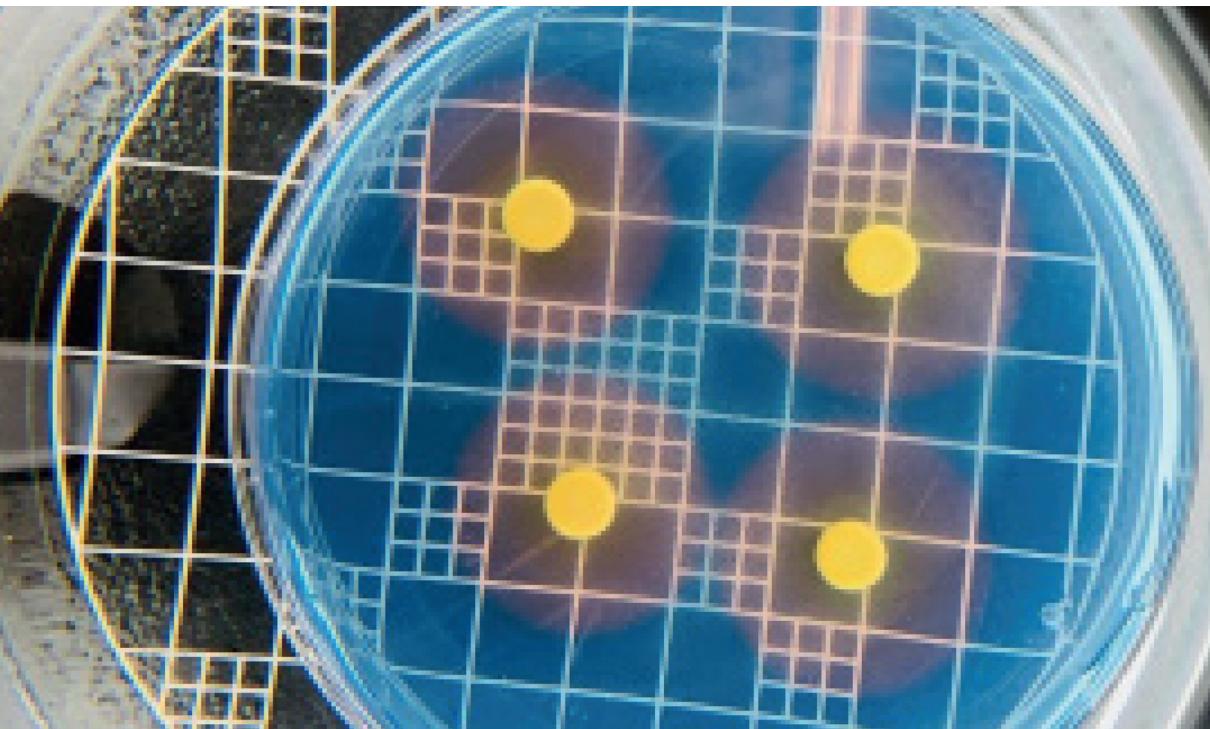


Documentos

462

Londrina, PR / Junho, 2024

Bioprospecção de microrganismos para o uso em bioinsumos: métodos para triagem inicial de bioativos visando à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos



Embrapa

Soja

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura e Pecuária*

ISSN 2176-2937

Documentos 462

Junho, 2024

Bioprospecção de microrganismos para o uso em bioinsumos: métodos para triagem inicial de bioativos visando à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos

Natalia Caetano Vasques

Paula Cerezini

Marco Antonio Nogueira

Mariangela Hungria

Embrapa Soja

Londrina, PR

2024

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rod. Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral
Caixa Postal 4006, CEP 86085-981, Distrito da Warta
Londrina, PR
www.embrapa.br/soja
Fone: (43) 3371 6000
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Soja

Presidente
Adeney de Freitas Bueno

Secretária-Executiva
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros
Claudine Dinali Santos Seixas, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Fernando Augusto Henning, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, Leandro Eugênio Cardamone Diniz, Maria Cristina Neves de Oliveira, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinatto Dall'Agno

Normalização
Valéria de Fátima Cardoso (CRB 9/1188)

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marisa Yuri Horikawa

Foto da capa
Natalia Caetano Vasques

1ª edição
Publicação digital: PDF

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 Soja

Bioprospecção de microrganismos para o uso em bioinsumos: métodos para triagem inicial de bioativos visando à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos / Natalia Caetano Vasques ... [et al.]. – Londrina : Embrapa Soja, 2024.
38 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 462).

1. Microrganismo. 2. Insumo. 3. Nutrição vegetal. I. Vasques, Natalia Caetano. II. Cerezini, Paula. III. Nogueira, Marco Antonio. IV. Hungria, Mariangela. V. Série.

CDD (21. ed.) 631.46

Autores

Natalia Caetano Vasques

Engenheira-agrônoma, mestre em Microbiologia, estudante de doutorado da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

Paula Cerezini

Bióloga, doutora em Agronomia, pesquisadora da Syngenta Proteção de Cultivos, Londrina, PR

Marco Antonio Nogueira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR

Mariangela Hungria

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR

Apresentação

É motivo de grande orgulho para a agricultura brasileira que o país tenha passado de importador de alimentos na década de 1960 para a elite dos países exportadores. O agronegócio responde, hoje, por um quarto do PIB nacional e a agricultura familiar é responsável por mais da metade da comida que vai à mesa dos brasileiros.

Uma nova percepção de agricultura, regenerativa, ou seja, indo além da sustentabilidade, com a recuperação da saúde e fertilidade do solo, passou a ganhar mais espaço nesta década. Em resposta a esse cenário, o Decreto Nº 10.375 de 26 de maio de 2020, que instituiu o Programa Nacional de Bioinsumos, veio a reforçar a vocação brasileira para o uso de insumos biológicos na agricultura. Ainda nesta década, a importância do desenvolvimento de bioinsumos com base na rica biodiversidade brasileira ganhou maior evidência com os problemas de restrições causados pela pandemia de COVID 19 e geopolíticos resultantes da guerra entre a Ucrânia e a Rússia, que evidenciaram a grande fragilidade do setor agrícola no suprimento de insumos. Como exemplo, 85% dos fertilizantes necessários para a produção agrícola nacional são importados.

Como resultado do despertar do setor agrícola para os insumos biológicos, constatou-se um incremento impactante na busca por soluções com base em microrganismos, com muitas solicitações, por parte dos setores acadêmico e privado, de indicação de métodos para a bioprospecção de novos ativos biotecnológicos.

Este Documento visa atender a essa demanda, detalhando e ilustrando métodos que foram validados no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, para facilitar uma prospecção inicial de microrganismos que podem vir a compor futuros bioinsumos destinados, principalmente, à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos.

