UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

THIAGO ROSA PIANETTI

***Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 como biocontroladores e crescimento vegetal**

Porto Alegre

2026

THIAGO ROSA PIANETTI

***Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 como biocontroladores e crescimento vegetal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof Dra. Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre

2026

CIP - Catalogação na Publicação

Pianetti , Thiago Rosa
Potencial de Bacillus altitudinis 1.4 e Pseudomonas fluorescens 5.4 como biocontroladores e promotores de crescimento em tomateiro / Thiago Rosa Pianetti . -- 2026.
151 f.
Orientador: Amanda de Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Microbiologia . 2. Bioinsumos. 3. Biocontrole. 4. Fitopatógenos. I. da Motta, Amanda de Souza, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Nenhum outro planeta no Sistema Solar é uma boa casa para os seres humanos; temos esse mundo ou nada” -

Carl Segan

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, professora doutora Amanda de Souza da Motta pelo seu empenho e atenção durante toda a minha trajetória. Suas lições e ensinamentos estarão sempre presentes ao meu desenvolvimento profissional, acadêmico e pessoal.

Agradeço a todos e todas do laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As minhas colegas de trabalho em especial, Gabriela Simões, Gabriela Doncato, Mariana Salvador. Expresso com muito carinho todo os momentos de colaboração que tivemos em conjunto ao longo desse tempo, obrigado por me acolherem de maneira tão calorosa. Desejo o melhor para todos, assim como muito sucesso profissional e pessoal, o meu mais sincero obrigado por tudo. Aos laboratórios de parasitologia e o Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais Microbianos os quais estabelecemos parcerias que auxiliaram na complementaridade desse trabalho.

A equipe do laboratório de Biotecnologia Vegetal da PUCRS. Em especial, o professor doutor Leandro Astarita pelos aconselhamentos e por permitir utilizar o espaço do laboratório. As alunas de doutorado Luísa Machado e Jéssica Freitas pelas conversas, aconselhamento e atenção ao decorrer deste trabalho. Aos bolsistas de iniciação científica que se dispuseram a auxiliar nos experimentos *in vivo*. Obrigado a todos vocês pelo apoio, companheirismo e confraternizações

À minha família, em especial meu pai Gilton Pianetti, minha mãe Tatiana Rosa e minha irmã Cássia Pianetti pelas lições, carinho, paciência e acolhimento ao longo da minha caminhada. Aos meus familiares, em especial minhas avós Geni, Sônia e avôs Milton e Manoel. A minha grande amiga Andressa Piva que é uma irmã para mim. A todos os meus amigos e amigas que sempre estão comigo, saibam o quão especiais são para mim. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Bacillus altitudinis 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 como biocontroladores e crescimento vegetal

Autor: Thiago Rosa Pianetti

Orientador(a): Prof(ª). Dr(ª). Amanda de Souza da Motta

RESUMO

A bioprospecção de bactérias para promoção de crescimento e defesa vegetal nas culturas agrícolas tornou-se um dos principais focos na área da agricultura. Com base nisso, o estudo buscou avaliar a aplicabilidade de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4, isoladamente e em consórcio, como agentes de biocontrole e promotores de crescimento em tomateiros. A inocuidade e a coexistência dos isolados foram avaliadas, bem como o potencial antimicrobiano frente a microrganismos de importância ambiental. As propriedades relacionadas à promoção do desenvolvimento vegetal foram avaliadas pela produção de sideróforos e auxinas, solubilização de fosfato, colonização de raízes de tomateiro e ensaios *in vivo*. Os achados do estudo demonstraram que *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 são inócuas e capazes de coexistir no mesmo meio de cultivo. Nos testes contra microrganismos alvos, *B. altitudinis* 1.4 inibiu *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum*, enquanto *P. fluorescens* 5.4 e o consórcio inibiram *Proteus vulgaris* C30, *Proteus hooseri* BJY, *Candida albicans* ATCC 90022 e *M. phaseolina*. Os ensaios voltados à avaliação de características de promoção do crescimento vegetal indicaram que os isolados têm habilidade de produzir sideróforos e auxinas, solubilizar fosfato de cálcio tribásico e colonizar raízes de tomate. Durante os experimentos *in vivo,* a aplicação individual e em consórcio de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 não resultou em diferença significativa no crescimento vegetal dos tomateiros. Logo, esses resultados indicam o potencial para o desenvolvimento de um bioproduto focado no biocontrole de microrganismos fitopatógenos *in vivo*.

Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (151 p.) abril, 2026.

Bacillus altitudinis 1.4 and *Pseudomonas fluorescens* 5.4 as biocontrol agents and plant growth promoters

Author: Thiago Rosa Pianetti

Advisor: Prof. Dra Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

Bioprospecting for bacteria to promote plant growth and defense in crops has become a major focus in the field of agriculture. Based on this, the study sought to evaluate the applicability of *Bacillus altitudinis* 1.4 and *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4, alone and in combination, as biocontrol agents and growth promoters in tomato plants. The safety and coexistence of the isolates were evaluated, as well as their antimicrobial potential against microorganisms of clinical and environmental importance. Properties related to promoting plant development were assessed by siderophore and auxin production, phosphate solubilization, tomato root colonization, and in vivo assays. The study findings demonstrated that *B. altitudinis* 1.4 and *P. fluorescens* 5.4 are harmless and capable of coexisting in the same culture medium. In tests against indicator microorganisms, *B. altitudinis* 1.4 inhibited *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Macrophomina phaseolina*, and *Fusarium oxysporum*, while *P. fluorescens* 5.4 and the consortium inhibited *Proteus vulgaris* C30, *Proteus hooseri* BJY, *Candida albicans* ATCC 90022, and *M. phaseolina*. Tests focused on evaluating plant growth-promoting characteristics indicated that the isolates could produce siderophores and auxins, solubilize tribasic calcium phosphate, and colonize tomato roots. During *in vivo* experiments, the individual and combined application of *Bacillus altitudinis* 1.4 and *Pseudomonas fluorescens* 5.4 did not demonstrate a significant difference in the plant development of tomato plants. Therefore, these results indicate the potential for the development of a bioproduct focused on the biocontrol of phytopathogenic microorganisms *in vivo*.

Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (151 p.) month, 2026

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. OBJETIVOS 18

2.1 Objetivo Geral 18

2.2 Objetivos Específicos 18

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

3.1 Tomate 19

3.2 Doenças que ameaçam a cultura do tomate 21

3.3 Manejo e métodos alternativos de controle de doenças da cultura 25

3 4. Bactérias benéficas para a agricultura 26

3 5. *Bacillus* 28

3.5.1 *Bacillus altitudinis* 29

3.6 Pseudomonas 30

3.6.1 *Pseudomonas fluorescens* 32

3.7 Consórcio Bacteriano 32

3.8 Bioinsumos no controle biológico 34

4. MATERIAL E MÉTODOS 36

4.1 Microrganismos e condições de cultivo 36

4.2 Avaliação da hemólise, gelatinase e suscetibilidade a antimicrobianos 37

4.3 Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e Pseudomonas fluorescens P.L 5.4. 38

4.4 Biocontrole in vitro frente a microrganismos de importância ambiental e cepas certificadas 39

4.5 Curva de Crescimento Bacteriano 40

4.6 Avaliação da produção de exopolissacarídeo (EPS) 41

4.7 Avaliação da produção de biofilmes pelas bactérias *Bacillus altitudinis* 1.4 e 41

Pseudomonas fluorescens P.L 5.4 pelo método do cristal violeta 41

4.8 Solubilização de fosfatos em placa 42

4.9 Produção de sideróforos e fitohormônios 43

4.10 Avaliação de atividade antifúngica *in vitro* 44

4.11 Capacidade de colonização de raiz 44

4.12 Avaliação das bactérias e consórcio na promoção do crescimento vegetal em plantas de tomate 45

4.13 Análise estatística 47

5. RESULTADOS 48

5.1 Avaliação da hemólise, gelatina e suscetibilidade a antimicrobianos 48

5.2 Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4. 49

5.3 Biocontrole *in vitro* frente a microrganismos de importância ambiental e cepas certificadas 51

5.4 Curva de Crescimento Bacteriano 53

5.5 Avaliação da produção de exopolissacarídeo (EPS) 57

5.6 Avaliação da produção de biofilmes pelas bactérias *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 pelo método do cristal violeta 58

5.7 Solubilização de fosfatos em placa 59

5.8 Produção de sideróforos e fitohormônios 60

5.9 Avaliação de atividade antifúngica in vitro 62

5.10 Microbiolização de sementes de tomate 65

5.11 Promoção de crescimento vegetal em tomateiros 67

6. DISCUSSÃO 70

7. CONCLUSÃO 82

8. REFERÊNCIAS 83

9. APÊNDICES 108

10. ANEXO 148

10.1 Condição de microrganismos de trabalho 148

10.2 Determinação das unidades arbitrárias (UA/mL) 148

10.3 Ensaio de atividade amebicida *in vitro* 149

10.4 Resultados preliminares da determinação das unidades arbitrárias (UA/mL). 151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação de biocontrole de *B. altitudinis* 1.4, *P. fluorescens* 5.4 e do consórcio bacteriano frente aos microrganismos indicadores. Os halos de inibição foram medidos em milímetros (mm). 58

Tabela 2. Média da densidade óptica obtida em espectrofotômetro (600 nm) do biofilme formado pelos tratamentos bacterianos ao serem submetidos ao método de cristal violeta a 0,1%. Na coluna da direita, constam as respectivas classificações empregadas por Stepanovic et al. (2004). 64

Tabela 3. Índice de solubilização de fosfato de cálcio tribásico das bactérias de trabalho após 7 dias de cultivo. O IS (índice de solubilização) foi obtido a partir da divisão do tamanho do halo de solubilização e o tamanho da colônia bacteriana. ... 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Mapa referente a produção nacional de tomate (IBGE, 2024). B) Mapa destacando a produtividade da cultura do tomate no estado do Rio Grande do Sul (IBGE, 2024)..... 21
Figura 2. Ciclo de vida *S sclerotium* (Mazumdar, 2021). (1) Os escleródios do solo podem desenvolver o corpo carpogênico (2a) ou micélio (2b), no caso do corpo carpogênico há formação do apotécio (3). Em seguida há a liberação dos ascósporos(4) que em conjunto das hifas infecta plantas hospedeiras (5), penetrando os tecidos vegetais (6) e colonizando o caule formando um micélio branco característica do fungo (7). Por fim há a formação das estruturas de resistência (8), os escleródios, que são dispersos no solo, reiniciando o ciclo..... 22
Figura 3 . Avaliação da atividade hemolítica pelas bactérias de trabalho. a) *Bacillus altitudinis* 1.4 classificada como beta hemolítica (hemólise total). b) *Pseudomonas fluorescens* 5.4 classificado como gama hemolítica (ausência de hemólise). 48
Figura 4. Suscetibilidade de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 frente a diferentes antibióticos. Os antibióticos utilizados para cada bactéria tiveram a lista do BrCAST de 2024 como critério de seleção. A coloração apresentada na imagem está relacionada à suscetibilidade dos microrganismos a antibióticos. (i) Em vermelho, representando “resistência”; (ii) Em amarelo, quando é classificada como “intermediária”, (iii) Em verde, sendo empregada como “suscetível” aos antibióticos. 49
Figura 5. Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 por meio de metodologia de difusão em ágar por meio de gota. a) B. altitudinis 1.4 inoculado em tapete e *P. fluorescens* 5.4, indicada pela seta azul, inoculada em gotas. b) *P. fluorescens* 5.4 inoculada em tapete enquanto *B. altitudinis* 1.4, sinalizada pela seta roxa, pipetada em gota..... 50
Figura 6. Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 por método de difusão em poço. a) *P. fluorescens* 5.4 inoculada nos poços, indicada pela seta azul, e *B. altitudinis* 1.4 inoculada em tapete. b) *B. altitudinis* 1.4 inoculado nos poços, sinalizada pela seta roxa, e *P. fluorescens* 5.4 em tapete. 51
Figura 7. Curva de crescimento de *B. altitudinis* 1.4, na linha contínua o valor de UFC/mL expresso em Log10, e na linha tracejada sua ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644, expressa em milímetros (mm). 55

Figura 8. Curva de crescimento de *P. fluorescens* 5.4, na linha contínua o valor de UFC/mL expresso em Log10, e na linha tracejada sua ação antimicrobiana frente a *C. albicans* ATCC 90022, expressa em milímetros (mm). 56
Figura 9. Curva de crescimento do consórcio microbiano, na linha contínua o valor de UFC/mL expresso em Log10, e na linha tracejada sua ação antimicrobiana frente a *C. albicans* ATCC 90022, expressa em milímetros (mm). 57
Figura 10. Testes para avaliação de síntese de exopolissacarídeos em vermelho congo. a) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, usado como controle positivo. b) *Bacillus altitudinis* 1.4. c) *Pseudomonas fluorescens* 5.4. 58
Figura 11. Produção de sideróforos em meio de cultivo suplementado com Cromoazurol S (CAS) pelos isolados *B. altitudinis* 1.4, *P. fluorescens* 5.4 e o consórcio. a) Avaliação de produção de sideróforos ao longo de 7 dias. b) Avaliação de produção de sideróforos ao longo de 14 dias. As setas destacam colônias das bactérias utilizadas no trabalho que ao longo do período do experimento. A bactéria *Burkholderia catarinensis* 89 foi utilizada como controle positivo. 61
Figura 12. Gráfico relacionado a avaliação dos tratamentos em relação a síntese de auxinas. As médias adquiridas nos experimentos foram analisadas quanto a sua normalidade por meio de shapiro-wilk, sendo p>0,05 considerado significativo. Após, os valores submetidos por ANOVA e por fim separadas por teste de Tukey. A fim de indicar a diferença estatística das médias dos tratamentos foi utilizado as letras “a” e “b”. 62
Figura 13. Imagens de placas de antibiose com *Macrophomina phaseolina*. I) tratamento controle negativo. II) Tratamento controle positivo “CLV 100”. III) Tratamento utilizando *B. altitudinis* 1.4. IV) Tratamento usando *P. fluorescens* 5.4. V) Tratamento impregnado com o consórcio bacteriano (*B. altitudinis* 1.4 + *P. fluorescens* 5.4). 63
Figura 14. Imagens de placa com *Fusarium oxysporum* cultivada ao longo de 7 dias. I) Tratamento de controle negativo apenas com o fitopatógeno. II) Controle positivo, utilizando isolado “CLV 100”. III) Tratamento utilizando *B. altitudinis* 1.4. IV) Tratamento no qual se aplicou *P. fluorescens* 5.4. IV) Ensaio no qual se aplicou o consórcio bacteriano. 64
Figura 15. Gráfico gerado a partir das análises das placas de antibiose pelo software ImageJ. Assim possibilitando analisar o desenvolvimento do micélio do fungo *M. phaseolina* frente ao tratamento com diferentes bactérias. Como controle positivo,

utilizou-se o isolado “CLV 100”. As letras nos gráficos são utilizadas para diferenciar grupos estatísticos distintos entre si e sua similaridade. 65
Figura 16. Imagem de microscopia eletrônica de varredura de raíz de tomateiro colonizado com *Bacillus altitudinis* 1.4. A) Imagem destacando células bacterianas em forma de bastonetes, em magnificação (mag) 10.000x. B) Imagem destacando células bacterianas em ampliação 12.000x. Barra de escala 10 µm 66
Figura 17. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de raíz de tomateiro colonizado com *Pseudomonas fluorescens* 5.4. A) Imagem destacando células bacterianas com ampliação 10.000x. B) Imagem destacando células bacterianas em ampliação 12.000x. Barra de escala 10 µm. 66
Figura 18. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura realizada em raízes de tomateiro colonizado com o tratamento consórcio no qual é possível visualizar células de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4, as imagens das raízes em ampliação 12.000x. Barra de escala 10 µm..... 67
Figura 19. Gráfico contendo os dados relacionados aos ensaios in vivo com tomate, utilizando diferentes tratamentos. As médias relacionadas ao comprimento das partes aéreas e das raízes não apresentaram diferença estatística. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para observar a distribuição dos dados dos dados, sendo p>0,05 significativo. As médias submetidas a teste ANOVA e essas separadas por teste de tukey. 68
Figura 20. Gráfico contendo os dados relacionados aos ensaios in vivo com tomate, utilizando diferentes tratamentos. As médias relacionadas à massa seca das partes aéreas e das raízes não apresentaram diferença estatística. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para observar a distribuição dos dados dos dados, sendo p>0,05 significativo. As médias submetidas a teste ANOVA e essas separadas por teste de tukey. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCD	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase
BDA	Batata Dextrose Ágar
DDPA	Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul
DO	Densidade óptica
EMATER	Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural
EPS	Exopolissacarídeos
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IBGE	Instituto brasileiro de geografia estatística
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
LABCEMM	Laboratório Central de Microscopia e Microanálises da PUCRS;
MAG	Magnificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NBRIP	*National botanical research institute's phosphate growth medium*
NM	Nanômetros
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
TSA	*Trypone soya agar*
TSB	*Tryptone soya broth*
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFC	Unidades formadoras de colônias
USDA	Departamento de agricultura dos Estados Unidos

1. INTRODUÇÃO

A agricultura foi desenvolvida no período paleolítico e permitiu o desenvolvimento de um novo meio de produção. Por meio desse novo sistema, foi possível desenvolver comunidades maiores de humanos, o que resultou na formação dos primeiros destacamentos da humanidade. Ao passar dos anos, novas técnicas de arado, seleção de cultivares e ferramentas foram desenvolvidas e aprimoradas com o objetivo de ampliar a produção animal e vegetal para abastecer a crescente população humana. Com adventos como a revolução verde, a produção agrícola ascendeu rapidamente por meio de novas tecnologias e instrumentos capazes de aumentar a produtividade e combater a disseminação de fitopatógenos em cultivos.

