



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA MARQUES SERQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS
ASSOCIATIVAS E SELEÇÃO DE ESTIRPES COM
POTENCIAL DE MITIGAR O ESTRESSE HÍDRICO
UTILIZANDO O TOMATE ("*Solanum lycopersicum*") COMO
MODELO EXPERIMENTAL**

Londrina
2023

JULIANA MARQUES SERQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS
ASSOCIATIVAS E SELEÇÃO DE ESTIRPES COM
POTENCIAL DE MITIGAR O ESTRESSE HÍDRICO
UTILIZANDO O TOMATE (“*Solanum lycopersicum*”) COMO
MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira.

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Elisete Pains Rodrigues

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Serqueira, Juliana Marques .

Caracterização de uma coleção de bactérias associativas e seleção de estirpes com potencial de mitigar o estresse hídrico utilizando o tomate ("Solanum lycopersicum") como modelo experimental / Juliana Marques Serqueira. - Londrina, 2023.
56 f.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira .

Coorientador: Elisete Pains Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Mudanças climáticas - Tese. 2. Soluções baseadas na natureza - Tese. 3. Inoculação - Tese. 4. Bioinsumo - Tese. I. Luiz Martinez de Oliveira , André . II. Pains Rodrigues, Elisete . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

JULIANA MARQUES SERQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS
ASSOCIATIVAS E SELEÇÃO DE ESTIRPES COM
POTENCIAL DE MITIGAR O ESTRESSE HÍDRICO
UTILIZANDO O TOMATE (“*Solanum lycopersicum*”) COMO
MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Admilton G. de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me capacitar sempre!

Ao meu orientador, André Luiz Martinez de Oliveira, pela confiança em apresentar esse projeto grandioso, no qual, me encantei em fazer parte.

À minha Co-orientadora, Elisete Pains Rodrigues, por ceder o uso de seu laboratório, pelos ensinamentos, auxílios e por contribuir com meu crescimento acadêmico.

À minha colega de curso, Lettícia Marques, por contribuir em algumas análises para execução do trabalho.

À minha colega Mestre, Mariane Campos, por realizar o início do projeto para que eu pudesse dar continuidade.

Aos membros da minha família, Rita de Cássia Marques, Caroline Marques e Abel Dognani (in memoriam) por possibilitar estar residindo em Londrina e conquistar esse feito, por me apoiar e acreditar no meu potencial.

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

SERQUEIRA, J. M. (2023). *Caracterização de uma coleção de bactérias associativas e seleção de estirpes com potencial de mitigar o estresse hídrico utilizando o tomate ("solanum lycopersicum") como modelo experimental*. (Dissertação de mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, 56p.

RESUMO

Existem estimativas de aumento significativo na temperatura atmosférica para os próximos anos, juntamente com alterações no regime pluvial que resultem na frequência de eventos extremos como seca e enchentes. A ocorrência frequente de eventos extremos de seca causa grande preocupação para o setor agropecuário, uma vez que a menor disponibilidade hídrica no solo resulta em consequências negativas diretas para o crescimento e produtividade das plantas. Pensando nisso, esse trabalho teve como objetivo caracterizar 129 isolados bacterianos selecionados a partir de uma coleção de isolados bacterianos previamente obtida a partir de plantas jovens de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, na busca por microrganismos capazes de mitigar o efeito negativo do estresse hídrico sobre o desenvolvimento de plantas. Os isolados selecionados para este estudo compunham grupos filogenéticos sem potencial patogênico, e sua caracterização envolveu atributos relacionados com a promoção de crescimento vegetal: produção de compostos indólicos, capacidade de solubilização de fosfato de ferro, biossíntese de sideróforos, formação de biofilme e tolerância ao estresse hídrico. Com base nesta caracterização, e capacidade de mitigar o estresse hídrico a fim de prospectar estirpes candidatas para desenvolver um bioinsumo. Foram identificadas as 10 estirpes mais tolerantes ao estresse osmótico, que foram utilizadas em um ensaio de inoculação em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*). Estas plantas foram cultivadas em câmara de crescimento por 30 dias sob diferentes concentrações de polietilenoglicol (PEG) para simular o estresse hídrico, sendo avaliadas quanto ao acúmulo de prolina nas raízes e biomassa de raízes. Na ausência de estresse osmótico, cinco dos dez isolados avaliados promoveram incremento na massa fresca de raízes (19,1% a 190,4%) e cinco isolados promoveram incremento no conteúdo de prolina (25,6% a 332,8%) em comparação aos valores obtidos de plantas não inoculadas, com destaque para *Bacillus* spp. estirpe 112R1CT que promoveu incremento em ambas as variáveis. Na presença de estresse osmótico moderado (250 g PEG L⁻¹), todas as estirpes inoculadas promoveram incremento na biomassa fresca de raízes (53,9% a 348,3%) e redução no conteúdo de prolina (13,8% a 81,4%). Nesta condição, houve destaque para as estirpes *Herbaspirillum* spp. 114JL e *Bacillus* spp. 145CT, que promoveram incrementos superiores a 300% na biomassa de raízes e redução de quase 80% no conteúdo de prolina. Sob estresse osmótico elevado (500 g PEG L⁻¹), sete estirpes foram capazes de aumentar a massa fresca de raízes (incrementos de 44,4% a 388,9%), com grande variação nos teores de prolina conforme a estirpe inoculada. As estirpes *Herbaspirillum* spp. 114JL e *Trinickia* spp. 24JL, promoveram os maiores aumentos na biomassa de raízes de plantas crescidas sob estresse osmótico elevado (incrementos de 388,9% e 308,3% respectivamente). Em conjunto, os resultados sugerem que as estirpes *Herbaspirillum* spp. 114JL, *Trinickia* spp. 24JL e *Bacillus* spp. 145CT possuem potencial para o desenvolvimento de um novo bioinsumo voltado ao aumento da tolerância de plantas ao estresse hídrico. Além disso, a proteção contra

o estresse hídrico promovida pelas estirpes mais promissoras parece não estar relacionada com o aumento nos teores de prolina dos tecidos radiculares.

Palavras chaves: mudanças climáticas; soluções baseadas na natureza; *herbaspirillum*; *bacillus*; *triniclia*; inoculação; bioinsumo.

SERQUEIRA, J. M. (2023). *Characterization of a collection of associative bacteria and selection of strains with the potential to mitigate water stress using tomato ("solanum lycopersicum") as an experimental model*. (Master's dissertation), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, 56p.

ABSTRACT

There are estimates of a significant increase in atmospheric temperature for the coming years, along with changes in rainfall that may increase the frequency of extreme events such as drought and floods. The occurrence of extreme drought events causes great concern for the agricultural sector since the lower water availability in the soil results in direct negative consequences for plant growth and productivity. Regarding this, the current work aimed to characterize 129 bacterial isolates selected from a collection previously obtained from young native tree plants from the Atlantic Forest grown in forest soil, in the search for microorganisms capable of mitigating the negative effect of water stress on plant development. The selected isolates composed phylogenetic groups without pathogenic potential, and their characterization involved attributes related to the promotion of plant growth: production of indole compounds, ability to solubilize iron phosphate, biosynthesis of siderophores, biofilm formation and tolerance to water stress. Based on this characterization, the 10 strains of highest tolerance to osmotic stress were identified and used in an inoculation trial on tomato seeds (*Solanum lycopersicum*). These plants were cultivated in a growth chamber for 30 days under different concentrations of polyethylene glycol (PEG) to simulate water stress, being evaluated for proline accumulation in the roots and root biomass. In the absence of osmotic stress, five of the ten isolates promoted increases in the root fresh weight (from 19.1% to 190.4%) and five isolates promoted increases in the proline content (25.6% to 332.8%) compared to values obtained from non-inoculated plants, with emphasis on *Bacillus* spp. strain 112R1CT that promoted an increase in both variables. In the presence of moderate osmotic stress (250 g PEG L⁻¹), all inoculated strains increased the root fresh weight (53.9% to 348.3%) and reduced the proline content (13.8% to 81.4%). In this condition, inoculation with the strains *Herbaspirillum* spp. 114JL and *Bacillus* spp. 145CT showed the best results, with increases of more than 300% in root biomass and reduction of almost 80% in proline content. Under high osmotic stress (500 g PEG L⁻¹), seven strains were able to increase root fresh weight (44.4% to 388.9%), with major variation in proline contents according to the inoculated strain. The *Herbaspirillum* spp. 114JL and *Trinickia* spp. 24JL, promoted the greatest increases in root biomass of plants grown under high osmotic stress (388.9% and 308.3% respectively). Together, the results suggest that *Herbaspirillum* spp. 114JL, *Trinickia* spp. 24JL and *Bacillus* spp. 145CT have potential for the development of a new bioinput aimed to improve the plant tolerance to water stress. Furthermore, the protection against water stress promoted by the most promising strains does not seem to be related to the increase in proline levels of root tissues.

Keywords: climate change; nature-based solutions; *herbaspirillum*; *bacillus*; *trinickia*; inoculation; bioinput.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação geral dos isolados referente às análises realizada para investigação dos mecanismos de crescimento vegetal e mitigação do estresse hídrico.....	30
Tabela 2 – Análise de produção de sideróforos	40
Tabela 3 – Análise de solubilização de fosfato de ferro	42
Tabela 4 – Análise de biofilme indicando a quantificação de biomassa e a classificação do padrão de formação de biofilme bacteriano	45
Tabela 5 – Análise de produção de compostos indólicos.....	46
Tabela 6 – Isolados que foram selecionados para inocular as sementes de tomate	47
Tabela 7 – Massa fresca de raiz de plantas de tomate crescidas sob diferentes concentrações de estresse, sendo, sem estresse [0]; estresse moderado [250] e estresse severo [500].....	48
Tabela 8 – Análise do acúmulo de prolina presente nas raízes sob concentrações de estresse.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS NO CRESCIMENTO E NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS	15
3.2	PAPEL DAS BPCP NA TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO ESTRESSE HÍDRICO.....	17
3.3	MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE HÍDRICO POR BPCP	20
3.4	IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS NO CRESCIMENTO E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO DO TOMATEIRO.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	ISOLADOS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	24
4.2	AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO.....	24
4.2.1	Produção de Compostos Indólicos	24
4.2.2	Tolerância a Estresse Hídrico.....	25
4.2.3	Solubilização de Fosfato de Ferro	25
4.2.4	Produção de Sideróforos	26
4.2.5	Capacidade de Formação de Biofilme.....	26
4.3	AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO A CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO DE TOMATEIRO.....	27
4.3.1	Ensaio de Inoculação	27
4.4	EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PROLINA	27
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

5.1	PRIMEIRO EXPERIMENTO: INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO.....	29
5.1.1	Resistência ao Estresse Hídrico.....	38
5.1.2	Produção de Sideróforos.....	39
5.1.3	Solubilização de Fosfato de Ferro.....	42
5.1.4	Capacidade de Formação de Biofilme.....	44
5.1.5	Produção de Compostos Indólicos.....	47
5.2	SEGUNDO EXPERIMENTO: GERMINAÇÃO DO TOMATE, PESAGEM DAS RAÍZES E DETERMINAÇÃO DA PROLINA.....	47
5.2.1	Ensaio de Inoculação.....	47
5.2.2	Determinação da Massa Fresca da Raiz do Tomate.....	48
5.2.3	Determinação da Prolina da Raiz do Tomate.....	49
6	CONCLUSÕES	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os pesquisadores em torno do mundo estimam que nos próximos 50 anos o planeta alcance uma temperatura média com um aumento de 4°C (VENTURA *et al.*, 2019). No Brasil, atualmente, pode-se sentir tais estimativas onde já se realiza previsões diante das diversas ocorrências registradas sobre os eventos climáticos, uma vez que, nos últimos anos, relataram-se períodos de secas extremas em paralelo com chuvas muito fortes, segundo Marengo (2014). Estas previsões climáticas apontam com frequência uma inconstância na precipitação com extremos de seca, o que, intensifica a sua ocorrência, havendo assim, menores eventos de precipitação e o aumento considerável de temperatura (IPCC 2012, 2014).

Com a intensificação da seca, a disponibilidade hídrica no solo diminui possibilitando consequências significativas para as plantas, tanto no processo de fotossíntese ocasionando fechamento estomático como também no seu desenvolvimento (MEDEIROS, 2013). O ajustamento osmótico é uma das respostas mais importantes ao estresse, constitui-se na acumulação de solutos pelas células o que possibilita a planta absorver água sem perder a turgidez (TORDIN, 2017). Segundo Zhang *et al.* 2008, o resultado ao estresse hídrico acontece a partir de uma ala de eventos relacionados na ativação de genes e síntese de componentes que levam a alterações bioquímicas e fisiológicas, assim, como resposta em situações de seca severa, as espécies realizam esse ajustamento osmótico, proporcionando um influxo de água (por meio do acúmulo de solutos na célula) que diminui o potencial osmótico.