Adeney de Freitas Bueno
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja

Sumário

Introdução.....	9
Processos microbianos e sua avaliação	10
Enzimas hidrolíticas	10
Importância da síntese de enzimas hidrolíticas	10
Métodos de avaliação da produção de enzimas hidrolíticas.....	11
Crescimento em condições restritivas de água e temperatura	15
Importância da capacidade de crescimento em condições restritivas de água e temperatura	15
Método de avaliação da capacidade de crescimento em meio com atividade de água reduzida e temperatura elevada	15
Síntese do fitormônio ácido indol-3-acético	17
Importância da síntese de ácido indol-3-acético	17
Método de avaliação da síntese de compostos indólicos	18
Síntese de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-deaminase	19
Importância da produção de ACC-deaminase	19
Método de avaliação da síntese de ACC-deaminase	20
Síntese de biofilme e exopolissacarídeos	22
Importância da síntese de biofilme e exopolissacarídeos.....	22
Métodos para avaliação da síntese de biofilme e exopolissacarídeos ..	23
Produção de sideróforos	25
Importância da síntese de sideróforos	25
Método de avaliação da síntese de sideróforos.....	26
Solubilização de fontes de fósforo	29
Importância da capacidade de solubilização de fósforo	29
Método de avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos	29
Considerações finais	32
Agradecimentos.....	32
Referências	33

Introdução

Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP ou *Plant Growth-Promoting Bacteria*, PGPB) podem estimular o crescimento das plantas através de diferentes processos microbianos, específicos em cada estirpe bacteriana, como produção de fitormônios, a disponibilização de nutrientes, aumento da tolerância a estresses, entre outros.

Como exemplo de processos microbianos, podem-se citar: a produção de sideróforos (Crowley et al., 1991; Kraemer, 2004), a solubilização de fosfato inorgânico (Reyes et al., 1999), o estímulo à produção de substâncias reguladoras do crescimento (Arshad; Frankenberger, 1997), a produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC-deaminase) (Glick et al., 1998), a atividade de enzimas hidrolíticas, como a celulase e a protease (Glick, 2012; Štursová et al., 2012; Oliveira et al., 2020), a capacidade de crescimento em condições de atividade de água reduzida (Hallsworth et al., 1998), a produção de exopolissacarídeos (EPS) e de biofilmes (Chang et al., 2007), entre outros.

Algumas BPCP podem, ainda, promover o crescimento de plantas por meio do biocontrole de doenças, devido à atividade metabólica antagonica aos fitopatógenos. Os metabólitos microbianos também podem induzir respostas de resistência sistêmica da planta, conforme observado por Naik et al. (2019), ou outras formas de suprimir o ataque de pragas e doenças (Ruiu, 2020).

É conveniente ressaltar que as BPCP estimulam o desenvolvimento das plantas; no entanto, a classificação de benefícios diretos e indiretos não se mostra consolidada, uma vez que um mesmo mecanismo pode exercer tanto influência direta, quanto indireta como, por exemplo, a produção de sideróforos (Kloepper et al., 1980; Schalk et al., 2012). Além disso, uma mesma estirpe pode ser portadora e/ou responsável por vários mecanismos simultaneamente (Mallick et al., 2018).

Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade do mundo (Val et al., 2022), percentagem que também deve se estender aos microrganismos. Existe, portanto, um enorme potencial para bioprospecção de microrganismos da biodiversidade brasileira com propriedades de grande interesse para a agricultura. Neste contexto, neste comunicado são detalhados métodos de avaliação do potencial de promoção de crescimento de plantas por espécies bacterianas. Esses métodos permitem avaliar diferentes características promissoras dos isolados bacterianos, com potencial impacto na nutrição de plantas e na tolerância a estresses abióticos, entre outros, representando uma primeira etapa para a bioprospecção de microrganismos destinados ao uso como bioinsumos na agricultura.

Processos microbianos e sua avaliação

Enzimas hidrolíticas

Importância da síntese de enzimas hidrolíticas

Enzimas hidrolíticas são classificadas quanto à especificidade ao substrato. Dois exemplos de enzimas hidrolíticas são as proteases e as celulases, produzidas por algumas BPCP. A importância da produção dessas enzimas diz respeito à capacidade de degradação de material orgânico fibroso e como agente de biocontrole. Tendo em vista a redução dos impactos ambientais no processo produtivo, o reaproveitamento de resíduos é uma alternativa proeminente, uma vez que potencializa a utilização de recursos naturais (Schneider et al., 2013), sendo necessária a atividade de bactérias especializadas na degradação destes compostos para que os elementos ali presentes sejam ciclados. Um exemplo é a utilização da torta de filtro em sistemas de produção de alface (*Lactuca sativa*), que pode ser usada como fonte de carbono e energia pelos microrganismos, favorecendo a atividade

biológica do solo, de Santana et al. (2012). A produção das enzimas protease e celulase também pode ser efetiva no biocontrole de fitopatógenos pela degradação de β -glucanos, principal constituinte de suas paredes celulares (Ahmadzadeh; Tehrani, 2009). Algumas proteases estão envolvidas, ainda, na inativação de enzimas líticas extracelulares de fungos fitopatogênicos, diminuindo a sua capacidade de infecção (Elad; Kapat, 1999).

Métodos de avaliação da produção de enzimas hidrolíticas

Atividade proteolítica

Para a avaliação da produção de enzimas proteolíticas, os isolados devem ser cultivados em meio de cultura segundo o Manual of Methods for General Bacteriology - American Society for Microbiology de Gerhardt et al. (1981), cuja composição consta da Tabela 1.

Tabela 1. Composição de meio de cultura para avaliação da atividade proteolítica

Componente	Quantidade
Leite desnatado	100 mL
Extrato de levedura	1,5 g
NaH_2PO_4	1,0 g
NaCl	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL
pH	7,2

Após a esterilização em autoclave a 121 °C por 20 minutos, faz-se a distribuição do meio de cultura em placas de Petri e a inoculação de uma gota, em triplicata, da estirpe avaliada, crescida em meio líquido ou preservada em glicerol. Os resultados esperados podem ser visualizados na Figura 1.

Ilustração: Natalia Caetano Vasques.



Figura 1. Ilustração do resultado esperado com a aplicação da metodologia. À esquerda, representação de resultado negativo e à direita, resultado positivo para produção de protease.

Após incubação por três a sete dias a 28 °C, a depender do microrganismo, a hidrólise de caseína pode ser observada pela formação de halo translúcido de degradação ao redor da colônia (Figura 2), quando o teste for positivo. A ausência de halo indica que a estirpe estudada não é produtora da enzima.

Foto: Natalia Caetano Vasques.

