



PREFEITURA DE
CAMPOS

SECRETARIA MUNICIPAL
DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA
E TECNOLOGIA

 **Mais
Ciência**

Caracterização Bioquímica, avaliação do controle nematicida e promotora do crescimento vegetal de microrganismos durante a interação bactéria- planta

Orientador: Dr. ^a Letícia Oliveira da Rocha

Bolsista: Ellen Peixoto Azeredo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

2026





SUMÁRIO

RESUMO	3
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1. Agricultura sustentável	3
3.2. Bioinoculantes	4
3.3. Fitonematoides	5
3.4. Biocontrole	6
MATERIAIS E MÉTODOS	6
4.1. Extração e sequenciamento do DNA microbiano	7
4.2. Prospeção de isolados com atividade nematidicida in vitro	8
4.3. Avaliação da produção de quitinase e protease por isolados microbianos	8
4.4. Efeito larvívoro e ovívoro das bactérias e fungos sobre Meloidogyne spp	9
4.5. Microscopia eletrônica de varredura	9
4.6. Análise de Biofilme	10
4.7. Delineamento e avaliação da promoção do crescimento vegetal	10
4.8. Análise estatística dos dados	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
5.1. Isolamento e Purificação dos microrganismos obtidos no rio Itapemirim- ES	12
5.2. Avaliação da presença de enzimas hidrolíticas microbiana	12
5.3. Avaliação da promoção do crescimento vegetal em casa de vegetação	13
5.4. Prospeção de isolados com atividade nematocida in vitro	18
5.5. Interação fungo/ bactéria	20
5.6. Microscopia eletrônica de varredura	21
5.7. Produção de Biofilme	22
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	24

RESUMO

As bactérias promotoras do crescimento vegetal têm sido amplamente estudadas devido ao seu potencial para aumentar a produtividade agrícola e atuar na bioproteção de plantas contra diferentes doenças e pragas. A busca por alternativas eficazes ao uso de produtos químicos tem impulsionado o desenvolvimento de estratégias biológicas inovadoras. Este estudo teve como objetivo selecionar microrganismos com potencial de biocontrole para fitonematoides, além de avaliar sua capacidade de promover o crescimento de plantas de interesse agrícola. Foram realizados ensaios de antibiose no qual as estirpes CCES74, CCES21, CCES67, CCES06, CCES53, CCES39 e CCES62, apresentaram compatibilidade positiva na presença do fungo *Paecilomyces lilacinus*, bem como ensaio de formação de biofilme onde a maior quantificação foi observada para as estirpes CCES39, CCES62, CCES06, CCES74, CCES53. O potencial nematicida das bactérias quanto à produção de enzimas hidrolíticas, como protease foi demonstrado para todas as estirpes, com exceção de CCES62 e CCES53, visto que para a atividade quitinase foi observada somente para CCES39. Para os ensaios com placas de agar/ água para atividade de mobilidade larval com nematoide de vida livre *Panagrellus spp.*, todas as estirpes apresentaram a formação de biofilme envolvendo as larvas ou até mesmo a presença de agregados bacterianos, os quais foram observados com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo através desta possível demonstrar a presença de alterações morfológicas cuticulares identificadas após o ensaio de atividade nematicida em placas de meio de cultura ágar/ água. Para o ensaio em casa de vegetal, foi observado maior incremento de massa vegetal para as estirpes CCES21, CCES62, CCES39, CCES06C e CCES53 para parte aérea e raiz. Em contrapartida as estirpes CCES06, CCES39, CCES62 e CCES74 foram capazes de promover maior comprimento vegetal, onde $p < 0,05$. A influência para aumento da densidade populacional dos microrganismos foi observada para a estirpe CCES74 ($1,46 \times 10^7$), seguida das estirpes CCES21 ($2,1 \times 10^9$), CCES53 ($1,3 \times 10^9$), CCES63 ($3,1 \times 10^9$), CCES06C ($2,3 \times 10^9$) e CCES62 ($1,5 \times 10^9$). A atividade microbiana no solo foi demonstrada pelo método de degradação do diacetato de fluoresceína, onde foi observado a maior atividade metabólica para as estirpes CCES39, CCES74, CCES06C e CCES62, onde $p < 0,0001$. Sendo assim, o estudo buscou identificar agentes microbianos promissores para o biocontrole de nematoides, a fim de compreender as interações entre microrganismos, plantas e nematoides, onde foi observado que as estirpes CCES39 e CCES06C foram capazes de apresentar atividades nematicidas e promover o crescimento vegetal. Neste contexto o estudo apresenta sua contribuição para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas voltadas à proteção e ao aprimoramento da qualidade de culturas agrícolas.

Palavras-chave: Fitonematoides; sustentabilidade; bioinoculantes; promoção do crescimento vegetal.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda dos consumidores e a competitividade dos mercados globalizados têm impulsionado a produção de alimentos de alta qualidade, com melhores propriedades nutricionais, sensoriais e qualitativas (Zayat et al., 2022). Neste sentido, a intersecção entre a agricultura moderna/ sustentabilidade e práticas inovadoras e a preservação de recursos naturais, visando o aumento da produtividade agrícola, tem se tornado alvo de diferentes estudos. Sendo assim, o uso de novas tecnologias (Rejeb et al., 2022; Wakchaure et al., 2023) associadas ao estudo da influência de microrganismos na produção agrícola e sua atividade no biocontrole (Singh et al., 2020; Baron e Rigobelo., 2022; Wang et al., 2021; Poveda et al., 2020), destacando o controle de nematoides, visto que são conhecidos por pragas vegetais e responsáveis por diversas perdas econômicas agrícolas. Neste contexto, os microrganismos tornam-se alvo de diferentes estudos que visam cada vez mais uma agricultura de maior qualidade.

Os fitonematoides são conhecidos como pragas agrícolas e podem acarretar diversos prejuízos a economia, sendo responsáveis por uma grande redução na produtividade do cultivo de plantas agrícolas. Diversos estudos demonstram que os agentes microbianos são vistos como alvo de estudo para o controle destes organismos devido sua ação na redução do número de galhas, na massa de ovos e na população de fêmeas de fitonematoides (Moslehi et al., 2021; Banihashemian et al., 2022) as quais são responsáveis por provocar doenças severas em grandes culturas agrícolas. Além disso, são relatadas alterações fisiológicas e bioquímicas (Loveys e Bird, 1973; Sharma e Sharma, 2016), modificações no arranjo estrutural das células vegetais (Ekino et al.,

2020), e a modulação das respostas imunológicas, hormonais e gênicas em plantas, associadas às nematodioses vegetais (Bali et al., 2019; Molinari e Leonetti, 2019). Sendo assim, estudos demonstram, ao longo do tempo, o papel dos nematoides na agricultura moderna, bem como os prejuízos acarretados por estes em diferentes culturas.

