe F.E. 75.8 (não identificada) não produziu biofilme em condições controle, mas apresentou valores positivos de BI nas três concentrações de PEG.

Com exceção da estirpe *Enterobacter* sp A.A 15.22 que esteve entre os maiores BI, em ambas as concentrações, não houve simetria entre as estirpes com maior BI quando comparado nas diferentes concentrações de PEG. Cabe ressaltar, que nenhuma estirpe que apresentou maior BI em concentrações de PEG, possuiu bom desempenho em condições controle (TSB)

Figura 10. Valores de BI dos isolados dos Campos Gerais em estresse induzido por PEG 11%, 21% e 26% e meio controle.



6.4 DISCUSSÃO

O P é um nutriente essencial no crescimento das plantas e é encontrado abundantemente nos solos, mas sua disponibilidade é limitada devido à sua alta reatividade. Como resultado, a agricultura tem optado pelo uso excessivo de fertilizantes químicos. Grande parte desses químicos persistem no solo na forma insolúvel, podendo gerar contaminação e alterando a matriz do solo e suas funções ecológicas. Em solos calcários, o P é frequentemente precipitado com Ca e em solos ácidos a sorção de P é atribuída aos óxidos hidratados de Fe e Al (Tariq et al., 2014), resultando em poucas formas biodisponíveis de P para absorção pela raiz, o que afeta o crescimento e a produtividade vegetal. Com isso as BSP apresentam um papel fundamental nos processos biogeoquímicos que envolvem fósforo.

Por outro lado, o estresse osmótico/hídrico atrelado às mudanças climáticas é considerado um dos mais prevalentes estresses abióticos enfrentados pelas plantas e suas respectivas comunidades microbianas associadas. De forma similar às plantas, as bactérias rizosféricas também sofrem efeitos causados pelo estresse osmótico, afetando sua viabilidade, crescimento e funções bioquímicas (Ahmad Ansari; Ahmad; Pichtel, 2023). Desta forma, no atual cenário de emergências climáticas, torna-se necessário isolar e caracterizar microrganismos que tenham a capacidade de manter suas atividades promotoras do crescimento mesmo em condições desfavoráveis, ou seja, que exibam maior plasticidade fenotípica (Orozco-Mosqueda et al., 2023).

Nesse contexto, o presente trabalho apresentou uma estratégia dupla para enriquecimento e seleção de RPCP, bioprospectadas a partir de amostras de solo com diferentes históricos de uso. Primeiramente, utilizou-se o conceito de efeito rizosférico a fim de selecionar microrganismos capazes de colonizar a rizosfera do milho. Subsequentemente, foram adotadas duas características para a triagem inicial: a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos (no caso, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e tolerar condições de estresse osmótico (inicialmente mediado por sorbitol). Das 7.056 estirpes isoladas, apenas 179 mostraram potencial em ambas as etapas de triagem, refletindo a seletividade nos critérios empregados para seleção de RPCPs eficazes.

A frequência de isolados variou entre os diferentes tipos de solo. A predominância de isolados provenientes de solos agrícolas (41,41%) em comparação com solos de preservação (25,02%) e de restauração (33,57%) sugere a maior demanda de P biodisponível pelas plantas de importância agrícola, visto que as plantas desempenham um papel importante na determinação do microbioma do solo, moldado principalmente pelos exudatos radiculares, que atraem os microrganismos fundamentais. Outro fator é a influência das atividades agrícolas,

uma vez que perturbações antrópicas no solo abalam o equilíbrio do ecossistema, selecionando os microrganismos ao novo habitat (Luft Da Silva et al., 2017).

Subsequentemente, quarenta isolados foram selecionados para caracterização com base em suas atividades fenotípicas, como formação de biofilme, produção de EPS, produção de AIA, solubilização/mineralização de P *in vitro*, produção de sideróforos e respostas frente ao estresse osmótico.

A análise da sequência do gene 16S rRNA estabeleceu que a predominância entre os isolados selecionados foi do gênero *Pseudomonas* (42%). Isso é consistente com estudos anteriores que destacam este gênero como uma das principais colonizadoras da rizosfera devido à sua versatilidade metabólica, tornando-as ecologicamente mais competentes mesmo sob variadas condições edáficas e de estresse (Patil et al., 2017). A capacidade de mineralização de P orgânico por *Pseudomonas* acontece por meio de várias enzimas conhecidas como fosfatases, fitases e fosfonatases e o principal estímulo que afeta a regulação do gene da fosfatase é a ativação em resposta a concentrações de fosfato baixas, atuando através do regulon *pho*, mecanismo de regulação que conserva e gere o P inorgânico intracelular (Miller et al., 2010).

Seis das oito estirpes que alcançaram os maiores valores de solubilização em Ca_3PO_4 foram classificadas como *Pseudomonas*, com valores entre 208,18 ug/ml e 162,89 ug/ml e tais estirpes também solubilizaram AlPO_4 . O gênero também apresentou produção de sideróforos em onze isolados. Além de disponibilizar ferro, os sideróforos também podem contribuir para a obtenção de fósforo através da dissolução de minerais no solo. Embora a solubilização de P geralmente ocorra através da troca de ligantes com ácidos orgânicos, a dissolução mineral, facilitada pelos sideróforos, pode ser uma estratégia adjuvante (Kumar et al., 2018; Park; Lee; Son, 2009).

As espécies fluorescentes de *Pseudomonas* são frequentemente relatadas quanto aos seus mecanismos de promoção do crescimento de diversas espécies vegetais, como alface (Freitas *et al.*, 2002) e milho (Pereira; Castro, 2014). Sua promoção indireta de crescimento também já foi relatada; por exemplo, O seu efeito a inoculação de *P. fluorescens* promoveu a indução de resistência sistêmica à doença causada por *Rhizoctonia solani* no arroz, reduzindo a incidência da doença e estimulando o crescimento das plantas, resultando em aumento tanto da produção de biomassa seca quanto a produção de grãos (Nandakumar et al., 2001). *P. fluorescens* biovar IV e *P. putida* foram capazes de sintetizar IAA a partir do triptofano como precursor e promover o crescimento de *Lens culinaris* e *Hordeum vulgare* (Meliani et al., 2017).