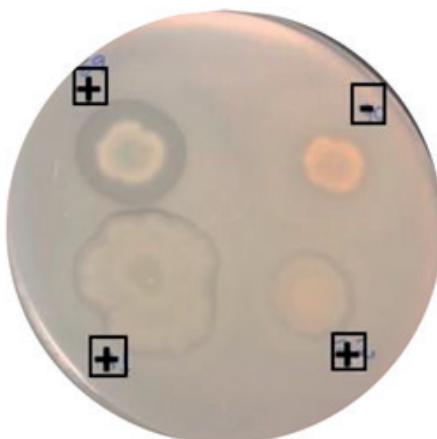


Figura 2. Resultado obtido após o crescimento de estirpes produtoras (+) e não produtoras (-) de protease.

Atividade celulolítica

Para avaliar a capacidade de degradação da celulose, o método descrito no *Manual of Methods for General Bacteriology - American Society for Microbiology* por Gerhardt et al. (1981) se mostra eficaz, sendo realizado no meio de cultura descrito na composição da Tabela 2.

Tabela 2. Composição de meio de cultura para avaliação da atividade celulolíticas.

Componente	Quantidade
K_2HPO_4	0,4 g
NaH_2PO_4	0,2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrato de levedura	0,1 g
CMC (carboximetil celulose)	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água deionizada	1000 mL
pH	7,0

O meio deve ser submetido à autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. Após o plaqueamento e a incubação, faz-se necessária a técnica de revelação dos halos de degradação da celulose pela adição de um pequeno volume de solução NaCl 1 mol L⁻¹ à superfície da placa. Após 5 minutos, a solução salina deve ser removida e adicionada uma solução de vermelho Congo a 0,1% (em 99,9 mL de água, adicionar 0,1 g de vermelho Congo). Após 30 minutos, realiza-se a lavagem com água destilada até que seja possível a observação dos halos de degradação ao redor das colônias, no caso de atividade positiva. O resultado esperado está demonstrado na Figura 3.

Ilustração: Natalia Caetano Vásques.



Figura 3. Ilustração do resultado esperado com a aplicação da metodologia. À esquerda, representação de resultado negativo e à direita, resultado positivo para produção de celulase.

Após a incubação por cinco dias a 28 °C e realizado o procedimento de revelação, o resultado deve ser conforme pode ser visualizado na Figura 4.

Foto: Natalia Caetano Vásques.

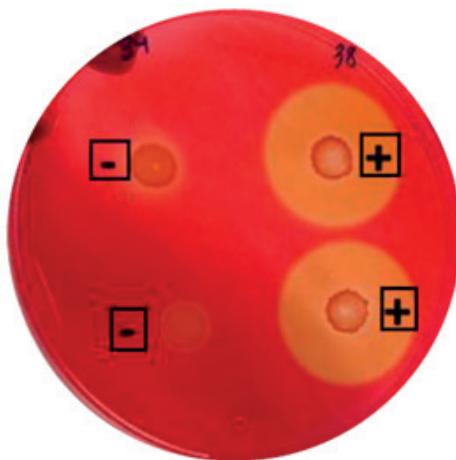


Figura 4. Resultado obtido após o crescimento de estirpes produtoras (+) e não produtoras (-) de celulase.

Crescimento em condições restritivas de água e temperatura

Importância da capacidade de crescimento em condições restritivas de água e temperatura

As condições do ambiente afetam diretamente o crescimento microbiano. A maioria das bactérias é cultivada em meio de cultura com atividade de água (Aw) em torno de 0,999 a 0,990, visto que a maioria não é capaz de crescer em meio com Aw inferior a 0,950. Desta maneira, espécies capazes de crescer em meio com Aw reduzida (< 0,950) mostram potencial para suportar variações osmóticas, seja pela alta concentração salina, seja pela restrição hídrica e, desta forma, podem trazer benefícios às plantas associadas, mesmo em condições críticas de sobrevivência para a maioria dos microrganismos (Hallsworth et al., 1998).

Método de avaliação da capacidade de crescimento microbiano em meio com atividade de água reduzida e temperatura elevada

Para avaliar o desenvolvimento das estirpes candidatas em meio com Aw reduzida, faz-se a repicagem em meio de cultura TSA (*Tryptic Soy Agar*, Tabela 3) a 10%, enriquecido com sorbitol (Tabela 4). Para Aw correspondente a 0,919, devem ser adicionados 405 g L⁻¹ de sorbitol ao meio de cultura, e para Aw equivalente a 0,897 se adicionam 520 g L⁻¹ de sorbitol ao meio de cultura que deve ser esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C, conforme proposto por Hallsworth et al. (1998). A Figura 5 ilustra como podem ser os resultados esperados

Tabela 3. Composição do meio de cultura TSA

Componente	Quantidade
TSB ¹	30,0 g
Ágar	15,0 g
Água deionizada	1000 mL
pH	7,1-7,5

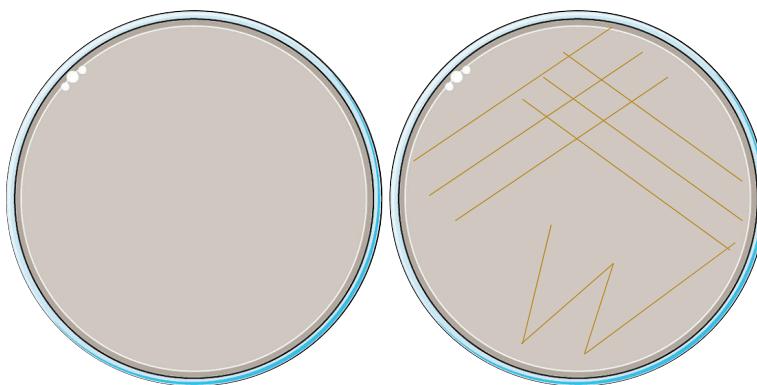
¹ Meio de cultura comercial, em conformidade com USP (*United States Pharmacopeia*), EP (*European Pharmacopoeia*), JP (*Japanese Pharmacopeia*) e FDA/BAM (*Food and Drug Administration/ Bacteriological Analytical Guide*).

Tabela 4. Composição de meio de cultura para avaliação da capacidade de crescimento em meio com atividade de água reduzida.

Componente	0,919 Aw*	0,897 Aw
Meio TS 10%	[10%]	[10%]
Sorbitol	405,0 g	520,0 g
Ágar	15,0 g	15,0 g
Água deionizada	1000 mL	1000 mL

*Aw: Atividade de água.

Ilustração: Natalia Caetano Vasques.

**Figura 5.** Ilustração do resultado esperado na avaliação da capacidade de crescimento em meio de cultura com atividade de água reduzida e temperatura elevada. À esquerda, representação de resultado negativo e à direita, resultado positivo para capacidade de crescimento.