Além da sua importância para o biocontrole de doenças vegetais, estudos consolidados relatam a ação de microrganismos sobre a promoção do crescimento vegetal elevando cada vez mais as safras agrícolas e afetando positivamente a economia deste ramo. Amogou et al. (2019) demonstrou que quando consolidado com 50% NPK, a inoculação da bactéria *Serratia marcescens* em plantas de milho, promoveu maior altura, biomassa subterrânea fresca, biomassa aérea seca, biomassa subterrânea seca e rendimento de grãos. Dartora et al. (2013), realizaram ensaios através da inoculação de uma combinação de estirpes de *Azospirillum brasilienses* (Ab-V5) e *Herbaspirillum seropedicae* (Smr1) acompanhado de adubação nitrogenada, onde foi demonstrado o aumento de incremento para matéria seca parte aérea (12%) e aumento na produtividade quando comparado ao controle sobre plantas de milho. Neste contexto, a influencia dos microrganismos sobre o desenvolvimento e proteção vegetal, vem sendo demonstrada em diferentes estudos.

Dito isto, a busca por agentes microbianos envolvidos na promoção do crescimento vegetal (PCV) e no biocontrole, tem se tornado cada vez mais frequente, visando otimizar a produção destes produtos biotecnológicos e promovendo uma agricultura de menor impacto e mais sustentável. Sendo assim, o projeto apontou para a construção de conhecimento científico para melhor compreensão na interação planta-bactéria e sua ação na promoção do crescimento vegetal, bem como a direção dos mecanismos de biocontrole de doenças, contribuindo para o desenvolvimento de novas tecnologias que poderão auxiliar no controle dos fitonematoides e no aumento da produção agrícola.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

A agricultura é um dos maiores e mais importantes setores econômicos no Brasil, sendo seu PIB representado por 29,4% do Brasil em 2025 segundo Cepea/CNA. Ao mesmo tempo que este setor vem crescendo, também é possível observar o aumento do uso de agrotóxicos e os danos ambientais causados pela indústria do agronegócio.

Segundo a Embrapa (2024) o consumo de agrotóxicos no Brasil nos últimos anos teve um aumento de 700%, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse mesmo período. O mercado brasileiro de agrotóxicos expandiu rapidamente na última década (190%), num ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global (93%), o que coloca o Brasil em primeiro lugar no ranking mundial, desde 2008. (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

O uso exacerbado de agrotóxicos e os danos provocados pelo mesmo no meio ambiente, torna necessário a implementação de uma agricultura mais sustentável a fim de não danificar suas fontes naturais de produção (solo, água, fauna e diversidade biológica), reconhecendo o papel essencial dos microrganismos do solo, insetos polinizadores e animais na manutenção do equilíbrio ecológico, assim como a importância da diversidade vegetal para a resiliência e estabilidade das agroecossistemas. Atualmente, há muito conhecimento e inovação em práticas alternativas e sustentáveis, eficientes para substituir os agrotóxicos utilizando organismos da própria natureza para ajudar no controle de pragas e doenças que acometem o campo. Segundo a Embrapa (2006) o controle biológico natural envolve o controle da densidade populacional de determinados organismos, considerados pragas, por meio da população de outros organismos, mantendo-se o equilíbrio da natureza. Esses inimigos naturais de pragas presentes no ambiente, podem ser insetos benéficos,

predadores, parasitoides, microrganismos como fungos, vírus e bactérias específicos para controle de seres alvos não benéficos para o meio ambiente.

2.2. BIOINOCULANTES

Os bioinoculantes são produtos que possuem microrganismos benéficos que auxiliam no desenvolvimento das plantas, podendo ajudar na promoção de crescimento vegetal e também no controle de pragas e doenças. Soluções mais sustentáveis e com base biológica têm ganhado importância pela necessidade de redução do uso de fertilizantes químicos sintéticos, insumos dos quais o Brasil é altamente dependente.

De acordo com Visconti et al. (2017), o uso de biofertilizantes, pode exercer o papel de promover maior crescimento de microrganismos benéficos presentes no solo, levando a um aumento de organismos atuantes no biocontrole e promovendo uma redução do inóculo de fitopatógenos, o que possibilita o controle de diferentes doenças. Além disso, Florencio et al. (2022), demonstrou que o uso de bioinoculantes, tem por estratégia aumentar a fertilização do solo e nutrição vegetal, visto maior absorção de nutrientes como fosforo, zinco e nitrogênio. Neste contexto, os inoculantes surgem como parte das soluções de manejo mais sustentáveis, com potencial para substituir, integral ou parcialmente, insumos sintéticos, a fim de contornar limitações produtivas das culturas agrícolas (REIS JUNIOR, 2025, p. 72).

2.3. FITONEMATOIDES

Segundo Machado e Castro (2017), os fitonematoides podem causar grandes perdas na agricultura, apresentando resistência à ação de pesticidas convencionais. Em campos cultivados, inclusive onde ocorre ausência de rotação de culturas, a taxa populacional aumenta significativamente. Dentre os nematoides descritos como patógenos de plantas, os nematoides-das-lesões-radiculares (“root-lesion nematodes”), pertencentes ao gênero *Pratylenchus spp.*, é mundialmente reconhecido como um dos maiores problemas em culturas de grande importância econômica, como, soja, milho,

algodão, feijão, café, cana-de-açúcar, além de diversas forrageiras, hortaliças e frutíferas (GOULART, 2008, p. 5).

Segundo pesquisadores da Embrapa Cerrados, praticamente todos os municípios visitados no Estado do Mato Grosso, apresentaram relatos de elevadas perdas de produção (em geral até 30 %) causadas por nematoides, especialmente do gênero *Pratylenchus spp.* (GOULART, 2008, p. 5) sendo que espécies do gênero *Meloidogyne spp.* chegam a causar redução de 70% da produção de tomate de acordo com levantamento publicado por Sasser e Freckman (1987).

Dessa forma, entende-se que os fitonematoides são pragas de elevado poder destrutivo na agricultura, atingindo as principais culturas econômicas e causando diversos danos e prejuízos, podendo até inviabilizar o solo. Devido à dificuldade de controle há necessidade de soluções mais eficazes.

