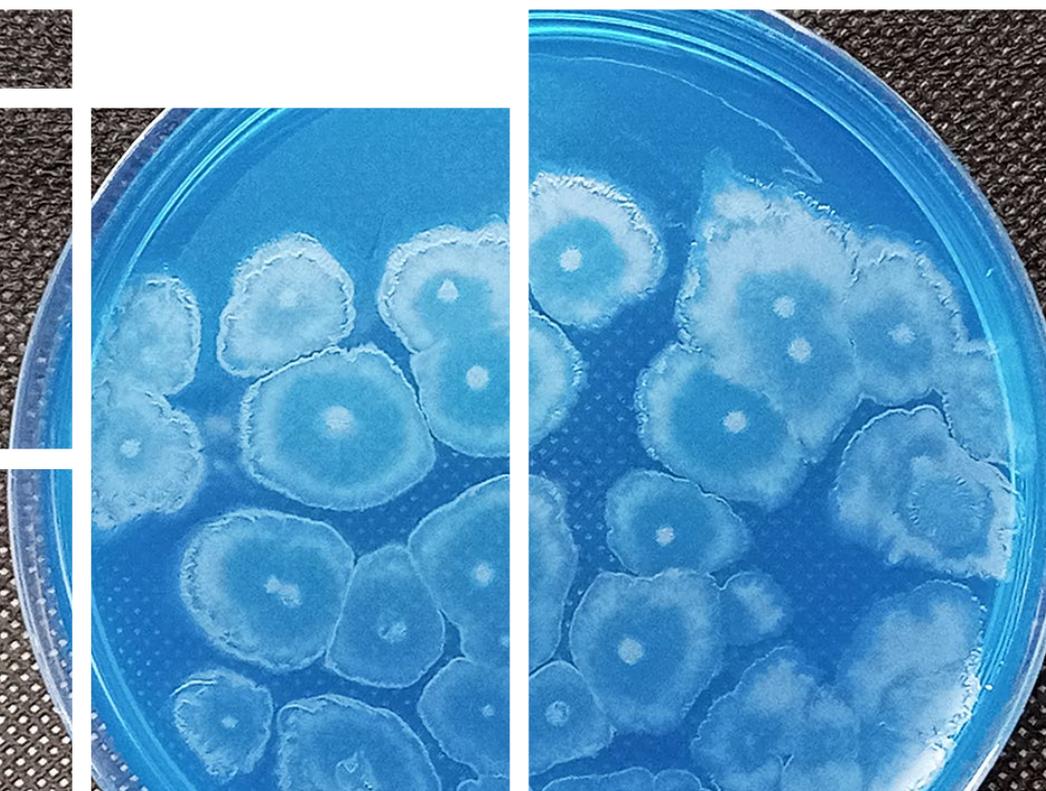


Contagem de *Bacillus velezensis* LMC44a pelo método do espalhamento em placa (*spread plate*)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
110**

Contagem de *Bacillus velezensis* LMC44a pelo
método do espalhamento em placa (*spread plate*)

*Veronica Massena Reis
Jerri Edson Zilli
Luis Henrique de Barros Soares
Marcia Soares Vidal
Ana Karla Santos Monsao
Eduarda Stefane Avila dos Santos*

Unidade Responsável pelo conteúdo:

Embrapa Agrobiologia

Rodovia BR 465, km 7

CEP 23891-000, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74.505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

www.embrapa.br/agrobiologia

www.embrapa.br/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia**

Presidente

Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executiva

Carmelita do Espírito Santo

Membros

Claudia Pozzi Jantalia, Janaina Ribeiro

Costa Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws,

Luis Cláudio Marques de Oliveira,

Luiz Fernando Duarte de Moraes, Marcia Reed

Rodrigues Coelho, Marta dos Santos Freire

Ricci de Azevedo, Nátia Élen Auras

Unidade Responsável pela edição:

Embrapa Agrobiologia

Normalização bibliográfica

Carmelita do Espírito Santo CRB 7/5043

Tratamento das ilustrações

Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa

Wilson Cabral da Fonseca

1ª edição

Publicação digital – PDF (2023)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

-
- C759 CONTAGEM de *Bacillus velezensis* LMC44a pelo método do
espalhamento em placa (*spread plate*). / Veronica Massena Reis
[et. al.] – Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2023.
18 p.: (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,
110).
ISSN: 1676-6709.
1. Bactéria. 2. Biocontrole. 3. Promoção de crescimento. I. Reis, Verônica
Massena II. Zilli, Jerri Edson. III. Soares, Luis Henrique Barros. IV. Vidal,
Marcia Soares. V. Monsao, Ana Karla Santos VI. Santos, Eduarda
Stefane Avila dos. VII. Embrapa Agrobiologia. VIII. Série.