De acordo com Moukhtari *et al.* (2020), a prolina é um aminoácido importante para as plantas principalmente quando estão sob estresse hídrico. Ela é acumulada no período de estresses ambientais e perante a essas situações opera como intermediadora no ajustamento osmótico e como estabilizadora de proteína .

A simulação de um estresse hídrico pode ser ocorrida por acréscimos de solutos que provocam a redução do potencial osmótico, reduzindo a energia livre da água, da mesma maneira que acontece utilizando uma molécula de peso molecular alto, aptas a deixarem o potencial osmótico da solução negativo como

o polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) que não possui capacidade de penetrar nas células vegetais (MEDEIROS, 2013).

Segundo Ventura *et al.* (2019), a agricultura é um dos setores que mais se preocupa com essas previsões, por isso, existem cada vez mais pesquisas sendo desenvolvidas com o intuito de achar uma solução para esse problema e o uso de bactérias é um forte potencial para ajudar as plantas a suportar esses estresses ambientais, uma vez que, a seca é um dos fatores ambientais que mais impacta na produtividade agrícola (TORDIN, 2017).

A parte interna das plantas e o próprio solo, abrangem uma variedade de microrganismos, dentre eles, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) que estão presentes, normalmente, em grandes quantidades (Pedrosa *et al.*, 2011). Podem ser citadas como BPCV os gêneros *Mucilaginibacter*, *Bacillus*, *Mesorhizobium*, *Herbaspirillum*, *Trinickia*, entre outras.

Pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente SP (2017), através de trabalhos realizados para agricultura tropical, constatou que esses microrganismos conseguem diminuir os efeitos do estresse hídrico em trigo, milho e soja, além de conceder aumento no crescimento nessas espécies vegetais. Os resultados propõem que essas bactérias possuem um impacto significativo em diversos mecanismos de tolerância ao estresse, onde, juntos, resultam no melhoramento dos processos das células que agem na mitigação do estresse. A expectativa desses pesquisadores é que aumente o uso dessas bactérias para tratamento de sementes de várias espécies agrícolas, sobretudo, em regiões que apresentam precipitação baixa e para culturas muito suscetíveis à seca (TORDIN, 2017).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de promoção do crescimento de plantas e a resistência ao estresse hídrico de isolados bacterianos, selecionar as estirpes com maior potencial na promoção de crescimento e mitigação do estresse hídrico em plantas com base nas análises bioquímicas e fisiológicas, avaliar o efeito da inoculação de bactérias no crescimento e no acúmulo de prolina de tomateiros sob condições normais e de estresse hídrico, comparar a eficácia dos isolados em promover o crescimento e reduzir os efeitos do estresse hídrico em tomateiros e identificar as estirpes mais promissoras no desenvolvimento de bioinsumos para promover o crescimento e mitigar o estresse hídrico em tomateiros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi caracterizar uma coleção de isolados bacterianos associativos de plantas Neotropicais nativas de Mata Atlântica quanto ao potencial de promoção do crescimento vegetal e capacidade de mitigar o estresse hídrico, prospectando estirpes candidatas ao desenvolvimento de um bioinsumo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar uma coleção de isolados bacterianos quanto à capacidade de produção de compostos indólicos, produção de sideróforos, solubilização de fosfato de ferro, formação de biofilme e resistência ao estresse hídrico induzido por polietilenoglicol;
- Selecionar isolados com potencial de promover o crescimento de plantas e mitigar o estresse hídrico a partir dos resultados de caracterização bioquímica;
- Avaliar o efeito da inoculação dos isolados selecionados sobre o crescimento e acúmulo de prolina em plantas de tomate cultivadas sob diferentes concentrações de polietilenoglicol simulando condições normais e de estresse hídrico;
- Identificar isolados mais promissores para o desenvolvimento de bioinsumos para promover o crescimento e mitigar o estresse hídrico em tomateiros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS NO CRESCIMENTO E NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS

De acordo com Cardoso *et al.* (2016) os microrganismos retratam as formas de vida mais abundante do planeta e apresentam uma grande proporção da diversidade genética global estimada. O solo é classificado como um dos principais reservatórios de diversidade biológica e é considerado um sistema vivo, dinâmico e complexo.

Os microrganismos afetam a composição físico-química e o crescimento das plantas e são essenciais na manutenção das funções do solo sendo os agentes principais em atividades de decomposição de matéria orgânica e de xenobióticos, bem como dos ciclos biogeoquímicos (NIELSEN *et al.*, 2011). Ainda, segundo Schnitzer *et al.* (2011), os microrganismos exercem encargos cruciais na supressão de doenças, controle de patógenos, produção de diferentes hormônios e enzimas, assim como na promoção do crescimento vegetal.

A capacidade do solo em fornecer suprimento necessário de nutrientes minerais para as plantas a longo prazo, está interligado na diversidade microbiana e as funções biológicas ajudando no melhoramento do crescimento delas em condições ambientalmente estressantes e assim aumentar sua adaptação e resistência a culturas (BRUGGEN *et al.*, 2006).

Miransari (2013) relatou que o solo possui uma grande variedade de microrganismos, na qual, apresentam efeitos benéficos, neutros ou patogênicos, onde o número populacional é afetado por fatores de seleção que se distinguem entre os ecossistemas, fazendo com que cada ecossistema seja único em relação a sua comunidade de microrganismos. Fatores esses que englobam o pH do solo, textura, nutrientes e teor de matéria orgânica, incluindo as características edáficas e climáticas referente a cada ambiente (CHAPARRO *et al.*, 2012).

O solo hospeda uma grande variação de populações bacterianas, que são formadas por representantes dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (PHILIPPOT, 2013). Calcula-se que em uma grama de solo apresenta em média

10⁹ células de bactérias, atingindo até 10⁶ espécies diferentes (NUNAN, 2014; BURNS *et al.*, 2013).

Para aumentar a produtividade das culturas é preciso um estudo complexo da biodiversidade microbiana para entender melhor a função dos microrganismos em seus habitats (BAKKER *et al.*, 2015).

Portanto, considera-se um solo saudável aquele que consegue providenciar tanto um substrato com características favoráveis para o crescimento radicular e a obtenção de nutrientes das plantas, quanto a hospedagem de uma comunidade biótica ativa (JANVIER *et al.*, 2007). Uma vez que, o crescimento das plantas no solo pode alterar a fisiologia e a estrutura genética das comunidades dos microrganismos da rizosfera (DI SALVO *et al.*, 2018).

O efeito do metabolismo das plantas perante o solo e os microrganismos próximos às raízes é chamado de efeito rizosfera (BERENDSEN *et al.*, 2012). Há diversas interações entre os microrganismos presentes na rizosfera e as plantas, na qual, estão relacionadas com a rizodeposição ou liberação de compostos pelas raízes que auxiliam na manutenção do aumento dos microrganismos nesse habitat (YEVDOKIMOV, 2013). O fato de se encontrar populações bacterianas relativamente maiores na rizosfera quando comparadas a fungos, algas, actinomicetos ou protozoários deve-se normalmente pela rizosfera possuir maior disponibilidade de nutrientes e pela capacidade das bactérias em usufruir os exsudatos cedidos pelas plantas em forma de substrato para seu metabolismo (PRASHAR *et al.*, 2014). Acontece que, as bactérias desenvolvem sua colonização quando conseguem um ambiente de alta disponibilidade nutricional, produzindo um biofilme sobre a raiz e assim são capazes de preservar uma população de células por um longo tempo, dando início então nas interações com as plantas hospedeiras (DANHORN; FUQUA, 2007).

Os microrganismos relacionados às plantas, podem obter resultados benéficos, prejudiciais ou neutros perante ao crescimento de seu hospedeiro. As bactérias que geram respostas benéficas são geralmente chamadas de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) ou bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP).

Kloepper e Schroth em 1978 relataram as BPCP como um conjunto benéfico e heterogêneo de microrganismos que estão presentes no solo podendo ser localizadas na rizosfera, na superfície das raízes (rizoplano), no filoplano ou em regiões endofíticas, elas conseguem colonizar as plantas e promover o seu crescimento vegetal. Essas bactérias podem ter interação com o hospedeiro por meio de processos simbióticos, endofíticos ou associativos podendo existir nos tecidos da planta ou até mesmo no solo (SOUZA et al., 2015).

Com os estudos relatados em Singh *et al.* (2011) as BPCP conseguem promover o desenvolvimento de plantas por mecanismos diretos e indiretos. O mecanismo direto é através da fixação biológica de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico) e solubilização de fosfatos inorgânicos, essas ações podem ajudar a planta a absorver a água e sais minerais em maiores quantidades, acrescentar atividade de enzimas pertinente ao metabolismo de nutrientes. Já os mecanismos indiretos são através do controle biológico de pragas, produção de siderófilos, proteção contra estresse biótico e abiótico como a seca, alta salinidade e a toxicidade de metais (YANG et al., 2009) e indução de resistência local e sistêmica (SING et al., 2011), praticamente, as BPCP promovem o crescimento indiretamente quando produzem uma grande variedade de substâncias que são capazes de diminuir ou suprimir os efeitos deletérios dos microrganismos fitopatogênicos (YANG et al., 2009).

Entre os gêneros mais habituais de bactérias benéficas para as plantas evidenciam-se: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Rhizobium* (VIDEIRA et al., 2012).

As BPCPs relacionadas às raízes possuem um papel importante no apoio à saúde das plantas, estimulando seu desenvolvimento. Assim, são desejadas e buscadas para aplicação, as bactérias que possuem mais de uma característica para promover o crescimento vegetal, como: fixar nitrogênio e solubilizar fosfatos ou produzir auxinas e sideróforos, por exemplo. Com isso, os principais mecanismos de ação das BPCP são solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, produção de fitormônios e aumento da tolerância à condição de estresse (COMPANT *et al.*, 2012).

3.2 PAPEL DAS BPCP NA TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO ESTRESSE HÍDRICO

Diante a todas características já citadas, as BPCP podem utilizar mecanismos simples de mitigação em estresses ambientais como por exemplo, deficiência ou excesso de água, deficiência nutricional ou até mesmo toxicidade por metais pesados (POTTERS *et al.*, 2007).

Segundo Saravanakumar *et al.* (2011) a expressão de genes e a resposta de plantas possuem uma estreita relação correlacionado com a tolerância a estresses bióticos e abióticos, ocasionando a sobrevivência das plantas em condições de estresse hídrico, uma vez que, o uso de microrganismos benéficos pode auxiliar na expressão de genes. Esse mesmo autor analisou uma resistência a estresse hídrico maior no feijão mungo (*Vignaradiata*) quando usou a bactéria *Pseudomonas fluorescens* e também um aumento na atividade das enzimas catalase e peroxidase, que por conta da indução do estresse eliminam H₂O₂ formado. Ainda, Cassan *et al.* (2001) descreveu que as BPCP tiveram forte influência na produção de fitormônios possibilitando modificações fisiológicas e morfológicas, certificando a eficiência da tolerância ao estresse hídrico.

É habitual observar em plantas inoculadas com as BPCP uma elevação no conteúdo relativo de água, na fração apoplástica de água e no potencial hídrico foliar, isso pelo fato das BPCP exsudar osmólitos que podem atuar em união com os osmotolerantes formados pelas plantas como glicina-betaína e prolina deixando a tolerância ao estresse hídrico maior (DIMKPA *et al.*, 2009).

Um dos passos iniciais para a promoção da tolerância de plantas a deficiência de água é a alteração da elasticidade das paredes celulares das raízes devido a inoculação de bactérias, onde acontece um aumento na produção de raiz na biomassa em geral (PEREYRA *et al.*, 2006).

As plantas, na presença de condições estressantes conseguem recorrer a mecanismos de ajustes fisiológicos, metabólicos e morfológicos que diminuem os danos causados pelo déficit hídrico e altas temperaturas (BLUM, 2016). Segundo Haworth *et al.* (2018) para manutenção do turgor celular e crescimento das plantas existem ajustes importantes como o controle, a eficiência do uso da água e o ajustamento estomático.

O ajuste osmótico é um dos mecanismos de proteção que as plantas desenvolvem a fim de evitar os efeitos prejudiciais causados pelos estresses. Este ajuste é estimulado pelo acúmulo de substâncias hidrofílicas orgânicas dentro do vacúolo ou no citosol que serve para ajudar na turgidez da célula em sua manutenção e na preservação e integridade de enzimas, proteínas, macromoléculas e membranas (ASHRAF *et al.*, 2011).