2.4. BIOCONTROLE

O biocontrole se trata de uma alternativa sustentável utilizando organismos vivos como fungos, bactérias e nematoides de vida livre, para controlar pragas ou doenças em plantas, promovendo equilíbrio ecológico e reduzindo impactos ambientais. Fungos e bactérias têm sido empregados neste controle, diminuindo a densidade populacional do parasita no campo e equilibrando a microbiota do solo, tornando-o supressivo ao patógeno (Padilha & Samuell, 2000).

Segundo Tian et al. (2007) bactérias nematófagas podem atuar de forma antagônicas sobre os nematoides, em especial, por parasitismo, produção de toxinas, antibióticos, enzimas, inclusive induzindo a resistência vegetal sistêmica e como promotores do crescimento. A capacidade de produzir metabólitos secundários inibitórios (toxinas) e de causar patologias nos nematoides acarreta efeitos sobre a eclosão, desenvolvimento, motilidade e mortalidade, reduzindo a invasão das raízes das plantas por estes parasitas (Siddiqui & Mahmood, 1993; Costa et al., 2002).

Fungos e bactérias têm sido empregados neste controle, diminuindo a densidade populacional do parasita no campo e equilibrando a microbiota do solo, tornando-o supressivo ao patógeno (Padilha & Samuell, 2000); sendo assim mostra-se eficaz as técnicas de biocontrole para serem implementadas de forma consistente na agricultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA MICROBIANO

As bactérias avaliadas para atividade nematicida e promoção do crescimento vegetal durante os ensaios, foram identificadas pelo método de extração do DNA, o qual foi realizado pelo método CTAB 2%, onde foram retirados 2 mL da solução microbiana, após 48 h de cultivo em meio de cultura NB. O material foi centrifugado 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e 1 mL do tampão CTAB 2% foi acrescentado e 20 µL de β-mercaptoetanol (2%), incubado à 65°C por 1 h. Em seguida, 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), foram acrescentados ao material e homogeneizados, sendo centrifugados à 12000 rpm por 15 min.

A fase aquosa obtida após a centrifugação foi transferida para um novo tubo, sendo adicionado 700 µL de isopropanol, homogeneizado e incubado por 30 min à -20°C. O material foi novamente centrifugado à 12000 rpm por 15 min, o sobrenadante descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e deixado em repouso por 20 min em temperatura ambiente. Após este período, o álcool foi descartado e o material foi seco à temperatura ambiente em capela de exaustão. Ao final do procedimento, o material foi suspenso em água destilada estéril e foi adicionado 1 µL de RNase na concentração de 100 µg/mL, sendo incubado a 37°C em banho Maria.

Após a extração, as concentrações foram quantificadas através de espectrofotometria com o programa NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada por reação de PCR utilizando os primers universais para bactérias: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). A amplificação do gene 16S foi observada por eletroforese em gel de agarose 1% usando tampão TAE 1x no sistema UV Bio - Imaging Systems (MF – ChemiBis 3.2). A purificação do produto da PCR foi realizada pela enzima ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific).

O sequenciamento foi realizado usando o kit BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing (Thermo Fisher Scientific) e as amostras foram analisadas no analisador genético 3500XL (Thermo Fisher Scientific). As sequências dos genes 16S rDNA foram analisadas e montadas com o software Geneious v11.0.15. Posteriormente foram alinhadas e comparadas com as sequências de dados depositadas no GenBank empregando-se o programa BLAST. Os isolados bacterianos foram considerados ao mesmo nível de espécie quando os valores de similaridade variaram entre 97% e 100%.

3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITINASE E PROTEASE POR ISOLADOS MICROBIANOS

A produção de quitinase pelos isolados bacterianos e preparo da quitina coloidal foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sales-Oliva et al. (2019). Uma alíquota de 10 µL dos isolados foi inoculada em meio de cultura sólido composto por: 6 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 3 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ NH₄Cl, 0,5 g.L⁻¹ NaCl, 0,05 g.L⁻¹ extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de quitina coloidal e 15 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico, o pH foi ajustado para 7,0. As placas foram incubadas por cinco dias em estufa à 32°C.

A análise da atividade protease foi realizada de acordo com Oliveira et al. (2012), onde após 48 h de cultivo, os microrganismos foram semeados em placas contendo meio de cultura sólido cuja composição: 0,05 g sulfato de magnésio; 0,025 g cloreto de sódio; 0,1 g extrato de levedura; 0,1 g fosfato de potássio monobásico; 0,025 g fosfato de potássio dibásico; 3,75 g ágar bacteriológico; 4 g leite em pó desnatado; 250 mL água destilada e incubados por 24 h a 30°C em estufa de crescimento.

3.3. ENSAIO DE INTERAÇÃO BACTÉRIA/ FUNGO

Os ensaios de interação bactéria-fungo foram realizados de acordo com o método descrito por Ahmad et al. (2008), através do qual foi avaliado o efeito da antibiose microbiana. Para este ensaio, o fungo *P. lillanicus* foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA), sendo seus esporos obtidos após 5 dias de cultivo por meio de raspagem e a ressuspensão realizada em 10mL água destilada estéril. As estirpes bacterianas foram previamente cultivado em meio de cultura líquido Dygs por 48h em shaker rotativo à 180rpm e 32°C. Após obtenção das culturas microbianas, bactérias e fungos foram dispostos em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo os esporos fúngicos dispostos em uma concentração de 10^4 e para os isolados bacterianos foram dispostas quatro alíquotas contendo uma concentração de 10^8 UFC/ mL. Os isolados foram incubados em estufa de crescimento por cinco dias à 30°C e ao abrigo da luz. A cada 24h após a incubação, foram observadas zonas de inibição formadas demonstrando o efeito antibiose presente ou ausente para as estirpes microbianas.

3.4. PROSPECÇÃO DE ISOLADOS COM ATIVIDADE NEMATIDICIDA *IN VITRO*

Para o ensaio de prospecção dos isolados com atividade nematocida, os mesmos foram cultivados em meio de cultura Dygs por 48 h. Ao final deste período, uma alíquota de 10 µL dos isolados foi transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura ágar/água sólido, onde foi realizada a interação com o nematoide. Este ensaio permitiu avaliar a capacidade dos isolados em diminuir a mobilidade dos nematoides. O período de interação foi acompanhado, com o auxílio de microscopia óptica, por sete dias, a fim de confirmar a presença ou ausência de migração destes nematoides na placa de Petri, até sua mortalidade. O ensaio de prospecção foi realizado com o nematoide de vida livre *Panagrellus* sp., o qual vem sendo cultivado em laboratório em meio de cultura ágar/aveia. A partir deste ensaio, as estirpes selecionadas foram acondicionadas para ensaios com ovos e larvas do fitonematoide *Meloidogyne incognita*, bem como ensaios em casa de vegetação.