Carmelita do Espírito Santo CRB 7/5043

CD2 23. ed.635.046

© Embrapa, 2023

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	11
Conclusões	17
Agradecimentos.....	17
Referências Bibliográficas	17

Contagem de *Bacillus velezensis* LMC44a pelo método do espalhamento em placa (*spread plate*)

Veronica Massena Reis¹

Jerri Edson Zilli¹

Luis Henrique de Barros Soares¹

Marcia Soares Vidal¹

Ana Karla Santos Monsao²

Eduarda Stefane Avila dos Santos²

Resumo – A busca por novos ativos biológicos que possam atuar no biocontrole de doenças de plantas tem sido valorizada nos últimos anos. *Bacillus velezensis* é uma bactéria Gram positiva com atividade comprovada de biocontrole de fungos fitopatogênicos associados à cultura de cana-de-açúcar sendo selecionada a estirpe LMC44a para um futuro inoculante. Este estudo mostra as etapas de desenvolvimento de método de contagem por espalhamento onde foram avaliadas três receitas de meios de cultivo usando açúcar cristal como fonte de carbono e pH 6,0 (SYP, SYP modificado e BPsc modificado), três corantes usados para visualização de pH (azul de bromotimol, verde de bromocresol e vermelho congo), três concentrações de ágar (15, 20 e 26 g L⁻¹) e tempo e temperatura de incubação das placas para a melhor visualização das colônias de *B. velezensis* estirpe LMC44a. Os resultados mostraram que o melhor meio de cultivo selecionado para crescimento das colônias foi o SYP modificado, com a adição do corante verde de bromocresol a 1% e com adição de 26 g L⁻¹ de ágar com tempo de incubação de 12 horas a 30°C. Este meio simples, rápido, com apenas quatro ingredientes permitiu a contagem por espalhamento de *B. velezensis* estirpe LMC44a de forma a atender as exigências de registro de bioprodutos no Brasil.

Termos para indexação: Bactéria, Promoção de crescimento, Biocontrole.

¹ Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia. Km 07 BR465, Seropédica-RJ. CEP 23891-000.

² Estudantes de PIBIC/Embrapa e alunas de graduação da UFRRJ. Km 07 BR465, Seropédica-RJ. CEP 23890-000.

Bacillus velezensis LMC44a count by the spread plate method

Abstract – The search for new biological products that can act in the disease biocontrol has been valued in recent years. *Bacillus velezensis* is a Gram-positive bacterium with proven biocontrol activity against phytopathogenic fungi associated with sugarcane cultivation, being selected strain LMC44a for a future inoculant. This study shows the stages of development of a scattering counting method where three recipes of culture media were evaluated using crystal sugar as a carbon source and pH 6.0 (SYP, modified SYP, and modified BPsc), three dyes used for visualization of pH (bromothymol blue, bromocresol green and Congo red), three Agar concentrations (15, 20 and 26 g L⁻¹) time and temperature of incubation of the plates for the best visualization of colonies of Bv-LMC44a. The results show that the best culture medium selected for colony growth was the modified SYP, adding 1% bromocresol green dye, adding 26 g L⁻¹ of Agar with an incubation time of 12 h at 30°C. This simple, fast medium with only four ingredients allowed the scatter count of *B. velezensis* strain LMC44a to meet the registration requirements of bioproducts in Brazil.

Index terms: Bacteria, Plant-growth promotion, Biocontrol.

Introdução

O desenvolvimento de novos insumos biológicos usados na forma de inoculantes tem crescido exponencialmente não só no Brasil (Crop Life Brasil, 2022), mas no mundo (BPIA, 2022). A utilização de produtos biológicos representa hoje um mercado de 12,9 bilhões de dólares com perspectivas de atingir 24,6 bilhões em 2027 (Agricultural..., 2022). Nos últimos dois anos cerca de 100 novos produtos biológicos foram registrados no Brasil, muitos deles contendo novas espécies e estirpes de uso multifuncional, podendo promover o crescimento de plantas e realizar biocontrole de patógenos.