A cultura do tomate enfrenta diferentes fitopatógenos bacterianos e fúngicos, que somados impactam severamente a sua produtividade. A fim de combater a progressão das diferentes doenças que afetam essas plantas, estratégias baseadas na aplicação de pesticidas foram adotadas de maneira intensiva. Porém, ao longo dos anos, devido a intensa aplicação observou-se um processo de seletividade de fitopatógenos resistentes que se propagaram com o decorrer do tempo. Com a necessidade de utilizar maiores quantidades de produtos químicos cada vez mais concentrados, estudos que avaliam o seu possível impacto sobre cadeias tróficas e a saúde humana têm sido realizados.

Como uma alternativa sustentável, pesquisas procuram utilizar interações ecológicas para suprimir o desenvolvimento de pragas. A antibiose, inibição de um organismo por outro, é uma das técnicas mais conhecidas para avaliar a capacidade de microrganismos de controlar o desenvolvimento de outros. Essa técnica abre diversas possibilidades que visam utilizar microrganismos como as bactérias para benefício na área agrícola. Uma dessas possibilidades é a produção de bioinsumos,

produtos que em sua composição podem conter microrganismos como ingredientes ativos, capazes de auxiliar na defesa e estimular o desenvolvimento vegetal.

Em 2022, o departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) relatou o investimento de 9,5 milhões de dólares destinados ao desenvolvimento de novos bioprodutos. Recentemente, o mesmo departamento publicou um relatório no qual destacava a importância dos produtos de base biológica no país já que tais permitiram a movimentação de 489 bilhões para a economia do país, influenciando setores de produtos e permitindo o desenvolvimento de novos empregos.

Para o desenvolvimento de bioprodutos a prospecção de microrganismos com interesse biotecnológico vem sendo realizada. Os gêneros bacterianos *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. vêm se destacando em pesquisas científicas para o desenvolvimento de bioinsumos, e produtos comerciais já se encontram no mercado. Estes gêneros possuem uma diversidade de espécies que de forma isolada ou associada podem compor formulações com efeitos biocontroladores a fim de minimizar a aplicação de produtos químicos promovendo um impacto significativo na saúde humana e no ambiente. Com isso, estudos que investigam espécies destes isolados como promotores de desenvolvimento vegetal de forma direta ou indireta, e seus potenciais bioativos tornam-se necessários para que novas formulações possam ser prospectadas para futuras aplicações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Bioprospectar e avaliar a capacidade de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 como biocontroladores e promotores do crescimento vegetal.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar o efeito antibacteriano e antifúngico de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4, isoladamente e em consórcio frente a microrganismos indicadores.

2.2.2 Caracterizar *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4, isoladamente e em consórcio, como promotores do crescimento vegetal.

2.2.3 Avaliar o efeito da aplicação de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4, isoladamente e em consórcio no crescimento de plantas de tomate.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é um fruto proveniente do tomateiro, considerado um dos vegetais mais consumidos da família Solanaceae, ficando atrás apenas da batata (Singh et al., 2017). Ao longo de diferentes estudos que buscam descobrir a origem e domesticação dessa planta, analisou-se a relação entre as variedades selvagens com as plantas cultivadas. Ao fim desses trabalhos, a região Mesoamericana foi destacada como o provável berço da planta que utilizamos no nosso dia a dia (Razifard et al., 2020; Sun et al., 2017). O fruto é uma rica fonte de compostos bioativos como: Vitaminas C e E, fenólicos e principalmente os carotenoides, em especial o licopeno. Tais compostos são de suma importância devido a suas propriedades anti-cancerígenas, combate a danos oxidativos, anti-inflamatórias, vasodilatadoras e cardio protetivas (Ali et al., 2020).

No último relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura “FAO” publicado em 2022, aproximadamente 189 milhões de toneladas da fruta foram cultivadas. A Ásia é o continente com a maior porcentagem de produção de tomate, com cerca de 63,9% do cultivo mundial, tendo a China como maior produtor, seguida pela Índia e Turquia. Ocupando o sétimo lugar desta lista, encontramos o Brasil (FAO, 2023).

De acordo com o Instituto brasileiro de geografia estatística “IBGE”, o país foi responsável pela produção de 4.407.502 toneladas em 2024, sendo o estado de Goiás o maior produtor da fruta para processamento industrial (Figura 2a). Enquanto isso, os estados de São Paulo e Minas Gerais foram importantes fornecedores do chamado tomate de mesa (IBGE, 2024). O Rio Grande do Sul, segundo o IBGE, estava na sexta posição de produtividade nacional no ano de 2024, movimentando

cerca de 411.103 mil reais em relação à produção de 92.055 toneladas (IBGE, 2024). Segundo a associação riograndense de empreendimentos de assistência técnica e extensão rural “EMATER”, no ano de 2023, existiam cerca de 3.095 produtores dessa hortaliça pelo estado (Figura 2b). Além disso, municípios como Caxias do Sul, Nova Bassano e Pelotas foram destacados como maiores produtores da fruta em 2024 (IBGE, 2024; EMATER-RS, 2024). No levantamento comercial de olericultura de 2025, estimou-se que a produção de tomate para o fim de 2025 para o total de 97.705,63 toneladas, assumindo a sexta posição do ranking das hortaliças produzidas no estado (EMATER-RS, 2025).

De acordo com a Embrapa, quatro cultivares principais de tomate circulam no mercado: Cereja, Italiano, Salada e Santa Cruz que se diferenciam por seu tamanho, formato e valores nutricionais (EMBRAPA, 2024). Muitos são os estudos desenvolvidos que objetivam melhorar a produtividade dos tomateiros, em especial relacionados a tolerância de estresses abióticos e bióticos e incremento da qualidade nutricional (Baranov & Timerbaev, 2024).

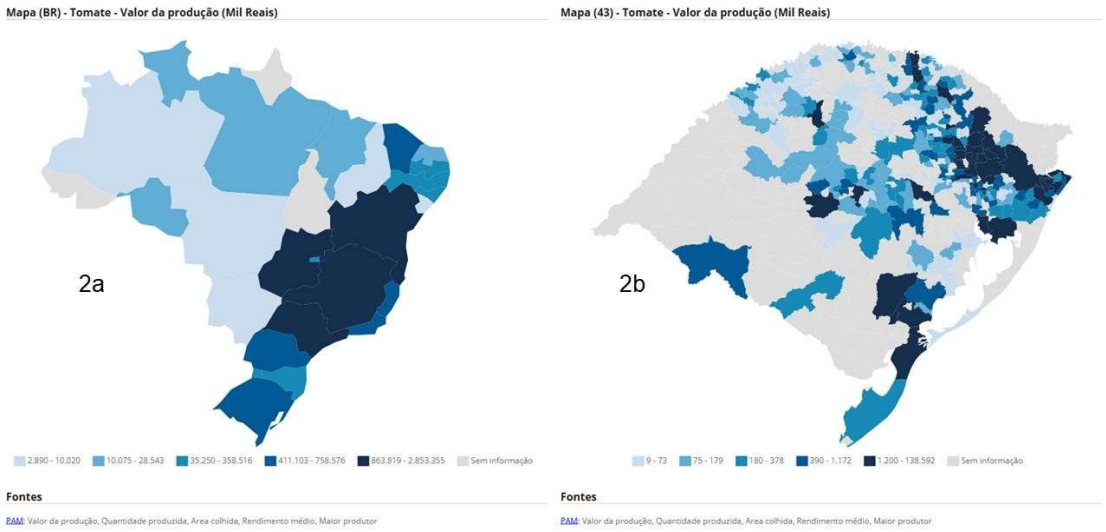


Figura 1. A) Mapa referente a produção nacional de tomate (IBGE, 2024). B) Mapa destacando a produtividade da cultura do tomate no estado do Rio Grande do Sul (IBGE, 2024).

3.2 Doenças que ameaçam a cultura do tomate

De acordo com Singh, Singh e Kumar (2017) essa cultura é constantemente ameaçada por cerca de 200 doenças causadas por bactérias, fungos, nematoides e vírus que prejudicam o desenvolvimento das plantas e consequentemente a produtividade das safras. No país, constantemente é necessário monitorar a propagação de doenças consideradas de extrema relevância causadas por fungos. Como exemplo, a doença conhecida como mofo-branco ou podridão-deesclerotínia, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Mazumdar, 2021). Esse patógeno possui estruturas de resistência características chamadas de escleródios, um aglomerado de hifas, que permitem o fungo a permanecer em áreas de cultivo após as colheitas e protegem as hifas de fatores externos, como a luz ultravioleta (Figura 3). Além disso, o micélio que reveste a região do caule e os frutos é característico pela sua coloração branca, o que facilita a identificação do fitopatógeno (Mazumdar, 2021).

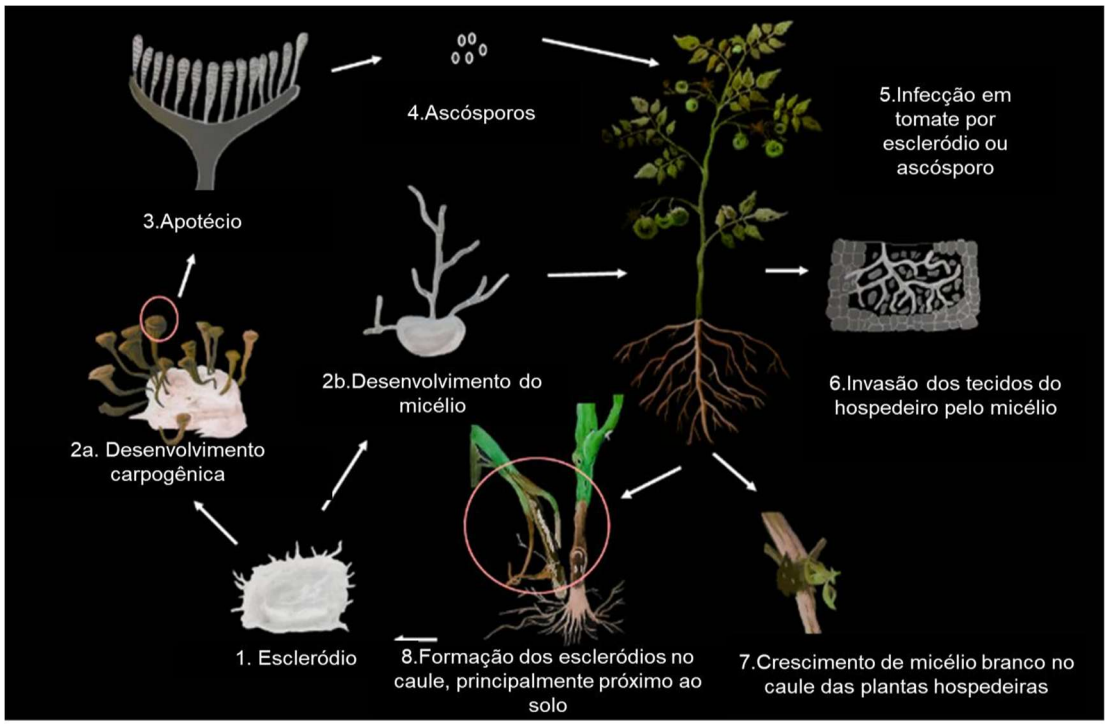


Figura 2. Ciclo de vida *S sclerotium* (Mazumdar, 2021). (1) Os escleródios do solo podem desenvolver o corpo carpogênico (2a) ou micélio (2b), no caso do corpo carpogênico há formação do apotécio (3). Em seguida há a liberação dos ascósporos(4) que em conjunto das hifas infecta plantas hospedeiras (5), penetrando os tecidos vegetais (6) e colonizando o caule formando um micélio branco característica do fungo (7). Por fim há a formação das estruturas de resistência (8), os escleródios, que são dispersos no solo, reiniciando o ciclo

A murcha de *Fusarium*, originado pelo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, é uma doença fúngica que apresenta distribuição cosmopolita que assola diferentes culturas econômicas. Um dos principais recursos que dificultam o seu combate está relacionado à habilidade de sobreviver ao ambiente por meio de estruturas de resistência conhecidas como clamidósporos (Anand & Yadav, 2026). Sob condições ambientais adequadas, o fungo infecta os tecidos vasculares da planta hospedeira, impedindo o fluxo de nutrientes da parte aérea para as raízes da planta (Srinivas et al., 2019). Com o surgimento de uma nova variedade nos estados do Espírito Santo e São Paulo foi rapidamente reclassificada como uma das principais ameaças fitossanitárias do país (Cabral et al., 2020; Reis et al., 2005).

O gênero *Alternaria* spp., comporta muitos fungos com relevância fitossanitária, que atingem culturas agrícolas não apenas do tomate, mas também para outras culturas de interesse econômico (Schmey et al., 2024). No trabalho de Baquerizo e colaboradores (2020) concluiu-se que com a intensificação do aquecimento global, espécies fitopatogênicas desse gênero serão mais incidentes solo, o que remete a utilização de novas metodologias para impedir sua proliferação. Muitas doenças são causadas por diferentes espécies do gênero, contudo a mais relevante é a pinta-preta, um dos distúrbios mais comuns da cultura, originada por 3 diferentes espécies, sendo elas: *A. tomatophila*, *A. cretica* e *A. subcylindrica* (Schmey et al., 2024). Segundo estimativas, já foram registradas perdas de culturas impactadas pelo patógeno de 5% a 78% podendo impactar significativamente a produtividade agrícola (Marzarotto et al., 2015). Além do mais, determinadas espécies de fungos desse gênero possuem a capacidade de sintetizar micotoxinas a partir do seu metabolismo secundário e em seguida liberá-las em contato com superfícies, como os alimentos (Pandey et al., 2023). O alternariol é uma dessas substâncias, produzida por alguns fungos do gênero *Alternaria* spp. Quando consumida em altas concentrações, essa toxina tem capacidade de prejudicar a saúde humana, como desamparar o sistema imunológico e a microbiota intestinal humana (Pandey et al., 2023; Saleh et al., 2024).

Além das doenças causadas por fungos, as bactérias são outros microrganismos capazes de impactar a produção agrícola (Meshram & Adhikari, 2024). Dentre as doenças causadas por esse grupo, destacam-se no cenário nacional:

Ralstonia solanacearum é a causadora da murcha bacteriana, que se aloja internamente nas estruturas das plantas, adentrando nos tecidos vegetais por meio de lesões e secreção de enzimas hidrolíticas, usando o flagelo para locomoção para o xilema e colonizando a região (Álvarez et al., 2010; Chachar et al., 2025). Sua capacidade de formar biofilme é essencial para a persistência da bactéria nos tecidos vasculares das plantas. Consequentemente, a colonização da região, o fluxo de

nutrientes entre a parte aérea e as raízes dos vegetais é interrompido, ocasionando prejuízos na produtividade e morte de cultivares (Álvarez et al., 2010; Chachar et al., 2025). Além do tomate, essa bactéria fitopatogênica é capaz de infectar outros culturas agrícolas de importância econômica da família Solanaceae como a berinjela e batatas, despertando o alerta a alta quantidade de possíveis hospedeiros para a doença (Álvarez et al., 2010; Chachar et al., 2025). Por meio de dados de distribuição atual da doença somado a diferentes variâncias climáticas, Tagyan e colaboradores estimaram a distribuição dessa espécie mundialmente ao decorrer dos anos. Ao fim do trabalho, notou-se um aumento na distribuição em novas localidades, principalmente aquelas com perspectivas no aumento da sua temperatura, sendo destacados continentes como Américas, Europa, Ásia, África e Indonésia o que ressalta a importância do controle desta fitobactéria (Tagyan et al., 2025).

Uma das doenças que é igualmente combatida no cenário agrícola é a mancha bacteriana ou também conhecida como pústula bacteriana, causada por algumas espécies dentro do gênero *Xanthomonas* spp. (Araújo et al., 2017). No Brasil, a *X. euvesicatoria pv. perforans* é a espécie mais prevalente, se alastrando rapidamente em temperaturas acima dos 25 °C em épocas chuvosas (Araújo et al., 2017). A doença ataca a região aérea da planta, independente do estágio de desenvolvimento, sendo possível identificar sintomas da doença a partir da observação de pequenas áreas com aspecto encharcado com bordas bem definidas; em seguida as manchas adquirem um estado necrótico e com halos cloróticos, com cor amarelada (QuezadoDuval et al., 2022). Com a perda das folhas devido a necrose, o fruto acaba sendo exposto aos raios solares o que acelera o seu amadurecimento e compromete a sua qualidade. Além disso, nos frutos observam-se pequenas lesões brancas que logo adquirem uma cor marrom-acinzentada e com uma textura áspera. Por fim, em períodos de floração o progresso da doença causa danos nos pedúnculos do vegetal, prejudicando a formação de novos frutos (Quezado-Duval et al., 2022).

3.3 Manejo e métodos alternativos de controle de doenças da cultura

Para controlar a disseminação desses fitopatógenos podem ser utilizadas diferentes metodologias. As técnicas variam de acordo com a praga, mas de maneira geral elas são: rotação de culturas, uso de linhagens resistentes, desinfestação de sementes, utilização de adubação adequada, mitigação de ferimentos nas plantas, uso de redução do volume de água ou melhorar o sistema de drenagem dos terrenos, cobertura do solo e solarização (EMBRAPA, 2022; Cucu et al., 2025). Todavia, a forma de combate mais utilizada e comercialmente viável é a utilização de agroquímicos com ação fungicida e bactericida, sendo o Brasil um dos maiores usuários de pesticidas (Gaboardi et al., 2023; Sharma et al., 2019). Exemplo disso, é constatado com o aumento de 130% na comercialização de fungicidas no país durante o período de 2009 e 2020 (Gaboardi et al., 2023). Analisando as condições climáticas do país, como temperatura e índices pluviométricas tornam o país um local adequado para a disseminação de microrganismos com potencial fitopatogênico, o que acaba estimulando a necessidade do uso de produtos químicos para defesa agrícola (Delgado-Baquerizo et al., 2020). Enquanto isso, para se controlar o desenvolvimento da mancha bacteriana são utilizados principalmente produtos com formulações à base de cobre e produtos como famoxadona, polissacarídeo lamarina, extrato de *Melaleuca alternifolia* (Quezado-Duval et al., 2022). Contudo, devido à má administração e uso intensivo desses produtos químicos, observam-se impactos significativos na esfera agrícola, ambiental e na saúde humana. Ao longo de anos de utilização de pesticidas, observa-se uma seleção de fitopatógenos resistentes capazes de tolerar diferentes concentrações de agroquímicos e por consequência comprometer a eficácia de agroquímicos no manejo de doenças (Yin et al., 2023). Exemplos desse evento podem ser observados em isolados dentro do gênero *Fusarium* spp. resistentes a triazois, estrobilurinas e benzimidazois (Naqvi et al., 2025). As bactérias fitopatogênicas resistentes também já são descritas na literatura, sendo exemplo variedades de *Xanthomonas* spp tolerantes a produtos cuja composição é o cobre (Fan et al., 2022).