3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após realização dos ensaios *in vitro*, as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nematoides *Panagrellus sp.* foram realizadas, a fim de visualizar mudanças morfológicas em sua cutícula, em ensaio antagonico com bactérias. Sendo assim, após as larvas serem incubadas com bactérias em meio de cultura líquido à 30°C em shaker rotativo a 180rpm, foram fixadas em solução composta glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,1M por 48h, seguidos de lavagem no mesmo tampão e desidratação em series gradativas de álcool sobre suporte metálico e metalização com ouro paládio. As amostras foram observadas em MEV Jeol com uma voltagem de 20kV (Rocha et al., 2020).

3.6. ANÁLISE DE BIOFILME

Para a quantificação do biofilme, foi realizada em placa de 96 poços, incubada com bactéria em meio de cultura NB à 30°C por 48h. Após incubação dos isolados, a placa foi lavada em água destilada e 200uL do corante cristal violeta 1% foi distribuído na placa por 10 min e descartado em seguida, levado a secagem em estufa 40°C por 2h. Após o processo de secagem foram acrescentados 200uL de ácido acético 30%. A quantificação foi obtida através da leitura em espectrofotômetro *versamax* com absorvância de 540nm pelo programa *SoftmaxPro*.

3.7. DELINEAMENTO E AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

Para avaliar o incremento de biomassa durante a promoção do crescimento vegetal, foram selecionadas estirpes a partir dos resultados obtidos durante os ensaios de caracterização descritos acima, bem como o fungo *Paecilomyces sp.* Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ. O substrato utilizado para compor as unidades experimentais foi o *Basaplant® Hortaliças* e as sementes de milho foram dispostas em tubetes. O preparo

do inóculo foi dado em meio Dygs pH 6.0 e o mesmo foi incubado em shaker rotativo por 48h à 180rpm.

Em casa de vegetação, após o preenchimento dos tubetes com substrato, foram distribuídas três sementes de milho variedade santa Helena (SHS5050). Após a distribuição das sementes, o inóculo foi aplicado diretamente no solo com o auxílio de uma micropipeta, sendo um volume final de 10mL para cada estirpe. O delineamento experimental foi dado de forma casualizada e a germinação foi acompanhada por 30 dias com um total de 5 repetições para cada estirpe. Após 30 dias, foram avaliados parâmetros como: altura da parte aérea, comprimento da raiz, peso fresco e seco da parte aérea e raiz. Ao final do experimento, foi obtido a biomassa total de parte aérea e raiz da planta após a inoculação.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para todos os ensaios as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *GraphPad prism* 5.0. Após as análises de caracterização da promoção de crescimento vegetal e biocontrole *in vitro* das bactérias, foram obtidas as médias e desvio padrão para cada ensaio realizado e a comparação dos dados foi dada através de teste *Tukey*. Para os resultados em casa de vegetação, foi realizado o teste de *Scott-Knott* e obtidas médias e desvio padrão de cada ensaio. Para todos os ensaios, o nível de significância será considerado quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS OBTIDOS NO RIO ITAPEMIRIM- ES

Foram isolados um total de 105 estirpes das quais foram pré-selecionadas 22 a partir de as de caracterizações quanto a forma e características da sua colônia, variando entre colônias circulares e filamentosa, com bordos ondulados ou lisos, elevação plana ou elevada, em sua grande maioria a superfície se apresentou lisa/ brilhante, bem como seu comportamento com a luz opaca e poucas se apresentaram translúcida. A

morfologia celular também foi demonstrada sendo entre estas cocos, bastões curtos, bastões longos, actinomorfos e leveduriformes. A coloração gram demonstrou a presença de um número de elevados de organismos gram positivos e um número menor de gram negativa. Os meios de cultivo Dygs e NB líquidos foram demonstrados como meios de cultivo padrão para o crescimento das estirpes. Após os resultados obtidos, das 105 estirpes do projeto da Dr.^a Letícia Oliveira da Rocha, 8 isolados microbianos foram selecionados e foram investigados quanto as características de promoção de crescimento e biocontrole de fitopatogénos para o atual projeto.

5.2. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS MICROBIANA

Através dos ensaios realizados com meio de cultura minimo contendo proteína do leite e quitina coloidal, foi possível demonstrar que as estirpes bacterianas apresentaram ambas as atividades. No entanto, para ensaios de protease foi possível demonstrar que as estirpes bacterianas CCES62 e CCES53 não apresentaram a presença de halo de protease. Para o ensaio com quitina coloidal, somente a estirpe CCES39 demonstrou a presença de halo para degradação de quitina, característica essencial para seleção de estirpes capazes de promover o biocontrole de fitonematoides, visto a presença de quitina em sua cutícula. No entanto, foi observado ainda, que além da formação de halos, algumas colônias bacterianas em meio de quitina apresentaram ramificações (CR) indicando alterações morfológicas e no padrão de crescimento dessas bactérias.

Tabela 1. Valores medianos para a síntese de enzimas hidrolíticas bacterianas.

HALO DE SOLUBILIZAÇÃO (cm)								
Estirpes	06C	67	21	63	39	74	53	62
Quitina	0	0	0	0	0,65	0	0	0
OBS	HPV, CR	HPV, CR	HPV, CR	HPV, CR	CH, CR	HPV, CR	SH, SR	SH, SR
Protease	0,55	0,8	1,05	1,1	1,225	0,475	0	0
OBS	CH, SR	CH, SR	CH, SR	CH, SR	CH, SR	CH, SR	SH, SR	SH, SR

SH= sem halo CR= com ramificações HPV= halo pouco visível
CH= com halo SR= sem ramificações

5.3. INTERAÇÃO FUNGO/ BACTÉRIA

A interação fungo/bactéria foi realizada, a fim de identificar o desenvolvimento das bactérias e fungos em consórcio, visto sua interação presente no solo. Então, após cinco dias de incubação, foram avaliadas as placas contendo o fungo *Paecilomyces lilacinus* (fig. 1) em combinação com diferentes estirpes bacterianas, com o objetivo de verificar o crescimento e a interação entre esses microrganismos. A interação foi classificada como positiva quando ambos apresentaram crescimento concomitante, sem sinais de inibição ou competição evidente. A interação positiva foi demonstrada para as estirpes CCES34, CCES21, CCES67, CCES06, CCES53, CCES39 e CCES62. Esse resultado essencial para a etapa de seleção de microrganismos com potencial nematicida, uma vez que a compatibilidade entre eles é um critério importante para a formulação de um bioinsumo.