B. velezensis (Ruiz-García *et al.*, 2005) é uma bactéria Gram-positiva, que forma esporos e promove o crescimento de plantas (Rabbee *et al.*, 2019). Várias estirpes foram isoladas, identificadas e testadas para o biocontrole de patógenos, sejam bactérias, fungos ou nematóides (Adeniji *et al.*, 2019). A estirpe de *B. velezensis* (Bv) LMC44a foi selecionada a partir de uma coleção de trabalho para biocontrole de patógenos importantes na cultura de cana-de-açúcar e selecionada como possível produto biológico (Melo *et al.*, 2021). Bv-LMC44a produz compostos indólicos, possui atividade de protease e celulase, mas não produz sideróforo ou solubiliza fosfato *in vitro* (Melo *et al.*, 2021). Esta estirpe foi selecionada por inibir *in vitro* o crescimento dos patógenos fúngicos *Fusarium moliniforme* (72%), *Ceratocystis multiannulata* (47%), *Colletotricum falcatum* (89%) comparada a uma coleção de *Bacillus* spp. isolada de apoplasto de cana-de-açúcar. Por estas razões, a estirpe foi selecionada para uso como inoculante a ser imobilizada em substrato sólido para fins de uso em viveiros de cana.

A legislação brasileira descreve que produtos veiculados no mercado nacional precisam ter a estirpe/espécie identificada, e que, no ato do registro, o método de avaliação da quantidade de células viáveis no produto comercial seja descrito para fins de análise pelo MAPA. A quantificação da população contida em um determinado produto inoculante contendo bactérias é a base de qualquer análise microbiológica para atestar pureza e qualidade. O desenvolvimento de meios de cultivo e a caracterização morfológica das colônias bacterianas é apenas o ponto inicial de quantificação. Para se efetuar uma contagem pelo método do espalhamento em placa (ou *spread plate*), faz-se necessário que a colônia seja de pequeno tamanho, de fácil visualização,

se possível que apresente forma e cores características, e que não escorra, ou mesmo não apresente crescimento difuso, para que as colônias fiquem separadas e passíveis de serem quantificadas. Embora seja uma premissa simples, dependendo da espécie/gênero bacteriano, pode-se ter bactérias de crescimento tão rápido, ou ao inverso tão lento, que o método tenha limitação de visualização, ou mesmo que a colônia seja invisível ao olho nu.

No âmbito do desenvolvimento de um novo bioproduto baseado em Bv-LMC44a, um método fácil e barato de contagem de bactérias foi testado. O meio de cultivo SYP (Caballero-Mellado *et al.*, 1994) foi selecionado por ser de fácil manuseio, considerado um meio rico e que permite a contagem desta estirpe em condições de laboratório. A seguir descrevemos os procedimentos de contagem e a identificação visual da estirpe Bv-LMC44a sob estudo.

Material e Métodos

A partir de uma amostra cujo número total de células se desconhece, diluições seriadas foram realizadas desde 10^{-2} até 10^{-9} - 1 mL diluído em 9 mL de solução salina (NaCl 0,8% – usando tubos de vidro). As diluições de 10^{-4} até 10^{-9} foram utilizadas para se inocular a bactéria sobre diferentes meios de cultivo (três placas de Petri por diluição - placas descartáveis de 9 cm de diâmetro receberam 20 mL de cada meio). Cada placa recebeu o volume de 0,1 mL de suspensão bacteriana para o espalhamento sobre o meio e a mesma foi incubada a 30°C em câmara de crescimento. Os meios foram otimizados e selecionados por apresentarem crescimento discriminatório da espécie em questão, neste caso o *Bacillus velezensis* estirpe LMC44a.

Visando melhorar a identificação de *B. velezensis* LMC44a para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de células bacterianas em placa com meio sólido, três indicadores de pH foram testados: azul de bromotimol, verde de bromocresol e vermelho Congo. Os três são utilizados em diferentes formulações de meios de cultura nos Laboratórios da Embrapa Agrobiologia.