Assim, os estresses ambientais, tais como: déficit hídrico, deficiência nutricional, presença de patógenos, alta salinidade e temperaturas extremas ocasionam o acúmulo de prolina nas plantas (SIRIPORNADULSIL *et al.*, 2002). Segundo Verbruggen e Hermans (2008) a existência do estresse conduz a síntese de prolina e dificulta a sua degradação, visto que, a quantidade desse aminoácido nessas circunstâncias varia entre as espécies vegetais dependendo também do grau do estresse em que foram expostas (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

A prolina é sintetizada nos tecidos foliares por dois caminhos, pelo glutamato e pela ornitina. Por isso é encontrado maiores concentrações de prolina nas folhas do que nas raízes (MWENYE *et al.*, 2016). No entanto, segundo Ernst *et al.* (2000), uma quantidade excessiva de produção de prolina pode ser prejudicial para as plantas, uma vez que, a prolina consome de 0,4 a 0,6% do nitrogênio total dos tecidos foliares podendo roubar parte do nitrogênio que seria utilizado para atividades de crescimento e também, ela pode ocasionar toxicidade atuando como inibidor de crescimento.

O bioinsumo é um produto de tecnologia biológica e para se obter um resultado positivo utilizando a tecnologia de inoculação de BPCP vai depender da estirpe microbiana e da formulação do inoculante (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012). A seleção de estirpes de BPCPs que apresenta grande potencial biotecnológico é umas das etapas mais importantes para se obter um inoculante eficaz (HUNGRIA, 2011). São essenciais pesquisas *in vitro* para a seleção das estirpes, esses estudos tem que permitir identificar e caracterizar essas bactérias, incluindo testes em casa de vegetação e também em condições de campo para confirmação das estirpes. Depois de selecionadas, as bactérias são normalmente cultivadas em meio sólido ou líquido para alcançar uma quantidade alta de níveis populacionais, fatores como temperatura, tempo de cultivo, composição do meio de cultura e agitação estão diretamente ligadas com a

natureza da estirpe. Assim, esses cultivos podem ser incorporados (ANPII, 2012; BASHA et al., 2013). Portanto, a inoculação de bactérias benéficas minimiza a utilização de diversos produtos como fertilizantes e pesticidas, ainda, capacitam a planta tornando-as mais tolerantes à seca e outros fatores.

3.3 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE HÍDRICO POR BPCP

A caracterização bioquímica dos isolados possibilita escolher estirpes que apontam uma maior estimativa de eficiência no processo de colonização, promoção de crescimento e controle biológico (RANA et al., 2011). Para se obter esses isolados é preferível os que apresentarem características nas análises bioquímicas como: Solubilização de fosfatos, produção de fitohormônios, produção de sideróforos, produção de biofilme e tolerância osmótica.

O fósforo é fundamental para o crescimento vegetal, pois é um nutriente limitante para o desenvolvimento atuando também nas atividades metabólicas e bioquímicas, e na elaboração de ácidos nucleicos e fosfolípidios. (GYANESHWAR et al., 2002). É visto em habitualmente insolúvel como matéria orgânica ou na forma inorgânica, também como precipitados com íons Ca^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3} ou até mesmo adsorvidos em áreas de partículas minerais do solo. As bactérias solubilizadoras de fosfatos produzem fosfatases onde sua ação acarreta na liberação do fósforo insolúvel na forma orgânica. Já na forma inorgânica o que favorece a solubilização de fosfatos são os fatores físico-químicos juntamente com modificações na acidificação do solo ocasionado pela liberação de prótons pela planta) e de ácidos orgânicos através dos microrganismos (NOVAIS et al., 2007). É de extrema importância nos ecossistemas a solubilização microbiana de fosfato mineral que é pouco solúvel no solo (MIKANOVA; NOYAKOVÁ, 2002). Dentro das bactérias que mostram a capacidade em solubilizar fosfato inorgânico por bactérias associativa estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUES; FRAGA, 1999).

A quantidade de ferro presente em grande parte do solo é alta, este elemento é um micronutriente fundamental das plantas, pois ele é utilizado como

cofator de diversas enzimas que apresentam atividade redox. No entanto, a sua acessibilidade é baixa devido a solubilidade dos óxidos de ferro ser relativamente pequena (HIRSCH, 2010). As plantas e os microrganismos presentes no solo entram em competição por ferro e fósforo, na rizosfera. Por conseguirem decompor fitosideróforos e por estar próximo a raiz, os microrganismos apresentam uma vantagem, porém, a quantidade de exsudatos disponibilizado pela rizosfera afeta a ação microbiana (disponibilidade de carbono). (MARSCHNER *et al.*, 2011). Segundo Holmstrom (2014) sideróforos são peptídeos que em condições de deficiência de ferro, são expelidos para poder sequestrar o ferro do ambiente externo ou de demais microrganismos. *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Enterobacter* são algumas BPCP que podem aumentar a disponibilidade de ferro perto da raiz, pois elas produzem uma faixa grande de compostos sequestradores de ferro permitindo auxiliar no crescimento da planta (LOACES *et al.*, 2011).

Auxinas são fitormônios importantes na regulação e crescimento de plantas, conseguem influenciar, com concentrações baixas, nos processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos das plantas (GAMALERO; GLICK, 2011). As auxinas são consideradas importantes para o crescimento vegetal, onde o ácido-3-indol acético (AIA) é a forma mais relevante fisiologicamente (TAIZ e ZEIGER, 2004). São esses fitormônios responsáveis por controlar a expansão celular, dominância apical, diferenciação vascular, formação de raízes laterais e pêlos radiculares, fototropismo e gravitropismo, obtendo o aumento da região da raiz possibilitando que a planta tenha um acesso maior ao nutrientes do solo (CASSÁN *et al.*, 2014). De acordo com Zahir *et al.* (2004) existe uma variação de bactérias associativas que produzem fitormônios e assim, ajudam na promoção do crescimento vegetal como: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*.

A fisiologia do estresse osmótico, caracterização e fenotipagem da resistência ao estresse osmótico vêm avançando significativamente nos últimos anos (SINGH *et al.*, 2018). A capacidade dos isolados em tolerar estresse osmótico é fundamental, uma vez que, os ambientes apresentam cada vez mais limitações hídricas às mudas utilizadas. O fechamento dos estômatos é normalmente a primeira resposta das plantas a pouca disponibilidade hídrica, podendo se agravar sendo submetidas a optar entre a dessecação ou ficar sem

assimilar o CO₂ (MATIZ *et al.*, 2013). Essa pouca disponibilidade hídrica afeta também a absorção de água e de nutrientes, ocasionando a redução da germinação das sementes, da atividade fotossintética e enzimática, da transpiração e demais processos fisiológicos e metabólicos. Apesar disso, devido às interações com microrganismos benéficos, às plantas vêm se desenvolvendo com mecanismos adaptativos complexos (SANTOS *et al.*, 2014).

Biofilme bacteriano é um conjunto complexo constituído por uma única, ou várias espécies de microrganismos enredadas por uma matriz polimérica que as protege. Para a produção desse biofilme é abrangido fatores específicos e inespecíficos. Os fatores específicos agem de maneira mais complexa abrangendo a expressão de genes que codificam adesinas e demais moléculas adesivas, originando uma matriz com substâncias poliméricas (MALAFAIA, 2016). Ainda, esses fatores conseguem se associar com outras proteínas da superfície do microrganismo, segundo Costa L. *et al.* (2011). Empregando esses fatores, principia a formação de biofilme, pelo microrganismo, com a adesão (reversível) na superfície e depois sucede a adesão irreversível, maturação, desnaturação e dispersão dos microrganismos (SAUER, 2003).

3.4 IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS NO CRESCIMENTO E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO DO TOMATEIRO

O tomate (*Solanum lycopersicum*), é uma das culturas mais cultivadas em todo o mundo segundo Howladar, 2016; El-Sappah *et al.*, 2021a; Abbas *et al.*, 2022. Ele é um fruto obtido do tomateiro que pertence à família das Solanáceas, dicotiledônea da ordem Tubiflorae, gênero Solanum (KOH *et al.* 2012). Conforme Alvarenga (2013), estima-se que o tomate partiu dos espanhóis para a Europa no século XV e foram transferidos por imigrantes europeus até o Brasil no século XIX.

O tomateiro é uma planta de cultivo anual que se desenvolve na forma rasteira, ereta ou semi ereta. Possuem folhas alternadas com aproximadamente seis a oito folíolos laterais, e o que realmente possui valor comercial são os frutos produzidos. Os frutos crescem por inflorescência,

podendo ser do tipo cachos que apresentam flores amarelas e pequenas, onde a floração se inicia em 45 dias depois da sementeira (ALVARENGA, 2013).

Para obter o melhor crescimento da planta é necessário alguns fatores como, luminosidade, temperatura, nutrição, disponibilidade de água e concentração de CO₂ (TAIZ e ZEIGER, 2013). Para germinação, formação de mudas e maturação dos frutos, o tomateiro necessita estar em uma temperatura entre 18 a 24°C, temperaturas abaixo de 10°C são prejudiciais à planta. Ainda, é bastante rígida em relação a água e adubação nas etapas de desenvolvimento e produção (NAIKA *et al.*, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Segundo Alvarenga (2004 b), existem cinco grupos de tomates aptos para consumo: Santa Cruz, Salada ou Caqui, Cereja, Saladinha e Saladete ou Italiano.

A cultura de tomate representa uma importância significativa na economia do agronegócio para o Brasil e é conceituado uma das hortaliças mais rigorosas e vulneráveis a pragas e doenças. Globalmente, mais de duzentas doenças e desordens fisiológicas foram descritos (ABRAHAMIAN *et al.*, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizados 129 isolados bacterianos previamente cultivados em estoque do trabalho anterior Mariane Campos (2022), provenientes da rizosfera de espécies nativas da mata atlântica Embaúba (*Cecropia pachystachya*) e Jequitibá (*Cariniana estrellensis*). O experimento foi realizado no laboratório de Genética de Microrganismos LAGEM, no departamento de Ciências Biológicas; UEL.

Para realização de todas as análises da caracterização bioquímica, os isolados foram reativados em meio líquido TSB (caldo triptona de soja - Acumedia) e LB (Luria Bertani - Kasvi) em agitação orbital de 180 rpm, 28°C por 24 horas. Os meios foram preparados usando 2 g LB/L e 3 gTSB/L. Em casos de meio sólido foi adicionado meio ágar 15 g/L Kasvi.

4.2 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO

4.2.1 Produção de compostos indólicos

Para a determinação da capacidade da produção de compostos indólicos (AIA) utilizou-se o método de colorimetria (SALWAR; KREMER, 1995) com a adição do reagente Salkowski modificado (BAUTISTA; GALLARDO, 2008). Os 129 isolados foram cultivados em 5 mL do meio YM (4 g/L manitol; 0,4 g/L extrato de levedura; 0,5 g/L fosfato de potássio; 0,2 g/L sulfato de magnésio e 0,1 g/L cloreto de sódio) suplementado com DL-triptofano (100 µg mL⁻¹), colocados no shaker a 28°C por 24 horas em agitação de 180 rpm. Em seguida, foi coletado 2 mL do cultivo e centrifugados por 5 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi coletado (1 mL) e transferido para um tubo de ensaio, no qual, foi adicionado 2 mL do reagente Salkowski (FeCl₃ 40mM; H₂SO₄ 7,9 M). Após homogeneização, a reação foi mantida em temperatura ambiente por 25 minutos e, em seguida, analisada. A produção de compostos indólicos foi avaliada qualitativamente, pela intensidade de coloração roxa da reação.

4.2.2 Tolerância a estresse hídrico

A capacidade dos isolados em tolerar estresse hídrico foi avaliada em meio de cultura com 45% de polietilenoglicol (PEG-8000), conforme van der Weele *et al.* (2000). Primeiramente, foram preparadas as placas de petri contendo o meio sólido (15 g ágar/L e 2 g LB/L; 3 g TSB/L), que depois de solidificar, foi adicionado a solução de PEG por 12 horas, após esse período o excesso do PEG foi descartado e as placas deixadas para secar por 30 minutos dentro do fluxo laminar. Em seguida, foi feita a inoculação com os isolados. Para isso, os isolados foram cultivados em meio TSB (Acumedia) e LB (Kasvi) líquido por 48 horas a 180 rpm, em seguida foram transferidos 5 µl do inóculo nas placas prontas contendo meio sólido (somente ágar e TSB; LB) e 5 µl nas placas com adição do PEG em concentração de 45 %. As placas foram mantidas em incubadora tipo BOD por 5 dias a 28°C. A análise foi feita a partir da razão do diâmetro da colônia crescida nas placas com PEG e sem PEG, na qual, a colônia foi medida com uma régua em cm em ambas placas. Foi considerado tolerante, os isolados que conseguiram crescer em meio com PEG e aqueles que cresceram somente em meio sem PEG foi considerado como não tolerantes. Ainda, para avaliação, foi dividido em três classes (alta, média e baixa capacidade de tolerância hídrica, de acordo com o intervalo de valores (terço superior, terço médio e terço inferior).