Fitopatógenos selecionados por resistência, geram uma maior agressividade dos sintomas das doenças, assim sendo necessário o aumento da concentração de agroquímicos nas culturas (Ons et al., 2020). Além do mais, a elevada utilização de tais substâncias em plantações corroboram com o desenvolvimento de enfermidades em humanos como danos ao sistema nervoso (Juntarawijit & Juntarawijit, 2018; Piel et al., 2019). Por fim, a presença de tais químicos no meio ambiente afeta diretamente no funcionamento de ecossistemas, bioacumulação de agrotóxicos em cadeias tróficas, alteração do sistema fisiológico de animais e impacto na comunidade microbiana (Gobbi et al., 2020; Sharma et al., 2019).

3 4. Bactérias benéficas para a agricultura

O termo PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) foi utilizado pela primeira vez em Kloepper e Schroth em 1978 para descrever bactérias capazes de colonizar tecidos e auxiliar no crescimento e defesa vegetal (Kloepper; schroth; Miller, 1978). Essas relações podem ser de maneira: (I) direta, (II) indireta ou (III) o conjunto de ambas as formas ao mesmo tempo e todas as alternativas acabam beneficiando e garantindo a sobrevivência das plantas (Santos et al., 2019; Stegelmeier et al., 2022). As PGPBs ascenderam como uma alternativa sustentável para tratamento de lavouras e aumento da produtividade. Por conta da capacidade integrarem formulações de bioprodutos foi possível mitigar as concentrações de agroquímicos sem prejudicarem o meio ambiente, isso pois bioprodutos são compostos por biomoléculas mais suscetíveis a biodegradação em comparação aos pesticidas convencionais (Fanai et al., 2024; Stegelmeier et al., 2022). Dentre as inúmeras bactérias classificadas como PGPBs temos as amplamente utilizadas na agricultura como *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., *Actinobacteria* spp., *Paenibacillus* spp., *Bradyrhizobium* spp. e *Rhizobium* spp., importantes gêneros benéficos para os vegetais (Patel et al., 2024).

Com o intuito de encontrar uma alternativa para o uso de agroquímicos, novos métodos que visam combater pragas e aumentar a produtividade das áreas vem ganhando destaque (El-Sheikh & Shahein, 2025; Pirttilä et al., 2021). Uma delas é o uso de agentes microbianos capazes de realizar biocontrole, onde a partir das interações ecológicas que já existem busca prevenir ataques às culturas de interesse O biocontrole ou controle biológico pode ser conceituado como: “Um método de controle racional e sadio, que tem por objetivo utilizar inimigos naturais, que não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde humana” (EMBRAPA, 2024). Bactérias podem ser agentes de biocontrole, auxiliando de maneira tanto direta quanto indireta as plantas as quais estas estão associadas (Al Raish et al., 2025). Isso se dá por conta de moléculas originadas do metabolismo secundário que podem apresentar propriedades antimicrobianas ou que induzem a proteção e defesa de culturas (Al Raish et al., 2025). Exemplo disso, são os sideróforos, moléculas quelantes de íons de ferro, que podem ser mecanismos de controle de fitopatógenos, pois ao liberar tais quelantes no ambiente ocorre uma competição por íons de ferro. Pela alta afinidade destes compostos com o ferro, os íons Fe^{3+} são capturados e causa a morte de outros microrganismos do ambiente (Schalk, 2025).

Outra característica dessas bactérias é a formação de biofilme. O biofilme é uma estrutura na qual possui uma comunidade microbiana, é envolvida por uma matriz extracelular sendo ela composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) como polissacarídeos, ácidos nucleicos, enzimas extracelulares e lipídeos liberados pelas células bacterianas (Ajijah et al., 2023). Com o auxílio destas estruturas, PGPBs conseguem aderir a determinadas superfícies, bióticas ou abióticas, sendo capazes de recrutar bactérias benéficas para o vegetal (Ajijah et al., 2023). Essa grande comunidade microbiana pode facilitar a comunicação entre os microrganismos, recrutar microrganismos benéficos, proteger contra fitopatógenos e induzir o sistema de defesa vegetal (Ajijah et al., 2023).

As plantas são ambientes que comportam alta variedade de comunidades microbianas, que podem estar presentes em diferentes regiões da planta, como a rizosfera. Devido a isso, a maioria das pesquisas voltadas a encontrar potenciais agentes de biocontrole utilizam técnicas de isolamento de bactérias ambientais (Pirttilä et al., 2021). Atualmente, dois principais gêneros de bactérias são destacados como agentes de biocontrole, sendo elas: *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. (Dimkić et al., 2022).

3 5. *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* spp são gram-positivas e capazes de formar endósporos, assim tendo capacidade de resistir de maneira mais eficiente a mudanças ambientais e estresses abióticos geradas pela radiação, salinização, seca ou chuvas intensas (Xu & Kovács, 2024). Espécies do gênero são encontradas em diferentes ambientes, participando de diferentes nichos ecológicos (Kumar et al., 2024). Devido a seu potencial biotecnológico, inúmeros são os trabalhos que buscam avaliar seu uso no desenvolvimento de bioprodutos em diversas áreas da indústria, em especial na área da agricultura (Crivelli et al., 2024; González et al., 2024; Sansinenea & Ortiz, 2011; Tsotetsi et al., 2022)**.** Por meio dessas associações, as bactérias facilitam a captação de nutrientes a partir da solubilização de nutrientes como o fosfato, assim como participar ativamente ou estimular a planta a sintetizar fitormônios com ação de crescimento ou de defesa vegetal (Poveda & González-Andrés, 2021). Um dos principais compostos produzidos pelo gênero é o ácido indol-3-acético (AIA), que eleva os níveis de auxina, substância responsável pelo desenvolvimento de tecidos vasculares e alongamento das células (Tsotetsi et al., 2022). Esses microrganismos podem influenciar diretamente ou indiretamente o crescimento vegetal das plantas (Tsotetsi et al., 2022). A prospecção do gênero como biocontrolador se dá principalmente pela sua capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos como lipopeptídeos, em especial, surfactina, bacilomicina, fengicina,

iturina e micosubtilina e enzimas hidrolíticas (Sansinenea & Ortiz, 2011). Além disso, a exploração de novas substâncias derivadas do metabolismo secundário desperta a atenção para formulação de novos produtos, sendo destaque metabólitos como sideróforos, compostos orgânicos voláteis, compostos antifúngicos e antibióticos. Por conta destes mecanismos, *Bacillus* spp. possuem a capacidade de auxiliar na captação de íons de ferro, inibir o desenvolvimento de fitopatógenos e estimular mecanismos de defesa vegetal (Caulier et al., 2019; Elnahal et al., 2022; Iqbal et al., 2023).

3.5.1 *Bacillus altitudinis*

Desde sua primeira descrição em 2006, *B*. *altitudinis* se tornou objeto de diferentes estudos por conta do seu potencial biotecnológico, em especial em moléculas com efeito antimicrobiano (Bach et al., 2022; Comba-González et al., 2024; Shivaji et al., 2006). Desde sua primeira coleta, cepas de *B*. *altitudinis* foram encontradas em diferentes locais ao longo do tempo como no ar e no solo, salientando que a descoberta de novos isolados é de essencial importância para aquisição de novas moléculas com uso biotecnológico (Cavalini et al., 2021; Comba-González et al., 2024; Shivaji et al., 2006). Pressupõe-se que essa ampla quantidade de moléculas dentro de *Bacillus* spp. e *B*. *altitudinis* esteja associada a alta adaptabilidade a diferentes nichos ecológicos, tendo alta variabilidade de compostos antimicrobianos pela presença de um genoma aberto (González et al., 2024; Kadiri et al., 2023). *B*. *altitudinis* 1.4 foi isolada a partir de amostras de solo da unidade de conservação Matriz Leopoldina-São Leopoldo (RS), com seu completo sequenciamento desperta a sua aplicação biotecnológica, principalmente pela presença de genes similares àqueles responsáveis pela produção de pumilacidina e bacilisina, importantes moléculas antimicrobianas (Cavalini et al., 2021, Jankoski et al., 2024, 2025). A recente descoberta da “Altitudinina A”, uma bacteriocina, com alta similaridade com a enterocina NKR-5-3B e amilociclina A foi obtida a partir de *B*. *altitudinis* ECC22. Quando aplicada diretamente contra bactérias de importância clínica, observou-se a

capacidade dessa substância de suprimir o crescimento dessas bactérias (Lafuente et al., 2024). Isolados de *B. altitudinis* já demonstraram serem biocontroladores em microrganismos que afetam culturas agrícolas (Budiharjo et al., 2017; Li et al., 2020). Bactérias fitopatogênicas como *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae, *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, tiveram seu desenvolvimento inibido ao entrar em contato com *B. altitudinis* (Li et al., 2020). Além de bactérias, a capacidade de espécies de *B. altitudinis* em suprimir fungos fitopatogênicos que impactam na produtividade de diferentes culturas agrícolas como *F. graminearum*, *A. alternata* e *S. sclerotiorum* (Ahmad et al., 2023; Bernal et al., 2024; Zulfiqar et al., 2024).

Além de sua atividade de biocontrole, essas bactérias já demonstraram ser capazes de influenciar positivamente as plantas às quais estão associadas, indicando uma relação benéfica que contribui para a proteção dos vegetais contra estresses abióticos e bióticos. Quando inoculadas com *B*. *altitudinis* CWN 5, plantas de feijão preto (*Vigna mungo L)* demonstraram significativa resistência a seca em relação aos demais tratamentos, apresentando uma elevação dos níveis de clorofila e captação de nutrientes, assim como a redução dos danos causados pelo etileno (Chandwani & Amaresan, 2024).

3.6 Pseudomonas

As espécies do gênero *Pseudomonas* spp. também receberam considerável atenção, principalmente pelo seu potencial uso na agricultura sustentável (Dimkić et al., 2022; Serafim et al., 2023; Shahid et al., 2018; Yang et al., 2025). Esse grupo de bactérias Gram-negativas, possuem metabolismo aeróbico, capazes de sintetizar pigmentos e podendo possuir flagelos. Elas possuem uma ampla versatilidade fisiológica e genética, características estas atreladas à alta adaptabilidade dessas bactérias a diferentes ambientes (Lalucat et al., 2020; Sokra, 2025). Assim, espécies do gênero podem atuar na promoção de crescimento e defesa vegetal, tanto

diretamente quanto indiretamente (Dimkić et al., 2022; Yang et al., 2025). A aplicabilidade do gênero de atuar como um biofertilizante ressalta a importância dessas bactérias no ambiente agrícola. Dentre as principais vias observadas que favorecem esse processo, destaca-se a solubilização de fosfato e a fixação de nitrogênio (Kumar et al., 2017).

Sua aplicabilidade como inoculantes e/ou bioinoculantes, se dá majoritariamente a habilidade de diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* spp. de sintetizar metabólitos secundários com ação antimicrobiana (Serafim et al., 2023; Shahid et al., 2018; Yang et al., 2025). Ao longo do tempo, mesmo com a descoberta de novas substâncias antimicrobianas produzidas por essas bactérias mostrou-se apenas uma parcela do potencial biotecnológico, tendo em vista que o número de genes e clusters encontrados excede a quantidade de metabólitos conhecidos (Yang et al., 2025). Dentre as substâncias produzidas mais relevantes produzidas por *Pseudomonas* spp. podem-se citar as enzimas com atividade hidrolítica capazes de degradar parede celular fúngica como: β-1,3-glucanase, quitinase, celulase e protease, que podem degradar a parede celular fúngica (Kumar et al., 2017; Shahid et al., 2018). A capacidade de sintetizar fenazinas, sideróforos, hidróxido de cianeto (HCN), compostos orgânicos voláteis são amplamente referenciados na literatura. Essas moléculas possibilitam que determinadas espécies de *Pseudomonas* spp. interfiram diretamente no desenvolvimento de outros microrganismos, tornando-as um biocontrolador de destaque na agricultura (Chen et al., 2023; Kumar et al., 2017; Lakshmikanthan et al., 2025). A desregulação da função da membrana plasmática, a indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), a interferência na respiração celular e na síntese de ATP são algumas das vias utilizadas por essas bactérias para suprimir os fitopatógenos (Kumar et al., 2017; Shahid et al., 2018).

3.6.1 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens é uma bactéria mesófila, aeróbia, e de relevante interesse biotecnológico para a prospecção de novas moléculas e sua aplicabilidade em especial no campo (Saiedlou et al., 2025; Lakshmikanthan et al., 2025; Papin et al., 2025; Shahid et al., 2018). Pertencente ao gênero *Pseudomonas* spp., *P. fluorescens* é capaz de sintetizar compostos antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação (Lakshmikanthan et al., 2025; Maurya et al., 2024; Shahid et al., 2018). Contudo dentre esses compostos, os mais característicos produzidos pela espécie são os lipopeptídeos cíclicos, fenazinas, o sideróforo pioverdina, compostos orgânicos voláteis de diferentes classes. Também se tem observado sua capacidade de sintetizar biofilme sendo de suma importância na sua aplicabilidade em lavouras (Lakshmikanthan et al., 2025; Maurya et al., 2024). Uma das substâncias mais conhecidas sintetizadas por essas bactérias é o 2,4-Diacetilfloroglucinol sendo responsável por danificar moléculas de DNA e outras estruturas celulares (Suresh et al., 2022). Como exemplo de sua aplicabilidade na agricultura, o isolado *P. fluorescens* VSMKU3054 auxiliou na defesa de tomateiros infectados por *R. solanacearum* sintetizando o 2,4 DAPG acetilfloroglucinol, substância de alto espectro antimicrobiano e capaz de induzir a expressão de fitorhormônios relacionados ao sistema de defesa vegetal (Suresh et al., 2022).

3.7 Consórcio Bacteriano

O consórcio bacteriano trata-se do uso de dois ou mais microrganismos em conjunto, que podem ser uma via de ação mais eficiente do que a ação de bactérias isoladamente, por conta disso diferentes trabalhos avaliavam a aplicabilidade desses conjuntos bacterianos em áreas de interesse, principalmente no setor agrícola (Nunes et al., 2024; Vishwakarma et al., 2020). As relações entre os consórcios microbianos podem ser sinérgicas, neutras ou maléficas, mas tal fato não necessariamente

significa que essas relações estão estáticas ao longo do tempo. Isso ocorre pois, devido a fatores externos, essas relações podem sofrer alterações durante o tempo, de forma que uma associação inicialmente benéfica pode assumir outro tipo de interação ecológica (Li et al., 2021). A associação entre mais de um microrganismo garante uma relação mais estável, tendo em vista as contínuas pressões ecológicas e ambientais, e além disso permite que os microrganismos presentes possam se complementar positivamente (Minchev et al., 2021; Nunes et al., 2024).

Algumas relações sinérgicas foram observadas em consórcios bacterianos de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Como exemplo, em estudo de Sun et al. (2022) pepinos foram inoculados com *B*. *velezensis* e *P*. *stutzer*. Em trabalho passado, observou-se que a espécie de *Bacillus* rapidamente formou biofilme, secretando metabólitos secundários auxiliando no recrutamento de bactérias benéficas como *Pseudomonas stutzer*, assim beneficiando a planta hospedeira. Observou-se resistência ao estresse salino, aumento da produção de clorofila e estímulo ao seu desenvolvimento (Sun et al., 2022). No trabalho desenvolvido em 2020, usou-se o inoculante contendo *B*. *amyloliquefaciens "*W19" como agente de biocontrole em plantas de banana infectadas com fusariose. Além de auxiliar na supressão da doença, a bactéria foi capaz de recrutar outros microrganismos benéficos para saúde vegetal (Tao et al., 2020). No trabalho de Zhang et al. (2023) realizado em casa de vegetação, plantas de soja foram co-inoculadas com *P*. *chlororaphis* H1 e *B*. *altitudinis* Y. As plantas tratadas com o consórcio bacteriano apresentaram aumento significativo do sistema radicular e da parte aérea em comparação ao controle. Além disso, a comunidade microbiana do solo não se modificou entre os tratamentos, sugerindo que a aplicação do consórcio não causou impactos negativos à microbiota da rizosfera (Zhang et al., 2023). Em determinado consórcio entre as duas espécies, foi observado que *Pseudomonas* spp. foi capaz de induzir a produção de surfactina por *Bacillus,* assim permitindo a aquisição de nutrientes e induzindo a colonização por bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. (Jia et al., 2023).

3.8 Bioinsumos no controle biológico

De acordo com a Lei Nº 15.070, de 23 de Dezembro de 2024, bioinsumos são classificados como produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, incluído o oriundo de processo biotecnológico, ou estruturalmente similar e funcionalmente idêntico ao de origem natural, destinado ao uso na produção, na proteção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, que interfira no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos, do solo e de substâncias derivadas e que interaja com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos (Brasil, 2024).