No presente trabalho, os seguintes meios de cultura foram utilizados:

- 1) Meio SYP original (Caballero-Melado *et al.*, 1994) – sólido
Quantidades por litro: açúcar cristal 10,0 g; extrato de levedura, 3,0 g; K_2HPO_4 , 1,0 g; KH_2PO_4 , 3,0 g. pH 6,0.

- 2) Meio de cultivo SYP modificado para avaliação por espalhamento em placa de *Bacillus velezensis*
Quantidades por litro: açúcar cristal 2,5 g; extrato de levedura, 1,5 g; K_2HPO_4 , 1,0 g; KH_2PO_4 , 3,0 g. pH 6,0.
- 3) Meio BPSc modificado (adaptado por Scheidt *et al.*, 2019) sólido
Quantidades por litro: sacarose 2,5 g; extrato de levedura 1,5 g; K_2HPO_4 , 0,5 g e $MgSO_4$, 0,5 g. pH 6,0.

Variações destes meios de cultivo:

- 1) Indicadores de pH: azul de bromotimol (AB) 0,0025%, verde de bromocresol (VB) 0,01% e vermelho Congo (VC) 0,0005%:
Para o preparo de 1 L de meio de cultivo foram empregados (a) 5 mL de solução de AB, (b) 10 mL de solução de VB ou (c) 2 mL de solução de VC. O AB foi preparado usando 5 g dissolvido em solução de KOH 0,2 N e a solução resultante foi diluída para 1 L com água destilada; O VB utilizou-se 1 g que foi primeiramente dissolvido em 5 mL de álcool etílico, e depois a solução foi diluída para 100 mL com água destilada; e o VC foi usado 2,5 g dissolvidos em 1 L de água destilada.
- 2) Ágar: foram avaliadas três concentrações de ágar, 15, 20 e 26 g L⁻¹. Neste caso o protocolo de teste usou a marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda (AGAR-AGAR - NMC 1302.39.90). Caso a marca de ágar mude, ajustes na quantidade poderão se fazer necessários.

Resultados e Discussão

A primeira dificuldade de utilização da contagem por espalhamento em placa foi limitar o crescimento de *Bacillus velezensis*, que apresenta uma colônia disforme e com bordas sem limitação em meio sólido SYP com a menor concentração de ágar testada (15 g L⁻¹ – Figura 1). A redução do pH não melhorou esta visualização, e foi observado que esta estirpe cresce rapidamente nas condições de meio rico, com elevada quantidade de extrato de levedura (Figura 1). Utilizando o meio BPSc pH 6,0 com verde de bromocresol, o crescimento foi ainda maior (Figura 2). Este meio é utilizado para produção de biomassa e, portanto, foi utilizado na forma sólida, mas o crescimento vigoroso e com a formação de colônias disformes não permitiu a contagem no método proposto.

Fotos: Wilson Cabral da Fonseca

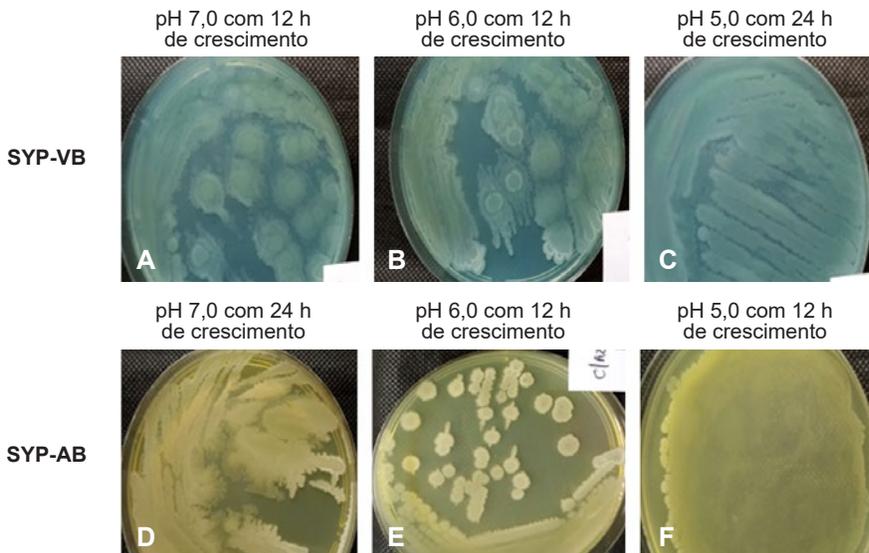


Figura 1. Colônias de *Bacillus velezensis* LMC44a em meio SYP com ágar 15 g L⁻¹ variando-se o pH e o indicador de pH – VB = verde de bromocresol, AB = azul de bromotimol.