Os mecanismos de promoção do crescimento de plantas, como a produção de AIA e a solubilização de P, podem atuar de forma sinérgica na estimulação do desenvolvimento vegetal,

tornando fundamental a investigação da diversidade e do potencial das rizobactérias nesses processos (Alemneh et al., 2021). A presença de IAA ou seu precursor nos meios de cultivo aumentou a capacidade solubilizadora de P por rizobactérias de grão-de-bico cultivados em diferentes tipos de solo e condições ambientais na Austrália, onde o AIA foi capaz de liberar pequenas concentrações de P do fosfato de rocha devido à extensão da acidificação da solução (Alemneh et al., 2021).

A estirpe *Microbacterium* sp. A.A 42.29 figurou entre as maiores solubilizadoras de Ca_3PO_4 e AlPO_4 , com produção de sideróforos, crescimento em diferentes concentrações de PEG e na produção de AIA nas concentrações de 11% e 21%, produção de biofilme e atividade da enzima fosfatase ácida. A capacidade de solubilizar fosfato (Di et al., 2016a; Malboobi et al., 2009; Zhang et al., 2017b) e de promoção de crescimento de plantas desse gênero já foi descrita anteriormente na literatura. Outras atividades como produção de IAA e ACC desaminase já foram destacadas em estirpes do gênero (Jayakumar; Natarajan, 2013; Madhaiyan et al., 2010).

Muitos processos de prospecção de RPCP falham no sentido de que as estirpes são selecionadas para uma dada atividade promotora do crescimento e fatores relacionados à capacidade de colonização da rizosfera não são levados em consideração nas etapas de triagem. A formação de biofilme e síntese de EPS, por exemplo, são mecanismos associados direta e indiretamente à capacidade de solubilização de P. No solo, os biofilmes microbianos possuem papel crucial na formação e estabilidade de agregados, intemperismo biológico de diversos minerais e sequestro de carbono orgânico (Velmourougane; Thapa; Prasanna, 2023). A formação de biofilme pelas RPCPs está associada à produção aprimorada de EPS e alginatos conhecidos por reduzir os efeitos adversos da seca, patógenos e outros estresses (Ahmad Ansari; Ahmad; Pichtel, 2023). O EPS produzido pelas RPCPs está envolvido na agregação das partículas do solo, e influencia associações entre matéria orgânica e minerais, afetando composição da matéria orgânica e a reatividade dos minerais (Guhra; Stolze; Totsche, 2022). Contudo, nem sempre a competência rizosférica está diretamente associada com taxas de produção de biofilme *in vitro*, como já apontado para *Pseudomonas fluorescens* (Barahona et al., 2010).

Pseudomonas produzem várias moléculas de matriz de biofilme, incluindo polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e componentes de matriz acessória que auxiliam na formação de biofilme e adaptabilidade sob condições variáveis (Mann; Wozniak, 2012), protegendo-as de patógenos e da escassez de água (Selvakumar; Panneerselvam;

Ganeshamurthy, 2012). Quinze isolados de *Pseudomonas* sp. apresentaram produção de EPS, com destaque para a estirpe A.A 35.12 obteve um alto índice de BI.

Estudos sobre a inoculação com *Pseudomonas* sp. mostraram que o uso aumentou a sobrevivência de girassol em estresse hídrico (Sandhya et al., 2009), exibiu melhor produção de PGP, alginato, EPS e desenvolvimento de biofilme sob os três estresses abióticos (estresse hídrico, de temperatura e salino) (Ahmad Ansari; Ahmad; Pichtel, 2023) e construiu um biofilme robusto em situações de estresse (Jadhav et al., 2024).

Além disso nossos resultados mostraram que o segundo gênero com maior número de representantes *Enterobacter*, também apresentou bom desempenho nos testes *in vitro* de solubilização de P nos três testes, Ca_3PO_4 , AlPO_4 , maior solubilizador em FePO_4 e alto BI. O gênero também já foi descrito por estudos anteriores como promotor de crescimento vegetal. A estirpe *Enterobacter* sp. ITCB-09 apresentou maiores índices de solubilização de P inorgânico pela produção de ácidos orgânicos do que outras estirpes avaliadas, com produção de sideróforos e substâncias poliméricas extracelulares, promovendo o crescimento de mudas de pimenta Habanero (Mendoza-Arroyo et al., 2020). Os efeitos positivos da inoculação de *Enterobacter* spp. também já foram relatados para o tomate (Bendaha; Belaouni, 2019). Em ensaio de bioprospecção de isolados a partir de rizosfera de tomate, os cinco isolados melhor ranqueados quanto aos seus potenciais biotecnológicos também foram pertencentes ao gênero (Zuluaga et al., 2020). Um desses isolados (*Enterobacter* sp. 15S) foi avaliado quanto aos efeitos no crescimento de milho e pepino, evidenciando que as respostas podem variar de acordo com as condições nutricionais e da planta hospedeira (Alzate; Zuluaga et al., 2021; Zuluaga et al., 2020).

Diversas espécies bacterianas podem desempenhar uma dada atividade promotora do crescimento comum, ou seja, possuem redundância funcional, e uma mesma bactéria pode ser multifuncional. Nas duas situações, deve-se levar em consideração que cada bactéria desempenha suas atividades biológicas em um conjunto de condições abióticas favoráveis. Estabelecer condições de estresse osmótico pela introdução de agentes osmóticos (como sorbitol e PEG) no meio de cultivo causa uma redução/bloqueio na quantidade de água disponível para utilização pelos microrganismos e, portanto, é capaz de simular um efeito de estresse. Essa estratégia é eficiente para uma seleção mais eficiente de microrganismos que sejam capazes de manter suas atividades promotoras do crescimento mesmo em condições ambientais adversas, tornando o processo de seleção de RPCP mais adequado aos contextos atuais.

Por fim, este estudo demonstra que, para além das capacidades bioquímicas das estirpes, a competência rizosférica e os mecanismos de colonização do solo são fatores cruciais na aplicação prática dessas BSP. Assim, a integração de estratégias de seleção mais abrangentes, que considerem tanto a funcionalidade quanto a resiliência das estirpes em ambientes variados, é essencial para viabilizar o uso de tecnologias microbianas na agricultura moderna. Essa abordagem não apenas promove uma produção agrícola mais sustentável, como também contribui para a mitigação dos impactos das mudanças climáticas e para a preservação da saúde dos solos.