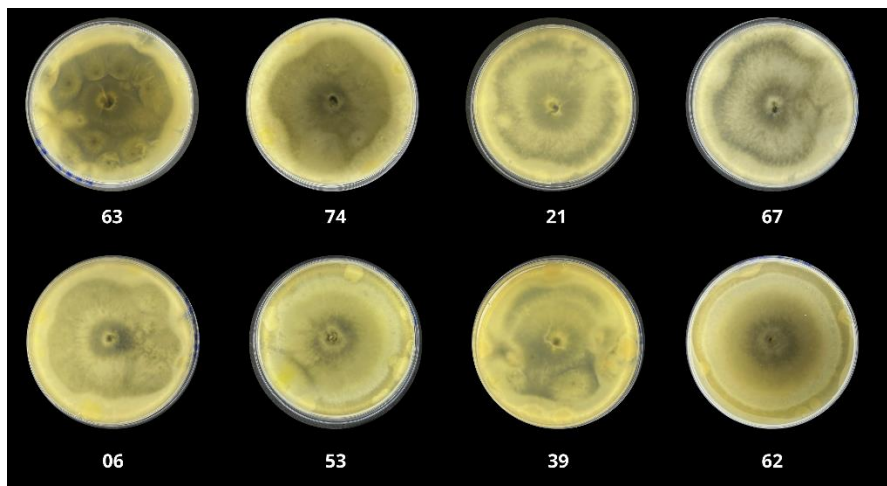


Figura 1. Ensaio de compatibilidade. Observação da interação bactéria/fungo, demonstrando que as estirpes bacterianas CCES74, CCES21, CCES67, CCES06, CCES53, CCES39 e CCES62, apresentaram compatibilidade positiva na presença do fungo *Paecilomyces lilacinus*. A estirpe CCES63 apresentou antagonismo, com inibição do crescimento do fungo na região de contato com a colônia bacteriana.

5.4. PROSPECÇÃO DE ISOLADOS COM ATIVIDADE NEMATICIDA *IN VITRO*

Para o ensaio de motilidade e mortalidade de nematoides, após cinco dias de observação para a interação das larvas com as oito estirpes bacterianas (fig. 2), com larvas do nematoide de vida livre *Panagrellus spp.*, foi possível observar a formação de um filme envolvendo os nematoides, o que levou a diminuição da motilidade e/ou a mortalidade das larvas. Além da formação do filme bacteriano, foi possível visualizar também um agregado celular formado em volta destas larvas. Este ensaio, possibilitou também a caracterização da atividade nematicida dos isolados bacterianos. Também foram identificados indivíduos em reprodução e em fase juvenil, durante a realização do ensaio.

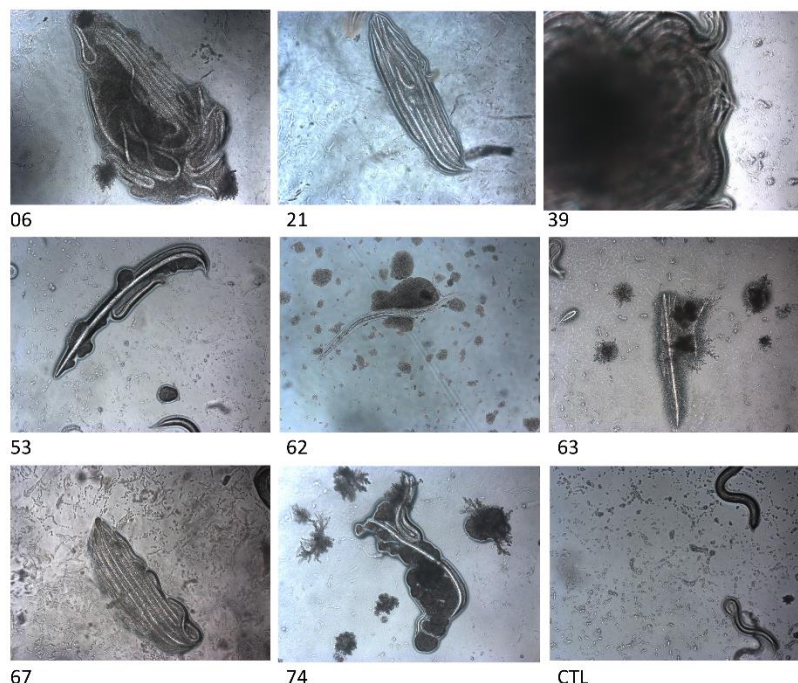


Figura 2. Atividade nematicida das estirpes bacterianas. Após cinco dias, foram observadas a interação entre bactérias e o nematoide de vida livre *Panagrellus spp.*, o qual foi observado a presença de um filme, bem como a presença de aglomerado bacteriano. As imagens demonstraram a interferência na motilidade dos nematoides, pelas estirpes CCES06 (A), CCES21 (B), CCES39 (C), CCES53 (D), CCES62 (E), CCES63 (F), CCES67 (G), controle negativo (H) e CCES74 (I).

5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou visualizar e avaliar os danos estruturais apresentados nas cutículas dos nematoides (fig. 3). Sendo assim, após a interação entre as oito estirpes bacterianas do nematoide de vida livre *Panagrellus spp.* Através das imagens foi possível observar a presença de um biofilme envolvendo os nematoides, formado pelas bactérias, bem como a formação de agregados bacterianos aderidos à superfície corporal dos nematoides. Também foram observadas alterações

cuticulares, incluindo regiões com sinais de degradação. Sendo assim, esses resultados demonstram a atividade nematicida das bactérias sobre os nematoides, comprovando a atividade nematicida das estirpes bacterianas nos ensaios de prospecção em placas de meio de cultura ágar/água demonstrados anteriormente.