Foto: Wilson Cabral da Fonseca

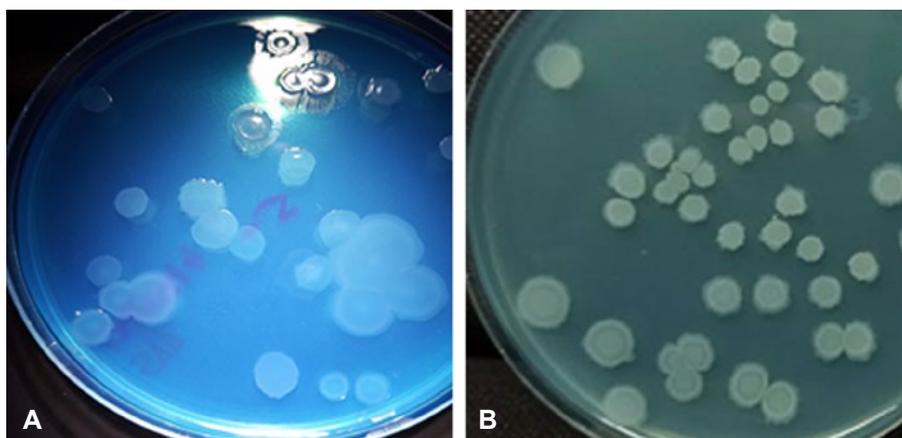


Figura 2. Colônias da estirpe Bv-LMC44a obtidas após o crescimento usando o meio BPSc com indicador verde de bromocresol (0,01%) pH 6,0 e ágar 15 g L⁻¹. Avaliado 12 h após o espalhamento.

A melhoria das condições de crescimento para utilização da contagem por espalhamento em placa foi atingida com o uso de ágar 26 g L⁻¹ (Figura 3). Deve-se ponderar a utilização de ágar de melhor qualidade podendo reduzir de 26 para 20 g L⁻¹. O importante é evitar a sobreposição das colônias que crescem rapidamente, impedindo uma avaliação neste tipo de método de contagem. Com meio mais sólido, as colônias têm dificuldade de desenvolver com menos umidade, restringindo o espalhamento delas.

O melhor crescimento foi observado em meio SYP com verde de bromocresol (VB) pH 6,0-6,2 (Figura 3). O indicador, como esperado, não afetou a forma da colônia e não foi absorvido pelas células. É importante ressaltar que o tempo de avaliação desta estirpe deve ser de 12 horas após o espalhamento e, para melhorar o contraste, aumentamos a quantidade do indicador para 10 mL L⁻¹ (Figura 3A), comparado a 5 mL (Figura 3B). Após este período, ocorre sobreposição das colônias. Mesmo nestas condições, ainda aparece a borda em forma de nuvem, que é característico desta estirpe.

Corantes usados como indicadores de pH podem ser absorvidos pelas colônias de algumas espécies, por exemplo *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrusubalbicans*, que absorvem o azul de bromotimol, dando-lhes uma coloração característica (Baldani *et al.*, 2014). Desta forma, esses indicadores são marcadores importantes para a identificação/confirmação visual de espécies bacterianas e sua separação de possíveis contaminações. O vermelho Congo também pode ser absorvido por colônias de algumas estirpes de *Azospirillum brasilense*, por exemplo, distinguindo a estirpe Cd, cujas colônias apresentam coloração vermelha, da Sp7, cujas colônias apresentam coloração creme ou leve coloração



Fotos: Wilson Cabral da Fonseca

Figura 3. Colônias de *B. velezensis* LMC44a em meio SYP-VB sólido com quantidades diferentes de ágar e indicador: **(A)** ágar 15 g L⁻¹ e VB 0,01%, **(B)** ágar 26 g L⁻¹ e VB 0,005%. O pH inicial do meio foi 6,0 – 6,2. Avaliado com 12 h de crescimento a 30°C.

avermelhada (Katupitiya *et al.*, 1995). Rodrigues-Cáceres (1982) observou esta coloração diferenciada entre estirpes de *Azospirillum* e na época recomendava o uso do meio NFB com vermelho Congo.