Após incubação das culturas a 40 °C por sete dias, são consideradas positivas para tolerância a altas temperaturas as estirpes que apresentarem crescimento e negativas as que não são capazes de se desenvolverem em meio de cultura com alta concentração de soluto e incubadas em temperatura elevada (Figuras 5 e 6).

Foto: Natalia Caetano Vasques.

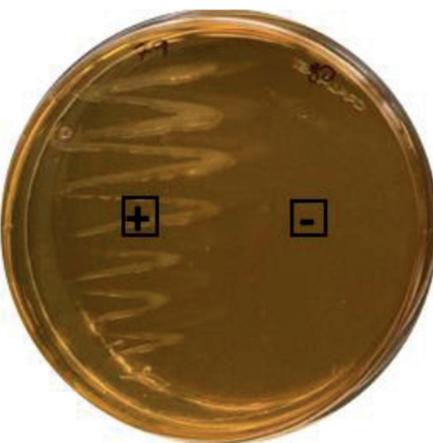


Figura 6. Resultado obtido após a incubação de estirpes capazes de crescerem em meio com atividade de água reduzida e temperatura elevada (+) e não capazes (-).

Síntese de compostos indólicos

Importância da síntese de ácido indol-3-acético

Dentre os diversos compostos indólicos produzidos por alguns microrganismos, está o hormônio vegetal ácido indol-3-acético (AIA), que é responsável pela regulação de vários processos celulares e de desenvolvimento vegetal (Taiz et al., 2017), sendo capaz de estimular efeitos instantâneos na planta, quando em baixas concentrações, como o aumento da elongação celular, e efeitos mais prolongados, como a divisão e diferenciação celular (Dobbelaere et al., 2003). Alguns microrganismos são capazes de sintetizar esse fitormônio (Spaepen et al., 2007), auxiliando a planta em seu desenvolvimento. A síntese de AIA pode se mostrar ainda mais significativa quando as condições para produção vegetal forem desfavoráveis, uma vez que favorece a proliferação das raízes, contribuindo para a absorção de água e nutrientes pelas plantas (Lambrecht et al., 2000).

Método de avaliação da síntese de compostos indólicos

Para quantificar a produção de ácido indol-3-acético (AIA) *in vitro* (Gordon; Weber, 1951; Sarwar; Kremer, 1995), cada estirpe bacteriana deve ser inoculada em 10 mL do meio de cultura líquido específico para o gênero, acrescido de triptofano ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e incubada sob agitação (100 rpm) por sete dias a 28 °C, ou nas condições de crescimento especificadas para cada estirpe. A seguir, a cultura deve ser transferida para microtubos e centrifugada a 10.000 rpm, por 10 min. Em seguida, transferir 1 mL do sobrenadante para novos microtubos e adicionar 750 μL do reagente de Salkowski (Gordon; Weber, 1951) (Tabela 5). Cabe salientar que o método avalia compostos indólicos em geral, incluindo o AIA.

Tabela 5. Composição da solução reagente de Salkowski.

Componente	Quantidade
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 mol L^{-1})	1 mL
HClO_4 [35 %]	50 mL

Após 30 minutos de reação no escuro e em temperatura ambiente, a intensidade de coloração deve ser avaliada no comprimento de onda de 540 nm utilizando espectrofotômetro. Os resultados serão expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA no sobrenadante, de acordo com os valores obtidos em uma curva de calibração com AIA sintético (0; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 800; 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), conforme apresentado na Figura 7.

Foto: Natalia Caetano Vasques.



Figura 7. Curva de calibração para quantificação, por espectrofotometria, do ácido indol-3-acético produzido por bactérias promotoras do crescimento de plantas. A concentração está indicada da esquerda (-), menos concentrada, para a direita (+), ou mais concentrada.

Síntese de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-deaminase

Importância da produção de ACC-deaminase

O 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) é o principal precursor do etileno, uma molécula orgânica com função biológica, que atua como regulador de crescimento vegetal em baixas concentrações. No entanto, sua produção pode aumentar em situações de estresse (Glick, 2005), resultando em condições deletérias, como a inibição do crescimento radicular (Müller; Munné-Bosch, 2015; Huang et al, 2023). A enzima ACC-deaminase pode ser produzida por algumas estirpes de BPCP, sendo responsável pela degradação do ACC, transformando-o em α -cetobutirato e amônia (Glick, 2005). Além de retardar a produção de etileno, a atuação da enzima ACC-deaminase reflete no aumento do desenvolvimento radicular (Glick et al., 1998), portanto, as plantas inoculadas com bactérias produtoras dessa enzima podem tolerar melhor condições de estresse devido ao favorecimento do sistema

radicular, o que contribuirá para a formação de biomassa da planta, elevação pela taxa fotossintética, conteúdo proteico e ativação de genes responsivos ao estresse (Sapre et al., 2019). É possível que AIA e ACC-deaminase trabalhem em conjunto para estimular o alongamento das raízes. O AIA exógeno (produzido por bactérias) é conhecido por aumentar a transcrição e a atividade da ACC-sintase, que catalisa a produção de ACC em plantas. A molécula de ACC estimula a atividade da enzima ACC-deaminase em bactérias (Patten; Glick, 2002).

Método de avaliação da síntese de ACC-deaminase

A capacidade de algumas estirpes de metabolizar ACC como única fonte de N no meio de cultivo, devido à ação da enzima ACC-deaminase, foi a premissa da metodologia adaptada por Glick et al. (1995) e Lucon et al. (2008).

Preparar um meio de cultura livre de nitrogênio - LN, segundo a composição da Tabela 6 e uma solução tampão, conforme Tabela 7.

Tabela 6. Composição de meio de cultura livre de nitrogênio (LN).

Componente	Quantidade
H ₃ BO ₄	10,0 mg
MnSO ₄ .7H ₂ O	10,0 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄	70,0 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,0 mg
CuSO ₄	50,0 mg
MoO ₃	10,0 mg
Glicose	2,0 g
Ácido glucônico	2,0 g
Ácido cítrico	2,0 g
Ágar	15,0 g
Água deionizada	1000 mL

Tabela 7. Composição de solução tampão para o meio de cultura livre de nitrogênio (LN)

Componente	Quantidade
KH_2PO_4	4,0 g
Na_2HPO_4	6,0 g
Água destilada	100 mL

Autoclavar o meio de cultura por 20 minutos a 121 °C e, separadamente, a solução tampão. Quando o meio de cultura e a solução tampão atingirem uma temperatura branda (50 °C), devem ser homogeneizados em condições assépticas e a mistura enriquecida com uma solução contendo 0,3 g de ACC em 50 mL de água, previamente esterilizada em filtro bacteriológico (0,22 micra).