REFERÊNCIAS

- Aguado-Santacruz, G. A. et al. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 35, n. 1, p. 9–21, 2012.
- Ahmad Ansari, F.; Ahmad, I.; Pichtel, J. Synergistic effects of biofilm-producing PGPR strains on wheat plant colonization, growth and soil resilience under drought stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 6, 1 jun. 2023.
- Alemneh, A. A. et al. Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilising activity of rhizobacteria. **Archives of microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3825–3837, 1 set. 2021.
- Alzate Zuluaga, M. Y. et al. Can Inoculation With the Bacterial Biostimulant *Enterobacter* sp. Strain 15S Be an Approach for the Smarter P Fertilization of Maize and Cucumber Plants? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 719873, 24 ago. 2021.
- Amaya-Gómez, C. V. et al. A Framework for the Selection of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Based on Bacterial Competence Mechanisms. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 14, 1 jul. 2020.
- Banerjee, S. et al. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 97, p. 188–198, 1 jun. 2016.
- Barahona, E. et al. Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 3185–3195, 1 dez. 2010.
- Bendaha, M. E. A.; Belaouni, H. A. Tomato growth and resistance promotion by *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* EB8D. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 52, n. 3–4, p. 318–332, 25 fev. 2019.
- Benite, A. M. C.; Machado, S. DE P.; Machado, B. Da C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155–1164, dez. 2002.

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, ago. 2012.

Bittencourt, P. P. et al. Mechanisms and Applications of Bacterial Inoculants in Plant Drought Stress Tolerance. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2023.

Bloemberg, G. V.; Lugtenberg, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 4, p. 343–350, 1 ago. 2001.

Boari, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation. 2009.

Bogino, P. C. et al. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838–15859, 2013.

Chaves, D. P.; Zucareli, C.; De Oliveira Junior, A. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 57–72, jan. 2013.

Chukwuneme, C. F. et al. Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. **Journal of Plant Interactions**, v. 15, n. 1, p. 93–105, 2020.

Combrink, L. et al. **Best practice for wildlife gut microbiome research: A comprehensive review of methodology for 16S rRNA gene investigations**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 2023.

Compant, S.; Clément, C.; Sessitsch, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 1 maio 2010.

Dar, D. et al. Spatial transcriptomics of planktonic and sessile bacterial populations at single-cell resolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 373, n. 6556, 13 ago. 2021.

De Oliveira-Paiva, C. A. et al. Inoculation with *Bacillus megaterium* CNPMS B119 and *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 improve P-acquisition and maize yield in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1426166, 26 jun. 2024.

De Zutter, N. et al. Uncovering New Insights and Misconceptions on the Effectiveness of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria in Plants: A Meta-Analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 858804, 2 mar. 2022.

Deb, C. R.; Tatung, M. Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. **South African Journal of Botany**, v. 165, p. 153–162, 1 fev. 2024.

Di, D. W. et al. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? **Plant Growth Regulation**, v. 3, n. 78, p. 275–285, 1 abr. 2016a.

Di, D.-W. et al. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? **Plant Growth Regulation**, v. 78, n. 3, p. 275–285, 4 abr. 2016b.

Etesami, H.; Jeong, B. R.; Glick, B. R. Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphate-Solubilizing Bacteria, and Silicon to P Uptake by Plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 1 jul. 2021.

Etesami, H.; Maheshwari, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 225–246, 30 jul. 2018.

Finn, D.; Yu, J.; Penton, C. R. Soil quality shapes the composition of microbial community stress response and core cell metabolism functional genes. **Applied Soil Ecology**, v. 148, p. 103483, abr. 2020.

Fitzpatrick, C. R. et al. The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 81–100, 8 set. 2020.

Florentino, L. A. et al. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.). **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 1, p. 89–96, 1 jan. 2017.

Ghosh, D.; Gupta, A.; Mohapatra, S. A comparative analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on osmotic-stress mitigation in *Arabidopsis thaliana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 90, 30 jun. 2019.

Glick, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012a.

Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012b.

Grover, M. et al. PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 8 jan. 2021.

Guhra, T.; Stolze, K.; Totsche, K. U. Pathways of biogenically excreted organic matter into soil aggregates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 164, p. 108483, 1 jan. 2022.

Gupta, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2016.

- Hakim, S. et al. Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 15 fev. 2021.
- Hassani, M. A.; Durán, P.; Hacquard, S. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 58, 27 dez. 2018.
- Heindl, J. E. et al. Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 6 maio 2014.
- Howe, J. A.; Smith, A. P. The soil habitat. **Principles and Applications of Soil Microbiology, Third Edition**, p. 23–55, 1 jan. 2021.
- Jadhav, V. G. et al. **Pseudomonas Aeruginosa VJ003: A Potential PGPR for Rhizosphere Colonization, Plant Growth Promoting Traits, and Biofilm Formation** *Journal of Chemical Health Risks*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.jchr.org>.
- Jayakumar, P.; Natarajan, S. Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 33–47, 1 ago. 2013.
- Jordán, M.; Casaretto, J. Capítulo XV Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. v. 15, p. xx–xx, 2006.
- Joshi, S. et al. Functional characterization and molecular fingerprinting of potential phosphate solubilizing bacterial candidates from Shisham rhizosphere. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.
- Khan, N. et al. Inoculation With a Microbe Isolated From the Negev Desert Enhances Corn Growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 19 jun. 2020.
- Klepa, M. S. et al. *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 7, 20 jul. 2022.
- Kumar, P. et al. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 264–269, 1 jul. 2018.
- Lahlali, R. et al. High-throughput molecular technologies for unraveling the mystery of soil microbial community: challenges and future prospects. **Heliyon**, v. 7, n. 10, 1 out. 2021.
- Lalucat, J. et al. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 126289, jan. 2022.
- Liu, Y. et al. Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. **AMB Express**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

Lucero, C. T. et al. Participation of type VI secretion system in plant colonization of phosphate solubilizing bacteria. **Rhizosphere**, v. 24, p. 100582, 1 dez. 2022.

Lucy, M.; Reed, E.; R. Glick, B. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 1–25, ago. 2004.

Luft Da Silva, T. et al. DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE *Bacillus* spp. OBTIDAS DE SOLOS DO OESTE DO PARANÁ SOB DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO E NATURAL. **Varia Scientia Agrárias**, v. 5, n. 2, p. 109–123, 23 out. 2017.

Madhaiyan, M. et al. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant-growth-promoting actinobacterium isolated from the rhizoplane of neem seedlings. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 1687–1692, 1 jul. 2010.

Malboobi, M. A. et al. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 1471–1477, 18 jul. 2009.

Mann, E. E.; Wozniak, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 893–916, jul. 2012.