4.2.3 Solubilização de fosfato de ferro

A capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos de ferro, foi investigada em meio de cultura NBRIP suplementado com $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (concentração final de 0,1% de fósforo (m/v) no meio de cultivo). Para isso, os isolados foram, primeiramente, cultivados em 5 mL do meio líquido LB e TSB por 24 horas a 28°C a 180 rpm. Posteriormente, 100 µL foi inoculado em 10 mL do meio líquido NBRIP (METHA; NAUTIYAL, 2001). As bactérias cresceram por 7 dias a 28°C sob agitação orbital a 180 rpm. Após, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi utilizado na análise quantitativa do fósforo, conforme método fosfomolibdico, descrito por Murphy e Riley (1962). Para isso, 1 mL do sobrenadante foi

misturado com 2 mL da solução de molibdato de amônio diluída e 20 µL de uma solução de ácido ascórbico 5%. Depois de 10 minutos de reação, a absorbância foi medida a 660 nm no espectrofotômetro. A quantidade de fósforo foi determinada pela curva de calibração construída com concentrações crescentes de 0; 1; 2; 3; 4; 5; 8 e 10 µg P/mL de uma solução padrão de KH_2PO_4 (40 µg P/mL). Para avaliação, foi dividido em três classes (alta, média e baixa capacidade de solubilizar fosfato de ferro, de acordo com o intervalo de valores (terço superior, terço médio e terço inferior).

4.2.4 Produção de sideróforos

A determinação da produção de sideróforos pelos isolados foi avaliada pelo método do cromo azurol S (CAS) descrito por Schwyn e Neilands (1987). Para isso, os isolados foram cultivados em 5 mL do meio LB ou TSB líquido a 28°C em agitação a 180 rpm por 24 horas. Alíquotas de 2 µL desta cultura foi inoculado em placas de petri contendo o meio T-CAS. As placas foram incubadas por 5 dias a 28°C e, posteriormente, analisadas quanto a formação do halo amarelo em torno das colônias, indicando a capacidade para produção de sideróforos. A avaliação da capacidade de produção de sideróforos foi determinada pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. Ainda, para avaliação, foi dividido em três classes (alta, média e baixa capacidade de produção de sideróforos, de acordo com o intervalo de valores (terço superior, terço médio e terço inferior).

4.2.5 Capacidade de formação de biofilme

A formação de biofilme foi analisada em um ensaio de placa de microtitulação para quantificação de biofilme. Os isolados foram cultivados em tubos de ensaio com 5 mL de meio TSB e LB por 24 horas a 180 rpm. Alíquota de 10 µL desta cultura foi inoculada em microplacas contendo 190 µL de meio TSB e LB por poço e a placa foi incubada por 16 horas a 28°C. O cultivo foi feito com três repetições. Após crescimento, a cultura foi removida com uma micropipeta e as células do biofilme aderidas ao poço foram fixadas com metanol absoluto (99%). Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com solução salina, secas ao ar, e coradas com 200 µL de solução de cristal violeta

(0,2%) por 5 minutos. O excesso do corante foi removido pela lavagem (2x) com água destilada. Após secagem ao ar, as células coradas foram retiradas da parede do poço com a solução de ácido acético 33%. A formação do biofilme foi analisada pela absorbância em um leitor de microplacas a 570 nm, conforme protocolo descrito por Shukla e Rao, (2017) e classificada como formadoras de biofilme, formadoras fracas e fortes formadoras de acordo com Pavão *et al.* (2021).

4.3 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO A CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO DE TOMATEIRO

A partir da capacidade de tolerância ao estresse osmótico (crescimento em PEG) e depois das demais análises de promoção, foram selecionados 10 isolados para inoculação em sementes de tomate, com a finalidade de testar suas capacidades de promover o crescimento da raiz do tomate e mitigar o estresse hídrico.

4.3.1 Ensaio de inoculação

Inicialmente, os 10 isolados selecionados foram reativados em meio líquido de TSB e LB por 24 horas a 180 rpm. Posteriormente, as sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) foram tratadas com hipoclorito de sódio 5% por 3 minutos e lavadas em água estéril por 3 vezes. As sementes foram inoculadas com 1 mL de cada cultura por 15 minutos. Após esse período, as sementes inoculadas (2 sementes/tratamento de inoculação) foram colocadas para germinar em tubos falcon com 1,5% de ágar contendo concentrações crescentes de PEG 0; 250; 500). As sementes foram incubadas em uma câmara de crescimento fitotron por 30 dias (25°C dia, 22°C noite, fotoperíodo de 16 horas, 37 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ luz do dia fluorescente) como descrito na metodologia de Edward e Michael (2018). Foram realizadas 12 repetições para cada isolado e controle em concentrações de PEG citadas acima. A avaliação do crescimento da raiz foi analisada através da pesagem da junção de raízes das 12 repetições e o acúmulo de prolina foi avaliado pela leitura no espectrofotômetro a 520 nm.

4.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PROLINA

A extração e a determinação do teor de prolina foi realizada de acordo com o protocolo de Carillo e Gibon (2011). Foram utilizadas raízes com 30 dias de crescimento de cada tratamento de inoculação e concentração de PEG conforme descrito acima. Amostras de 200 mg de raiz foram maceradas com N₂ líquido e, em seguida, homogeneizadas com 2 mL de tampão de extração (álcool etílico 70%) no vórtex por 2 minutos. Os extratos foram centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi coletado para análise.

Para determinação de prolina o reagente de reação foi preparado todo no escuro. Primeiro, foi diluído o ácido acético glacial a ácido acético 60% onde adicionou-se 5,92 mL de água destilada em 8,88 mL de ácido acético glacial para a quantidade de amostras necessárias. Depois, foi preparado a solução de ninhidrina 1% utilizando o ácido acético 60% como solvente e por fim, foi adicionado etanol à solução de ninhidrina de modo que fique 20% na solução. No preparo da amostra, foi adicionado em eppendorfs 200 µL dos padrões da curva de prolina, do branco (etanol 70%) e das amostras. Em seguida, adicionou-se 400 µL do mix de reação. Foi deixado em banho-maria a 95°C por 20 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, foi coletado 200 µL do padrão/amostra e colocado na microplaca de poços transparentes. O sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de prolina. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expressos em micromol de prolina por grama de massa fresca ($\mu\text{mol. gMF}^{-1}$).

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no programa RStudio (ExpDes.pt), onde as médias foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obtenção dos resultados, o experimento foi realizado em duas partes.

A primeira parte foi feita a avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento de plantas e mitigação do estresse hídrico dos 129 isolados para avaliar o potencial de crescimento vegetal. As análises realizadas foram: resistência ao estresse hídrico induzido por polietilenoglicol, produção de sideróforos, solubilização de fosfato de ferro, formação de biofilme e produção de compostos indólicos.

A segunda parte foi feita a seleção dos 10 isolados mais promissores de promover crescimento vegetal e mitigar o estresse osmótico, de acordo com as análises bioquímicas, e então feita a inoculação nas sementes do tomate, a pesagem da massa fresca da raiz e a determinação da concentração de prolina presente na raiz de cada semente germinada em concentrações crescentes de PEG.

5.1 PRIMEIRO EXPERIMENTO: INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS E MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO

De acordo com a análise de resistência ao estresse hídrico, foi criado um tabela dos isolados que mais cresceram em placas contendo polietilenoglicol (PEG) em uma concentração de 45%. A partir dessa classificação, os isolados que conseguiram obter valores considerados nas demais análises foram listados na frente (Tabela 1). Os isolados que estão em branco na coluna de gênero, não foram identificados até o presente trabalho, os que não apresentaram valores nas colunas de sideróforos e solubilização de fosfato os isolados não apresentaram potencial, os que não apresentaram valores na coluna de biofilme não foram analisados e na coluna de compostos indólicos, os isolados que não apresentam 'sim' não promoveram potencial de sintetizar fitohormônios.

Tabela 1 - Classificação geral dos isolados referente às análises realizada para investigação dos mecanismos de crescimento vegetal e mitigação do estresse hídrico.

Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG / sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
1º	53	JTSB	<i>Leifsonia</i>	2,7	ND	ND	ND	ND
2º	74	JTSB	<i>Bacillus</i>	2,5	ND	ND	ND	ND
3º	78	JTSB		1,52	ND	ND	0,262	SIM
4º	3	JTSB	<i>Mucilaginibacter</i>	1,5	0,5	2,4	0,486	ND
5º	25	CLB	<i>Methylobacterium</i>	1,3	ND	ND	ND	SIM
6º	88	CLB		1,3	ND	ND	ND	ND
7º	108	CLB	<i>Streptomyces</i>	1,3	ND	ND	ND	ND
8º	32	JTSB	<i>Dyella</i>	1,3	ND	ND	ND	SIM
9º	49	JTSB		1,3	ND	ND	ND	ND
10º	137	CTSB		1,3	ND	4	ND	ND
11º	85	CLB	<i>Paracoccus</i>	1,2	ND	ND	ND	ND
12º	87	CLB		1,2	ND	ND	ND	ND
13º	106	CLB		1,2	ND	1,2	0,43	SIM
14º	24	JLB	<i>Trinickia</i>	1,1	ND	ND	0,282	SIM
15º	35	JTSB	<i>Dyella</i>	1,1	0,2	ND	ND	ND
16º	112 R1	CTSB	<i>Bacillus</i>	1,1	ND	ND	0,459	SIM
17º	15	JLB		1	0,7	ND	0,292	SIM
18º	65	JLB	<i>Ralstonia</i>	1	0,9	ND	0,444	SIM
19º	85	JLB	<i>Ralstonia</i>	1	ND	ND	0,296	SIM

Tabela 1 – Continuação.

Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG/ sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
20 ^o	111	JLB	<i>Dyella</i>	1	0,3	ND	ND	ND
21 ^o	16	CLB		1	ND	ND	ND	ND
22 ^o	105	CLB	<i>Bacillus</i>	1	0,4	ND	0,417	SIM
23 ^o	109	CLB	<i>Dyella</i>	1	0,3	ND	ND	ND
24 ^o	6	JTSB	<i>Burkholderia</i> (100%)	1	ND	ND	ND	ND
25 ^o	41R2	JTSB	<i>Burkholderia</i> (100%)	1	ND	ND	ND	ND
26 ^o	4	CTSB	<i>Bacillus</i>	1	ND	ND	0,616	SIM
27 ^o	62	CTSB		1	ND	6,8	ND	ND
28 ^o	64	CTSB		1	ND	7,1	0,416	SIM
29 ^o	67	CTSB		1	ND	3,3	ND	ND
30 ^o	98	CTSB	<i>Mesorhizobium</i>	1	ND	4,5	ND	SIM
31 ^o	135	CTSB		1	ND	4,1	ND	ND
32 ^o	43	JLB		0,9	ND	ND	ND	ND
33 ^o	46	JLB		0,9	ND	3,7	0,367	SIM
34 ^o	82	JLB		0,9	0,2	4,3	ND	ND
35 ^o	102	JLB	<i>Mycobacterium</i>	0,9	ND	ND	ND	ND
36 ^o	9	CLB	<i>Streptomyces</i>	0,9	0,1	5,2	ND	ND
37 ^o	89	CLB		0,9	ND	ND	ND	ND
38 ^o	112	CLB		0,9	0,1	ND	ND	ND
39 ^o	4	JTSB	<i>Ralstonia</i>	0,9	ND	3,2	ND	ND

Tabela 1 – Continuação.

Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG/ sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
40 ^o	76	JTSB		0,9	ND	ND	ND	ND
41 ^o	97	JTSB	<i>Dyella</i>	0,9	0,2	ND	ND	ND
42 ^o	111	JTSB	<i>Dyella</i>	0,9	0,3	ND	ND	ND
43 ^o	113R1	JTSB	<i>Dyella</i>	0,9	ND	ND	ND	ND
44 ^o	19 R2	CTSB		0,9	ND	ND	0,381	SIM
45 ^o	61	CTSB		0,9	ND	7	ND	ND
46 ^o	145	CTSB	<i>Bacillus</i>	0,9	ND	4,1	ND	ND
47 ^o	14	JLB		0,8	ND	ND	ND	SIM
48 ^o	100	JLB	<i>Mycobacterium</i>	0,8	ND	ND	ND	ND
49 ^o	114	JLB	<i>Herbaspirillum</i>	0,8	0,5	2,5	ND	ND
50 ^o	7	CLB		0,8	0,2	2,9	0,303	ND
51 ^o	51	CLB	<i>Lysinibacillus</i>	0,8	ND	ND	ND	ND
52 ^o	113	CLB		0,8	ND	1,2	ND	ND
53 ^o	35R2	JTSB		0,8	0,2	ND	ND	ND
54 ^o	41	JTSB	<i>Burkholderia</i> (100%)	0,8	ND	ND	ND	ND
55 ^o	46	JTSB	<i>Leifsonia</i>	0,8	0,3	ND	ND	ND
56 ^o	77	JTSB		0,8	ND	ND	ND	ND
57 ^o	81	JTSB		0,8	ND	ND	ND	ND
58 ^o	87	JTSB	<i>Allorhizobium-</i> <i>Neorhizobium-</i> <i>Pararhizobium-</i> <i>Rhizobium</i>	0,8	0,2	ND	ND	ND

Tabela 1 – Continuação.

Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG/ sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
59 ^o	90R2	JTSB	<i>Allorhizobium- Neorhizobium- Pararhizobium- Rhizobium</i>	0,8	0,2	ND	ND	ND
60 ^o	93R1	JTSB	<i>Dyella</i>	0,8	ND	ND	ND	ND
61 ^o	95	JTSB	<i>Dyella</i>	0,8	0,1	ND	ND	ND
62 ^o	100R2	JTSB		0,8	ND	ND	ND	ND
63 ^o	110	JTSB	<i>Ralstonia</i>	0,8	ND	ND	ND	ND
64 ^o	18	CTSB	<i>Lysinibacillus</i>	0,8	ND	6,2	ND	ND
65 ^o	142	CTSB		0,8	ND	5,2	ND	ND
66 ^o	13	JLB		0,7	ND	ND	0,36	SIM
67 ^o	34	JLB		0,7	ND	3,3	0,38	SIM
68 ^o	38	JLB	<i>Bacillus</i>	0,7	ND	ND	0,33	SIM
69 ^o	45	JLB	<i>Mucilaginibacter</i>	0,7	ND	ND	0,65	SIM
70 ^o	77	JLB		0,7	ND	5,1	ND	ND
71 ^o	92	JLB	<i>Paraburkholderia</i> (8 5%)	0,7	ND	ND	ND	ND
72 ^o	98	JLB		0,7	ND	ND	ND	ND
73 ^o	107	JLB	<i>Rhizobium</i> (79%)	0,7	0,3	ND	ND	ND
74 ^o	4	CLB	<i>Allorhizobium- Neorhizobium- Pararhizobium- Rhizobium</i>	0,7	ND	1,2	ND	ND

Tabela 1 – Continuação.

Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG/ sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
75 ^o	8	CLB	<i>Bacillus</i>	0,7	0,2	2,1	ND	ND
76 ^o	10	CLB	<i>Leifsonia</i>	0,7	ND	ND	ND	ND
77 ^o	27	CLB		0,7	ND	ND	ND	ND
78 ^o	57	CLB	<i>Microbacterium</i>	0,7	ND	1	0,616	ND
79 ^o	40	JTSB	<i>Burkholderia</i> (99%)	0,7	ND	ND	ND	ND
80 ^o	41R1	JTSB	<i>Burkholderia</i> (100%)	0,7	ND	ND	ND	ND
81 ^o	42	JTSB		0,7	0,1	ND	ND	ND
82 ^o	47	JTSB	<i>Burkholderia</i> (100%)	0,7	ND	ND	ND	ND
83 ^o	82R2	JTSB	<i>Rhizobium/Agrobacterium</i> group; <i>Rhizobium</i> ;	0,7	0,2	ND	ND	ND
84 ^o	90R1	JTSB	<i>Dyella</i>	0,7	ND	ND	0,216	SIM
85 ^o	24	CTSB		0,7	ND	5,7	0,22	SIM
86 ^o	76	CTSB		0,7	ND	3,5	ND	ND
87 ^o	80	CTSB	<i>Mesorhizobium</i>	0,7	ND	2,8	ND	ND
88 ^o	116 R1	CTSB	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	0,7	ND	ND	ND	ND
89 ^o	47	JLB		0,6	0,5	3	ND	ND
90 ^o	52	JLB		0,6	0,1	ND	ND	SIM
91 ^o	76	JLB	<i>Dyella</i>	0,6	ND	3,2	ND	ND

Tabela 1 – Continuação.

Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG/ sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
92º	106	JLB	<i>Trinickia</i> (100%)	0,6	0,5	ND	ND	ND
93º	113	JLB	<i>Ralstonia</i>	0,6	ND	ND	ND	ND
94º	5	CLB	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	0,6	ND	ND		
95º	11	CLB		0,6	ND	1,7	ND	ND
96º	22	CLB	<i>Dyella</i>	0,6	ND	ND	ND	ND
97º	36	JTSB	<i>Burkholderia</i> (100%)	0,6	ND	ND	ND	ND
98º	79R2	JTSB	<i>Ralstonia</i>	0,6	ND	ND	ND	ND
99º	93R2	JTSB	<i>Ralstonia</i>	0,6	ND	ND	ND	ND
100º	13	CTSB	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,6	ND	ND	ND	ND
101º	14 R1	CTSB		0,6	ND	5,3	ND	ND
102º	23	CTSB	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,6	0,4	7,7	ND	ND
103º	68 R1	CTSB		0,6	ND	1,5	ND	
104º	77	CTSB	<i>Paenibacillus</i>	0,6	ND	4,5	ND	SIM
105º	120	CTSB	<i>Streptomyces</i>	0,6	ND	4,5	ND	ND
106º	126	CTSB		0,6	ND	5,2	ND	ND
107º	10	JLB	<i>Trinickia</i>	0,5	ND	ND	ND	SIM

Tabela 1 – Continuação.

Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG/ sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
108º	39	JLB		0,5	0,2	8,4	ND	SIM
109º	40	JLB	<i>Bacillus</i>	0,5	ND	2,9	ND	ND
110º	2	CLB	<i>Ralstonia</i>	0,5	ND	ND	ND	ND
111º	13	CLB		0,5	ND	ND	ND	ND
112º	17	CLB		0,5	0,3	ND	ND	ND
113º	37	JTSB	<i>Dyella</i>	0,5	0,3	ND	ND	ND
114º	6	CTSB	<i>Streptomyces</i>	0,5		ND	ND	ND
115º	28	CTSB	<i>Sphingomonadaceae</i>	0,5	0,5	6,5	ND	ND
116º	39	CTSB	<i>Ralstonia</i>	0,5		6,5	ND	ND
117º	42	CTSB	<i>Burkholderia-Caballeronia</i> <i>-Paraburkholderia</i>	0,5	0,3	6,9	ND	ND
118º	51	CTSB		0,5	ND	5,9	ND	ND
119º	73	CTSB	<i>Burkholderia-Caballeronia</i> <i>-Paraburkholderia</i>	0,5	ND	3	ND	ND
120º	101	CTSB		0,5	ND	4,8	ND	ND
121º	5	JLB		0,4	ND	ND	ND	ND
122º	18	JLB		0,4	ND	ND	0,799	SIM
123º	93	JLB		0,4	ND	ND	ND	ND
124º	14	CLB		0,4	ND	ND	ND	ND

Tabela 1 – Continuação.

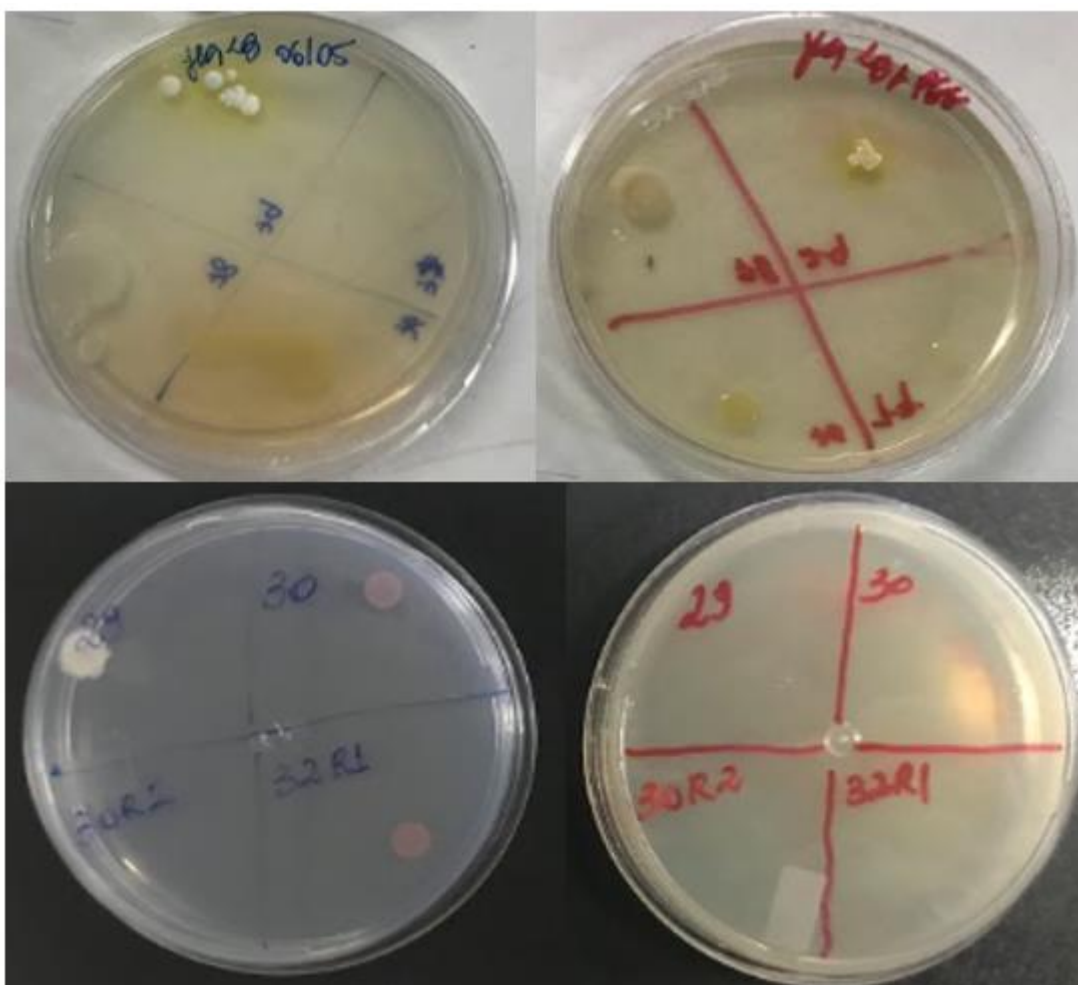
Posição	Isolado	Meio	Gênero	Razão diâmetro com PEG/ sem PEG	Sideróforos (Razão diâmetro halo/ colônia)	Solubilização de fosfato (ug P/mL)	Biofilme (D.O)	Compostos indólicos
125º	37	CTSB	<i>Sphingomonadaceae</i>	0,4	0,1	6,4	ND	ND
126º	49	JLB	<i>Ralstonia</i>	0,3	ND	4,3	ND	ND
127º	131	CTSB		0,3	ND	4,9	ND	ND
128º	79	JLB		0,2	ND	3,1	ND	ND
129º	147	CTSB		0,1	ND	5	ND	ND

ND= Não detectado nas condições de ensaio.

5.1.1 Tolerância ao estresse hídrico

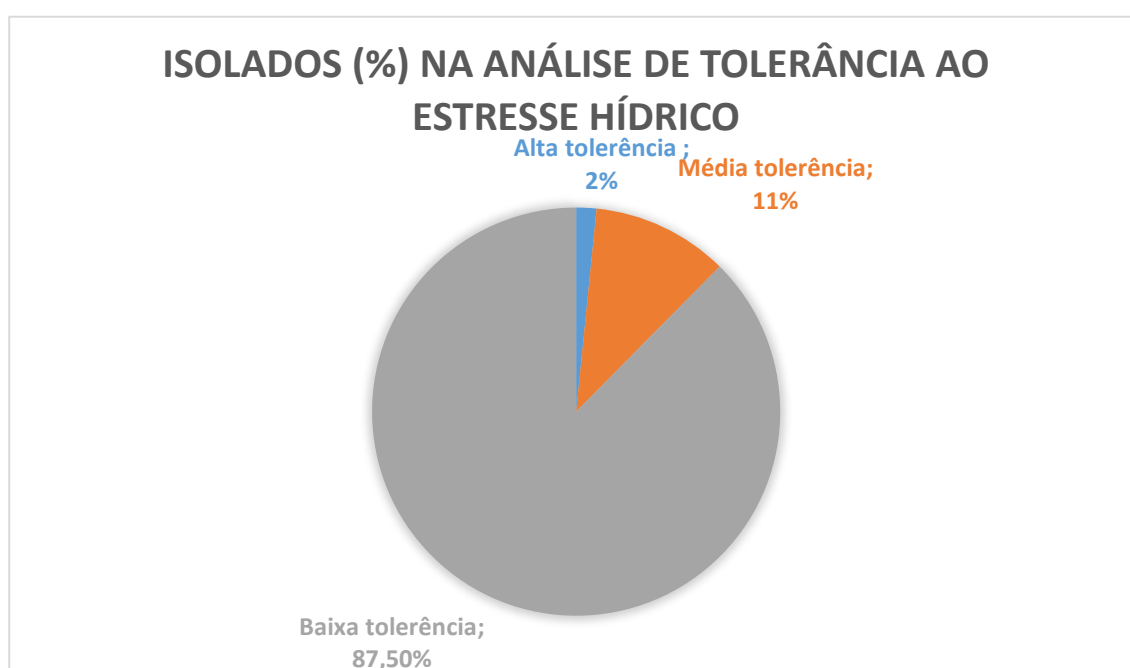
Na análise de tolerância ao estresse hídrico utilizando PEG 8000 a uma concentração de 45% observou-se que grande parte dos isolados conseguiram crescer em meio contendo PEG, se diferenciando apenas pelo tamanho da formação da colônia que foi calculado a razão do diâmetro com PEG e sem PEG de cada isolado (Tabela 1). Foi considerado tolerante, os isolados que conseguiram crescer em meio com PEG e aqueles que cresceram somente em meio sem PEG foi considerado como não tolerantes. Na figura 1, as placas com tinta azul refere-se ao controle contendo somente o meio ágar e as placas com tinta vermelha refere-se ao meio ágar + PEG 45%.