No entanto, neste trabalho, a utilização do vermelho Congo como indicador foi descartada pois a estirpe LMC44a apresentou um crescimento anormal, mesmo no meio com elevada quantidade de ágar (Figura 4A), comparado com o mesmo meio usando azul de bromotimol (Figura 4B).

Uma vez estabelecidas as condições de cultivo para quantificação de unidades formadoras de colônias (UFCs) da Bv-LMC44a, foi possível quantificar a população desta bactéria inoculada em diferentes substratos sólidos para cultivo vegetal. Os substratos testados foram fibra de coco e vermiculita expandida, e a contagem foi realizada após 60 dias à inoculação, contando-se nas diluições 10^{-6} e 10^{-5} (Figura 5).

As colônias puntiformes que se formaram junto com as colônias características da Bv-LMC44a seriam de contaminantes que cresceram na diluição 10^{-6} , mesmo após a pasteurização do substrato utilizado antes da inoculação (Figura 5A). Desta forma o novo método permitiu a contagem e a identificação de possíveis contaminantes.

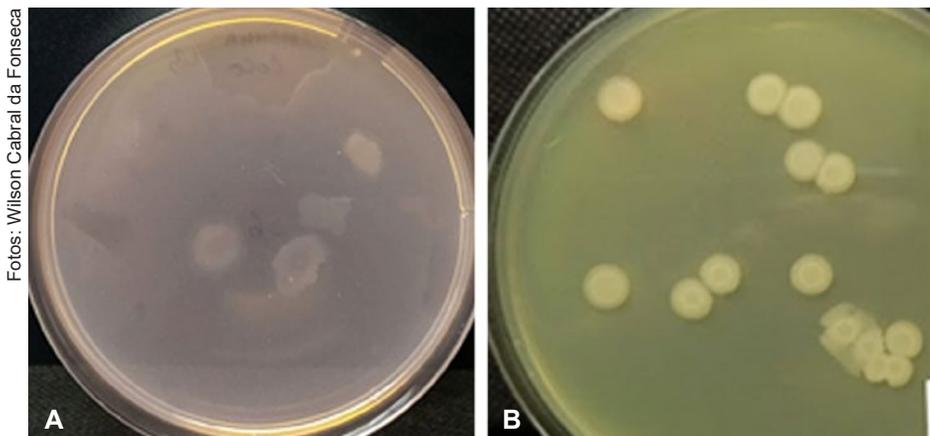


Figura 4. Colônias de *B. velezensis* LMC44a em meio SYP sólido com ágar 26 g L^{-1} adicionado dos indicadores (A) vermelho Congo, e (B) azul de bromotimol. Avaliado com 12 h de crescimento a 30°C .