Marra, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1, p. 289–307, 3 ago. 2012.

Meliani, A. et al. Plant Growth-Promotion and IAA Secretion With *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. 28 abr. 2017.

Mendoza-Arroyo, G. E. et al. Inorganic Phosphate Solubilization by a Novel Isolated Bacterial Strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and Its Application Potential as Biofertilizer. **Agriculture 2020, Vol. 10, Page 383**, v. 10, n. 9, p. 383, 1 set. 2020.

Menna, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315–332, 6 jun. 2006.

Miller, S. H. et al. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 3, p. 403–411, 1 jun. 2010.

Mohite, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, n. ahead, p. 0–0, 2013.

Naing, A. H.; Maung, T. T.; Kim, C. K. The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 173, n. 4, p. 1992–2012, 1 dez. 2021.

Nandakumar, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 4–5, p. 603–612, 1 abr. 2001.

Nascimento, E. et al. Phenotypic and genomic characterization of phosphate-solubilizing rhizobia isolated from native Mimosa and Desmodium in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 12 ago. 2024.

Naseem, H. et al. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1009–1022, 1 dez. 2018.

Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, jan. 1999.

Numan, M. et al. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. **Microbiological Research**, v. 209, p. 21–32, abr. 2018.

Olanrewaju, O. S.; Glick, B. R.; Babalola, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 197, 6 nov. 2017.

Oleńska, E. et al. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140682, nov. 2020a.

Oleńska, E. et al. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140682, 15 nov. 2020b.

Omae, N.; Tsuda, K. Plant-Microbiota Interactions in Abiotic Stress Environments. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 35, n. 7, p. 511–526, 1 jul. 2022.

Orhan, F. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 621–627, jul. 2016.

Orozco-Mosqueda, M. Del C. et al. Agroecological Management of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea* by Plant Growth-Promoting Bacteria. **Plants 2023, Vol. 12, Page 637**, v. 12, n. 3, p. 637, 1 fev. 2023.

Orozco-Mosqueda, Ma. Del C. et al. Rhizobiome engineering: Unveiling complex rhizosphere interactions to enhance plant growth and health. **Microbiological Research**, v. 263, p. 127137, out. 2022.

O'toole, G. A.; Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449–461, 1998.

Özen, A. I.; Ussery, D. W. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 239–248, 3 fev. 2012.

Palleroni, N. J. The *Pseudomonas* Story. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1377–1383, 7 jun. 2010.

Park, K. H.; Lee, C. Y.; Son, H. J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 2, p. 222–228, 2009.

Pascale, A. et al. Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 24 jan. 2020.

Patil, S. et al. Multi-stress tolerant plant growth promoting *Pseudomonas* spp. MCC 3145 producing cytostatic and fungicidal pigment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 53–63, 1 abr. 2017.

Peiffer, J. A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548–6553, 16 abr. 2013.

Pereira, S. I. A.; Castro, P. M. L. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. **Ecological Engineering**, v. 73, p. 526–535, 1 dez. 2014.

Pérez-Jaramillo, J. E.; Mendes, R.; Raaijmakers, J. M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 635–644, 18 abr. 2016.

Pérez-Miranda, S. et al. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n. 1, p. 127–131, jul. 2007.

Pezoa Maldonado, M. I. Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes *Peltigera* del Parque Nacional Patagonia. 2021.

Pollak, S.; Cordero, O. X. Rhizobiome shields plants from infection. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 978–979, 24 jul. 2020.

Protachevich, A. P. et al. Pioneering *Desmodium* spp. are nodulated by natural populations of stress-tolerant alpha- and beta-rhizobia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 3127–3135, 6 dez. 2023.

Rawat, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 2020 **21:1**, v. 21, n. 1, p. 49–68, 30 set. 2020a.

Rawat, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 2020 **21:1**, v. 21, n. 1, p. 49–68, 30 set. 2020b.

- Reis Junior, F. B. Dos; Reis, V. M.; Teixeira, K. R. Dos S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 431–438, mar. 2006.
- Roper, M. C. et al. Detection and Visualization of an Exopolysaccharide Produced by *Xylella fastidiosa* In Vitro and In Planta. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7252, nov. 2007.
- Sandhya, V. et al. 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, nov. 2009.
- Sandhya, V.; Ali, SK. Z. The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. **Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 512–519, 26 jul. 2015.
- Santaella, C. et al. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 8, p. 2150–2163, ago. 2008.
- Santoyo, G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. **Journal of Advanced Research**, v. 40, p. 45–58, set. 2022.
- Sarikhani, M. R.; Aliasgharzad, N.; Khoshru, B. P Solubilizing Potential of Some Plant Growth Promoting Bacteria Used as Ingredient in Phosphatic Biofertilizers with Emphasis on Growth Promotion of *Zea mays* L. **Geomicrobiology Journal**, v. 37, n. 4, p. 327–335, 20 abr. 2020.
- Selvakumar, G.; Panneerselvam, P.; Ganeshamurthy, A. N. Bacterial Mediated Alleviation of Abiotic Stress in Crops. **Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management**, v. 9783642234651, p. 205–224, 1 jul. 2012.
- Seneviratne, G. et al. Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. p. 81–95, 2010.
- Sharma, P. et al. Rhizosphere, Rhizosphere Biology, and Rhizospheric Engineering. **Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management**, p. 577–624, 2021.
- Silveira, A. P. D. DA; Freitas, S. Dos S. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. 2007.
- Tang, J. et al. Biosynthetic Pathways and Functions of Indole-3-Acetic Acid in Microorganisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 2077, 12 ago. 2023.
- Tariq, A. et al. Influence of Zinc Nutrition on Growth and Yield Behaviour of Maize (<i>Zea mays</i> L.) Hybrids. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 18, p. 2646–2654, 2014.

Tomer, S.; Suyal, D. C.; Goel, R. Biofertilizers: A timely approach for sustainable agriculture. **Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture**, p. 375–395, 1 jan. 2017.

Trivedi, P. et al. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607–621, 12 nov. 2020.

Vandenkoornhuyse, P. et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **The New phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 1 jun. 2015a.

Vandenkoornhuyse, P. et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 5 jun. 2015b.

Velmourougane, K.; Thapa, S.; Prasanna, R. Prospecting microbial biofilms as climate smart strategies for improving plant and soil health: A review. **Pedosphere**, v. 33, n. 1, p. 129–152, 1 fev. 2023.