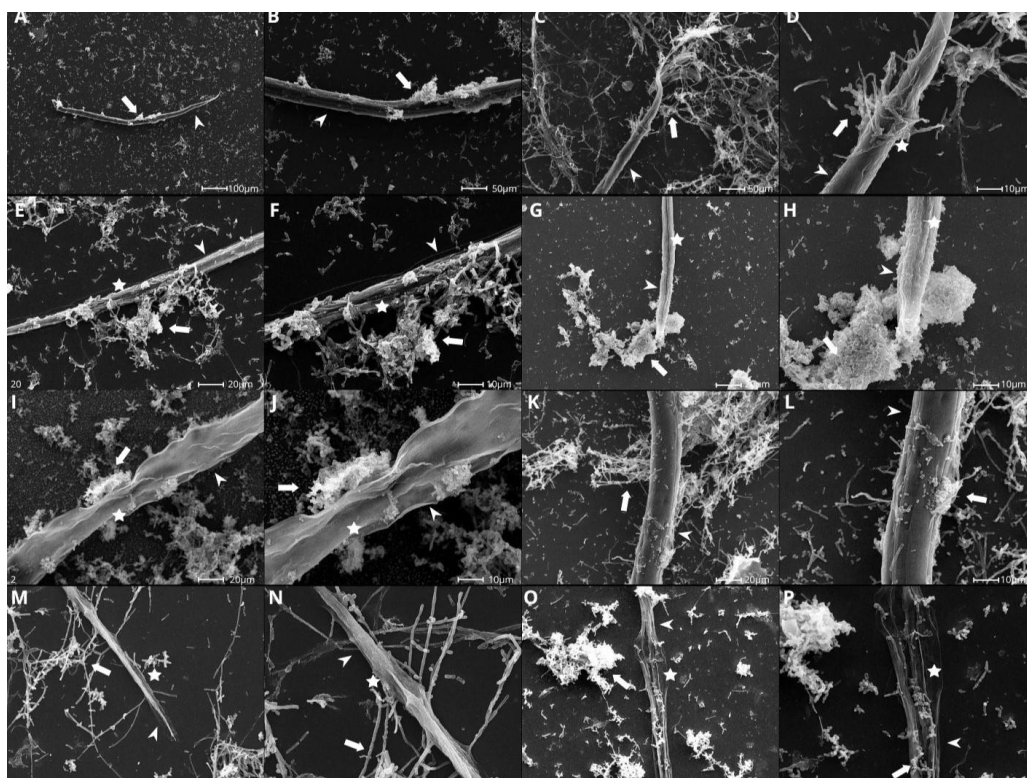


Figura 3 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens foram obtidas após a fixação das estirpes bacterianas, A e B CCES06; C e D CCES21; E e F CCES39; G e H CCES53; I e J CCES62; K e L CCES63; M e N CCES67; O e P CCES 74, em interação com o nematoide *Panagrellus* spp., evidenciando a formação de agregados bacterianos aderidos à superfície corporal (seta larga) e alterações na cutícula dos nematoides (estrela). A cabeça de seta representa o nematoide. As imagens foram obtidas em microscópio de varredura JEOL em voltagem de 20kV.

5.6. PRODUÇÃO DE BIOFILME

A quantificação de biofilme foi obtida através da leitura em espectrofotômetro (fig. 4), onde foi observado que as estirpes CCES39, CCES62, CCES06, CCES74, CCES53 apresentaram maior capacidade de produção de biofilme em comparação ao controle. Em contrapartida, as estirpes CCES21, CCES67, CCES63 apresentaram valores iguais ou inferiores ao controle, não evidenciando produção significativa de biofilme ou sua baixa produção.

A capacidade de formação de biofilme observada nas estirpes CCES39, CCES62, CCES06, CCES74 e CCES53 sugere maior potencial de colonização e proteção da raiz de diferentes plantas, bem como a maior tolerância a estresses abióticos. Além disso, durante os ensaios foi observada a aderência de fitonematoides ao biofilme formado por algumas dessas estirpes, indicando que essa estrutura pode contribuir para o aprisionamento dos nematoides.

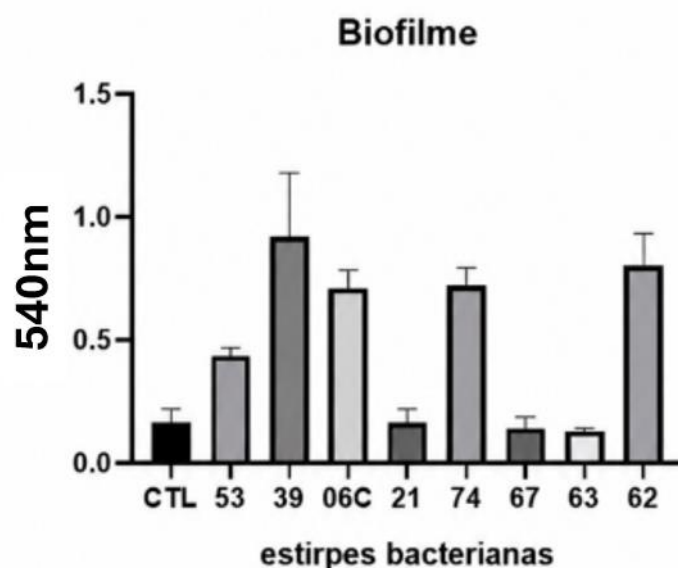


Figura 4. Quantificação da produção de biofilme. A quantificação de biofilme foi observada para as estirpes CCES39, CCES62, CCES06, CCES74, CCES53 que apresentaram maior capacidade de produção de biofilme em comparação ao controle. Em contrapartida, as estirpes CCES21, CCES67, CCES63 apresentaram valores iguais ou inferiores ao controle pelas estirpes bacterianas, determinada pelo método do cristal violeta, quantificada em espectrofotometro com absorbância a 540 nm.

5.7. AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL EM CASA DE VEGETAÇÃO

Durante a avaliação da promoção de crescimento vegetal, foi demonstrado que as bactérias inoculadas foram capazes de modular o crescimento das plantas de milho, sendo capazes de promover a alteração dos parâmetros de crescimento das plantas, bem como a atividade microbiana e densidade populacional da microbiota do solo.

Os parâmetros de biomassa das plantas de milho foram avaliados e através destes foi possível demonstrar a influência sobre o peso seco referente a parte aérea,

para as estirpes CCES21 (0,65g), CCES62 (0,59g), CCES39 (0,57g), CCES06C (0,57g) e CCES53 (0,55), respectivamente. A influência destas estirpes também pode ser demonstrada, quando avaliado a peso fresco da parte aérea das plantas de milho, apresentando uma modulação positiva quando comparadas ao controle (fig. 5).