O mesmo meio LN deve ser preparado com a adição de tampão e sem ACC. A estirpe estudada deve ser inoculada em placas de Petri com cada um dos dois meios e incubadas a 28 °C, por oito dias. A seguir, comparar os crescimentos em ambas as condições (Figuras 8 e 9).

Ilustração: Natalia Caetano Vasques.

**Figura 8.** Ilustração do resultado esperado na avaliação da síntese de ACC-deaminase. À esquerda, representação da estirpe estudada em meio LN e à direita, em meio LN com adição de ACC, para verificação de resultado positivo.

Foto: Natalia Caetano Vasques.

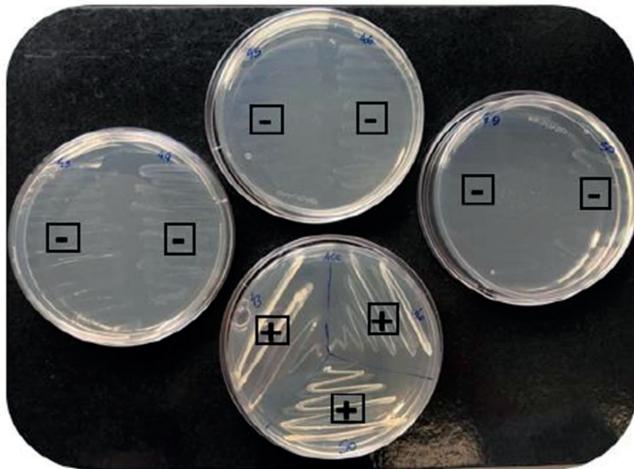


Figura 9. Resultado obtido a partir do crescimento de estirpes capazes de produzir a enzima ACC deaminase, com crescimento destacado em meio contendo ACC (+) e imperceptível em meio LN de ACC (-).

Estirpes que mostrarem crescimento mais pronunciado no meio contendo ACC são capazes de utilizar ACC como fonte de N e, portanto, são consideradas produtoras de ACC-deaminase.

Síntese de biofilme e exopolissacarídeos

Importância da síntese de biofilme e exopolissacarídeos

Biofilmes são formados por comunidades de microrganismos cooperantes envolvidas em substâncias poliméricas extracelulares. Na natureza, os biofilmes constituem uma modalidade de crescimento protegido, permitindo que microrganismos sobrevivam em ambientes hostis (Ansari et al., 2017). Entre as principais funções dos biofilmes para a vida microbiana podem-se citar a proteção contra antimicrobianos e estresses abióticos, e o transporte facilitado de nutrientes e metabólitos, entre outros processos (Rafique et al., 2015). A composição do biofilme é variável de acordo com o ambiente em que se desenvolve mas, geralmente, o meio é constituído por água, células bacterianas e

uma matriz de polímeros extracelulares, principalmente, exopolissacarídeos (EPS) (Flemming; Wingender, 2010).

A produção de EPS por microrganismos que interagem com as plantas pode auxiliar na disponibilização de nutrientes, bem como contribuir para a sobrevivência das plantas em várias situações, como estresse hídrico e salino, entre outros (Kumar et al., 2020). Mallick et al. (2018) afirmam que a produção de substâncias poliméricas extracelulares aumenta a capacidade do microrganismo em colonizar com sucesso a raiz de uma planta.

Métodos para avaliação da síntese de biofilme e exopolissacarídeos

Síntese de biofilme

A avaliação da produção de biofilme pode ser realizada com algumas adaptações do método proposto por Lima et al. (2017), a partir do crescimento das estirpes em microtubos em meio de cultura específico para cada estirpe. É importante ressaltar que a inoculação deve ser realizada em concentração conhecida e semelhante para todas as estirpes a serem estudadas, para comparação entre estirpes (por exemplo, densidade óptica D.O.₆₀₀ ~ 0,6). Após incubação a 28 °C por 96 h, o meio de cultura com as células é descartado e os tubos lavados três vezes com água destilada e, a seguir, adicionar 1 mL da solução de cristal violeta [0,1%] (em 100 mL de água, adicionar 0,1 g de cristal violeta). Após repouso por 15 minutos em temperatura ambiente, os microtubos devem ser novamente lavados por três vezes com água destilada e, então, adiciona-se 1 mL de álcool etílico [95%]. Com a adição de álcool etílico, o cristal violeta retido no biofilme é solubilizado e, dessa forma, a densidade óptica pode ser determinada por espectrofotometria a 560 nm (Figura 10).

Foto: Natalia Caetano Vasques.



Figura 10. A concentração de cristal violeta em função da produção de biofilme em meio de cultura líquido está indicada da esquerda (-), menos concentrada, para a direita (+), mais concentrada.

Nessa análise não há um padrão de concentração comparativo como uma curva de calibração, levando em consideração somente as diferenças entre as estirpes pela densidade óptica, sendo que quanto maior a leitura, maior produção de biofilme.

Síntese de exopolissacarídeos

A avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS) pode ser realizada com algumas adaptações do método proposto por Meneses et al. (2009) e Castellane et al. (2014). Alíquotas de 2 mL dos cultivos incubados por 72 h a 28 °C devem ser colocadas em microtubos e centrifugadas a 14.000 rpm por 12 min a 4 °C. O pélete de células deve ser descartado e uma parte do sobrenadante - 50 µL - transferida para um novo microtubo contendo 150 µL de álcool etílico [70%] gelado. Os microtubos são novamente centrifugados a 14.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, são transferidos para um concentrador a 45 °C por 1 h, ou até secar. Quando as amostras se encontrarem totalmente secas, adicionar 200 µL de água ultrapura e homogeneizar em vórtex.

A quantificação é realizada a partir do método fenol-sulfúrico para dosagem de carboidratos totais, descrito por Dubois et al. (1956). Devem ser adicionados 200 µL de solução fenol [5%] (ácido fênico) e 1 mL de H₂SO₄ concentrado e homogeneizado em vórtex. Como branco, deve ser utilizada apenas a água ultrapura, fenol [5%] e H₂SO₄. Após 15 minutos de reação em temperatura ambiente, realiza-se a análise espectrofotométrica, com leitura da D.O. a 485 nm.

Os resultados são aferidos após a obtenção de uma curva de calibração com glicose (0; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 200 µg mL⁻¹) como substrato padrão da curva de calibração (Figura 11).

Foto: Natalia Caetano Vasques.



Figura 11. Curva de calibração utilizando glicose para quantificação, por espectrofotometria, da concentração de exopolissacarídeos produzidos por bactérias promotoras do crescimento de plantas. A concentração está indicada da esquerda (-), menos concentrada para a direita (+), mais concentrada.