Figura 1: Placas em azul contendo meio ágar e placas em vermelho contendo ágar e PEG em concentração 45%, cultivadas na BOD por 5 dias a 28°C.



Os 129 isolados analisados quanto a tolerância ao estresse, apresentou-se um intervalo de 0,1 a 2,7. Com base nesse intervalo foi classificado o potencial destes isolados em alta, média e baixa tolerância, onde, os isolados que cresceram entre 2,0 a 2,7 foram classificados com alta tolerância, entre 1,1 a 1,9 como média tolerância e entre 0,1 a 1,0 como baixa tolerância. Sendo assim, 2 isolados (1,6%) foram classificados com alta tolerância, 14 isolados (10,8%) com média tolerância e 113 isolados (87,5%) com baixa tolerância.

Gráfico 1 – Isolados (%) classificados em três classes: alta, média e baixa tolerância ao estresse hídrico.



Os gêneros *Leifisonia* e *Bacillus* foram os dois gêneros que apresentaram um alto potencial em tolerar o estresse hídrico.

Segundo Godinho *et al.* (2019), que realizou um ensaio com 414 cepas isoladas do solo, onde, 28 conseguiram crescer em meio de cultura contendo sorbitol nas concentrações de 520 e/ou 780 g L⁻¹ e destes, a maioria do gênero *Bacillus*. Ainda, concluiu através de seus resultados que os diferentes isolados do gênero *Bacillus* são microrganismos promissores para a utilização na promoção do crescimento de plantas em condições de estresse hídrico.

5.1. 2 Produção de sideróforos

Na análise de produção de sideróforos, 17% dos isolados cresceram com formação de halo em meio T-CAS (Tabela 2), o que é um indicativo positivo de produção. A avaliação da capacidade de produção de sideróforos foi determinada pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Figura 2).

Figura 2 – Isolados que conseguiram formar halo em meio T-CAS cultivados na BOD por 5 dias a 28°C.

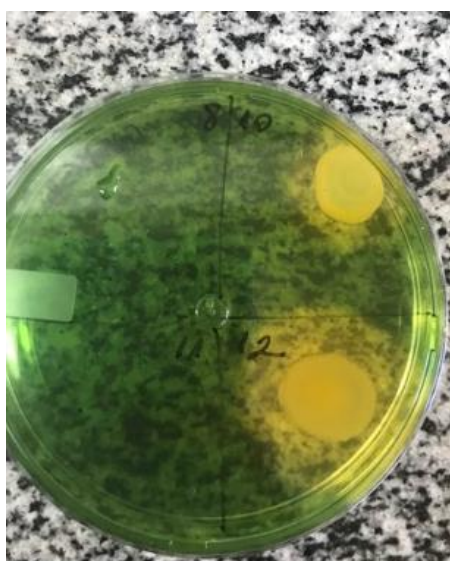


Tabela 2 – Análise de produção de sideróforos

Isolado	Gênero	Sideróforos (cm) *
65 JL	<i>Ralstonia</i>	0,9
3 JT	<i>Mucilaginibacter</i>	0,5
28 CT	<i>Sphingomonadaceae</i>	0,5
114 JL	<i>Herbaspirillum</i>	0,5
106 JL	<i>Trinickia (100%)</i>	0,5
105 CL	<i>Bacillus</i>	0,4
46 JT	<i>Leifsonia</i>	0,3
42 CT	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,3
37 JT	<i>Dyella</i>	0,3
111 JT	<i>Dyella</i>	0,3
111 JL	<i>Dyella</i>	0,3
109 CL	<i>Dyella</i>	0,3
107 JL	<i>Rhizobium (79%)</i>	0,3
97 JT	<i>Dyella</i>	0,2
90 R2	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	0,2
87 JT	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	0,2
82R2	<i>Rhizobium/Agrobacterium</i>	0,2
JT	<i>group;Rhizobium;</i>	
8 CL	<i>Bacillus</i>	0,2

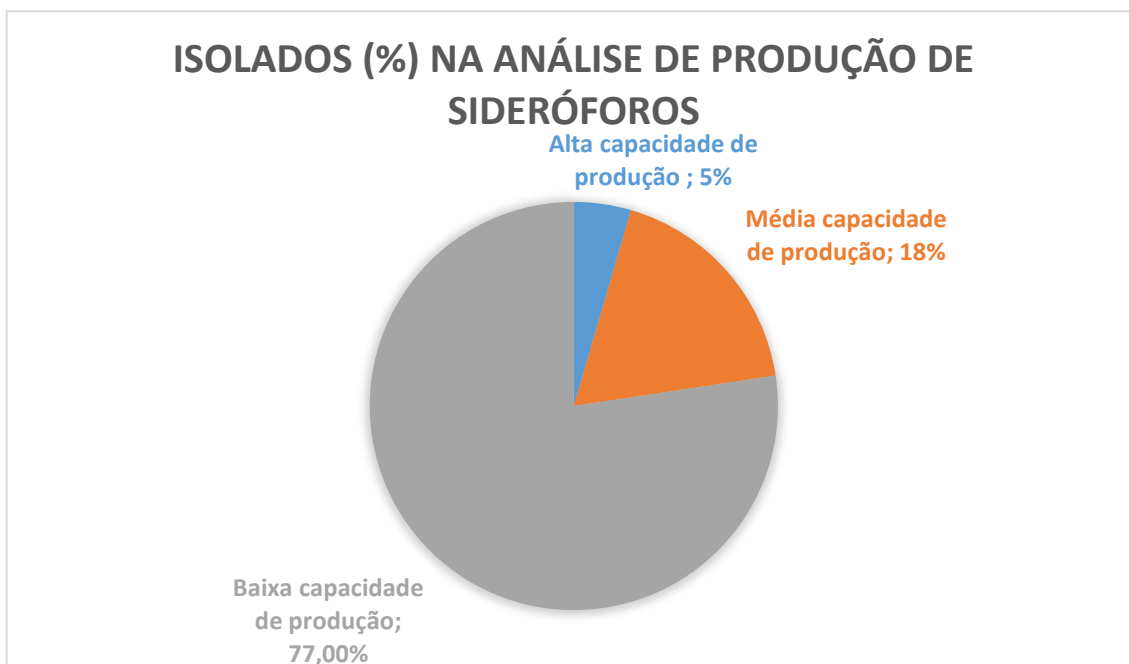
35 JT	<i>Dyella</i>	0,2
93R1	<i>Dyella</i>	0,1
37 CT	<i>Sphingomonadaceae</i>	0,1
36 CL	<i>Streptomyces</i>	0,1

* A coluna de sideróforos representa, em ordem decrescente, a razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.

Dos isolados que conseguiram formar halo em meio T-Cas, a bactéria do gênero *Ralstonia* (65 JL) foi a que apresentou maior valor (0,9 cm), o que indica que esse gênero possui maior capacidade de produzir sideróforos comparada às demais que foram testadas (Tabela 2). As bactérias do gênero *Mucilaginibacter* (3 JT), *Herbaspirillum* (114 JL) e *Trinickia* 100% (106 JL) apresentou valores medianos (0,5 cm), as bactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Dyella* apresentou os menores valores (0,1 cm) para produção de sideróforos. Já as bactérias do gênero *Sphingomonadaceae* apresentaram valores bem distintos, sendo que a 28 CT mostrou-se 0,5 cm e a 37 CT mostrou-se 0,1 cm, ambas do mesmo gênero.

Os 22 isolados que formaram halo na colônia, analisados quanto à produção de sideróforos, apresentaram-se um intervalo de 0,1 cm a 0,9 cm. Com base nesse intervalo foi classificado o potencial destes isolados em alta, média e baixa produção de sideróforos, onde, os isolados que cresceram entre 0,8 cm a 0,9 cm foram classificados com alta capacidade de produção de sideróforos, entre 0,5 cm a 0,7 cm como média capacidade de produção e entre 0,1 cm a 0,4 cm como baixa capacidade de produção. Sendo assim, 1 isolado (5%) foi classificado com alta capacidade de produção, 4 isolados (18%) com média capacidade de produção e 17 isolados (77%) com baixa capacidade de produção de sideróforos.

Gráfico 2 – Isolados (%) classificados em três classes: alta, média e baixa capacidade de produção de sideróforos.



5.1.3 Solubilização de fosfato de ferro

A avaliação do potencial bacteriano para solubilização de fosfato foi realizada por meio de ensaio bioquímico em meio NBRIP contendo fosfato. Foi construída uma curva padrão usando diferentes concentrações de fosfato e após a construção da equação da reta, os valores da absorbância foram utilizados para o cálculo das concentrações de fosfato solubilizado.

Tabela 3 – Análise de solubilização de fosfato de ferro

Isolado	Gênero	Solubilização de Fosfato (µg P/mL) *
23 CT	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	7,7
42 CT	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	6,9
28 CT	<i>Sphingomonadaceae</i>	6,5
39 CT	<i>Ralstonia</i>	6,5
37 CT	<i>Sphingomonadaceae</i>	6,4
18 CT	<i>Lysinibacillus</i>	6,2
9 CL	<i>Streptomyces</i>	5,2
98 CT	<i>Mesorhizobium</i>	4,5
77 CT	<i>Paenibacillus</i>	4,5
120 CT	<i>Streptomyces</i>	4,5
49 JL	<i>Ralstonia</i>	4,3
145 CT	<i>Bacillus</i>	4,1
4 JT	<i>Ralstonia</i>	3,2

76 JL	<i>Dyella</i>	3,2
73 CT	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	3
40 JL	<i>Bacillus</i>	2,9
80 CT	<i>Mesorhizobium</i>	2,8
114 JL	<i>Herbaspirillum</i>	2,5
3 JT	<i>Mucilaginibacter</i>	2,4
8 CL	<i>Bacillus</i>	2,1
4 CL	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	1,2
57 CL	<i>Microbacterium</i>	1

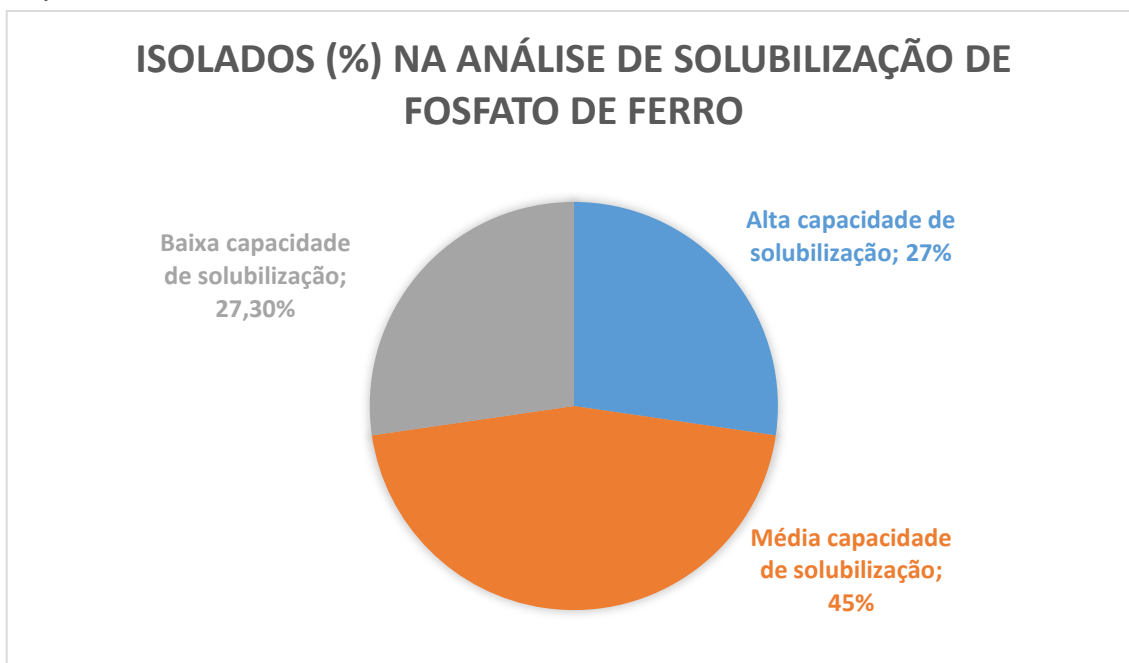
* A coluna de solubilização de fosfato de ferro representa, em ordem decrescente, os valores que os isolados conseguiram solubilizar em µg P/mL.