Vieira Junior, R. C. et al. Treinamento aeróbio de natação aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculoesquelético de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 3, p. 204–208, jun. 2013.

Xiong, C.; Lu, Y. Microbiomes in agroecosystem: Diversity, function and assembly mechanisms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 14, n. 6, p. 833–849, 2 dez. 2022.

Yang, M. Q. et al. **Research progress on the application of 16S rRNA gene sequencing and machine learning in forensic microbiome individual identification.** **Frontiers in Microbiology**Frontiers Media SA, , 2024.

Zboralski, A.; Fillion, M. Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 18, p. 3539–3554, 1 jan. 2020.

Zhang, B.-H. et al. *Microbacterium lacusdiani* sp. nov., a phosphate-solubilizing novel actinobacterium isolated from mucilaginous sheath of *Microcystis*. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 2, p. 147–151, 19 fev. 2017a.

Zhang, S. Y. et al. Land scale biogeography of arsenic biotransformation genes in estuarine wetland. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 6, p. 2468–2482, 1 jun. 2017b.

Zuluaga, M. Y. A. et al. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of *Solanum*. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227422, 1 jan. 2020.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais. A coluna Tukey indica o agrupamento estatístico com teste de Tukey (letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos).

Estirpe	Média ± SD	Tukey	Sideróforo
Rhodococcus sp. P.C.G 5.04	0	q	Sim
Priestia sp. F.E pr03	5,389 ± 0,453	pq	Sim
Enterobacter sp. A.A 43.30	7,493 ± 0,087	opq	Sim
Bacillus sp.A.A 34.04	7,534 ± 0,761	opq	Não
Pseudomonas sp. P.C.G 12.4-2	13,406 ± 0,796	nopq	Sim
Pseudomonas sp. P.C.G 49.7	14,995 ± 0,847	nopq	Sim
Enterobacter sp. A.A 15.22	15,342 ± 0,494	nopq	Sim
Bacillus sp.F.E 65.22	16,022 ± 1,494	nopq	Sim
(F.E 75.8)	22,939 ± 3,129	mnopq	Sim
Priestia aryabhattai sp. A.A 115.32	23,748 ± 1,880	lmnopq	Não
Bacillus sp. F.E 76.32	26,187 ± 2,166	lmnopq	Sim
Pseudomonas sp. P.C.G 97.7	26,870 ± 2,475	lmnopq	Sim
Pseudomonas sp. F.E 90.7	27,786 ± 0,723	lmnopq	Sim
Pseudomonas sp. P.C.G 49.12	29,093 ± 0,467	lmnop	Sim
Rhodococcus A.A 137.36	32,173 ± 0,700	klmnop	Não
Pseudomonas sp. P.C.G 35.12	35,714 ± 3,528	klmno	Sim
Priestia sp. A.A 111.3	36,141 ± 4,408	klmn	Não
Enterobacter sp. A.A 15.24	50,222 ± 8,379	jklm	Não
Enterobacter sp. F.E 56.17	51,465 ± 3,098	jklm	Não
Pseudomonas SP. P.C.G 86.5	51,526 ± 3,494	jkl	Não
Enterobacter sp. F.E 56.33	58,935 ± 2,124	jk	Sim
Burkholderia sp. A.A 39.1	59,858 ± 5,266	jk	Sim
Leclercia sp. A.A 36.14	66,040 ± 1,066	j	Não
Priestia sp. F.E pr31	103,119 ± 15,622	i	Não
Pseudomonas sp. A.A 82.13	113,949 ± 0,805	hi	Não
Pseudomonas sp. F.E 102.28	120,181 ± 28,623	ghi	Não
Cedecea sp. A.A 38.22	129,261 ± 24,689	fghi	Sim
Pseudomonas sp. P.C.G 97.9	134,645 ± 2,487	efgh	Sim
Enterobacter sp. A.A 39.40	137,611 ± 3,743	defgh	Não
Achromobacter sp. A.A 35.2	140,021 ± 3,000	defgh	Não
Pseudomonas sp. A.A 20.7	145,986 ± 0,484	cdefg	Sim
Enterobacter sp. A.A15.28	148,182 ± 0,856	cdefg	Sim
Pantoea sp. P.C.G 53.7	149,255 ± 3,463	cdef	Não
Pseudomonas sp. P.C.G 13.33	162,886 ± 4,668	bcde	Não
Microbacterium sp. A.A 42.29	165,408 ± 9,070	bcd	Sim

<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 92.11	169,911 ± 2,435	bc	Sim
<i>Pseudomonas</i> s.p P.C.G 97.10	172,663 ± 18,137	bc	Sim
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 59.4	177,947 ± 1,290	b	Sim
<i>Pseudomonas</i> sp. A.A 38.12	180,043 ± 7,693	ab	Sim
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 92.22	208,183 ± 2,378	a	Sim

Tabela S2. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de AlPO_4 , mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais. A coluna Tukey indica o agrupamento estatístico com teste de Tukey (letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos).

Estirpe	Média ± SD	Tukey
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 92.11	2,30 ± 0,66	e
<i>Pseudomonas</i> sp. F.E 59.4	2,89 ± 0,47	de
<i>Pseudomonas</i> sp. A.A 38.12	3,93 ± 1,25	cde
<i>Enterobacter</i> sp. A.A 15.28	4,12 ± 0,35	bcd
<i>Microbacterium</i> sp. A.A 42.29	4,75 ± 0,25	bc
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 97.10	5,80 ± 0,78	ab
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 13.33	7,35 ± 0,14	a
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G92.22	7,06 ± 0,52	a

Tabela S3. Solubilização de fosfato em meio líquido NBRIP acrescido de FePO_4 , mg/L após 72 horas incubação por bactérias rizosféricas isoladas de solos dos Campos Gerais. A coluna Tukey indica o agrupamento estatístico com teste de Tukey (letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos).

Estirpe	Média ± SD	Tukey
<i>Pseudomonas</i> sp. F.E 59.4	0,32 ± 0,0283	c
<i>Microbacterium</i> sp. A.A 42.29	0	c
<i>Pseudomonas</i> sp. A.A 38.12	0	c
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 92.11	0	c
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 97.10	0	c
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 92.22	1,44 ± 0,018	b
<i>Pseudomonas</i> sp. P.C.G 13.33	1,36 ± 0,103	b
<i>Enterobacter</i> sp. A.A 15.28	3,38 ± 0,575	a

Tabela S4. Atividade da enzima fosfatase ácida produzida por BSP isoladas da rizosfera de milho. A coluna Tukey indica o agrupamento estatístico com teste de Tukey a 0,05% de confiança (letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos).