Dentre os bioinsumos, encontram-se os biopesticidas que ascenderam rapidamente nos mercados brasileiros e internacionais, com altas estimativas de movimentação monetária com o decorrer dos anos. Exemplo de tal tendência é confirmada ao analisar o registro no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) de novas patentes e empresas destinadas a essa produção no Brasil desde o início do século (Andreata et al., 2025; Soares et al., 2023).O desenvolvimento de novas patentes de bioinsumos é de sumo interesse para o setor agrícola brasileiro. Como forma de estimular a formação de novos negócios na área, elaborou-se o Programa Nacional de Bioinsumos no Brasil, de suma importância para tornar o país independente de insumos internacionais, que influenciam diretamente o preço dos itens para os agricultores (Vidal et al., 2022).

O biocontrole ou controle biológico pode ser conceituado como a utilização de um ou mais organismos ou microrganismos, para reduzir as atividades determinantes de uma doença provocada por um patógeno (Bettiol, 2009). Por meio de relações ecológicas já existentes é possível combater espécies “fitopatogênicas” consideradas ameaças a culturas agrícolas, e esse método se torna uma alternativa para mitigar o uso de agroquímicos em lavouras (Bettiol, 2009). Ao analisarmos o contexto geral dos biodefensivos no país em 2021, 62,1% são produtos à base de microrganismos. Em

segundo, com 15,5%, estão os produtos que utilizam macrorganismos como princípio ativo. Com 12,2%, estão os produtos bioquímicos, utilizando moléculas como princípio ativo. Por fim, com 10,2% encontram-se os produtos semioquímicos, que são produtos produzidos a partir de substâncias como feromônios e aleloquímicos, usados para controlar o comportamento de outros organismos (MAPA, 2021).

Produtos que utilizam *Bacillus* e *Pseudomonas* para compor sua formulação são conhecidos mundialmente (Reis et al., 2024). Produtos dessa origem registrados no MAPA são disponibilizados para aquisição de produtores, auxiliando-os na produtividade e proteção das lavouras (Monnerat et al., 2020). Determinadas espécies dentro dos gêneros vem sendo mais empregadas como *B*. *subtilis, B. velezensis* e *B. pumilus* que compõe produtos como Serenade®, Biobac® e Sonata® atuando como biocontroladores (Kuzmanovska et al., 2023; Rabbee et al., 2023). Bioinoculantes como ActiBio X Phos® e Biofree®, cujos ingredientes ativos são constituídos por *P. fluorescens*, são empregados para auxiliar as plantas na aquisição de nutrientes como o fósforo, sendo identificados como importantes para o crescimento e funcionamento do metabolismo vegetal (Silva et al., 2022). No Brasil, há considerável variedade de tais produtos, sendo que dos 480 biopesticidas registrados no ano de 2023 cerca de 83 desses possuem algum tipo de consórcio microbiano, com utilização prioritária na proteção de culturas, atacando alvos biológicos relevantes (Nunes et al., 2024).

Diante desse contexto, torna-se necessário estudar novas alternativas sustentáveis, como a identificação de microrganismos com potencial para se tornarem ingredientes ativos de novos bioinsumos. O incentivo ao desenvolvimento de produtos biológicos é de extrema importância para esse mercado em ascensão, uma vez que representam uma via sustentável capaz de contribuir para a mitigação do uso e da quantidade de agroquímicos empregados nas lavouras brasileiras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os microrganismos empregados neste estudo como potenciais agentes de biocontrole, foram *Bacillus altitudinis* 1.4 (Cavalini et al., 2021; Jankoski et al., 2024, 2025) e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 (Bogo et al., 2017, 2020; Cruz & Motta, 2019). A bactéria do gênero *Bacillus* sp. foi isolada de uma área úmida na Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo - RS, Brasil, em 2016 (Cavalini et al., 2021). Enquanto *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 foi isolado de tanque de refrigeração com leite de búfala cru em propriedade localizada no município de Glorinha - RS, Brasil, entre 2012 e 2013 (Bogo et al., 2017).

As culturas usadas como microrganismos alvos foram selecionadas baseadas no seu impacto na produção e qualidade do tomate, além de outros microrganismos de impacto ambiental e cepas padronizadas pertencente ao laboratório de microbiologia aplicada. Os microrganismos utilizados foram: *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Xanthomonas citri* subsp. citri, *Xanthomonas campestris* pv. passiflorae, *Candida albicans* ATCC 90022, *Proteus vulgaris* C30, *Proteus hauseri* BJY, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter aerogenes* e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. As bactérias indicadoras fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia e Saúde Única (ICBS-UFRGS). Além disso, bactérias fitopatogênicas do tomateiro como *Ralstonia solanacearum* 00022-B, *Pantoea indologenes* 00018-B, *Pseudomonas corrugata* 00008-B e *Pectobacterium carotovorum* 00020-B foram obtidas por meio de parceria com Laboratório Agronômica parte do grupo Conecta. Os microrganismos foram conservados a -20 °C em uma solução de 10% de leite em pó desnatado e 10%

de glicerol. Posteriormente, todos foram descongelados e recuperados nas condições ótimas de cada isolado.

Além das bactérias, culturas de fungos filamentosos fitopatogênicos foram utilizados. Esses foram selecionados tendo como base a sua capacidade de infectar tomateiros e outras culturas de interesse agrícola. Os fungos utilizados no trabalho foram: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani* e *Macrophomina phaseolina*, obtidos por meio de parceria com o Laboratório de Biotecnologia Vegetal da PUCRS. Um isolado do gênero *Fusarium* spp. (“Fusto-07”) isolado de tomateiro, *Fusarium* spp. (“Fusfe-11”) foram obtidos por meio de parceria com DDPA (Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul).

As sementes de tomate da variedade Santa Cruz foram adquiridas de estabelecimentos comerciais, para os experimentos *in vivo.*

4.2 Avaliação da hemólise, gelatinase e suscetibilidade a antimicrobianos

A avaliação da produção de hemolisina por *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 foi realizada segundo Brenden e Janda (1987) (Brenden & Janda, 1987). *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* PL 5.4. foram estriados em placas contendo Blood agar base (Himedia®) com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas a 37 ºC ±1 ºC durante 24 h e após o período de incubação, foram observadas hemólise: Beta (total), Alfa (parcial) ou Gama (ausência de hemólise). Para verificação da hidrólise da gelatina, os isolados foram semeados em tubos contendo caldo gelatina nutritivo (Extrato de carne 0,3%, peptona bacteriológica 0,5% e 12% de gelatina) e incubado à 37 °C ±1 ºC por 48 h. Após o período de incubação, os tubos foram transferidos para banho de gelo por 30 minutos e em seguida o meio de cultivo foi observado quanto a liquefação da gelatina. A cepa *Staphylococcus*

aureus ATCC 25923 foi usada como controle positivo para ambos os testes (Marra et al., 2007).

B. altitudinis 1.4 e *P. fluorescens* PL 5.4 foram avaliados quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos através da técnica de difusão em ágar com discos em meio Ágar Mueller-Hinton, como preconizado pelo Método Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Os antimicrobianos testados para *Bacillus altitudinis* 1.4 foram: imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), norfloxacina (10µg), vancomicina (5 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), aztreonam (30 µg) e linezolida (10 µg). O isolado *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 foi avaliado frente aos seguintes antimicrobianos: amicacina (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), doripenem (10 µg), meropenem (10 µg) e levofloxacina (5 µg). A incubação das placas foi realizada em estufa a 37 °C ±1 ºC por 18 h para avaliação dos halos de inibição, através das faixas de interpretação específicas para *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. (BrCAST, 2024).

4.3 Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e Pseudomonas fluorescens P.L 5.4.

Para o ensaio de coexistência foram realizadas metodologias de difusão em gota e difusão em posto. No método de difusão em gota, os isolados *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* PL 5.4 foram cultivados em ágar TSA, por 24 h (28 ºC) (Motta & Brandelli, 2002). Após incubação, *Bacillus* foi ressuspendido em solução salina 0,85% a fim de adequar a escala 0.5 de Mcfarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) e a suspensão espalhada em placa contendo ágar Mueller-Hinton. Em 3 pontos equidistantes, inoculou-se 20 uL de suspensão bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* 5.4. *P. fluorescens* 5.4 foi ressuspendida em solução salina 0,85% até ser ajustada a escala 0.5 Mcfarland e semeada em tapete na superfície da placa contendo Ágar Muller-Hinton. Em 3 pontos equidistantes, 20 uL de cultura de *Bacillus altitudinis* 1.4 foi

inoculada em cada ponto da placa (Balouiri et al., 2016). As placas foram incubadas por 24 horas em temperatura de 28 ºC ± 2.

O outro método utilizado para avaliar a coexistência foi o método de difusão em poço de ágar (Magaldi et al., 2004). Suspensões de solução salina 0,85% contendo as bactérias de trabalho foram ajustadas a escala 0,5 de Mcfarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) e inoculadas em tapete em placas de Mueller-Hinton. Em seguida, 3 poços equidistantemente separados foram feitos no meio de cultivo. Após inoculouse 20 uL de cultura bacteriana nos poços da outra bactéria e as placas foram incubadas por 24 horas em temperatura de 28 ºC ± 2. Após as incubações, avaliou-se a capacidade de crescimento associada entre os microrganismos em ambos os testes.

4.4 Biocontrole in vitro frente a microrganismos de importância ambiental e cepas certificadas

As bactérias *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 foram cultivadas em meio TSB ao longo de 24 horas, a temperatura de 28 ºC sendo determinado como “pré-inóculo”. Passado tal período, alíquotas de 100 uL foram transferidas para novos tubos com meio de cultivo, no caso do consórcio 50 uL de cada bactéria de trabalho foram inoculadas em um único frasco de TSB sendo cultivadas entre 24 e 48 horas a 28 ºC. Os microrganismos indicadores *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Xanthomonas citri* subsp. citri, *Xanthomonas campestris* pv. passiflorae, *Candida albicans* ATCC 90022, *Proteus vulgaris* C30, *Proteus hauseri* BJY, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Bradyrizhobium japonicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Ralstonia solanacearum* 00022-B, *Pantoea indologenes* 00018-B, *Pseudomonas corrugata* 00008-B e *Pectobacterium carotovorum* 00020-B foram empregados no teste.

Para a realização dos testes, suspensões dos microrganismos indicadores foram preparadas em solução salina 0,85% na escala de McFarland 0.5 (1,5 x 10^8 UFC/mL). Cada uma das suspensões foi espalhada, em tapete, em placas contendo o ágar Mueller-Hinton. Em seguida, as placas foram inoculadas com 20 µL do cultivo de 24 e 48 horas de cada uma das culturas de trabalho usadas como biocontroladores e do consórcio das bactérias, em triplicata. A incubação foi realizada a 28±2 ºC e os experimentos observados em 24-48 h. Após, foi observada a formação de halos de inibição, os quais foram expressos em milímetros (mm). A cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada como controle positivo (Cavalini et al., 2021).

4.5 Curva de Crescimento Bacteriano

Com o intuito de determinar o melhor período da produção de atividade antimicrobiana de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4, de maneira isolada e em conjunto formando um consórcio bacteriano, foi feita uma curva de crescimento bacteriano. Para cada bactéria, um pré-inóculo de 72 horas contendo o microrganismo de trabalho em caldo TSB foi preparado. Em seguida 100 uL do pré inóculo, foram pipetados em 3 Erlenmeyers contendo 200 mL de TSB. Desde o início dos experimentos (T0), houve a determinação de períodos para análise de: atividade antimicrobiana, unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e pH. Os períodos determinados foram: T0 (0 horas), T6 (6 horas), T24 (24 horas), T30 (30 horas) e T48 (48 horas).

Para avaliar a atividade antimicrobiana, as culturas de *Listeria monocytogenes*, ATCC 7644, *Candida albicans* ATCC 90022 e *Proteus vulgaris* C30 foram ajustados a escala de 0.5 de McFarland e inoculados em tapete em placas de Mueller-Hinton. Na placa, foi pipetado 20 uL da cultura bacteriana, que estava sendo cultivada em Erlenmeyers, em três pontos equidistantes na placa. Após a secagem das gotas, as

placas foram incubadas e observadas após 24 e 48 horas para avaliar a formação de halo de inibição. Para avaliar a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) utilizou-se da metodologia descrita por Milles (Miles et al., 1938). O pH estimado foi medido com auxílio de tira universal de pH (KASVI)

.

4.6 Avaliação da produção de exopolissacarídeo (EPS)

Para o ensaio de detecção de exopolissacarídeos (EPS) o método descrito por Freeman et al. (1989) foi utilizado (Freeman et al., 1989). Os isolados bacterianos foram estriados em placas contendo o meio ágar vermelho congo e incubadas à temperatura de 28 ± 2 ºC por 24h e 48h, para observação de colônias escuras, indicativas da presença de EPS. Como controle positivo, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada.

4.7 Avaliação da produção de biofilmes pelas bactérias *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 pelo método do cristal violeta

Para a produção de biofilmes, foi usado o método descrito por Stepanovic et al. (2004). Os isolados bacterianos foram previamente cultivados em placas contendo meio TSA e incubados a temperatura 28 ºC por 24 h. Após o período de incubação, os isolados foram ressuspendidos em solução salina 0,85% e ajustados conforme a escala 0.5 de McFarland. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação (96 poços) de poliestireno de fundo plano. Os poços foram preenchidos com 180 µL de caldo TSB e 20 µL das suspensões bacterianas. Além disso, os isolados bacterianos foram avaliados em forma de consórcio, nos poços contendo 180 µL de caldo TSB, sendo inoculados 10 µL de cada suspensão bacteriana.

Para o controle negativo, a primeira coluna da microplaca foi inoculada somente com caldo TSB, seguido pelo controle positivo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Moura et al., 2015). As placas de microtitulação foram incubadas à 28 ºC ± 2 por 72 h, para permitir a fixação das células e formação de biofilmes, como descrito por Borucki et al. (2003). Após a incubação, os poços foram aspirados e as amostras lavadas três vezes com 200 µL de solução salina estéril 0,85%. A fixação bacteriana ocorreu com auxílio de 200 µL de metanol 99,8% (PA) durante 20 min. O metanol foi aspirado, as microplacas invertidas e deixadas para secagem "*overnight*" à temperatura de 28 ºC ± 2. O procedimento de coloração se deu com aplicação de 200 µL de Cristal Violeta sob concentrações de 0,1% por 15 min, seguido por lavagem da placa com água destilada estéril. Após a secagem das placas, as células foram ressuspendidas em 200 µL de etanol 95% por 30 min e a quantificação dos biofilmes foi executada. A densidade óptica (DO) do biofilme bacteriano foi avaliada com o auxílio de um leitor espectrofotômetro de microplacas usando comprimento de onda de 570 nm (Anthos 2010 Tipo 17 550 S. No. 17 550 4894). O isolado bacteriano foi classificado de acordo com a metodologia de Stepanovic et al. (2004), sendo possível categorizar os microrganismos como: não formador de biofilme (DO ≤ Doc), fraco formador de biofilme (DOc < DO ≤ 2 x Doc), moderado formador de biofilme (4 x DOc < DO ≤ 4 x Doc) e forte formador de biofilme (4x DOc < DO). Os ensaios foram realizados em duplicata biológica e em octoplicata técnica.

4.8 Solubilização de fosfatos em placa

Para o ensaio de solubilização de fosfato, os microrganismos testados para o biocontrole foram crescidos ao longo de 2 dias, sob 28ºC, usando o meio TSB (Tryptone Soya Broth). Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi transferida para Eppendorfs e esses foram centrifugados a 130 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células lavadas com solução salina 0,85% estéril duas vezes. Em cada solução, retirou-se uma alíquota de 5 uL e essa foi inoculada em placas contendo meio NBRIP (Glicose, 10 g/L; $Ca_3(PO_4)_2$, 5 g/L; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

0,25 g/L; KCl, 0.2 g/L e $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g/L). O meio de cultivo foi produzido utilizando três formulações diferentes, sendo utilizado três diferentes fontes de nutrientes, sendo eles: (I) Fosfato cálcio tribásico (II) Fosfato de ferro e (III) Fosfato de alumínio. As placas foram incubadas sob temperatura de 28 ºC, pelo período de sete dias e após, verificou-se a presença de halos transparentes em torno da colônia, indicando a capacidade de solubilização do fosfato. Os diâmetros dos halos e das colônias foram medidos para a obtenção do índice de solubilização (IS), usando a razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia (Nautiyal, 1998). O experimento foi realizado em triplicata e o isolado *Burkholderia catarinensis* 89 foi utilizado como controle positivo.

4.9 Produção de sideróforos e fitohormônios

Para avaliar a capacidade de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 de sintetizar auxinas, ambas foram cultivados em meio Kings' B K_2HPO_4, 1,5g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5g/L; e triptofano 0,5g/L diluído cinco vezes (Glickmann & Dessaux, 1995), sendo incubado por 7 dias, a 28°C, sob agitação de 120 rpm. Após, a amostra foi centrifugada (10.000 rpm por 10 min), o sobrenadante coletado e misturado com volume igual (proporção 1:1) com reagente de Salkowski (12 g/L $FeCl_3$ e 7,9 M H_2SO_4). Passados 30 minutos de incubação no escuro, observou-se a mudança de coloração da reação. A coloração rosa à vermelha foi indicativa da presença de compostos indólicos. Uma curva padrão foi preparada com ácido indol acético comercial sendo usada para comparação (Ambrosini et al., 2012). A bactéria *Burkholderia catarinensis* 89 foi utilizada como controle positivo.

Para avaliar a produção de sideróforos, as bactérias de trabalho foram cultivadas em Kings' B durante 7 dias, 28°C, sob agitação de 120 rpm. As amostras foram centrifugadas e 20 µL do sobrenadante foi pipetado em meio de cultivo contendo o reagente Chrome azurol S (Schwyn & Neilands, 1987). Ao longo de 7 dias as placas foram observadas a fim de confirmar a produção de halo amarelado. O

desenvolvimento de cores amarelas ou alaranjadas foi indicativo da presença de sideróforos. A bactéria *Burkholderia catarinensis* 89 foi utilizada como controle positivo.