Cerca de 17% dos isolados foram observados capacidade de solubilizar fosfato, dos 119 isolados totais. A quantidade de FePO₄ solubilizado variou de 1,0 a 7,7 µg P/mL.

Os gêneros que mais conseguiram solubilizar fosfato, de acordo com a análise, foram *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* com os isolados 23 CT e 42 CT com 7,7 e 6,9 µg P/mL respectivamente, *Ralstonia* 6,5 µg P/mL (39 CT), *Sphingomonadaceae* 6,5 µg P/mL (28 CT) e as que apresentaram menores valores foram *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 1,2 µg P/mL (4 CL) e *Microbacterium* 1 µg P/mL (57 CL).

Os 22 isolados que foram observados capacidade de solubilizar fosfato de ferro, apresentou-se um intervalo de 1,0 a 7,7 µg P/mL. Com base nesse intervalo foi classificado o potencial destes isolados em alta, média e baixa capacidade de solubilização de fosfato de ferro, onde, os isolados que cresceram entre 5,4 a 7,7 µg P/mL foram classificados com alta capacidade de solubilizar fosfato de ferro, entre 2,9 a 5,3 µg P/mL com média capacidade de solubilizar e entre 0,3 a 2,8 µg P/mL com baixa capacidade de solubilizar. Sendo assim, 6 isolados (27,3%) foram classificados com alta capacidade de solubilizar, 10 isolados (45,4%) com média capacidade de solubilizar e 6 isolados (27,3%) com baixa capacidade de solubilizar fosfato de ferro.

Gráfico 3 – Isolados (%) classificados em três classes: alta, média e baixa capacidade de solubilizar fosfato de ferro.



5.1. 4 Capacidade de formação de biofilme

Para análise da capacidade de formação de biofilme pelos isolados, utilizou-se o método de quantificação de biomassa com cristal violeta e leitura a 570nm. Foram selecionados os 12 isolados mais promissores de acordo com as outras análises descritos na tabela 1 e medido a absorvância em triplicata. O critério utilizado para selecionar estes isolados foi pelas análises de produção de compostos indólicos, biosíntese de sideróforos e déficit hídrico. Para o cálculo do percentual de formação foram empregados os valores de D.O no controle de crescimento e a classificação de acordo com Pavão *et al.* (2021).

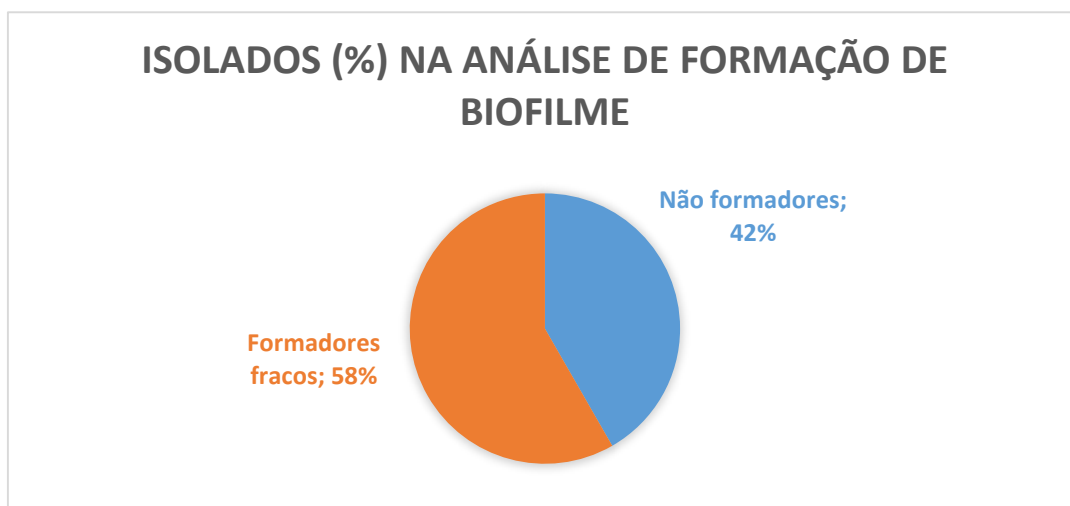
Tabela 4 – Análise de biofilme indicando a quantificação de biomassa e a classificação do padrão de formação de biofilme bacteriano.

ISOLADO	GÊNERO	MÉDIA D.O*	D.P *	CLASSIFICAÇÃO
10JL	<i>Trinickia</i>	0,302	0,013	Não produtora
24JL	<i>Trinickia</i>	0,282	0,040	Não produtora
45 JL	<i>Mucilaginibacter</i>	0,645	0,021	Fraca
65 JL	<i>Ralstonia</i>	0,444	0,028	Fraca
57 CL	<i>Microbacterium</i>	0,491	0,051	Fraca
105 CL	<i>Bacillus</i>	0,417	0,081	Fraca
3 JT	<i>Mucilaginibacter</i>	0,486	0,137	Fraca
90 R1 JT	<i>Dyella</i>	0,216	0,022	Não produtora
4 CT	<i>Bacillus</i>	0,616	0,284	Fraca
77 CT	<i>Paenibacillus</i>	0,230	0,035	Não produtora
98 CT	<i>Mesorhizobium</i>	0,344	0,079	Não produtora
112 R1 CT	<i>Bacillus</i>	0,459	0,126	Fraca

*D.O=Densidade Óptica; D.P = Desvio Padrão.

No total de 12 isolados testados, 5 (41,7%) não foram classificadas como formadoras de biofilme dos gêneros *Trinickia*, *Dyella*, *Paenibacillus*, *Mesorhizobium*, 7 (58,3%) como formadoras fracas dos gêneros *Mucilaginibacter*, *Ralstonia*, *Microbacterium*, *Bacillus* e nenhum dos isolados analisados foram classificados como fortes formadores de biofilme.

Gráfico 4 – Isolados (%) classificados em não formadores de biofilme e formadores fracos.



5.1. 5 Produção de compostos indólicos

Para análise qualitativa da avaliação dos isolados em produzir compostos indólicos, foi medido de acordo com a tonalidade da cor roxa provocada pela reação de calorimetria. Cerca de 10,8% dos isolados apresentaram coloração roxa, o que indica que possuem potencial de produção. Quanto mais forte a tonalidade maior probabilidade de produção (figura 4).

Figura 4 – Cultura em junção com o reagente Salkowski em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente para ocorrer a reação calorimétrica.



Os isolados que conseguiram produzir os compostos indólicos foram dos gêneros *Methylobacterium*, *Dyella*, *Trinickia*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter* e *Paenibacillus*, como apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Análise de produção de compostos indólicos

Isolados	Gênero	Compostos indólicos *
25 CL	<i>Methylobacterium</i>	Sim
32 JT	<i>Dyella</i>	Sim
24 JL	<i>Trinickia</i>	Sim
112 R1 CT	<i>Bacillus</i>	Sim
65 JL	<i>Ralstonia</i>	Sim
85 JL	<i>Ralstonia</i>	Sim
105 CL	<i>Bacillus</i>	Sim
4 CT	<i>Bacillus</i>	Sim
98 CT	<i>Mesorhizobium</i>	Sim
38 JL	<i>Bacillus</i>	Sim
45 JL	<i>Mucilaginibacter</i>	Sim
90 R1 JT	<i>Dyella</i>	Sim

77 CT	<i>Paenibacillus</i>	Sim
10 JL	<i>Trinickia</i>	Sim

* A coluna de compostos indólicos, representa os isolados que conseguiram produzir.

5.2 SEGUNDO EXPERIMENTO: GERMINAÇÃO DO TOMATE, PESAGEM DAS RAÍZES E DETERMINAÇÃO DA PROLINA

5.2.1 Ensaio de inoculação

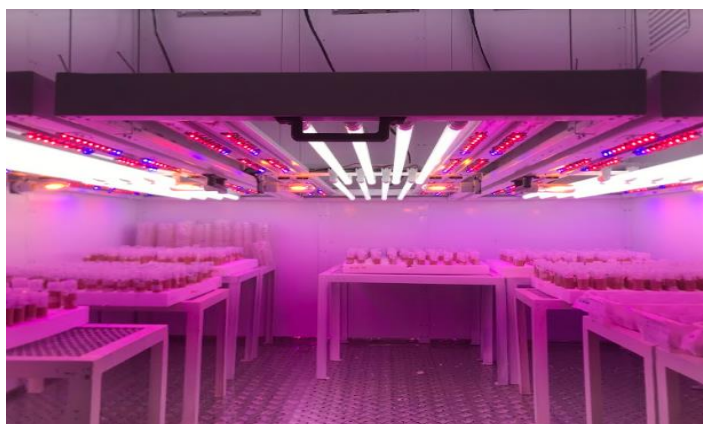
O segundo experimento foi selecionado dos 129 isolados (Tabela 1), 10 isolados de diferentes gêneros (Tabela 6). Esses 10 isolados selecionados foram inoculados nas sementes de tomate e colocados para germinar no meio ágar-PEG em concentrações de 0; 250 e 500 de PEG para sofrerem estresse hídrico. Foram feitas 12 repetições para cada concentração por bactéria e o controle somente com a condição de estresse sem bactéria.

Tabela 6 - Isolados que foram selecionados para inocular as sementes de tomate

ISOLADO	GÊNERO
3 JT	<i>Mucilaginibacter</i>
112 R1 CT	<i>Bacillus</i>
105 CL	<i>Bacillus</i>
98 CT	<i>Mesorhizobium</i>
114 JL	<i>Herbaspirillum</i>
24 JL	<i>Trinickia</i>
4 CT	<i>Bacillus</i>
145 CT	<i>Bacillus</i>
45 JL	<i>Mucilaginibacter</i>
8 CL	<i>Bacillus</i>

Após 30 dias na câmara de crescimento (Figura 5), foi retirado as raízes e congeladas a -80°C para realizar a determinação de massa fresca e a análise de prolina.

Figura 5 – Tubos contendo os meios sob concentrações crescentes de estresse e as sementes do tomate na câmara de crescimento para germinação por 30 dias.



5.2.2 Determinação da massa fresca da raiz do tomate

A tabela 7 descreve a média da quantidade pesada, em mg, de massa fresca das raízes obtidas dos isolados em cada concentração de estresse hídrico. O controle utilizado, foi a germinação da semente não inoculada por nenhuma bactéria, cultivado sob condições de estresse, iguais as demais.

Tabela 7 - Massa fresca de raiz de plantas de tomate crescidas sob diferentes concentrações de estresse, sendo, sem estresse [0]; estresse moderado [250] e estresse severo [500].

ISOLADO	GÊNERO	ESTRESSE		
		[0]	[250]	[500]
3 JT	<i>Mucilaginibacter</i>	467	162	6
112 R1 CT	<i>Bacillus</i>	700	137	27
105 CL	<i>Bacillus</i>	143	304	203
98 CT	<i>Mesorhizobium</i>	200	210	80
114 JL	<i>Herbaspirillum</i>	327	399	352
24 JL	<i>Trinickia</i>	287	234	294
4 CT	<i>Bacillus</i>	210	152	164
145 CT	<i>Bacillus</i>	297	381	145
45 JL	<i>Mucilaginibacter</i>	177	234	104
8 CL	<i>Bacillus</i>	251	275	166
Controle		241	89	72

Na condição normal, sem estresse hídrico [0], notou-se que houve aumento na massa fresca da raiz, sendo que os mais significativos foram nas estirpes: 112 R1 CT *Bacillus* (700 mg), 3 JT *Mucilaginibacter* (467 mg), 114 JL *Herbaspirillum* (327 mg), 145 CT *Bacillus* (297 mg) e 24 JL *Trinickia* (287 mg).

Na condição de estresse hídrico moderado [250], todos os isolados apresentaram aumento significativo, principalmente: 114 JL *Herbaspirillum* (399 mg), 145 CT *Bacillus* (381 mg), 105 CL *Bacillus* (304 mg), 8 CL *Bacillus* (275 mg), 45 JL *Mucilaginibacter* (234 mg) e 24 JL *Trinickia* (234 mg).