Estirpe	Média ± SD	Tukey
Enterobacter sp. A.A 15.28	51,1 ± 3,15	d
Pseudomonas sp. P.C.G 13.33	35,5 ± 1,54	d
Microbacterium sp. A.A 42.29	107,3 ± 0,78	c
Pseudomonas sp. P.C.G 97.10	101,7 ± 4,4	c
Pseudomonas sp. A.A 38.12	93,4 ± 0,61	c
Pseudomonas sp. P.C.G 92.11	139,5 ± 4,07	b
Pseudomonas sp. F.E 59.4	202,2 ± 10,8	a
Pseudomonas sp. P.C.G92.22	198,7 ± 9,05	a

Tabela S4. Índice de Biofilme (BI) produzido por BSP isoladas da rizosfera de milho. A coluna Tukey indica o agrupamento estatístico com teste de Tukey a 0,05% de confiança (letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos).

Estirpe	Média ± SD	Tukey
Achromobacter sp. A.A 35.2	0.1891351 ± 0.00361	jk
Bacillus sp. A.A 34.04	0.3865617 ± 0.00774	f
Bacillus sp. F.E 65.22	0.1667892 ± 0.0208	jkl
Bacillus sp. F.E 76.32	0.3185026 ± 0.0141	gh
Burkholderia sp. A.A 39.1	0.05451833 ± 0.00242	nop
Cedecea sp. A.A 38.22	0.3600695 ± 0.00238	fg
Enterobacter sp. A.A 15.22	0.2900812 ± 0.00685	h
Enterobacter sp. A.A 15.24	0.2700541 ± 0.0065	hi
Enterobacter sp. A.A 15.28	1.287518 ± 0.075	a
Enterobacter sp. A.A 39.40	0.6672568 ± 0.0373	c
Enterobacter sp. A.A 43.30	0.1667731 ± 0.0155	jkl
Enterobacter sp. F.E 56.17	0.1260805 ± 0.00123	lm
Enterobacter sp.F.E 56.33	0.5558078 ± 0.0114	d
F.E 75.8	0.0 ± 0.0	p
Leclercia sp. A.A 36.14	0.124237 ± 0.00133	lm
Microbacterium sp. A.A 42.29	0.5245562 ± 0.0184	d
Pantoea sp. F.E 53.7	0.4605895 ± 0.0225	e
Priestia sp. A.A 111.3	0.1238917 ± 0.0231	lm
Priestia sp. A.A 115.32	0.04635649 ± 0.00309	nop

Priestia sp. F.E pr03	0.6471766 ± 0.0102	c
Priestia sp. F.E pr31	0.1379555 ± 0.0132	klm
Pseudomonas sp. A.A 20.7-3	0.1594501 ± 0.00286	klm
Pseudomonas sp. A.A 35.12	0.3123996 ± 0.0199	gh
Pseudomonas sp. A.A 38.12	0.05473365 ± 0.00311	nop
Pseudomonas sp. A.A 82.13	0.2783029 ± 0.0118	h
Pseudomonas sp. F.E 102.28	0.03062751 ± 0.000309	op
Pseudomonas sp. F.E 90.7	0.133494 ± 0.0055	klm
Pseudomonas sp. P.C.G 12.4-2	0.05744686 ± 0.0023	nop
Pseudomonas sp. P.C.G 13.33	0.9546273 ± 0.0168	b
Pseudomonas sp. P.C.G 49.12	0.1541824 ± 0.00304	klm
Pseudomonas sp. P.C.G 49.7	0.02534062 ± 0.00298	op
Pseudomonas sp. P.C.G 59.4	0.04075849 ± 0.00327	op
Pseudomonas sp. P.C.G 86.5	0.1339417 ± 0.00688	klm
Pseudomonas sp. P.C.G 92.11	0.09830542 ± 0.00686	mn
Pseudomonas sp. P.C.G 92.22	0.02548991 ± 0.00132	op
Pseudomonas sp. P.C.G 97.10	0.163686 ± 0.00824	jkl
Pseudomonas sp. P.C.G 97.7	0.1513294 ± 0.0118	klm
Pseudomonas sp. P.C.G 97.9	0.1258055 ± 0.00326	lm
Rhodococcus sp. A.A 137.36	0.01487112 ± 0.00298	op
Rhodococcus sp. P.C.G 5.04	0.2160214 ± 0.0189	ij

7 CONCLUSÃO

O estudo evidenciou que os Campos Gerais do Paraná abrigam uma grande diversidade de rizobactérias com capacidade de solubilização de P e características promotoras de crescimento de plantas sob situações de estresse osmótico, evidenciando a importância e potencial biotecnológico destas estirpes. Embora os resultados *in vitro* sejam promissores, a validação *in vivo* é crucial para confirmar sua eficácia no campo.

REFERÊNCIAS

- Aguado-Santacruz, G. A. et al. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 35, n. 1, p. 9–21, 2012.
- Ahmad Ansari, F.; Ahmad, I.; Pichtel, J. Synergistic effects of biofilm-producing PGPR strains on wheat plant colonization, growth and soil resilience under drought stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 6, 1 jun. 2023.
- Alemneh, A. A. et al. Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilising activity of rhizobacteria. **Archives of microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3825–3837, 1 set. 2021.
- Alzate Zuluaga, M. Y. et al. Can Inoculation With the Bacterial Biostimulant *Enterobacter* sp. Strain 15S Be an Approach for the Smarter P Fertilization of Maize and Cucumber Plants? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 719873, 24 ago. 2021.
- Amaya-Gómez, C. V. et al. A Framework for the Selection of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Based on Bacterial Competence Mechanisms. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 14, 1 jul. 2020.
- Banerjee, S. et al. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 97, p. 188–198, 1 jun. 2016.
- Barahona, E. et al. Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 3185–3195, 1 dez. 2010.
- Bendaha, M. E. A.; Belaouni, H. A. Tomato growth and resistance promotion by *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* EB8D. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 52, n. 3–4, p. 318–332, 25 fev. 2019.
- Benite, A. M. C.; Machado, S. De P.; Machado, B. Da C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155–1164, dez. 2002.
- 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, ago. 2012.
- Bittencourt, P. P. et al. Mechanisms and Applications of Bacterial Inoculants in Plant Drought Stress Tolerance. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2023.
- Bloemberg, G. V.; Lugtenberg, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 4, p. 343–350, 1 ago. 2001.
- Boari, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo Biofilm formation by

Aeromonas hydrophila and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation. 2009.