4.10 Avaliação de atividade antifúngica *in vitro*

As bactérias *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 foram cultivadas em meio de cultivo TSB ao longo de 24 horas por 28 ºC, isoladamente e em consórcio. Em paralelo, os fungos fitopatogênicos (item 4.1) foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), por 7 dias, em temperatura de ± 28°C (D. Zhang et al., 2020). Em placa, com meio de cultivo BDA, foram produzidos 3 poços equidistantes no meio de cultivo e alíquotas de 20 µL das suspensões bacterianas e do consórcio crescidas por 24 horas foram pipetadas nos poços. Em seguida, com o auxílio de um furador de rolha foram retirados *plugs* de 0,5 mm de ágar contendo os micélios do fitopatógeno, sendo estes inseridos a uma distância de 2 cm dos poços. No tratamento controle, não houve inoculação dos isolados bacterianos. O isolado *Streptomyces* spp. “CLV 100” foi utilizada como controle positivo (Missau, 2023). Com o desenvolvimento do micélio ao longo de 7 dias, as placas foram fotografadas e as imagens transferidas para o software “ImageJ”. A área do micélio do fungo foi mensurada e os dados analisados estatisticamente (Wockenfuss et al., 2024). No experimento, cada tratamento foi testado em triplicata.

4.11 Capacidade de colonização de raiz

Para avaliar a capacidade de colonização de raíz por *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* P.L 5.4 foi adaptada a metodologia utilizada por Silva (Silva et al., 2003). Colônias das bactérias foram transferidas para 3 mL de solução de salina (0,85%

NaCl). Utilizando um densitômetro de McFarland, as suspensões foram ajustadas para escala 5,0 de McFarland correspondente a $1,5x10^9$ UFC/mL.

Sementes de tomate da variedade Santa Cruz tiveram sua superfície esterilizada. Este procedimento foi realizado com a imersão em solução de etanol 50% por 30 segundos, em seguida elas foram imersas em solução com água sanitária (NaClO 2%) por 3 minutos e por fim, com água destilada estéril, sendo as sementes lavadas 3 vezes. As estruturas foram transferidas para tubos de solução salina 0,85% contendo suspensões de bactérias *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* P.L 5.4 isoladamente, e o consórcio bacteriano na proporção de 1:1. As sementes foram deixadas em embebição *overnight* sob temperatura 28 ± 2 ºC. Passado tal período, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo água - ágar 0,6%.

Os tubos foram diariamente observados, com o intuito de se observar a mudança de coloração na região radicular das plântulas. Passadas duas semanas de desenvolvimento, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio e suas raízes foram particionadas. As raízes foram transferidas para tubos eppendorfs com 1,5 mL de solução fixadora contendo glutaraldeído (2.5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M; pH 7.4), sendo estes armazenados em geladeira durante 7 dias. Após, os fragmentos das raízes foram encaminhados ao Laboratório Central de Microscopia e Microanálises (LABCEMM-PUCRS), e observados em microscopia eletrônica de varredura (MEV) como descrito por Neto (Neto et al., 2025).

4.12 Avaliação das bactérias e consórcio na promoção do crescimento vegetal em plantas de tomate

Para avaliar a capacidade de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* P.L 5.4, isoladas e em consórcio, de estimular o crescimento vegetal, ensaios em plantas foram realizados, adaptando-se a metodologia descrita por Silva (Silva et al., 2003) e Sun (Sun et al., 2022). As sementes de tomate foram desinfetadas e plantadas em sacos

plásticos para mudas contendo substrato constituído por terra, vermiculita e areia, na proporção de 1:1:1. Ao total utilizou-se 120 plantas no experimento, onde 30 plantas foram destinadas para cada tratamento, sendo estes identificados como: Água destilada (“Controle”), *Bacillus altitudinis* 1.4 (“Ba”), *Pseudomonas fluorescens* 5.4 (“Pf”) e consórcio bacteriano (“B+P”). Os tomateiros foram cultivados em sala de cultura sob temperatura de 28 ºC, onde se acompanhou o desenvolvimento das sementes até o surgimento das plântulas. Após 14 dias do aparecimento das plântulas, houve a aplicação das soluções bacterianas. Para isso, erlenmeyers contendo 250 mL de TSB com culturas líquidas dos microrganismos, tendo *B. altitudinis* 1.4 crescido por 48 horas e *P. fluorescens* 5.4 cultivado por 24 horas, foram transferidas para tubos falcons de 50 mL, centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante descartado, o *pellet* lavado com água destilada estéril três vezes e por fim as bactérias foram ressuspensas em 45 mL de água destilada estéril. Em seguida, com o auxílio de espectrofotômetro (Modelo-Sp 220, marca biospectro) com comprimento de onda 600 nm, as suspensões foram ajustadas a DO 0,5 (10^8 UFC/ mL). Na produção da suspensão do consórcio bacteriano, 15 mL das suspensões de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 foram transferidas para novo tubo falcon e homogeneizadas. Cada planta teve sua região radicular inoculada com 1 mL da suspensão bacteriana isolada ou em consórcio. Os tratamentos foram acompanhados ao longo de 15 dias, e uma nova aplicação das bactérias foi realizada. Decorridos mais 10 dias, mensurou-se o comprimento das partes aéreas e radiculares dos tomateiros. Após, ambas foram encaminhadas para secagem em estufa a 60 ºC ao longo de 5 dias. As plantas foram secas até atingirem peso constante, sendo posteriormente determinada a massa seca da parte aérea e das raízes dos tomateiros.

4.13 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa IBM SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Os dados foram expressos como média e erro padrão. Os dados foram analisados quanto à homogeneidade de variância pelo teste de Levene e, quando necessário, os dados foram transformados para ajustar à distribuição normal. A ocorrência de outliers foi determinada por BoxPlot e os valores extremos removidos. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA, $p<0,05$), e posteriormente separadas por teste de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da hemólise, gelatina e suscetibilidade a antimicrobianos

Na avaliação da inocuidade dos isolados, observou-se que *Bacillus altitudinis* 1.4 apresentou capacidade hemolítica total, sendo classificada como beta hemolítica (Figura 4a). Por outro lado, *Pseudomonas fluorescens* 5.4 foi considerada gama-hemolítica, sendo classificada como não hemolítica (Figura 4b). Ao se avaliar a capacidade de ambas as bactérias de sintetizar gelatinase, constatou-se que as duas bactérias não foram capazes de liquefazer a gelatina, sendo classificadas como gelatinase negativas.

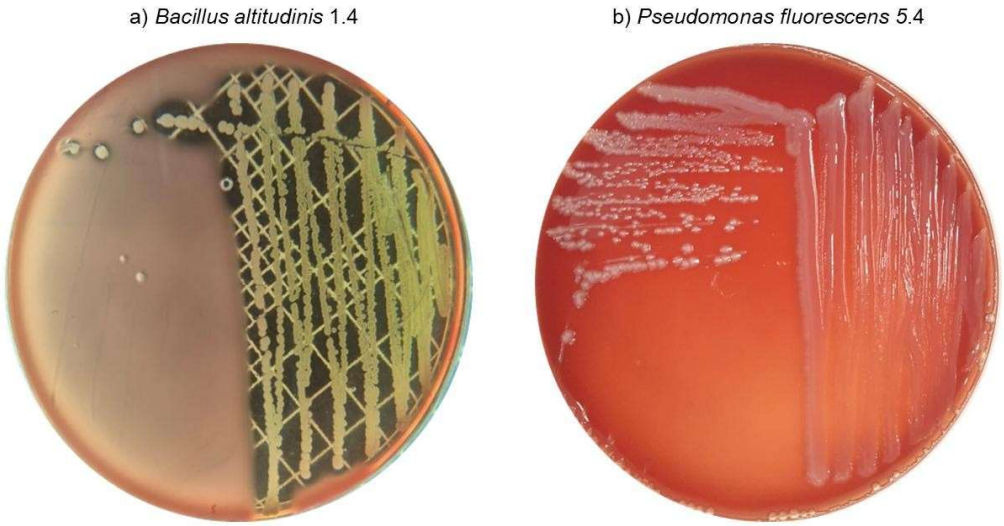


Figura 3 . Avaliação da atividade hemolítica pelas bactérias de trabalho. a) *Bacillus altitudinis* 1.4 classificada como beta hemolítica (hemólise total). b) *Pseudomonas fluorescens* 5.4 classificado como gama hemolítica (ausência de hemólise).

Após os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos pelas bactérias em estudo, seguindo a norma do BrCAST 2024, observou-se que *B. altitudinis* 1.4 demonstrou ser intermediário a ciprofloxacina (5 µg) e a levofloxacina (5 µg), além disso, apresentou ser sensível aos demais antibióticos citados no item 4.2 (Figura 5).

O isolado *P. fluorescens* 5.4 demonstrou ser sensível a amicacina (30 µg), intermediário aos antibióticos: cefepima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacina (05 µg), levofloxacina (5 µg), meropenem (10 µg) e piperacilina 30-tazobactam 6 (36 µg) e mostrou-se resistente a aztreonam (30 µg) e imipenem (10 µg).



Figura 4. Suscetibilidade de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 frente a diferentes antibióticos. Os antibióticos utilizados para cada bactéria tiveram a lista do BrCAST de 2024 como critério de seleção. A coloração apresentada na imagem está relacionada à suscetibilidade dos microrganismos a antibióticos. (i) Em vermelho, representando “resistência”; (ii) Em amarelo, quando é classificada como “intermediária”, (iii) Em verde, sendo empregada como “suscetível” aos antibióticos.

5.2 Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4.

Durante os ensaios de coexistência utilizando método da gota observou-se que *B. altitudinis* 1.4, quando inoculado em tapete, e *P. fluorescens* 5.4, pipetada equidistantemente em gota, não demonstraram atividade antimicrobiana, indicando a capacidade das bactérias de coexistirem (Figura 6a). O isolado *P. fluorescens* 5.4

quando cultivado em tapete e *B. altitudinis* 1.4, inoculado em gota, não demonstrou formação de um halo inibitório (Figura 6b).

Paralelamente, nos experimentos de coexistência pelo método de difusão em poço. O isolado *B. altitudinis* 1.4 cultivado em tapete e *P. fluorescens* 5.4 inoculada nos poços do meio de cultivo não demonstrou atividade antimicrobiana entre os isolados. (Figura 7a). Quando *P. fluorescens* 5.4 foi cultivada em tapete e *B. altitudinis* 1.4 foi inoculado nos poços, não houve inibição por parte das bactérias empregadas, sugerindo a capacidade dessas de coexistirem (Figura 7b).

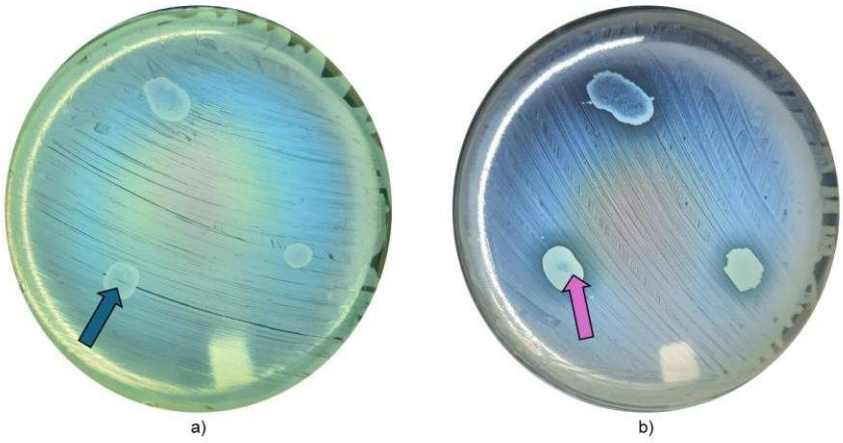


Figura 5. Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 por meio de metodologia de difusão em ágar por meio de gota. a) *B. altitudinis* 1.4 inoculado em tapete e *P. fluorescens* 5.4, indicada pela seta azul, inoculada em gotas. b) P. fluorescens 5.4 inoculada em tapete enquanto *B. altitudinis* 1.4, sinalizada pela seta roxa, pipetada em gota.

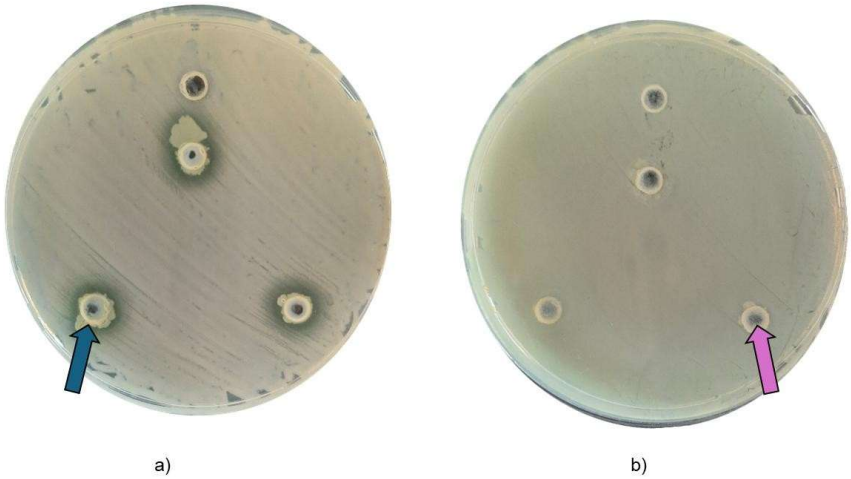


Figura 6.Ensaio de coexistência entre *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 por método de difusão em poço. a) *P. fluorescens* 5.4 inoculada nos poços, indicada pela seta azul, e *B. altitudinis* 1.4 inoculada em tapete. b) *B. altitudinis* 1.4 inoculado nos poços, sinalizada pela seta roxa, e *P. fluorescens* 5.4 em tapete.

5.3 Biocontrole *in vitro* frente a microrganismos de importância ambiental e cepas certificadas

Para se avaliar a capacidade de biocontrole de *Bacillus altitudinis* 1.4, *Pseudomonas fluorescens* 5.4 e do consórcio bacteriano, estes foram testados frente aos microrganismos indicadores especificados no item 4.4. Assim, as atividades antimicrobianas obtidas nos ensaios foram compiladas na Tabela 1.

O isolado *Bacillus altitudinis* 1.4 indicou ser capaz de controlar o desenvolvimento dos microrganismos *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Bradyrhizobium japonicum*. Com a aplicação de cultivos de 24 horas de *B. altitudinis* 1.4, observaram-se halos de inibição com média de 14,7 mm contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de 4,0 mm frente a *B. japonicum*. Com alíquota de 48 horas de cultivo, notou-se a capacidade de inibir *B. japonicum* apresentando halos de inibição com média de 3,7 mm, contudo não foi observada inibição de *L.*

monocytogenes ATCC 7644. A bactéria não apresentou atividade antimicrobiana frente aos outros microrganismos testados.

Ao se determinar a ação antimicrobiana de *P. fluorescens* 5.4 cultivada por 24 horas, notou-se sua eficácia de inibir *Proteus vulgaris* C30 e *Proteus hauseri* BJY com halos inibitórios de 8,5 mm e 7,5 mm, respectivamente. Usando o cultivo de 48 horas, observou-se capacidade de inibição de *P. vulgaris* C30, *P. hauseri* BJY e *Candida albicans* ATCC 90022, sendo observados halos com média de 7,8 mm, 7,5 mm e 3,8 mm, respectivamente. A bactéria não apresentou atividade antimicrobiana frente aos demais isolados testados.

O consórcio bacteriano comportou-se de maneira semelhante a *P. fluorescens* 5.4, inibindo o crescimento de *Proteus vulgaris* C30, *Proteus hauseri* BJY e *Candida albicans* ATCC 90022. Ao se cultivar o consórcio por 24 horas, constatou-se atividade antimicrobiana indicada pelos halos de inibição de 8,5 mm frente a *P. vulgaris* C30, 7,5 mm em *P. hauseri* BJY e 3,7 mm em *C. albicans* ATCC 90022. Ao testar o cultivo de 48 horas, os mesmos microrganismos indicadores foram inibidos, com a presença de halos de inibição com médias iguais a 7,8 mm, 7,5 mm e 6,2 mm, respectivamente. O consórcio não apresentou atividade antimicrobiana frente aos outros microrganismos empregados.

Tabela 1. Avaliação de biocontrole de *B. altitudinis* 1.4, *P. fluorescens* 5.4 e do consórcio bacteriano frente aos microrganismos indicadores. Os halos de inibição foram medidos em milímetros (mm).

Bactérias de trabalho	Microrganismos indicadores	24 horas	48 horas
Bacillus altitudinis 1.4	*Listeria monocytogenes* ATCC 7644	14,7	0,0
	Bradyrizhobium japonicum	4,0	3,7
Pseudomonas fluorescens 5.4	*Proteus vulgaris* C30	8,5	8,2
	Proteus hauseri BJY	7,5	8,2
	Candida albicans ATCC 90022	0,0	3,8
Consórcio bacteriano	*Proteus vulgaris* C30	8,5	7,8
	Proteus hauseri BJY	7,8	7,5
	Candida albicans ATCC 90022	3,7	6,2

5.4 Curva de Crescimento Bacteriano

Para avaliar o crescimento das bactérias de trabalho e observar a cinética da produção de atividade antimicrobiana e do pH, curvas de crescimento bacteriano de *B. altitudinis* 1.4, *P. fluorescens* 5.4 e do consórcio bacteriano, foram elaboradas ao longo de 48 horas de cultivo. Para testar a ação antimicrobiana das bactérias *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 e do consórcio foram utilizados microrganismos indicadores *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *C. albicans* ATCC 90022. O pH dos meios de cultivo foi medido em cada etapa dos experimentos.