Produção de sideróforos

Importância da síntese de sideróforos

A biodisponibilidade do ferro (Fe) é limitada no ambiente aeróbio devido à forma oxidada predominante (Fe³⁺), contudo, alguns organismos são capazes de formar quelantes biogênicos para a complexação do Fe³⁺ presente no ambiente, nomeados sideróforos (Römheld, 1987).

Dessa forma, o nutriente que antes se apresentava indisponível pode, então, ser reduzido a Fe^{2+} e ser assimilado tanto por plantas, como por alguns microrganismos. No caso dos microrganismos, esses passarão a apresentar vantagem competitiva e, até mesmo, inibição do crescimento de patógenos, caracterizando uma estratégia de biocontrole, dado que o Fe fica indisponível para os outros microrganismos, em especial os fungos, que não possuem capacidade metabólica de assimilação do elemento por tal via (Kloepfer et al., 1980; Schalk et al., 2012). A produção de sideróforos pode, ainda, estar relacionada com a solubilização de fosfato de ferro, decorrente da altíssima afinidade das moléculas por Fe, que é quelado e libera o fosfato (Batista et al., 2018).

Método de avaliação da síntese de sideróforos

Para a avaliação da produção de sideróforos, os isolados devem ser cultivados em meio de cultura ágar King B, cuja composição consta da Tabela 8 (King et al., 1954).

Tabela 8. Composição de meio de cultura ágar King B.

Componente	Quantidade
Glicerol	3,00 g
Peptona bacteriológica	4,00 g
K_2HPO_4	0,23 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,30 g
Ágar	15,0 g
Água deionizada	1000 mL
pH	6,8

O meio deve ser esterilizado por 20 minutos a 121 °C. Ao atingir temperatura branda (50 °C), deve ser enriquecido com o corante cromoazurol S (CAS) (Schwyn; Neilands, 1987), o qual pode ser preparado a partir de quatro soluções, cujas composições constam da Tabela

9, que devem ser esterilizadas em condições similares à do meio de cultura.

Solução 1 - 7,5 mL; Solução 2 - 37,5 mL; Solução 3 - 30 mL; Solução 4 - 25 mL.

Tabela 9. Composição das quatro soluções utilizadas para formação do corante cromoazul S (CAS).

Componente	Quantidade
Solução 1	
FeCl.6H ₂ O	13,5 mg
HCl (10 mM)	41 mL
Água deionizada	50 mL
Solução 2	
CAS (cromoazul S)	121 mg
Água deionizada	100 mL
Solução 3	
CTAB/HDTMA (Brometo de hexadeciltrimetilâmônio)	364,45 mg
Água deionizada	50 mL
Solução 4	
Piperazina anidra	4,307 g
HCl (12 M)	6,25 mL
Água destilada	100 mL

Inocular as bactérias no meio de cultura a partir de uma gota de suspensão de cultivo bacteriano em meio líquido (10 µL) e acompanhar a evolução do crescimento. Após 24 horas de incubação a 28 °C, no escuro, já é possível avaliar algumas estirpes de crescimento rápido.

A capacidade de produção de sideróforos será considerada positiva quando observada a formação de halo de coloração laranja ou rosada ao redor da colônia (Figura 12) e, então, pode ser medida sua extensão com o auxílio de um paquímetro para a obtenção da razão halo/colônia (Figura 13).

Foto: Natalia Caetano Vasques.

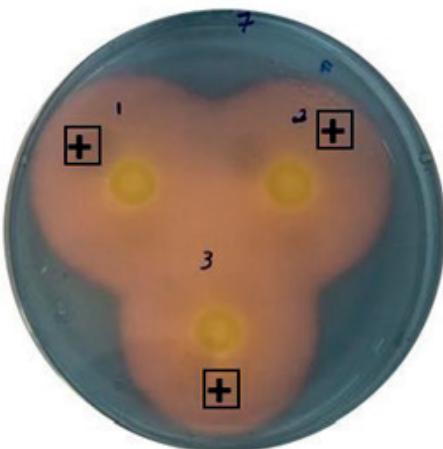


Ilustração: Natalia Caetano Vasques.

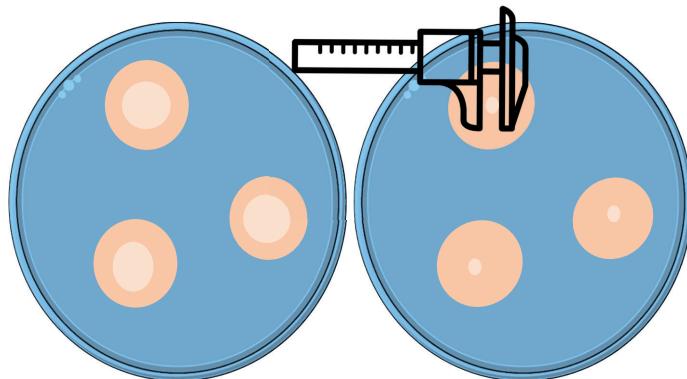


Figura 12. Resultado obtido após a incubação e crescimento de estirpes produtoras de sideróforos (+).

Figura 13. Ilustração do resultado esperado com a aplicação da metodologia. À esquerda, menor razão halo/colônia e à direita, maior habilidade de produção de sideróforos.

Solubilização de fontes de fósforo

Importância da capacidade de solubilização de fósfato

O fósforo (P), elemento essencial ao ciclo metabólico das plantas, é facilmente retido devido a características intrínsecas de solos tropicais. Bactérias solubilizadoras de fosfato contribuem para a ciclagem do elemento, convertendo formas pouco solúveis em formas solúveis e, portanto, assimiláveis às plantas. Tal conversão pode ocorrer por diversas vias, sendo que a principal ocorre pela produção e liberação de metabólitos (Hameeda et al., 2008; Young et al., 2013), como os ácidos orgânicos, que podem liberar fosfato solúvel pela redução do pH do meio (Salih et al., 1989; Nahas, 1991).

Método de avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos

A avaliação da capacidade solubilizadora de fosfato pode ser realizada pelo método proposto por Sylvester-Bradley et al. (1982), em meio de cultura cuja composição consta da Tabela 10, com composição de Fe-EDTA segundo Tabela 11 e de solução de micronutrientes segundo Tabela 12.

Tabela 10. Composição de meio de cultura para avaliação da capacidade de solubilização de fosfato.

Componente	Quantidade
KNO ₃	0,10 g
Glicose	10,00 g
Extrato de levedura	5,00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
NaCl	0,10 g
CaCl	0,02 g
Solução Fe-EDTA	4 mL
Solução de micronutrientes	2 mL
Ágar	15,0 g
Água deionizada	1000 mL

Tabela 11. Composição de solução Fe-EDTA do meio de cultura da Tabela 10.