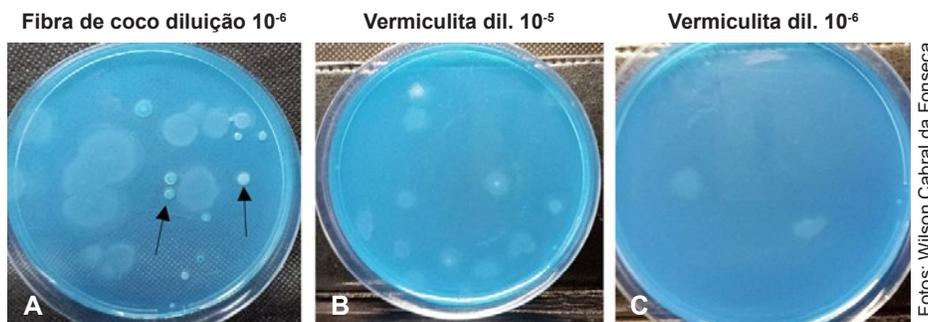
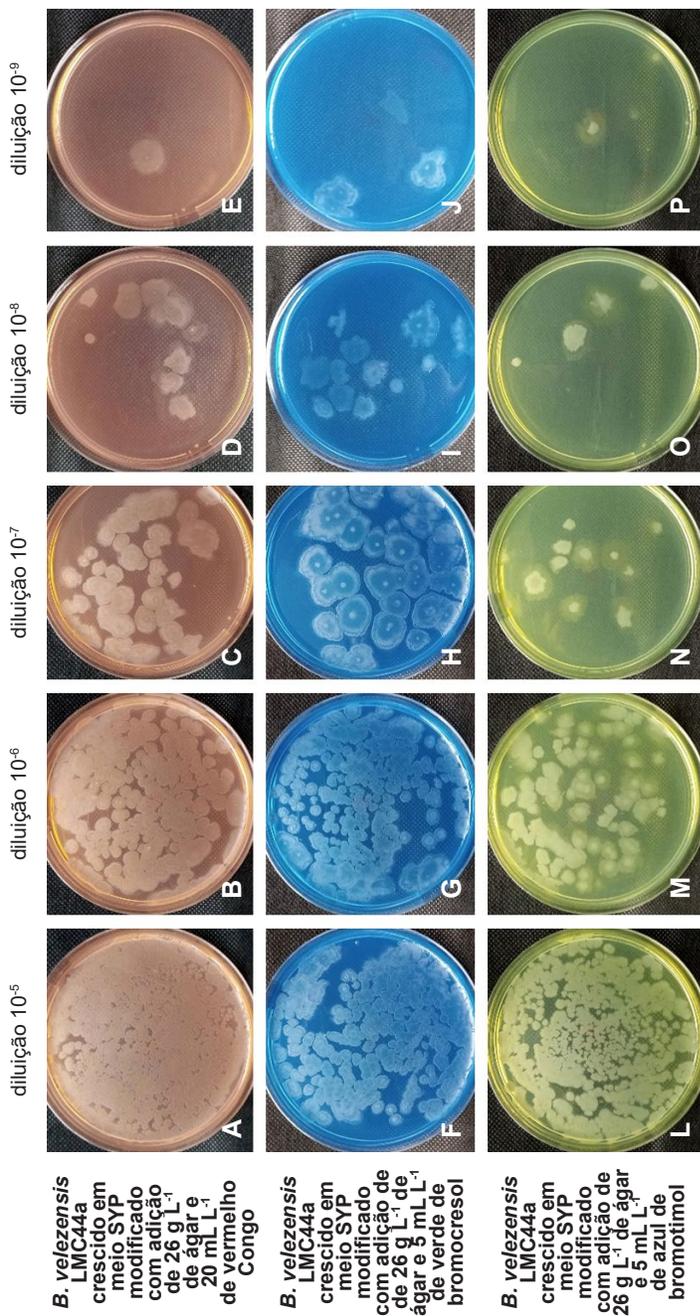


Figura 5. Contagem de Bv-LMC44a veiculada em fibra de coco (A) e vermiculita (B, C) após 60 dias à inoculação, e incubação à temperatura ambiente. Setas indicam contaminantes. Inóculo em diferentes diluições (dil.). Avaliado após 12 h de crescimento a 30°C.

Utilizando a cultura pura de Bv-LMC44a, diluindo seriadamente até 10⁻⁹ e inoculando em meio SYP modificado, foi possível comparar a formação de colônias individualizadas pela escolha do melhor corante (Figura 6). Por exemplo, o uso de vermelho Congo, embora não interfira no crescimento celular, resulta na obtenção de colônias disformes (Figura 6C, D) comparado ao uso do azul de bromotimol (Figura 6H) na diluição 10⁻⁷. O uso do azul de bromotimol dificultou a identificação das colônias pela falta de contraste com o meio nas maiores diluições (Figura 6M, 6N, 6O), comparado ao uso do corante verde de bromocresol (Figura 6H) nesta mesma diluição. Nas diluições maiores, com menos colônias, o verde de bromocresol permite uma melhor visualização mesmo com o crescimento mais difuso (Figura 6I, 6J).

Possivelmente esta metodologia pode ser aplicada para outros *Bacillus*, como por exemplo o *B. amyloliquefaciens*, que até recentemente também pertencia ao mesmo grupamento filogenético que o *B. velezensis*, juntamente com *Bacillus siamensis* (Chun *et al.*, 2019).

Com base nos dados apresentados, recomendamos a utilização do meio SYP com elevada concentração de ágar (26 g L⁻¹) visando limitar o crescimento das colônias com a adição do corante verde de bromocresol 0,01% para inoculação e contagem pelo método *spread plate* avaliando-se após 12 h de incubação a 30°C.