A avaliação da curva de crescimento de *Bacillus altitudinis* 1.4 foi acompanhada por 48 horas de cultivo e *L. monocytogene*s ATCC 7644 foi empregada como cultura indicadora. Na avaliação da produção da atividade antimicrobiana, observou-se que ela teve início na fase logarítmica do crescimento de *B. altitudinis* 1.4, observando-se atividade máxima às 24 horas de cultivo com halos médios de 14 mm (Log_{10} 7,73). A partir de 30 horas de cultivo, não foi mais observada a produção de atividade antimicrobiana (Figura 8). Ao longo deste período o pH do cultivo manteve-se 7,0.

A avaliação da curva de crescimento de *Pseudomonas fluorescens* 5.4 foi acompanhada por 48 horas de cultivo e *C. albicans* ATCC 90022 foi empregada como cultura indicadora. Na avaliação da produção da atividade antimicrobiana, visualizouse que essa teve início no tempo 30 horas do crescimento de *P*. *fluorescens* 5.4, observando-se atividade máxima às 48 horas de cultivo com halos médios de 13,72 mm durante a fase logarítmica (Log_{10} 8,88). Durante as primeiras 24 horas de cultivo, não se observou halos de inibição (Figura 9). Durante os ensaios, o pH do cultivo de *P*. *fluorescens* 5.4 manteve-se 7,0.

Também ao longo de 48 horas acompanhou-se a curva de crescimento de ambas as bactérias em conjunto, utilizando *C. albicans* ATCC 90022 como cultura indicadora. Na avaliação da produção da atividade antimicrobiana, visualizou-se que essa teve início no tempo de 24 horas do crescimento do consórcio bacteriano, tendo atividade máxima às 30 horas de cultivo com halos médios de 5,11 mm durante a fase logarítmica (Log_{10} 9,41). Durante as primeiras 6 horas de cultivo, não se observou halos de inibição (Figura 10). Ao longo desses ensaios, o pH manteve-se 7,0.

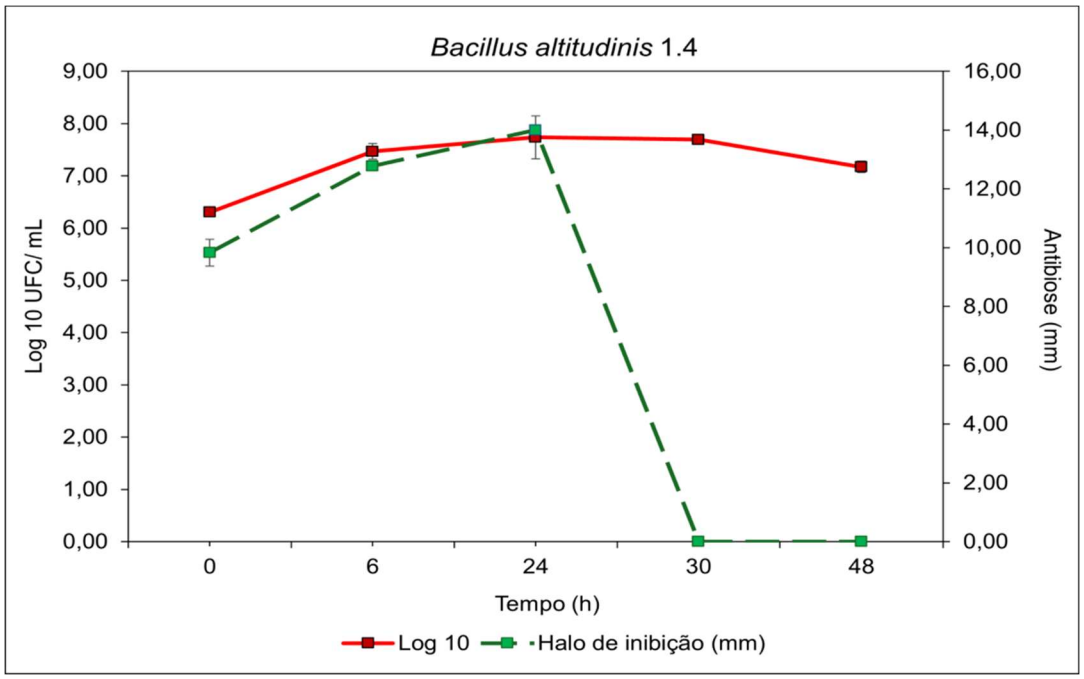


Figura 7. Curva de crescimento de *B. altitudinis* 1.4, na linha contínua o valor de UFC/mL expresso em Log10, e na linha tracejada sua ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644, expressa em milímetros (mm).

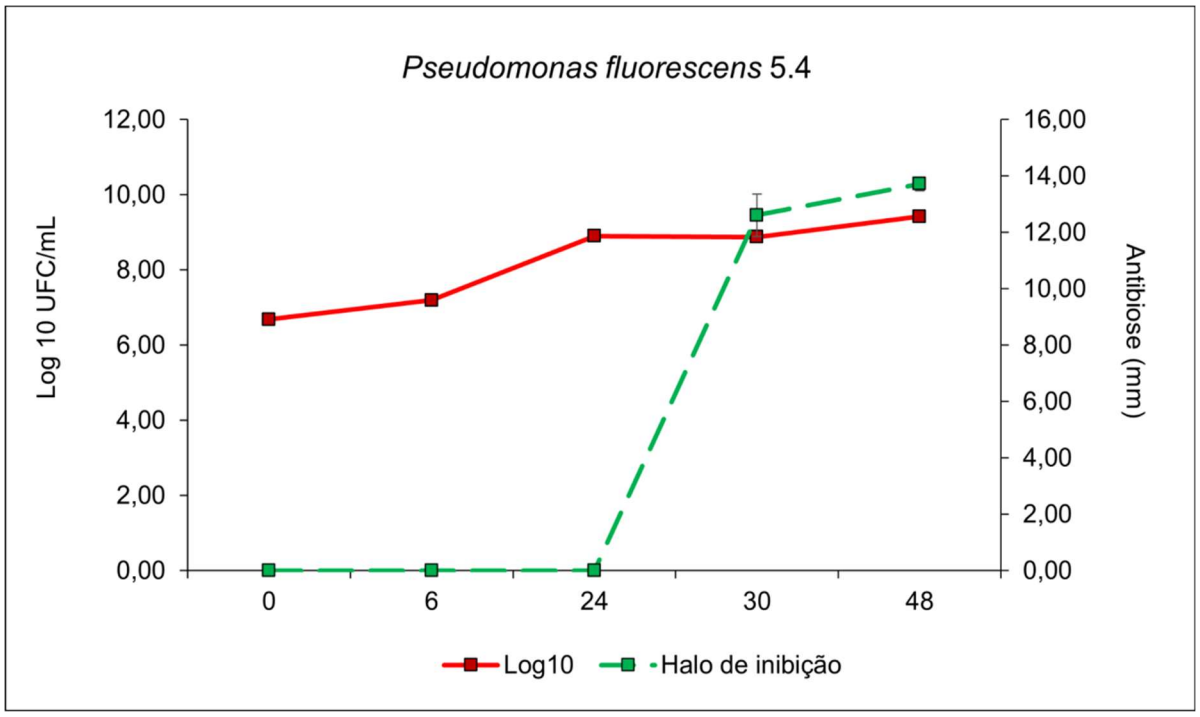


Figura 8. Curva de crescimento de *P. fluorescens* 5.4, na linha contínua o valor de UFC/mL expresso em Log10, e na linha tracejada sua ação antimicrobiana frente a *C. albicans* ATCC 90022, expressa em milímetros (mm).

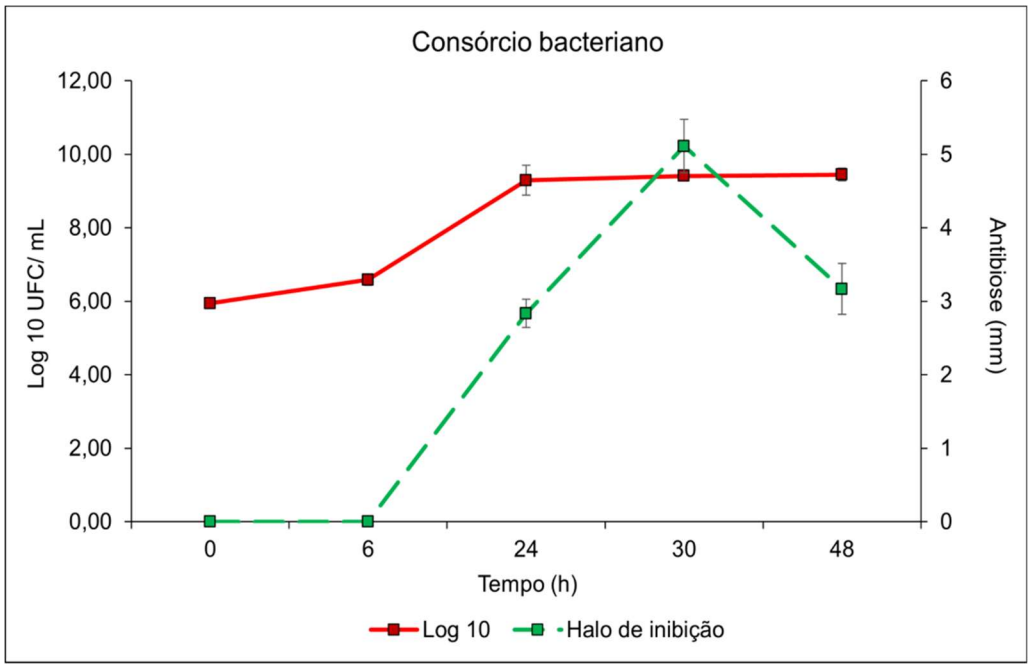


Figura 9. Curva de crescimento do consórcio microbiano, na linha contínua o valor de UFC/mL expresso em Log10, e na linha tracejada sua ação antimicrobiana frente a *C. albicans* ATCC 90022, expressa em milímetros (mm).

5.5 Avaliação da produção de exopolissacarídeo (EPS)

Com o intuito de avaliar a produção de exopolissacarídeos pelas bactérias de trabalho, o meio de cultivo vermelho congo foi designado por Freeman et al., (1989). Contudo, ao examinar a produção de exopolissacarídeos, tanto *Bacillus altitudinis* 1.4 quanto *Pseudomonas fluorescens* 5.4 tiveram resultados negativos, ou seja, não sintetizaram exopolissacarídeos sob as condições empregadas (Figura 11). Ao utilizar como controle positivo, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram observadas colônias com coloração escura, características de uma bactéria produtora de exopolissacarídeos no meio de cultivo (Figura 11).

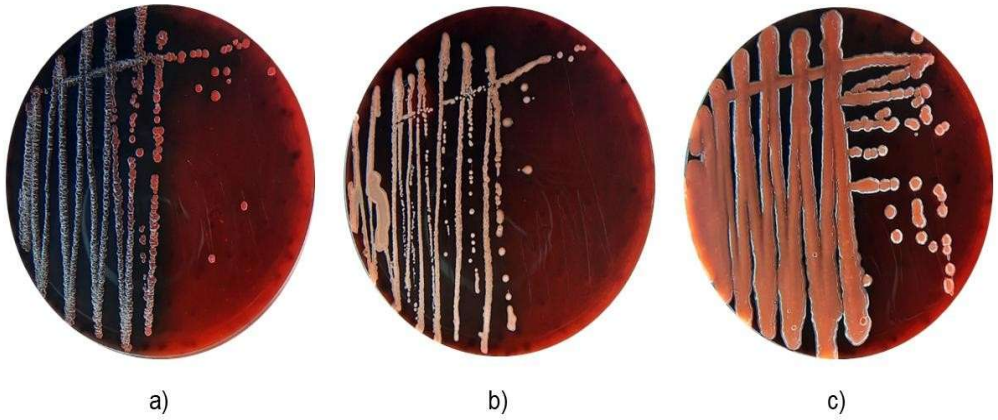


Figura 10. Testes para avaliação de síntese de exopolissacarídeos em vermelho congo. a) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, usado como controle positivo. b) *Bacillus altitudinis* 1.4. c) *Pseudomonas fluorescens* 5.4.

5.6 Avaliação da produção de biofilmes pelas bactérias *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 pelo método do cristal violeta

A habilidade de sintetizar a matriz extracelular por *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4, individualmente e em consórcio bacteriano, foi investigada pelo método do cristal violeta na concentração de 0,1% (Tabela 2). A média de densidade óptica (DO) por *B. altitudinis* 1.4 foi de 0,304, *P. fluorescens* 5.4 com média de DO de 0,337 e a incubação em conjunto de ambas resultou em DO média de 0,234. O tratamento controle negativo composto pelo meio de cultivo TSB registrou DO média referente a 0,058. Em comparação, notou-se valores de DO médios de 1,081 ao usar *S. epidermidis* ATCC 35984, isolado utilizado como controle positivo. Utilizando a classificação de Stepanovic et al. (2004), os diferentes ensaios foram classificados quanto a sua capacidade de formar biofilme (Tabela 2). Desta forma, o controle negativo no qual o meio de cultivo TSB foi usado foi classificado como “não formador de biofilme”, *Bacillus altitudinis* 1.4 e o consórcio bacteriano foram classificados como “moderados formadores de biofilme” e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 e *S. epidermidis* ATCC 35984 foram classificados como “fortes formadores de biofilme”.

Tabela 2. Média da densidade óptica obtida em espectrofotômetro (600 nm) do biofilme formado pelos tratamentos bacterianos ao serem submetidos ao método de cristal violeta a 0,1%. Na coluna da direita, constam as respectivas classificações empregadas por Stepanovic et al. (2004).

Microrganismo	Média DO	Classificação
Controle TSB	0,058	Não Formador de Biofilme
S. epidermidis ATCC 35984	1,082	Forte Formador de Biofilme
Bacillus altitudinis 1.4	0,304	Moderado Formador de Biofilme
Pseudomonas fluorescens P.L 5.4	0,338	Forte Formador de Biofilme
Consórcio	0,234	Moderado Formador de Biofilme

5.7 Solubilização de fosfatos em placa

Durante os ensaios visando testar a capacidade de solubilização de fosfato, *Bacillus altitudinis* 1.4, *Pseudomonas fluorescens* 5.4 e o consórcio foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio tribásico, sendo observada a formação de halos transparentes característicos no entorno das colônias bacterianas (Tabela 3). O índice de solubilização dos ensaios foi elaborado a partir da divisão do diâmetro do halo de solubilização com o diâmetro da colônia bacteriana, como especificado no item 4.9. A bactéria *B. altitudinis* 1.4 registrou índice médio de 1,95. *P. fluorescens* 5.4 após feito o cálculo demonstrou valores de solubilização de 2,51 e por fim ao cultivar ambas as bactérias em conjunto foram observados índices de solubilização médios de 2,53. O controle positivo *B. catarinensis* 89, após o mesmo período de cultivo, obteve razão entre halo de solubilização e tamanho da colônia médio de 2,4.

Ao se testar a habilidade de solubilizar fontes de fosfato alternativas como fosfato de alumínio e o fosfato de ferro, não foi observada capacidade de solubilizar essas fontes de fosfato nas condições empregadas.

Tabela 3. Índice de solubilização de fosfato de cálcio tribásico das bactérias de trabalho após 7 dias de cultivo. O IS (índice de solubilização) foi obtido a partir da divisão do tamanho do halo de solubilização e o tamanho da colônia bacteriana.

Tratamentos	Índice de Solubilização (IS)
Burkholderia catarinensis 89	2,4
Bacillus altitudinis 1.4	1,95
Pseudomonas fluorescens 5.4	2,51
Consórcio	2,53

5.8 Produção de sideróforos e fitohormônios

O meio de cultivo suplementado com cromoazurol S foi empregado para avaliação da síntese de sideróforos pelos microrganismos de trabalho. Com o cultivo de *Bacillus altitudinis* 1.4, *Pseudomonas fluorescens* 5.4 e o consórcio bacteriano ao longo de 7 e 14 dias (Figura 12) sob temperatura de 28ºC observou-se a produção de halos amarelados, característicos do meio de cultivo, indicando a habilidade desses isolados de sintetizar sideróforos.

Além disso, com o intuito de estimar a produção de fitohormônios pelas bactérias do trabalho. Buscou-se avaliar a capacidade de *B. altitudinis* 1.4, *P. fluorescens* 5.4 e do consórcio dos microrganismos de produzir auxinas, sendo elaborada uma curva comercial. Observou-se que todos os microrganismos submetidos a esses ensaios foram capazes de sintetizar fitormônios ao cultivá-los em meio de cultivo com triptofano adicionado. Ao determinar a habilidade de *B. altitudinis* 1.4 de sintetizar esses compostos, constataram-se valores com média de 3,2 µg/mL durante os ensaios. A bactéria *P. fluorescens* 5.4 também apresentou capacidade de produzir essas moléculas por meio desta metodologia, sendo observados valores em média de 10,0 µg/mL. Na avaliação do consórcio bacteriano, este demonstrou capacidade de sintetizar auxinas sendo medidos valores 8,8 µg/mL, em média. O

controle positivo *Burkholderia catarinensis* 89 foi capaz de sintetizar auxinas no decorrer do experimento, no qual observaram valores médios de 3,8 µg/mL. Com a análise estatística das médias, notase que *Pseudomonas fluorescens* 5.4 e o consórcio bacteriano produziram maior quantidade de auxinas em relação aos demais ensaios, destacando-se como estatisticamente diferentes de *B. altitudinis* 1.4 e do controle positivo *B. catarinensis* 89 (Figura 13).