Na condição de estresse severo [500], os isolados que apresentaram um aumento significativo foram: 114 JL *Herbaspirillum* (352 mg), 24 JL *Trinickia* (294 mg) e 105 CL *Bacillus* (203 mg).

5.2.3 Determinação da prolina da raiz do tomate

A prolina está presente em quantidades pequenas nas plantas e possui uma concentração elevada sob condições de estresse, permitindo a osmoproteção celular como tampão, prevenindo efeitos deletérios nas membranas e preservando a integridade de compostos como proteínas e enzimas (MARIN, 2003).

Matysik *et al.* (2002) também confirmou que em células vegetais não estressadas de espécies como arroz, milho, tomate entre outras, este aminoácido está presente em baixas concentrações de aproximadamente 1 a 5 $\mu\text{mol. g}^{-1}$ o que apresenta menos de 5% dos aminoácidos totais.

Porém, esta concentração pode aumentar em até 100 vezes, sob condições de estresse, com variação de espécie para espécie (ASHRAF *et al.*, 2011).

Para realizar a análise de quantificação da prolina, foi construída uma curva padrão usando diferentes concentrações de prolina. A concentração de prolina obtida pelas absorbâncias das amostras na curva de calibração foi utilizada para o cálculo dos teores de prolina das amostras, expressos em $\mu\text{mol. g}^{-1}$.

Os valores de concentração de prolina presente em 1g de raiz que foram expostas ao estresse em concentrações crescentes, foram adicionadas na tabela 8. As análises foram feitas em triplicatas.

Tabela 8 – Análise do acúmulo de prolina presente nas raízes sob concentrações de estresse.

ISOLADO	GÊNERO	ESTRESSE		
		[0]	[250]	[500]
3 JT	<i>Mucilaginibacter</i>	0,756 d	3,731 b	0 e
112 R1 CT	<i>Bacillus</i>	2,693 b	2,253 d	0 e
105 CL	<i>Bacillus</i>	2,031 c	1,024 f	2,208 d
98 CT	<i>Mesorhizobium</i>	2,183 c	1,433 e	21,210 a
114 JL	<i>Herbaspirillum</i>	1,281 d	0,881 f	5,953 c
24 JL	<i>Trinickia</i>	0,980 d	1,196 f	1,024 e
4 CT	<i>Bacillus</i>	1,782 c	2,704 c	5,680 c
145 CT	<i>Bacillus</i>	1,469 d	0,936 f	5,419 c
45 JL	<i>Mucilaginibacter</i>	6,142 a	1,395 e	7,823 b
8 CL	<i>Bacillus</i>	1,220 d	0,804 f	1,949 d
Controle		1,419 d	4,330 a	5,104 c

Valores indicam média de três repetições. Letras iguais os valores não diferem entre si.

Na concentração [0] sem efeito de estresse, comparando com o controle ($1,4 \mu\text{mol. g}^{-1}$), o isolado que mais apresentou concentração de prolina foi a 45 JL *Mucilaginibacter* ($6,1 \mu\text{mol. g}^{-1}$). Em geral, 5 dos 10 isolados promoveram aumento no conteúdo de prolina.

Na concentração [250] sob estresse hídrico moderado, dois isolados apresentaram-se com maiores concentrações, comparando com os demais isolados, que foram a 3 JT *Mucilaginibacter* ($3,7 \mu\text{mol. g}^{-1}$) e a 4 CT *Bacillus* ($2,7 \mu\text{mol. g}^{-1}$), no entanto, todos os isolados promoveram a redução no conteúdo de prolina.

Na concentração [500] sob estresse hídrico severo, o isolado que mais produziu quantidades de prolina, significadamente, foi a 98 CT *Mesorhizobium* ($21,2 \mu\text{mol. g}^{-1}$), seguido da 45 JL *Mucilaginibacter* ($7,8 \mu\text{mol. g}^{-1}$). Em geral houve uma grande variação nos teores de prolina conforme a estirpe inoculada.

Resultados parecidos foram observados em outros estudos. Segundo os resultados do estudo de Moussa e Abdel-Aziz (2008), onde dois cultivares de milho sob condições de estresse hídrico, resultaram no aumento na quantidade de prolina conforme as plantas eram submetidas a condições de estresse. O cultivar que não possuía tolerância à seca obteve maiores quantidades de prolina. O mesmo foi obtido por Masoumi *et al.* (2011).

6 CONCLUSÕES

Na ausência de estresse osmótico, cinco dos dez isolados avaliados promoveram incremento na massa fresca de raízes (19,1% a 190,4%) e cinco isolados promoveram incremento no conteúdo de prolina (25,6% a 332,8%) em comparação aos valores obtidos de plantas não inoculadas, com destaque para *Bacillus* spp. estirpe 112R1CT que promoveu incremento em ambas as variáveis. Na presença de estresse osmótico moderado (250 g PEG L⁻¹), todas as estirpes inoculadas promoveram incremento na biomassa fresca de raízes (53,9% a 348,3%) e redução no conteúdo de prolina (13,8% a 81,4%). Nesta condição, houve destaque para as estirpes *Herbaspirillum* spp. 114JL e *Bacillus* spp. 145CT, que promoveram incrementos superiores a 300% na biomassa de raízes e redução de quase 80% no conteúdo de prolina. Sob estresse osmótico elevado (500 g PEG L⁻¹), sete estirpes foram capazes de aumentar a massa fresca de raízes (incrementos de 44,4% a 388,9%), com grande variação nos teores de prolina conforme a estirpe inoculada. As estirpes *Herbaspirillum* spp. 114JL e *Trinickia* spp. 24JL, promoveram os maiores aumentos na biomassa de raízes de plantas crescidas sob estresse osmótico elevado (incrementos de 388,9% e 308,3% respectivamente). Em conjunto, os resultados sugerem que as estirpes *Herbaspirillum* spp. 114JL, *Trinickia* spp. 24JL e *Bacillus* spp. 145CT possuem potencial para o desenvolvimento de um novo bioinsumo voltado ao aumento da tolerância de plantas ao estresse hídrico. Além disso, a proteção contra o estresse hídrico promovida pelas estirpes mais promissoras parece não estar relacionada com o aumento nos teores de prolina dos tecidos radiculares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, M., Li, Y., Elbaiomy, R. G., Yan, K., Ragauskas, A. J., Yadav, V., et al. (2022). Genome-wide analysis and expression profiling of SIHsp70 gene family in *Solanum lycopersicum* revealed higher expression of SIHsp70-11 in roots under Cd (2+) stress. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 27, 186.

ABRAHAMIAN, P., SHARMA, A., JONES, J.; VALLAD, G.E. Dynamics and spread of bacterial spot epidemics in tomato transplants grown for field production. *Plant Disease*, 105, 566–575. 2021.

ALVARENGA, M. A. Valor alimentício. In: ALVARENGA, M. A. *Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia*. Lavras, editora: UFLA, 2004. p. 27-30. B

BAKKER, M. G et al. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. *Plant and Soil*, v. 392, n.1, p. 115-126, 2015.

BERENDSEN, R. L et al. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, v. 17, p. 478-486, 2012.

BRINGHURST, R. M et al. Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.98, p.4540-4545, 2001.

BURLYN E. MICHEL AND MERRILL R. KAUFMANN Artigo de revisão: The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 60001

BURNS, R. G et al. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology & Biochemistry*, v.58, p. 216234, 2013

CARDOSO, E.J.B.N; ANDREOTE, F.D. *Microbiologia do solo*. 2 ed. Piracicaba, São Paulo, 2016. 221 p.

CASSÁN, F et al. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, v.45, p. 383- 0393, 2009.

CHAPARRO, J. M et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, v.48, p. 489-499, 2012.

El-Sappah, A. H., Elrys, A. S., Desoky, E.-S. M., Zhao, X., Bingwen, W., El-Sappah, H. H., et al. (2021a). (eds). "Comprehensive genome wide identification and expression analysis of MTP gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) under multiple heavy metal stress." In: *Saudi J. Biol. Sci.* 2, 6946–6956. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.07.073

Extremina CI, Costa L, Peixe L, Fonseca AP. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods*. 2011; 84(2): 167-1738. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol*. 2003; 219 (4).

Giannakoula A, Moustakas M, Mylona P, Papadakis I, Yupsanis T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients,

carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and ABA accumulation. *J. Plant Physiol.* 2008; 165(4):385-396. doi: 10.1016/j.jplph.2007.01.014.

GODINHO, Bárbara Temponi Vilarino *et al.* Isolamento e Potencial Uso de Bactérias do Gênero *Bacillus* na Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Déficit Hídrico. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1: Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - Mg*, v. 2, n. 9, p. 11-16, nov. 2019.

GYANESHWAR, P *et al.* Role of Soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, V. 245, p.83-93, 2002.

Howladar, S. M. (2016). Exogenous applications of biochar and α -tocopherol improve the performance of salt-stressed tomato plants. *Umm Al-Qura Univ. J. Appl. Sci. (UQUJAS)* 3 (1), 16.

IPCC – Intergovernmental Panel in Climate Change. *Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Edited by C. B. Field *et al.* Cambridge/New York, Cambridge university Press/IPCC, 2012. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Edited by C. B. Field *et al.* Cambridge/New York, Cambridge university Press/IPCC, 2014.

Malafaia CB. Formação de biofilme, atividade antibiofilme de extratos vegetais e avaliação de métodos de extração de proteínas em fitobactérias. Recife; 2016. Tese de Doutorado [Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas] – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2016.

Marin A. Influência associada do estresse hídrico e do alumínio na germinação e crescimento inicial de guandu (*cajanus cajan* (L.) Millsp). 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal 2003

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, p. 3075-3084, 2013.

MOUKHTARI, Ahmed El *et al.* How Does Proline Treatment Promote Salt Stress Tolerance During Crop Plant Development? *Frontiers In Plant Science*, Paris, France, v. 11, n. 9, p. 1-2, 23 jul. 2020. *Frontiers Media SA*.

NAIKA, S; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M; DAM, B.V. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.

NIELSEN, U.N *et al.* Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function Relationships. *European Journal of Soil Science*, v.62, p. 105-116, 2011.

PAVÃO, Danilo Pavão *et al.* Capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas e ação antibiofilme do extrato de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). *Revista Fitos*, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 153-165, 30 jun. 2021. Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos. <http://dx.doi.org/10.32712/2446-4775.2021.1073>.

Pedrosa, F.O., Monteiro, R.A., Wassem, R., Cruz, L.M. et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, May, vol.7, 5.

PHILIPPOT, L et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, v.11, p. 789-799, 2013.

PRASHAR, P et al. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and biotechnology*, v.13, p.63-77, 2014.

RANA, A et al. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology*, v.61, p.893-900, 2011.

RIBEIRO, Igor Daniel Alves. Caracterização de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura da canola (*Brassica napus* L.). 2019. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Genética e Biologia.

Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rs, 2019.
SANTOS, J. F.; SACRAMENTO, B. L.; MOTA, K. N. A. B.; SOUZA, J. T.; AZEVEDO NETO, A. D. Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 44, n. 2, p. 142-150, 2014

SCHNITZER, S.A et al. Soil microbes drive the classic plant iversityproductivity pattern. *Ecology*, v.92, n.2,p. 296-303, 2011.

Shukla, SK, Rao, TS, 2017. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/100214>

SINGH, B et al. Crop phenomics for abiotic stress tolerance in crop plants. In: Wani Biochemical, physiological and molecular avenues for combating abiotic stress tolerance in plants. Elsevier, New York, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed., Artmed 918, p. 2013.
van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential innutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* 51: 1555-1562

TORDIN, Cristina. Cientistas usam bactérias para ajudar plantas a resistir à seca: Mudanças climáticas Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/22885691/cientistas-usam-bacterias-para-ajudar-plantas-a-resistir-a-seca#:~:text=ao%20estresse%20h%C3%ADdrico,-,A%20seca%20%C3%A9%20o%20fator%20ambiental%20limitante%20ao%20crescimento%20das,sua%20integra%C3%A7%C3%A3o%20com%20os%20horm%C3%B4nio> s. Acesso em: 01 mar. 2023.

VENTURA, Ricardo Borjas et al. Efeito do déficit hídrico e do aumento de temperatura sobre variáveis produtivas fisiológicas e bioquímicas do “cacau” *Theobroma cacao* L. *Arnaldoa*, Peru, v. 26, n. 1, p. 1-2, abr. 2019. *Universidad Privada Antenor Orrego*. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26112>.

YEVDOKIMOV, I. V. Dynamics of the Rhizosphere Effect in Soils. *Eurasian Soil Science*, v.46, n.6, p. 676-684, 2013.

Zhang, H., Xie, X., Kim, M.S., Korniyev, D.A., Holaday, S. Pare, P.W. (2008) Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in plants. *The Plant Journal*, 56, 264–273.