Bogino, P. C. et al. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838–15859, 2013.

Chaves, D. P.; Zucareli, C.; De Oliveira Junior, A. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciencias Agrarias**, v. 34, n. 1, p. 57–72, jan. 2013.

Chukwuneme, C. F. et al. Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. **Journal of Plant Interactions**, v. 15, n. 1, p. 93–105, 2020.

Combrink, L. et al. **Best practice for wildlife gut microbiome research: A comprehensive review of methodology for 16S rRNA gene investigations**. **Frontiers in Microbiology**Frontiers Media S.A., , 2023.

Compant, S.; Clément, C.; Sessitsch, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 1 maio 2010.

Dar, D. et al. Spatial transcriptomics of planktonic and sessile bacterial populations at single-cell resolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 373, n. 6556, 13 ago. 2021.

De Oliveira-Paiva, C. A. et al. Inoculation with *Bacillus megaterium* CNPMS B119 and *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 improve P-acquisition and maize yield in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1426166, 26 jun. 2024.

De Zutter, N. et al. Uncovering New Insights and Misconceptions on the Effectiveness of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria in Plants: A Meta-Analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 858804, 2 mar. 2022.

Deb, C. R.; Tatung, M. Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. **South African Journal of Botany**, v. 165, p. 153–162, 1 fev. 2024.

Di, D. W. Et al. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? **Plant Growth Regulation**, v. 3, n. 78, p. 275–285, 1 abr. 2016a.

Di, D.-W. et al. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? **Plant Growth Regulation**, v. 78, n. 3, p. 275–285, 4 abr. 2016b.

Etesami, H.; Jeong, B. R.; Glick, B. R. Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphate-Solubilizing Bacteria, and Silicon to P Uptake by Plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 1 jul. 2021.

Etesami, H.; Maheshwari, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 225–246, 30 jul. 2018.

Finn, D.; Yu, J.; Penton, C. R. Soil quality shapes the composition of microbial community stress response and core cell metabolism functional genes. **Applied Soil Ecology**, v. 148, p. 103483, abr. 2020.

Fitzpatrick, C. R. et al. The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 81–100, 8 set. 2020.

Florentino, L. A. et al. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.). **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 1, p. 89–96, 1 jan. 2017.

Ghosh, D.; Gupta, A.; Mohapatra, S. A comparative analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on osmotic-stress mitigation in *Arabidopsis thaliana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 90, 30 jun. 2019.

Glick, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012a.

Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012b.

Grover, M. et al. PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 8 jan. 2021.

Guhra, T.; Stolze, K.; Totsche, K. U. Pathways of biogenically excreted organic matter into soil aggregates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 164, p. 108483, 1 jan. 2022.

Gupta, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2016.

Hakim, S. et al. Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 15 fev. 2021.

Hassani, M. A.; Durán, P.; Hacquard, S. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 58, 27 dez. 2018.

Heindl, J. E. Et al. Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 6 maio 2014.

Howe, J. A.; Smith, A. P. The soil habitat. **Principles and Applications of Soil Microbiology, Third Edition**, p. 23–55, 1 jan. 2021.

Jadhav, V. G. et al. **Pseudomonas Aeruginosa VJ003: A Potential PGPR for Rhizosphere Colonization, Plant Growth Promoting Traits, and Biofilm Formation** *Journal of Chemical Health Risks*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.jchr.org>.

Jayakumar, P.; Natarajan, S. Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 33–47, 1 ago. 2013.

Jordán, M.; Casaretto, J. Capítulo XV Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. v. 15, p. xx–xx, 2006.

Joshi, S. et al. Functional characterization and molecular fingerprinting of potential phosphate solubilizing bacterial candidates from Shisham rhizosphere. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

Khan, N. et al. Inoculation With a Microbe Isolated From the Negev Desert Enhances Corn Growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 19 jun. 2020.

Klepa, M. S. et al. *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 7, 20 jul. 2022.

Kumar, P. et al. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 264–269, 1 jul. 2018.

Lahlali, R. et al. High-throughput molecular technologies for unraveling the mystery of soil microbial community: challenges and future prospects. **Heliyon**, v. 7, n. 10, 1 out. 2021.

Lalucat, J. et al. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 126289, jan. 2022.

Liu, Y. et al. Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. **AMB Express**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

Lucero, C. T. et al. Participation of type VI secretion system in plant colonization of phosphate solubilizing bacteria. **Rhizosphere**, v. 24, p. 100582, 1 dez. 2022.

Lucy, M.; Reed, E.; R. Glick, B. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 1–25, ago. 2004.

Luft Da Silva, T. et al. DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE *Bacillus* spp. OBTIDAS DE SOLOS DO OESTE DO PARANÁ SOB DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO E NATURAL. **Varia Scientia Agrárias**, v. 5, n. 2, p. 109–123, 23 out. 2017.

- Madhaiyan, M. et al. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant-growth-promoting actinobacterium isolated from the rhizoplane of neem seedlings. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 1687–1692, 1 jul. 2010.
- Malboobi, M. A. et al. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 1471–1477, 18 jul. 2009.
- Mann, E. E.; Wozniak, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 893–916, jul. 2012.
- Marra, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1, p. 289–307, 3 ago. 2012.
- Meliani, A. et al. Plant Growth-Promotion and IAA Secretion With *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. 28 abr. 2017.
- Mendoza-Arroyo, G. E. et al. Inorganic Phosphate Solubilization by a Novel Isolated Bacterial Strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and Its Application Potential as Biofertilizer. **Agriculture 2020, Vol. 10, Page 383**, v. 10, n. 9, p. 383, 1 set. 2020.
- Menna, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315–332, 6 jun. 2006.
- Miller, S. H. et al. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 3, p. 403–411, 1 jun. 2010.
- Mohite, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, n. ahead, p. 0–0, 2013.
- Naing, A. H.; Maung, T. T.; Kim, C. K. The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 173, n. 4, p. 1992–2012, 1 dez. 2021.
- Nandakumar, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 4–5, p. 603–612, 1 abr. 2001.
- Nascimento, E. et al. Phenotypic and genomic characterization of phosphate-solubilizing rhizobia isolated from native *Mimosa* and *Desmodium* in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 12 ago. 2024.
- Naseem, H. et al. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1009–1022, 1 dez. 2018.

Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, jan. 1999.

Numan, M. et al. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. **Microbiological Research**, v. 209, p. 21–32, abr. 2018.

Olanrewaju, O. S.; Glick, B. R.; Babalola, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 197, 6 nov. 2017.

Oleńska, E. et al. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140682, nov. 2020a.

Oleńska, E. et al. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140682, 15 nov. 2020b.

Omae, N.; Tsuda, K. Plant-Microbiota Interactions in Abiotic Stress Environments. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 35, n. 7, p. 511–526, 1 jul. 2022.

Orhan, F. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 621–627, jul. 2016.

Orozco-Mosqueda, M. Del C. et al. Agroecological Management of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea* by Plant Growth-Promoting Bacteria. **Plants** 2023, Vol. 12, Page 637, v. 12, n. 3, p. 637, 1 fev. 2023.

Orozco-Mosqueda, Ma. Del C. et al. Rhizobiome engineering: Unveiling complex rhizosphere interactions to enhance plant growth and health. **Microbiological Research**, v. 263, p. 127137, out. 2022.

O'toole, G. A.; Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449–461, 1998.

Özen, A. I.; Ussery, D. W. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 239–248, 3 fev. 2012.

Palleroni, N. J. The *Pseudomonas* Story. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1377–1383, 7 jun. 2010.

Park, K. H.; Lee, C. Y.; Son, H. J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 2, p. 222–228, 2009.

Pascale, A. et al. Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 24 jan. 2020.

Patil, S. et al. Multi-stress tolerant plant growth promoting *Pseudomonas* spp. MCC 3145 producing cytostatic and fungicidal pigment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 53–63, 1 abr. 2017.

Peiffer, J. A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548–6553, 16 abr. 2013.

Pereira, S. I. A.; Castro, P. M. L. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. **Ecological Engineering**, v. 73, p. 526–535, 1 dez. 2014.

Pérez-Jaramillo, J. E.; Mendes, R.; Raaijmakers, J. M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 635–644, 18 abr. 2016.

Pérez-Miranda, S. et al. O-Cas, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n. 1, p. 127–131, jul. 2007.

Pezoa Maldonado, M. I. Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes *Peltigera* del Parque Nacional Patagonia. 2021.

Pollak, S.; Cordero, O. X. Rhizobiome shields plants from infection. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 978–979, 24 jul. 2020.

Protachevich, A. P. et al. Pioneering *Desmodium* spp. are nodulated by natural populations of stress-tolerant alpha- and beta-rhizobia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 3127–3135, 6 dez. 2023.

Rawat, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 2020 **21:1**, v. 21, n. 1, p. 49–68, 30 set. 2020a.

Rawat, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 2020 **21:1**, v. 21, n. 1, p. 49–68, 30 set. 2020b.

Reis Junior, F. B. Dos; Reis, V. M.; Teixeira, K. R. Dos S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 431–438, mar. 2006.

Roper, M. C. et al. Detection and Visualization of an Exopolysaccharide Produced by *Xylella fastidiosa* In Vitro and In Planta. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7252, nov. 2007.

Sandhya, V. et al. 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, nov. 2009.

Sandhya, V.; Ali, Sk. Z. The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. **Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 512–519, 26 jul. 2015.

Santaella, C. et al. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 8, p. 2150–2163, ago. 2008.

Santoyo, G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. **Journal of Advanced Research**, v. 40, p. 45–58, set. 2022.

Sarikhani, M. R.; Aliasgharzad, N.; Khoshru, B. P Solubilizing Potential of Some Plant Growth Promoting Bacteria Used as Ingredient in Phosphatic Biofertilizers with Emphasis on Growth Promotion of *Zea mays* L. **Geomicrobiology Journal**, v. 37, n. 4, p. 327–335, 20 abr. 2020.

Selvakumar, G.; Panneerselvam, P.; GANESHAMURTHY, A. N. Bacterial Mediated Alleviation of Abiotic Stress in Crops. **Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management**, v. 9783642234651, p. 205–224, 1 jul. 2012.

Seneviratne, G. et al. Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. p. 81–95, 2010.

Sharma, P. et al. Rhizosphere, Rhizosphere Biology, and Rhizospheric Engineering. **Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management**, p. 577–624, 2021.

Silveira, A. P. D. Da; Freitas, S. Dos S. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. 2007.

Tang, J. et al. Biosynthetic Pathways and Functions of Indole-3-Acetic Acid in Microorganisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 2077, 12 ago. 2023.

Tariq, A. et al. Influence of Zinc Nutrition on Growth and Yield Behaviour of Maize (<i>Zea mays</i> L.) Hybrids. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 18, p. 2646–2654, 2014.

Tomer, S.; Suyal, D. C.; Goel, R. Biofertilizers: A timely approach for sustainable agriculture. **Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture**, p. 375–395, 1 jan. 2017.

Trivedi, P. et al. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607–621, 12 nov. 2020.

Vandenkoornhuyse, P. et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **The New phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 1 jun. 2015a.

Vandenkoornhuyse, P. et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 5 jun. 2015b.

Velmourougane, K.; Thapa, S.; Prasanna, R. Prospecting microbial biofilms as climate smart strategies for improving plant and soil health: A review. **Pedosphere**, v. 33, n. 1, p. 129–152, 1 fev. 2023.

Vieira Junior, R. C. et al. Treinamento aeróbio de natação aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculoesquelético de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 3, p. 204–208, jun. 2013.

Xiong, C.; Lu, Y. Microbiomes in agroecosystem: Diversity, function and assembly mechanisms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 14, n. 6, p. 833–849, 2 dez. 2022.

Yang, M. Q. et al. **Research progress on the application of 16S rRNA gene sequencing and machine learning in forensic microbiome individual identification.** *Frontiers in Microbiology*Frontiers Media SA, , 2024.

Zboralski, A.; Fillion, M. Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 18, p. 3539–3554, 1 jan. 2020.

Zhang, B.-H. et al. *Microbacterium lacusdiani* sp. nov., a phosphate-solubilizing novel actinobacterium isolated from mucilaginous sheath of *Microcystis*. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 2, p. 147–151, 19 fev. 2017a.

Zhang, S. Y. et al. Land scale biogeography of arsenic biotransformation genes in estuarine wetland. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 6, p. 2468–2482, 1 jun. 2017b.

Zuluaga, M. Y. A. et al. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of *Solanum*. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227422, 1 jan. 2020.