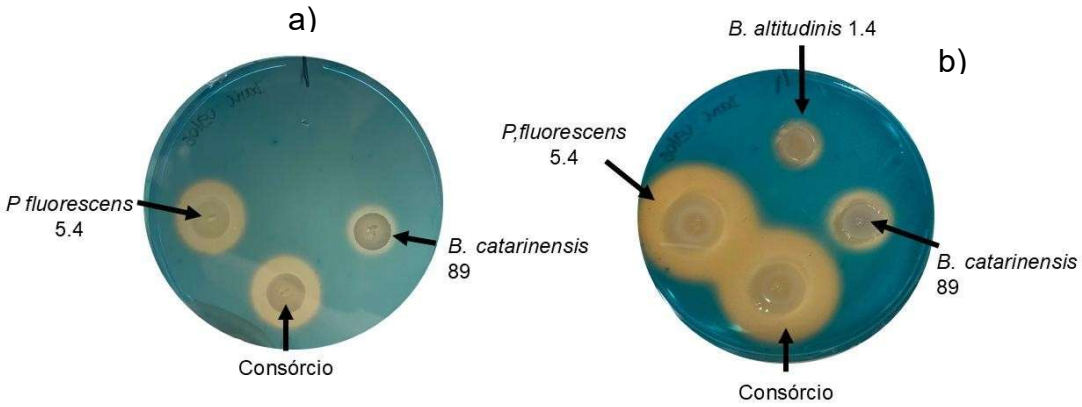


Figura 11. Produção de sideróforos em meio de cultivo suplementado com Cromoazurol S (CAS) pelos isolados *B. altitudinis* 1.4, *P. fluorescens* 5.4 e o consórcio. a) Avaliação de produção de sideróforos ao longo de 7 dias. b) Avaliação de produção de sideróforos ao longo de 14 dias. As setas destacam colônias das bactérias utilizadas no trabalho que ao longo do período do experimento. A bactéria *Burkholderia catarinensis* 89 foi utilizada como controle positivo.

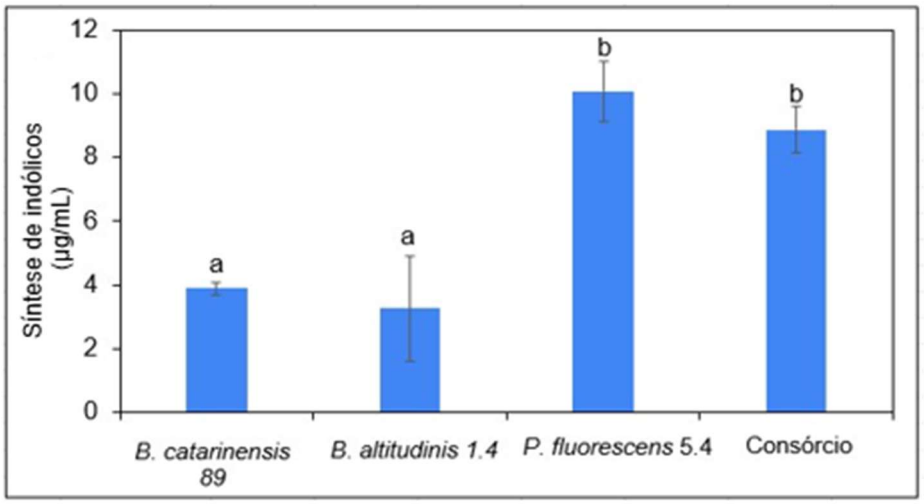


Figura 12. Gráfico relacionado a avaliação dos tratamentos em relação a síntese de auxinas. As médias adquiridas nos experimentos foram analisadas quanto a sua normalidade por meio de shapiro-wilk, sendo p>0,05 considerado significativo. Após, os valores submetidos por ANOVA e por fim separadas por teste de Tukey. A fim de indicar a diferença estatística das médias dos tratamentos foi utilizado as letras “a” e “b”.

5.9 Avaliação de atividade antifúngica in vitro

Com o intuito de se estimar a capacidade de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 separadamente e em conjunto como biocontroladores, essas bactérias foram testadas frente a fitopatógenos de destaque no setor agrícola.

Durante os ensaios antifúngicos, o isolado *Bacillus altitudinis* 1.4 foi capaz de reduzir a área do micélio de diferentes fitopatógenos (Figura 14; Figura 15). Quando testadas frente a *B. altitudinis* 1.4, os fitopatógenos *M. phaseolina* e *F. oxysporum* tiveram redução da área do micelial em 62,5% e 15,3%, respectivamente, em relação ao controle negativo (Figura 16; Figura 17). A bactéria *P. fluorescens* 5.4 foi capaz de reduzir o desenvolvimento da área do micélio de *M. phaseolina* significativamente, com redução de 43,8% da área em cm^2 quando comparado ao controle negativo (Figura 16). Ao testar *P. fluorescens* 5.4 frente a *Fusarium oxysporum*, esta não foi capaz de reduzir sua área micelial significativamente (Figura 17). O consórcio bacteriano, sob as condições de cultivo aplicadas demonstrou capacidade de inibir

Macrophomina phaseolina e *Fusarium oxysporum*, mas não significantemente em relação ao controle positivo (Figura 14; Figura 15; Figura 16; Figura 17).

Ao se testar as bactérias de trabalho de forma isolada e em consórcio quanto a sua ação antifúngica contra os fungos fitopatógenos: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani*, *Fusarium* spp. “Fusg 03” e “Fusto 07“ não se observou atividade inibitória, ou seja, não representando inibição no desenvolvimento dos micélios conforme se pode observar nas figuras 18, 19, 20 e 21.

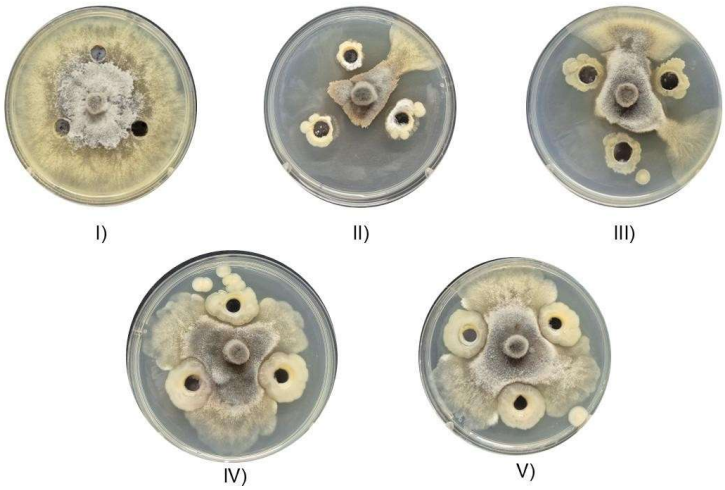


Figura 13. Imagens de placas de antibiose com *Macrophomina phaseolina*. I) tratamento controle negativo. II) Tratamento controle positivo “CLV 100”. III) Tratamento utilizando *B. altitudinis* 1.4. IV) Tratamento usando *P. fluorescens* 5.4. V) Tratamento impregnado com o consórcio bacteriano (*B. altitudinis* 1.4 + *P. fluorescens 5.4*).

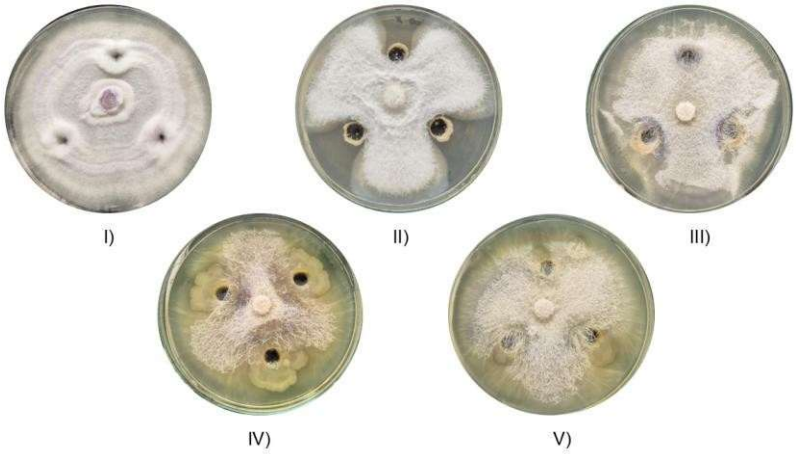


Figura 14. Imagens de placa com *Fusarium oxysporum* cultivada ao longo de 7 dias. I) Tratamento de controle negativo apenas com o fitopatógeno. II) Controle positivo, utilizando isolado “CLV 100”. III) Tratamento utilizando *B. altitudinis* 1.4. IV) Tratamento no qual se aplicou *P. fluorescens* 5.4. IV) Ensaio no qual se aplicou o consórcio bacteriano.

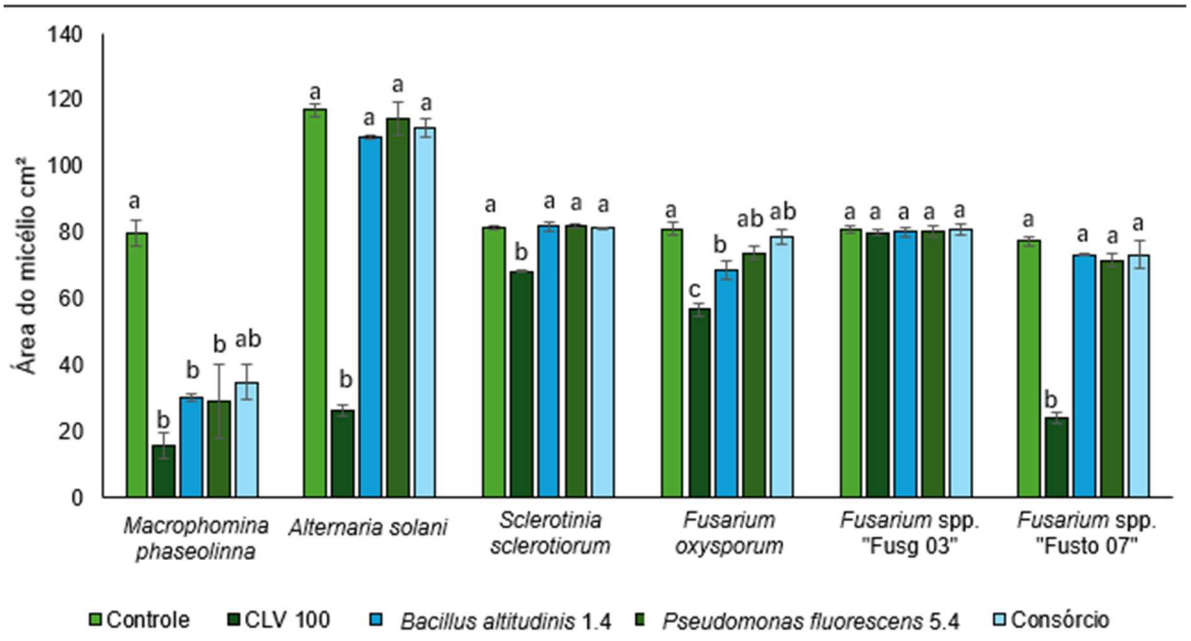
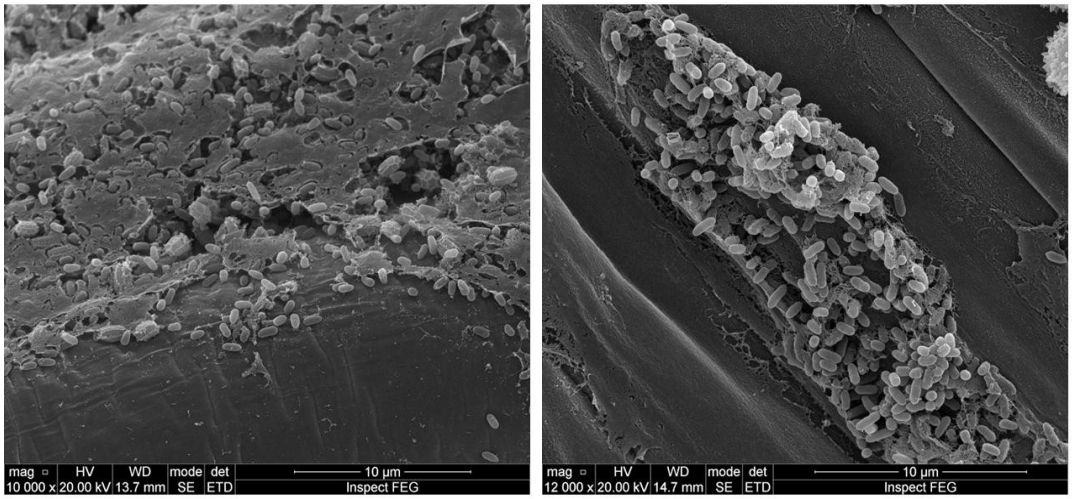


Figura 15. Gráfico gerado a partir das análises das placas de antibiose pelo software ImageJ. Assim possibilitando analisar o desenvolvimento do micélio do fungo *M. phaseolina* frente ao tratamento com diferentes bactérias. Como controle positivo, utilizou-se o isolado “CLV 100”. As letras nos gráficos são utilizadas para diferenciar grupos estatísticos distintos entre si e sua similaridade.

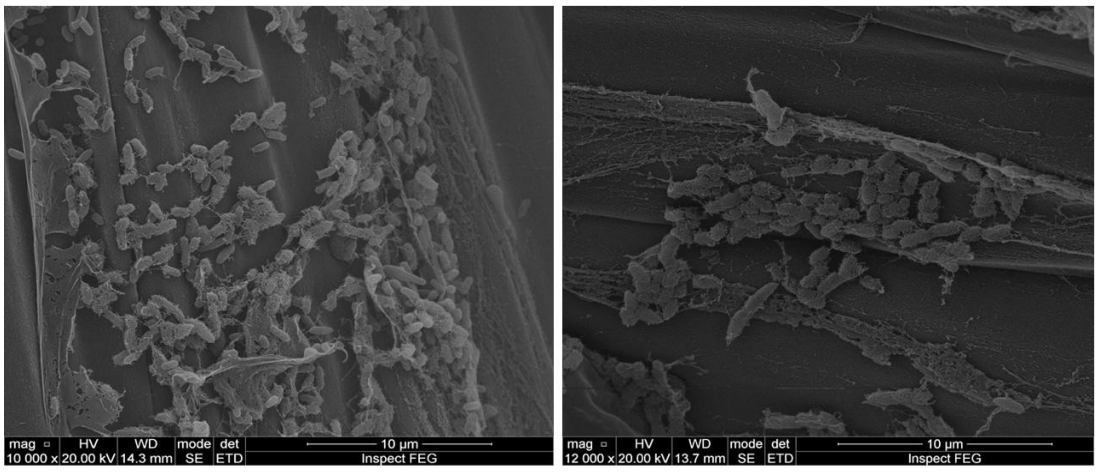
5.10 Microbiolização de sementes de tomate

Com o intuito de visualizar a capacidade das bactérias de se aderir a superfície das raízes de plantas de tomate, ensaios utilizando suspensões bacterianas e sementes de tomates foram realizados. A microbiolização das sementes utilizando as suspensões com os microrganismos de interesse, demonstrou capacidade de colonização da região radicular em todos os ensaios testados. As imagens adquiridas pela microscopia eletrônica de varredura permitiram visualização da morfologia das células bacterianas de *B. altitudinis* 1.4 (Figura 22), *P. fluorescens* 5.4 (Figura 23) e do consórcio de ambas as bactérias (Figura 24), em raízes de plântulas utilizadas no experimento.



A) B)

Figura 16. Imagem de microscopia eletrônica de varredura de raíz de tomateiro colonizado com Bacillus altitudinis 1.4. A) Imagem destacando células bacterianas em forma de bastonetes, em magnificação (mag) 10.000x. B) Imagem destacando células bacterianas em ampliação 12.000x. Barra de escala 10 µm



A) B)

Figura 17. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de raíz de tomateiro colonizado com *Pseudomonas fluorescens* 5.4. A) Imagem destacando células bacterianas com ampliação 10.000x. B) Imagem destacando células bacterianas em ampliação 12.000x. Barra de escala 10 µm.

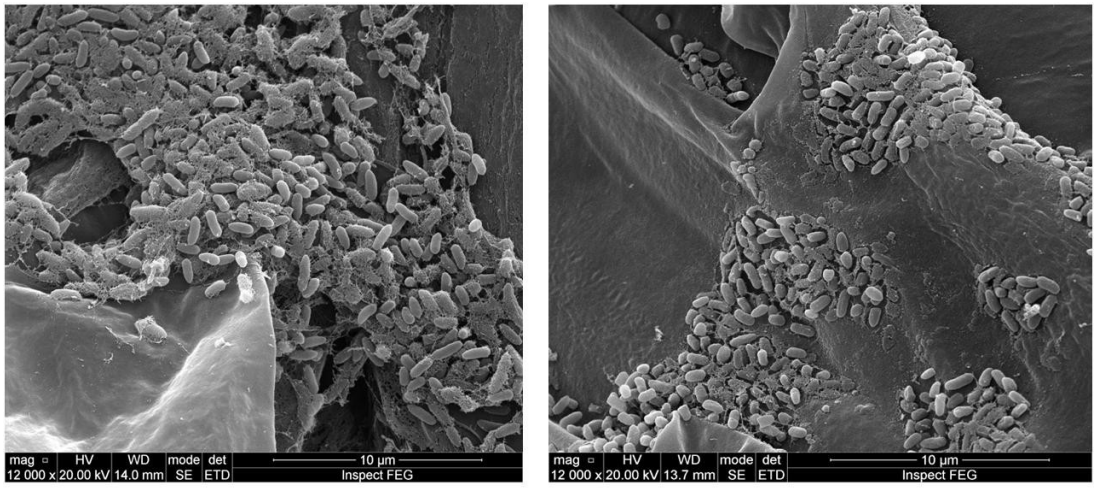


Figura 18. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura realizada em raízes de tomateiro colonizado com o tratamento consórcio no qual é possível visualizar células de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4, as imagens das raízes em ampliação 12.000x. Barra de escala 10 µm.