Componente	Quantidade
Na-EDTA	6,07 g
FeSO ₄ .H ₂ O	6,17 g
Água deionizada	900 mL

Tabela 12. Solução de micronutrientes do meio de cultura da Tabela 10.

Componente	Quantidade
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,200 g
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,280 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g
Água deionizada	200 mL

Após autoclavagem por 20 min a 121 °C, o meio de cultura pode ser enriquecido com três diferentes fontes de fosfato separadamente, de acordo com a análise desejada, para verificar a capacidade de solubilização dos fosfatos inorgânicos na forma de fostato de Ca, Fe e Al.

As soluções deverão ser preparadas a partir de 4,93 g de CaHPO₄.2H₂O; ou 5,35 g de FePO₄.2H₂O; ou 3,50 g de AlPO₄ suspensos em 100 mL de água destilada e, então, autoclavadas por 20 minutos a 121 °C. A mistura do meio de cultura com cada solução de fosfato deve ser realizada assepticamente, em câmara de fluxo laminar, e com o meio a, aproximadamente, 50 °C e, então, distribuída nas placas de Petri.

Após inoculação do meio de cultura a partir de uma gota de suspensão de cultivo bacteriano em meio líquido (10 µL) e incubação a 28 °C, será verificada a presença ou ausência de halo transparente ao redor da colônia (Figura 14) e, quando presente, com o auxílio de um paquímetro digital (Figura 15), pode ser medida sua extensão, bem como a extensão da colônia, para obtenção do Índice de Solubilização.

Foto: Natalia Caetano Vasques.

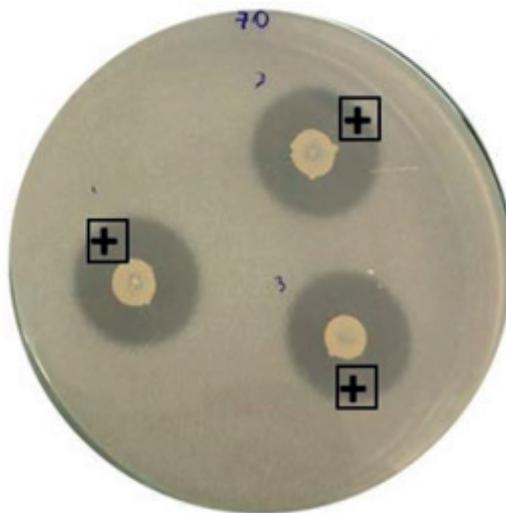


Figura 14. Resultado obtido a partir do crescimento de estirpes solubilizadoras de fósfato (+).

Ilustração: Natalia Caetano Vasques.

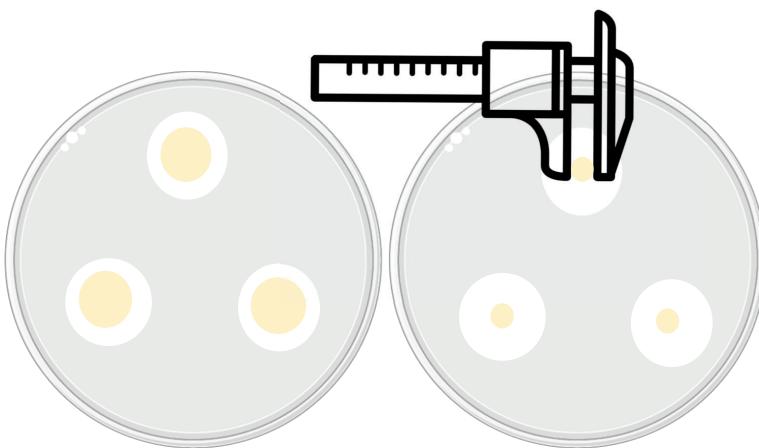


Figura 15. Ilustração do resultado esperado com a aplicação da metodologia para avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos. À esquerda, menor razão halo/colônia ou índice de solubilização e à direita, estirpes com maior habilidade de solubilização.

Considerações finais

As BPCP desempenham um papel crucial na promoção do crescimento das plantas, influenciando uma ampla variedade de processos microbianos, com consequências positivas na qualidade do solo e na produtividade das culturas agrícolas. Os métodos apresentados neste estudo fornecem ferramentas essenciais para a identificação e avaliação de microrganismos promissores que podem ser utilizados no desenvolvimento de bioinsumos agrícolas. Esses bioinsumos têm como principal objetivo promover a nutrição das plantas e aumentar sua tolerância a estresses ambientais, tanto bióticos, quanto abióticos.

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, o que oferece um vasto tesouro de microrganismos ainda não explorados para uso na agricultura. Ao capitalizar essa riqueza biológica, podemos impulsionar a agricultura em direção à resiliência e à sustentabilidade, beneficiando não apenas os agricultores, mas também o meio ambiente e a sociedade como um todo. Ao explorar a biodiversidade única do Brasil, essas abordagens não apenas abrem novas oportunidades para a inovação na agricultura, mas também destacam o potencial do país para liderar o caminho em práticas agrícolas sustentáveis e adaptáveis às mudanças climáticas.

Agradecimentos

N. C. Vasques agradece à CAPES pela bolsa de mestrado (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Código de Financiamento 001). Equipe apoiada pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia “Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental” (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI 043/2019) e pelo projeto de Bioinsumos (CNPq 405666/2022-5).

Referências

- AHMADZADEH, M.; TEHRANI, A. S. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. **Biological Control**, v. 48, n. 2, p. 101-107, 2009. DOI: 10.1016/j.bioc.2008.10.012
- ANSARI, F. A.; JAFRI, H.; AHMAD, I.; ABULREESH, H. H. Factors affecting biofilm formation in *in vitro* and in the rhizosphere. In: AHMAD, I.; HUSAIN, F. M. **Biofilms in plant and soil health**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. cap. 15, p. 275-290. DOI: 10.1002/9781119246329.ch15.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v. 62, p. 45-151, 1997. DOI: 10.1016/S0065-2113(08)60567-2.
- BATISTA, F. de C.; FERNANDES, T. A.; ABREU, C. S.; OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, V. P.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A. **Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 21 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 166).
- CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. de M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191-197, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.066.
- CHANG, W. S.; VAN DE MORTEL, M.; NIELSEN, L.; GUZMAN, G. N. de; LI, X.; HALVERSON, L. J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8290-8299, 2007. DOI: 10.1128/jb.00727-07.
- CROWLEY, D. E.; WANG, Y. C.; REID, C. P. P.; SZANISZLO, P. J. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. In: CHEN, Y.; HADAR, Y. (ed.). **Iron nutrition and interactions in plants**. Dordrecht: Springer, 1991. p. 213-232. DOI: 10.1007/978-94-011-3294-7_27.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003. DOI: 10.1080/713610853.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of plant pathology**, v. 105, n. 2, p. 177-189, 1999. DOI: 10.1023/A:1008753629207.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415.

GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILOW, R. N.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. **Manual of methods for general bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 524 p.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 1-7, 2005. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.030.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 963401, 2012. DOI: 10.6064/2012/963401.

GLICK, B. R.; KARATUROVÍC, D. M.; NEWELL, P. C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 533-536, 1995. DOI: 10.1139/m95-070.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63-68, 1998. DOI: 10.1006/jtbi.1997.0532.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951. DOI: 10.1104/pp.26.1.192.

HALLSWORTH, J. E.; NOMURA, Y.; IWAHARA, M. Ethanol-induced water stress and fungal growth. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 451-456, 1998. DOI: 10.1016/S0922-338X(98)80150-5.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 234-242, 2008. DOI: 10.1016/j.micres.2006.05.009.

HUANG, J.; ZHAO, X.; BÜRGER, M.; CHORY, J.; WANG, X. The role of ethylene in plant temperature stress response. **Trends in Plant Science**, v. 28, n. 7, p. 808-824, 2023. DOI: 10.1016/j.tplants.2023.03.001.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954. DOI: 10.5555/uri:pii:002221435490222X.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 317-320, 1980. DOI: 10.1007/BF02602840.

KRAEMER, S. M. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. **Aquatic Sciences**, v. 66, n. 1, p. 3-18, 2004. DOI: 10.1007/s00027-003-0690-5.

KUMAR, A.; SINGH, S.; GAURAV, A. K.; VERMA, J. P. Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1216, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01216.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01732-7.

LIMA, J. L. D. C.; ALVES, L. R.; PAZ, J. N. P. D.; RABELO, M. A.; MACIEL, M. A. V.; MORAIS, M. M. C. D. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 310-316, 2017. DOI: 10.5935/0103-507X.20170039.

LUCON; C. M. M.; AKAMATSU, M. A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 691-697, 2008. Doi: 10.1590/S0100-204X2008000600004.

MALLICK, I.; BHATTACHARYYA, C.; MUKHERJI, S.; DEY, D.; SARKAR, S. C.; MUKHOPADHYAY, U. K.; GHOSH, A. Effective rhizoinoculation and biofilm formation by arsenic immobilizing halophilic plant growth promoting bacteria (PGPB) isolated from mangrove rhizosphere: a step towards arsenic rhizoremediation. **Science of The Total Environment**, v. 610-611, p. 1239-1250, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.234.

MENESES, C. H. S. G. de; SERRATO, R. V.; ROUWS, L. F. M.; ARAUJO, J. L. S. de; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. **Produção, extração e quantificação de exopolissacarídeos sintetizados por *G. diazotrophicus* PAL5T em meio de cultivo líquido**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 122).

MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 32-41, 2015. Doi: 10.1104/pp.15.00677.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo**: transformações microbianas. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 67 p.

NAIK, K.; MISHRA, S.; SRICHANDAN, H.; SINGH, P. K.; SARANGI, P. K. Plant growth promoting microbes: potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101326, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101326.

OLIVEIRA, F. M.; FIGUEIREDO, M. P. de; ROSEIRA, J. P. S.; FIGUEIREDO, R. M. de; FERREIRA, J. Q.; PADRE, E. C. de O.; BERNADINO, F. S.; LUZ, Y. dos S. Degradabilidade *in vitro* do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1956-1971, 2020. DOI: 10.34188/bjaerv3n3-109

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795-3801, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002.

RAFIQUE, M; HAYAT, K.; MUKHTAR, T.; AMNA; KHAN, A. A.; AFRIDI, M. S.; HUSSAIN, T.; SUNTAN, T.; MUNIS, M. F. H.; IMRAN, M; CHAUDHARY, H. J. Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. In: CHAKRAVARTY, I.; KUNDU, K.; KUNDU, S. **The battle against microbial pathogens**: basic science, technological advances and educational programs. Badajoz: Formatex Research Centre, 2015. p. 373-382. (Microbiology Book Series #5, v. 1).

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R. R.; ANTOUN, H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, p. 281-290, 1999. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00583.x.

RÖMHELD, V. Different strategies for iron acquisition in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 231-234, 1987. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb06137.x.

RUIU, L. Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) against insects and other agricultural pests. **Agronomy**, v. 10, n. 6, 861, 2020. DOI: 10.3390/agronomy10060861.

SALIH, H. M.; YAHYA, A. I.; ABDUL-RAHEM, A. M.; MUNAM, B. H. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant and Soil*, v. 120, p. 181-185, 1989. DOI: 10.1007/BF02377067.

SANTANA, C. T. C.; SANTI, A.; DALLACORT, R.; SANTOS, M. L.; MENEZES, C. B. de. Desempenho de cultivares de alface americana em resposta a diferentes doses de torta de filtro. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 1, p. 22-29, 2012. DOI: 10.1590/S1806-66902012000100003.

SAPRE, S.; GONTIA-MISHRA, I.; TIWARI, S. ACC deaminase-producing bacteria: a key player in alleviating abiotic stresses in plants. In: KUMAR, A.; MEENA, V. S. (eds.). **Plant growth promoting rhizobacteria for agricultural sustainability: from theory to practices**. Singapore: Springer, 2019. p. 267-291. DOI: 10.1007/978-981-13-7553-8_14.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1995.tb00446.x.

SCHALK, I. J.; MISLIN, G. L. A.; BRILLET, K. Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Current Topics in Membranes*, v. 69, p. 37-66, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1.

SCHNEIDER, C. F.; SCHULZ, D. G.; LIMA, P. R.; GONÇALVES JUNIOR, A. C. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos ambientais. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 7, n. 5, p. 08-17, 2013.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.

ŠTURSOVÁ, M.; ŽIFČÁKOVÁ, L.; LEIGH, M. B.; BURGESS, R.; BALDRIAN, P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 80, n. 3, p. 735-746, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01343.x.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAOKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982. DOI: 10.1590/1809-43921982121015

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 858 p.

VAL, A. L.; RECH FILHO, E. L.; HUNGRIA, M.; ARRUDA, P. **Biomass e agro**: sinergia para uma bioeconomia pujante e sustentável. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2022. 15 p. Disponível em: <https://www.abc.org.br/wp-content/uploads/2022/02/Revista-Biomass-e-Agro-ABC-2022.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2024.

YOUNG, L. S.; HAMEED, A.; PENG, S. Y.; SHAN, Y. H.; WU, S. P. Endophytic establishment of the soil isolate *Burkholderia* sp. CC-A174 enhances growth and P-utilization rate in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology*, v. 66, p. 40-47, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.02.001.

Apoio