Fotos: Wilson Cabral da Fonseca

Figura 4. Colônias de *B. velezensis* em meio SYP modificado com açúcar 26 g L⁻¹ e os indicadores de pH vermelho Congo 0,005% (A-E), verde de bromocresol 0,005% (F-J) e azul de bromotimol 0,0025% (L-P). Para cada indicador de pH, as diluições decimais variam seriadamente da esquerda para a direita de 10⁻⁵ a 10⁻⁹.

Conclusões

Os resultados mostram que a melhor condição para crescimento das colônias de *Bacillus velezensis* estirpe LMC44a foi utilizando o meio SYP modificado, com a adição do corante verde de bromocresol a 0,01% e ágar 26 g L⁻¹, tempo de incubação de 12 horas a 30°C. Utilizando a metodologia de espalhamento em placa, a partir de 0,1 mL de suspensão celular oriunda de diluição seriada em NaCl (0,8%), incubando-se a 30°C por 12 horas.

Nessa condição, as colônias de Bv-LMC44a foram classificadas da seguinte forma: disformes, com elevação umbilicada e com a borda lobada e de superfície rugosa; não produzem muco e não absorvem nenhum dos corantes testados; de crescimento rápido, não alteram o meio de cultivo pois nenhuma mudança de pH foi observada nas primeiras 24 horas de avaliação. Quanto aos detalhes óticos são opacas, sem brilho e podem variar de tamanho de acordo com o meio utilizado e de coloração branco fosco.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao técnico de Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia, Wilson Cabral da Fonseca, que participou da caracterização do *B. velezensis* em todas as etapas deste trabalho, e documentando o material aqui apresentado. Ao projeto FINEP: Pluricana número 01.13.0295.00 que financia a pesquisa.

Referências Bibliográficas

ADENIJI, A. A.; LOOTS, D. T.; BABALOLA, O. O. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 9, p. 3669-3682, 2019. doi: 10.1007/s00253-019-09710-5.

AGRICULTURAL Biologicals Market: size, share, trends, and forecasts to 2027. www.marketsandmarkets.com. Acesso em 11 nov. 2022.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>

BPIA. Biological Products Industry Alliance. Disponível em: <http://www.bpia.org>. Acesso em 09 nov. 2022.

- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1532–1537, 1994. <https://doi.org/10.1128/aem.60.5.1532-1537.1994>
- CHUN, B. H.; KIM, K. H.; JEONG, S. E.; JEON, C. O. Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group- *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*- revealed by pan-genome analysis. **Food Microbiology**, v. 77, p. 146-157, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.001>.
- CROP LIFE BRASIL. **Produtos biológicos registrados**. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/> www.croplifebrasil.org. Acesso em 09 de nov 2022.
- FRID, P.; ANISIMOV, S. V.; POPOVIC, N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, v. 53, n. 1, p. 135-160, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.001>.
- KATUPITIYA, S.; MILLET, J.; VESK, M.; VICCARS, L.; ZEMAN, A.; LIDONG, Z.; ELMERICH, C.; KENNEDY, I. R. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1987-1995, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1987-1995.1995>.
- MELO, L. H. V.; ROCHA, F. Y. O.; VIDAL, M. S.; GITAHY, P. M.; ARRUDA, G. M.; BARRETO, C. P.; ALVES, P. B.; RAMOS, E. T. A.; ROSSI, C. P.; SCHWAB, S.; BOA SORTE, P. M. F.; AVELAR, J. P.; BALDANI, J. I. Diversity and biotechnological potential of endophytic *Bacillus* species originating from the stem apoplast fluid of sugarcane plants. **Applied Soil Ecology**, v. 166, p. 103985, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103985>.
- RABBEE, M. F.; ALI, M. S.; CHOI, J.; HWANG, B. S.; JEONG, S. C.; BAEK, K. H. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1046, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>.
- RODRIGUEZ-CÁCERES, E. A. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 990-991, 1982.
- RUIZ-GARCÍA, C.; BÉJAR, V.; MARTÍNEZ-CHECA, F.; LLAMAS, I.; QUESADA, E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 191-195, 2005.
- SCHEIDT, W. dos S. P.; PIOVEZAN, I. C.; FONTANA, J.; MELEIRO, L. A.; SOARES, L. H. de B.; REIS, V. M. Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology (RSM). **Plant and soil**, v. 451, p. 75 - 87, 2019.

Embrapa

Agrobiologia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA