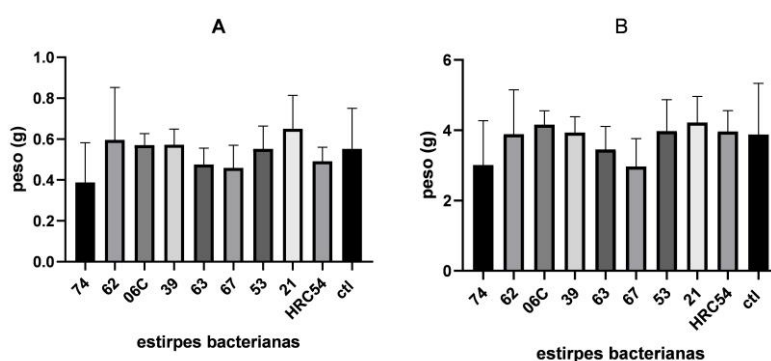


Figura 5. Biomassa vegetal parte aérea. A biomassa vegetal na parte aérea foi demonstrada através do peso seco (A) e fresco (B), principalmente para as estirpes CCES21, CCES62, CCES39, CCES06C e CCES53. O controle positivo foi realizado com *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), sendo o controle negativo somente com água à vontade. Todo ensaio foi realizado com cinco réplicas.

A influência das estirpes também foi demonstrada sobre o aumento da biomassa seca e fresca da raiz de plantas de milho. Sendo assim, para a análise do peso seco da raiz as estirpes CCES21, CCES62, CCES39, CCES06C e CCES53 proporcionaram um aumento da biomassa seca nas raízes. No entanto, o aumento da biomassa fresca de raízes de milho foi proporcionado pelas estirpes CCES21, CCES63, CCES39, CCES67 e CCES53, sendo estes resultados superiores ao controle (fig. 6).

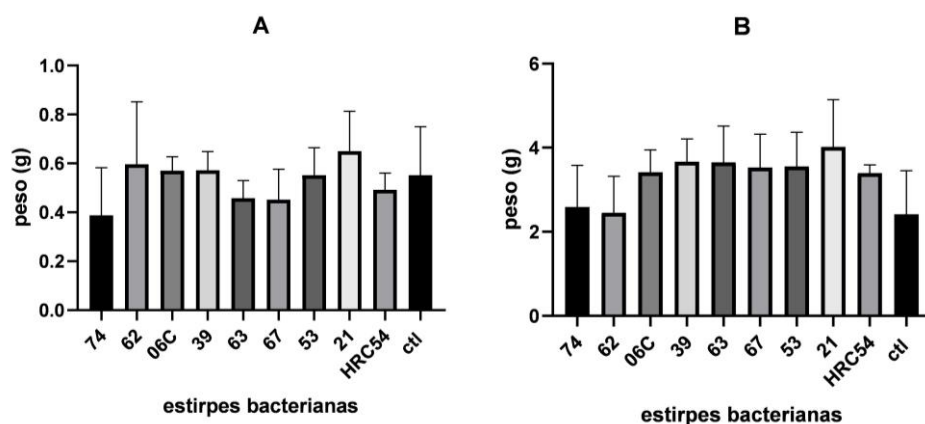


Figura 6. Biomassa vegetal da raiz. A biomassa vegetal na raiz foi demonstrada através do peso seco (A) para as estirpes CCES21, CCES62, CCES39, CCES06C e CCES53 e fresco (B) principalmente para as estirpes CCES21, CCES39, CCES63, CCES67, CCES53 e CCES06C. O controle positivo foi realizado com *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), sendo o controle negativo somente com água à vontade. Todo ensaio foi realizado com cinco réplicas.

O aumento da biomassa foi demonstrado para as raízes de milho, após inoculação das estirpes. Para ambos, biomassa seca (A) foi observado que as estirpes CCES21, CCES62, CCES39, CCES06C e CCES53 apresentaram uma modulação positiva quando comparadas ao controle. Em contrapartida, o aumento da biomassa fresca (B) foi influenciado pelas estirpes CCES21, CCES39, CCES63, CCES67, CCES53 e CCES06C. Todo ensaio foi realizado com 5 réplicas e foram usados um controle positivo com *H. seropedicae* HRC54 e controle negativo (planta testemunha).

Além dos parâmetros de peso fresco e seco, foi avaliado o comprimento das plantas (fig. 7) como um indicador do efeito das estirpes bacterianas na promoção de crescimento vegetal. Observou-se que as estirpes CCES06, CCES39, CCES62 e CCES74 induziram um aumento significativo ($p < 0,05$) no comprimento total das plantas,

sugerindo um papel relevante dessas bactérias na melhoria do desenvolvimento estrutural da cultura de milho.

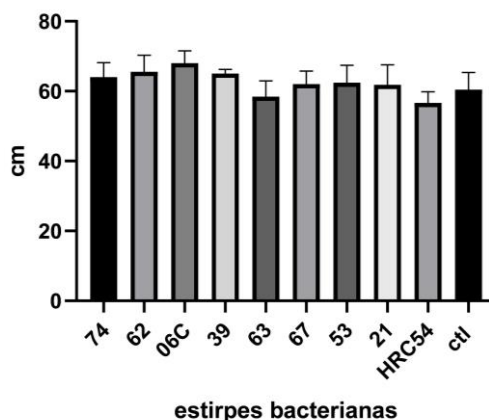


Figura 7. Comprimento total vegetal. O comprimento total vegetal foi demonstrado para as estirpes CCES06, CCES39, CCES62 e CCES74, onde $p < 0,05$. O controle positivo foi realizado com *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), sendo o controle negativo somente com água à vontade. Todo ensaio foi realizado com cinco réplicas.

A densidade populacional microbiana foi demonstrada através da presença de unidades formadoras de colônia (UFC/g de solo), sendo possível demonstrar uma variação da população de bactérias presentes em solo rizosférico (tabela 2), quando comparada ao controle. Sendo assim, foi possível observar que a bactéria CCES74 apresentou um aumento da densidade populacional de $1,46 \times 10^7$, seguida das estirpes CCES21 ($2,1 \times 10^9$), CCES53 ($1,3 \times 10^9$), CCES63 ($3,1 \times 10^9$), CCES06C ($2,3 \times 10^9$) e CCES62 ($1,5 \times 10^9$).

Tabela 2. Densidade populacional bacteriana demonstrada durante a contagem de UFC/g de solo rizosférico.

UFC/g de solo rizosferico				
Estirpes bacterianas	nº de colônias			
	-4	-5	-6	-7
CCES74	$4,1 \times 10^6$	$6,8 \times 10^7$	$4,3 \times 10^8$	$1,46 \times 10^{10}$
CCES62	3×10^7	$2,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$
CCES06C	$5,6 \times 10^6$	$1,39 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$
CCES39	$5,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	8×10^8
CCES63	3×10^6	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$3,1 \times 10^9$
CCES67	3×10^6	$1,6 \times 10^7$	8×10^7	4×10^8
CCES53	$2,5 \times 10^6$	3×10^7	$2,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$
CCES21	$2,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$2,06 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
HRC54	$5,2 \times 10^6$	3×10^8	$2,6 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$
ctl	$3,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$

Sabendo-se que a densidade populacional pode afetar atividade metabólica microbiana do solo, esta foi demonstrada para solo rizosférico através do método de diacetato de fluoresceína (fig. 8). Sendo assim, pode-se observar que a estirpe CCES74 apresentou maior atividade quando comparada ao controle, seguido da CCES06C. No entanto, quando observado a atividade da bactéria CCES39 pode-se observar uma alta atividade, mesmo quando sua densidade populacional foi de 8×10^8 . Através da análise estatística foi possível demonstrar a diferença significativa para atividade bacteriana quando $p < 0,0001$.

A atividade microbiana foi demonstrada através do método de degradação do diacetato de fluoresceína, através do qual a quantidade de fluoresceína liberada foi quantificada com auxílio de um espectrofotômetro em comprimento de onda de 420nm. A análise foi realizada em triplicata e o cálculo para concentração final de fluoresceína foi realizado através da equação da reta $y = 0,0433x + 0,0679$ obtida através da construção da curva padrão. A atividade metabólica microbiana foi observada para as estirpes CCES39, CCES74, CCES06C e CCES62, onde $p < 0,0001$.

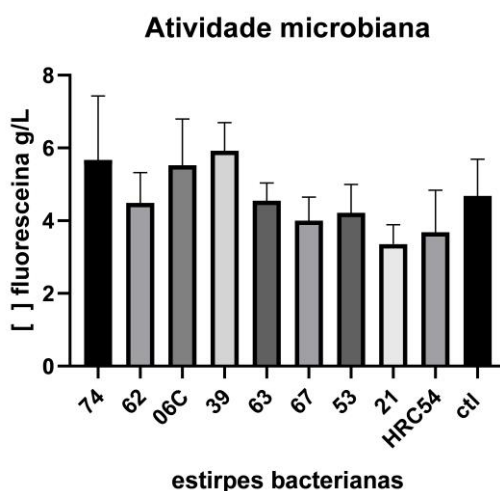


Figura 8. Atividade microbiana do solo. A atividade microbiana do solo foi demonstrada através da presença de fluoresceína/ g de solo. Sendo observado a maior atividade metabólica microbiana para as estirpes CCES39, CCES74, CCES06C e CCES62, onde $p < 0,0001$. O controle positivo foi realizado com *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), sendo o controle negativo somente com água à vontade. Todo ensaio foi realizado com cinco réplicas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram selecionar estirpes bacterianas com potencial para aplicação como agentes promotores do crescimento vegetal e biocontrole de fitonematoides. As estirpes selecionadas foram a CCES39 e CCES06, apresentaram diferentes características de interesse biotecnológico, incluindo produção de enzimas hidrolíticas, formação de biofilme, atividade nematicida, compatibilidade com *Paecilomyces lilacinus* e capacidade de promover incremento na biomassa e no desenvolvimento de plantas de milho. Além disso, as análises por microscopia eletrônica de varredura evidenciaram alterações estruturais nos nematoides e intensa interação entre as bactérias e os organismos avaliados, corroborando os resultados observados nos ensaios.

Em conjunto, esses resultados indicam que as estirpes selecionadas apresentam elevado potencial para o desenvolvimento de bioinoculantes destinados ao manejo

sustentável de fitonematoides e à promoção do crescimento vegetal, contribuindo para a redução da dependência de insumos químicos na agricultura. Entretanto, estudos complementares, como ensaios e avaliações em condições de campo, são necessários para viabilizar futuras aplicações agrícolas.

REFERÊNCIAS

Araújo, F. F. de.; Guerreiro, R. T. “Bioprospecção de Isolados de *Bacillus* promotores do crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural”. *Ciência agro tecnológica Lavras*. v. 34, p. 837-844, 2010.

Berraquero, F. R.; Baya, A. M.; Cormenzana, A.R.; “Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo”. *Ars Pharmaceutica*. v. 17, p. 399-406, 1976.

Dilkin, E. R. da S.; Matias, R.M.; Corrêa, B.O.C.; Guedes, N.M.R.; “Uso de pesticidas em Mato Grosso do Sul: riscos e contaminação em aves e suas consequências”. *Revista Concilium*. v. 22, 2022.

Gírio, L. A. da S.; Dias, F. L. F.; Reis, V. M.; Urquiaga, S.; Schultz, N.; Bolonhezi, D.; Mutton, M. A.; “Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas”. *Pesquisa agropecuária brasileira*. v.50, p.33-43, 2015.

Gu, S. H.; Wan, W.; Shao, Z. Y.; Zhong, W.; “High -throughput method for detecting siderophore production by rhizosphere bacteria”. *Bio-protocol*. v. 11, p. 4001, 2021.

Leite, M.F.A.; Dimitrov, M.R.; Freitas-Iório, R.P.; Hollander, M. de; Cipriano, M.A.P.; Andrade, S.A.L.; Silveira, A.P.D.; Kuramae, E.; “Rearranging the sugarcane holobiont via plant growth-promoting bacteria and nitrogen input”. *Science of the Total Environment*. v. 800, p. 149493, 2021.

LOVEYS, B.R.; BIRD, A.F. “The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants”. *Physiological Plant Pathology*. v. 3, p. 525-629, 1973.

Molinari, S.; Leonetti, P.; “Bio-control agents activate plant immune response and prime susceptible tomato against root-knot nematodes”. *PLoS ONE*. v. 14, 2019.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. v. 6, 2012.

Ranawat, B., Pooja, B.; Aneesha, S.; Sandhya, M.; “Enterobacter hormaechei as Plant Growth-Promoting Bacteria for Improvement in Lycopersicum esculentum”. Current Microbiology. v.78, p. 1208 – 1217, 2021.

Salas-Oliva, R.; Gálvez-López, D.; Vázquez-Ovando, A.; Salvador-Figueroa, M.; Rosas-Quijano, R.; “Isolation and identification of marine strains of Stenotrophomona maltophilia with high chitinolytic activity. Peer J. v. 7, p. 6102, 2019.

Sharma, I.P.; Sharma A.K.; “Co-inoculation of tomato with an arbuscular mycorrhizal fungus improves plant immunity and reduces root-knot nematode infection”. Rhizosphere. v. 4, p. 25-28, 2017.