5.11 Promoção de crescimento vegetal em tomateiros

Visando testar a habilidade de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 em relação a promoção de crescimento vegetal em plantas de tomate, ensaios *in vivo* foram realizados. Após os 40 dias de experimento, os vegetais cujo *B. altitudinis* 1.4 foi inoculado tiveram médias de comprimento aérea e radicular de 41,3 cm e 17,4 cm, respectivamente. Após a secagem das plantas obteve-se o peso seco de ambas as partes, com valores médios de parte aérea de 0,45 g enquanto pesos secos médios das raízes de 0,09 g foram registrados. Ao aplicar *P. fluorescens* 5.4 em contato com as plantas, observou se medidas de extensão aérea de 41,2 cm e 19,4 cm do comprimento das raízes. Após a secagem de ambas as regiões, obtiveram-se valores médios de massa seca referentes a 0,59 g para a parte aérea e 0,10 g referente a parte radicular.

Por fim, com a inoculação conjunta das bactérias, foram registrados comprimentos médios de 37,5 cm para a parte aérea e 16,4 cm para a porção radicular. Após o processo de secagem de ambas as estruturas, obtiveram-se valores

médios de massa seca de 0,41 g para a parte aérea e 0,07 g para a parte radicular. Durante o tratamento controle, as plantas foram inoculadas apenas com água. Nessas condições, observou-se comprimento médio da parte aérea de 38,2 cm e comprimento médio das raízes de 17,9 cm. Após o processo de secagem, a massa seca média obtida foi de 0,51 g para a parte aérea e 0,08 g para a parte radicular.

Constatou-se que o comprimento da região aérea e da porção radicular dos vegetais não foram significativamente distintas entre os tratamentos. Desta forma, não houve distinção entre a aplicação de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5,4, isoladamente e em conjunto, em relação ao controle (Figura 25). Além disso, com a averiguação dos dados relacionados à massa seca das partes aéreas e das raízes, constatou-se que não houve influência significativa da aplicação dos microrganismos em comparação ao tratamento controle, não sendo possível observar diferença estatística significativa entre os diferentes ensaios (Figura 26).

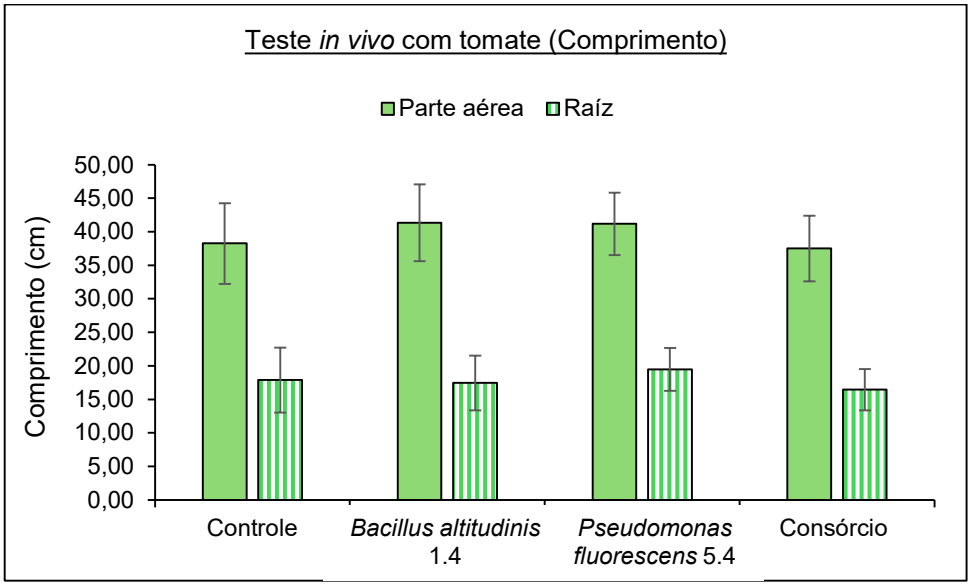


Figura 19. Gráfico contendo os dados relacionados aos ensaios in vivo com tomate, utilizando diferentes tratamentos. As médias relacionadas ao comprimento das partes aéreas e das raízes não apresentaram diferença estatística. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para observar a distribuição dos dados dos dados, sendo p>0,05 significativo. As médias submetidas a teste ANOVA e essas separadas por teste de tukey.

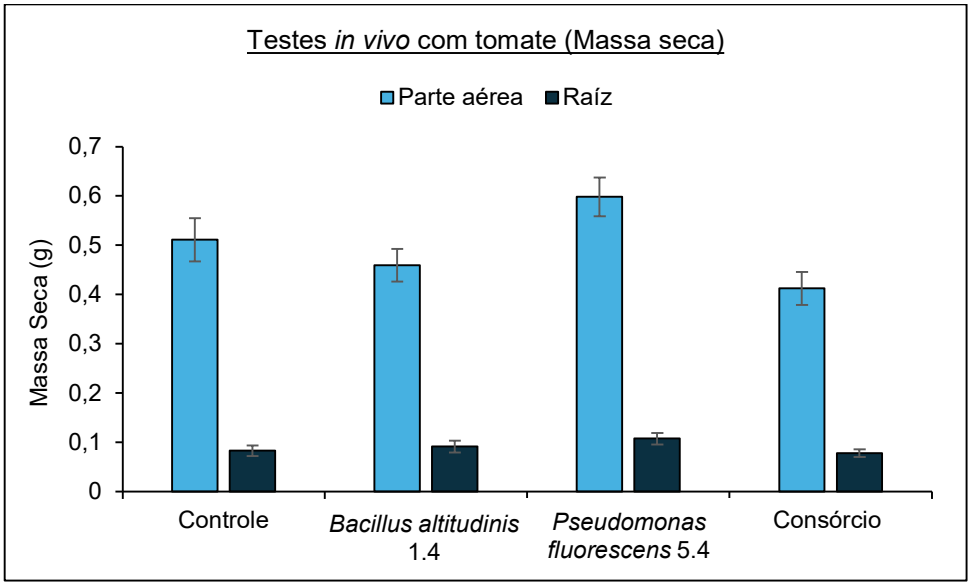


Figura 20. Gráfico contendo os dados relacionados aos ensaios in vivo com tomate, utilizando diferentes tratamentos. As médias relacionadas à massa seca das partes aéreas e das raízes não apresentaram diferença estatística. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para observar a distribuição dos dados dos dados, sendo p>0,05 significativo. As médias submetidas a teste ANOVA e essas separadas por teste de tukey.

6. DISCUSSÃO

Bacillus spp. e *Pseudomonas* spp. são gêneros bacterianos distintos, mas que são frequentemente referenciados por sua aplicabilidade em diferentes setores, inclusive na agricultura (Khan et al., 2022; Yang et al., 2025). *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 foram objetos de estudo em trabalhos anteriores, sendo utilizados como controladores de microrganismos e na caracterização da formação de biofilme (Bogo et al., 2017; Jankoski et al., 2025). Contudo, não haviam sido testadas suas capacidades, tanto isoladas quanto em conjunto, para atuarem como biocontroladores de fitopatógenos e agentes de promoção de crescimento vegetal.

A espécie *B. altitudinis* apresenta-se filogeneticamente relacionada ao complexo *B*. *pumilus,* dentro do grupo *B. subtilis*, onde muitos microrganismos do grupo destacam-se pela aplicabilidade biotecnológica (Bach et al., 2022; Comba-González et al., 2024; Hudson et al., 2021; Iqbal et al., 2023). O sequenciamento do genoma completo de *B. altitudinis* 1.4 foi de essencial importância para estimar sua aplicabilidade biotecnológica, principalmente pela presença de genes similares àqueles responsáveis pela produção de pumilacidina e bacilisina, importantes moléculas antimicrobianas (Jankoski et al., 2024, 2025). O isolado *P. fluorescens* 5.4 foi identificado como pertencente ao complexo *P. fluorescens* a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA (Lakshmikanthan et al., 2025; Lalucat et al., 2020; Sokra, 2025). Esses grandes grupos de bactérias comportam diferentes isolados que demonstraram aplicabilidade no setor agrícola (Khan et al., 2022; Pirttilä et al., 2021; Yang et al., 2025). Exemplo disso, foi constatado ao comparar o sequenciamento de *P. fluorescens* 5.4, onde observou-se 99% de similaridade com *P. fluorescens* A506, isolado pertencente na formulação do bioinsumo “*BlightBan*” comercialmente disponível e referenciado como agente de biocontrole (Bogo et al., 2017; Cruz & Motta, 2019; Palkina et al., 2025; Stockwell et al., 2013).

Durante as avaliações voltadas à inocuidade, os isolados de trabalho demonstraram diferentes propriedades. Durante a avaliação da capacidade hemolítica de *B. altitudinis* 1.4, este demonstrou ser beta hemolítico, característica associada a presença do gene hemolisina-III (*hlyIII*) (Jankoski et al., 2024). Contudo, a presença desse gene não é suficiente para caracterizar a bactéria como patogênica, pois em espécies de *B. cereus*, por exemplo, a expressão de genes associados a atividade hemolítica são regulados pelo regulon PlcR que pode ser influenciado por estresses externos, o que pode tornar algumas espécies gama hemolíticos e influenciar a expressão de fatores de virulência (Jacobs et al., 2025; Meng et al., 2025). Quanto ao perfil de suscetibilidade, o isolado *B. altitudinis* 1.4 indicou suscetibilidade intermediária a fluoroquinolonas, indicando que sob aumento de concentração do antibiótico o isolado apresenta comportamento suscetível (EUCAST, 2019). Resultados semelhantes foram catalogados ao testar a suscetibilidade de *B. cereus* frente a ciprofloxacino e levofloxacino, no qual se observou que essa bactéria também foi classificada como suscetível intermediária (Haque et al., 2024). Por outro lado, não foi observada atividade hemolítica de *P. fluorescens* 5.4, o que corrobora com outros isolados encontrados dentro da espécie provenientes de coletas ambientais (Mogrovejo et al., 2020). Além disso, indivíduos dentro da espécie *P. fluorescens* provenientes de amostras ambientais se mostraram resistentes aos antibióticos aztreonam e imipenem, assim como observado nos ensaios de suscetibilidade a antibióticos de *P. fluorescens* 5.4 (Silverio et al., 2022, 2025).

A ação antimicrobiana dos isolados frente a bactérias e fungos de importância ambiental e padronizados foram constatados ao longo do trabalho, destacando-se a capacidade de *B. altitudinis* 1.4 de inibir *L. monocytogenes* ATCC 7644, *M. phaseolina* e *F. oxysporum*. De acordo com outros estudos, observam-se que diferentes indivíduos de *B. altitudinis* estão relacionados como biocontroladores, em especial contra fungos fitopatogênicos (Cao et al., 2024; Goswami & Deka, 2019; Lafuente et al., 2024; Sahu et al., 2020). Resultados correlacionados foram encontrados por Sahu

et al (2020) que usou *B. altitudinis* GTS 16 para controlar *M. phaseolina*, associando a geração de compostos orgânicos voláteis como as principais vias da ação antifúngica. Durante a análise de genoma de *B. altitudinis* 1.4, os genes relacionados à produção de pumilacidina e o precursor da bacteriocina UViB foram destacados, importantes substâncias antimicrobianas que podem estar relacionadas a atividade observada no trabalho (Jankoski et al., 2025). A síntese de lipopeptídeos como surfactina, especificamente pumilacidina, altitudinina “A”, bacteriocinas, compostos aromáticos (acetoína e 2,5-dimetilpirazina) e peptídeos sintetizados ribossomicamente modificados pós-traducionalmente, já foram constatados como responsáveis pela supressão de importantes fitopatógenos por diferentes cepas de *B. altitudinis* e grupos filogenéticamente relacionados (Comba-González et al., 2024; Espinosa Bernal et al., 2024; Hudson et al., 2021; Lafuente et al., 2024). Enquanto isso, *P. fluorescens* 5.4*,* demonstrou-se eficiente no controle de microrganismos de origem clínica e do fungo *M. phaseolina*. As bactérias *P*. *fluorescens* e *Pseudomonas* spp. possuem a habilidade de sintetizar diferentes moléculas de ação antimicrobiana como as fenazinas, metabólitos secundários heterocíclicos, como o ácido fenazina-1carboxílico que foi responsável por inibir *B. cinerea*, *F. oxysporum, X. oryzae* em trabalhos passados (Castaldi et al., 2021; Lakshmikanthan et al., 2025; Serafim et al., 2023). A capacidade de inibir *M. phaseolina* também foi observada por Castaldi et al. (2021), ao utilizar *P. fluorescens* como biocontrolador, onde se sugeriu que as fenazinas foram fundamentais para o controle do fungo. Além dessas moléculas, diferentes grupos de compostos voláteis podem atuar em conjunto na promoção do biocontrole, assim como observado por Yue et al (2023) em ensaios de antibiose utilizando o isolado *P. fluorescens* ZX. Pelo uso conjunto dos compostos voláteis de *P. fluorescens* ZX, foram observados danos às estruturas celulares e inibição do metabolismo de *Botrytis cinerea* (Yue et al., 2023). A inibição das bactérias por *Pseudomonas* spp. poderia estar associada a capacidade do gênero de elaborar antibióticos como pirrolnitrina e pioluteorina, capazes de inibir *Erwinia* spp*., X. campestris e P. syringae* pv*. syringae* (Pawar et al., 2019; Yang et al., 2025).

Outra possibilidade que pode estar relacionada a ação antimicrobiana das bactérias deste trabalho está relacionada às condições de cultivo empregadas. Isso pois, fatores variáveis de cultivo como: fonte de carbono e nitrogênio, pH, tempo de incubação, temperatura e aeração podem influenciar a produção e a concentração de lipopeptídeos, fenazinas e bacteriocinas com propriedades antimicrobianas (Biniarz et al., 2018; Elazzazy et al., 2024; Lakshmikanthan et al., 2025). Exemplo disso, foi observado em estudo que avalia a ação de *P. fluorescens* VSMKU3054 de inibir *R. solanacearum.* Durante os ensaios observou-se que o meio de cultivo King's B influenciava na produção de moléculas antimicrobianas, assim *P. fluorescens* VSMKU3054 cultivada em King's B incrementou a sua produção de 2,4-Diacetilfloroglucinol (Suresh et al., 2022)**.** Durante ensaios utilizando *B. altitudinis* "MS16" como objeto de estudo, a produção de biossurfactante antifúngico sintetizado por essa bactéria foi diretamente relacionado a variáveis como pH, temperatura e concentração de sal no meio de cultivo (Goswami & Deka, 2019).

O sinergismo é essencial para a eficácia de um consórcio bacteriano, a aplicação de mais de um microrganismo pode influenciar beneficamente e apresentar melhores resultados em comparação a aplicação desses microrganismos isoladamente (Santoyo et al., 2021; D. Yang et al., 2024). Diferentes estudos buscam promover a aplicação de consórcios bacterianos para estimular a defesa de cultivares frente fitopatógenos e promoção de crescimento vegetal (Moreno-Velandia et al., 2024; Shukla et al., 2022; D. Yang et al., 2024). A associação de *B*. *subtilis* "BHU M"e *P*. *fluorescens* "BHU V" quando aplicados em consórcio em plantas infectadas por *Sclerotium rolfsii* demonstraram induzir o sistema de defesa vegetal de maneira mais eficiente em comparação às bactérias separadas (Shukla et al., 2022) Em outro estudo realizado por Yang et al (2024), diferentes isolados de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. foram testados a fim de testar sua sinergia como biocontroladores e promotores de crescimento vegetal. Ao fim desse trabalho, foi observado que algumas combinações entre essas bactérias foram mais eficientes no controle de *F.*

oxyporum f. sp. *niveumem* em relação à utilização individual de isolados de *Bacillus* spp. (Yang et al., 2024).

Na avaliação da atividade antimicrobiana do consórcio de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 contra *C. albicans* ATCC 90022, não foi observado aumento no halo de inibição em relação ao uso individual de *P. fluorescens* 5.4. Além disso, quando colocado frente a *M. phaseolina*, o consórcio bacteriano não demonstrou atividade antifúngica significativa, enquanto as aplicações individuais de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 demonstraram ação antifúngica contra esse fungo. Um biocontrolador quando utilizado em um consórcio pode impedir a proliferação de um patógeno alvo, porém pode interferir diretamente sobre outros organismos dentro do consórcio, diminuindo a eficácia da antibiose (Bizjak-Johansson et al., 2025; Nunes et al., 2024; Rosenberg et al., 2016). As relações de sinergia entre os microrganismos do consórcio podem ser alteradas devido a mudanças ambientais e na disponibilidade de recursos, assim consórcios de microrganismos podem sofrer alterações na sua sinergia (Bizjak-Johansson et al., 2025; Maciag et al., 2023; Nunes et al., 2024). O isolado *P. fluorescens* A506, por exemplo, já foi capaz de degradar antibióticos sintetizados por *Pantoea vagans* C9-1 e *Pantoea agglomerans* Eh252, reduzindo sua eficácia como biocontroladores ao serem empregados em consórcio (Maciag et al., 2023; Stockwell et al., 2011).

Durante a curva de crescimento de *B. altitudinis* 1.4, em sua fase exponencial, e *P. fluorescens* 5.4, durante a fase estacionária, demonstraram atividade antimicrobiana. Diferentes compostos antimicrobianos podem ser sintetizados durante a fase logarítmica e início da fase estacionária por diferentes bactérias, inclusive as dos gêneros *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. (Biniarz et al., 2018; Chavarria-Quicaño et al., 2025; Elazzazy et al., 2024). Lipopeptídeos com função antimicrobiana, como a fengicina e a surfactina, são produzidas em maiores escalas ao longo da fase logarítmica de *B. paralicheniformis* TB197 (Chavarria-Quicaño et al., 2025). A avaliação da atividade da ação antimicrobiana presente no sobrenadante de

B. altitudinis 1.4, obtido através da centrifugação das culturas, foi testada frente a isolados do gênero *Listeria* spp. (Cavalini et al., 2021b). No decorrer do estudo, Cavalini et al. (2021) observaram que a atividade antimicrobiana variou de acordo com o tempo de cultivo em que o sobrenadante era obtido, sendo a maior ação antibacteriana verificada em 24 horas de cultivo de *B. altitudinis* 1.4 (Cavalini et al., 2021).

Ao avaliar a atividade antimicrobiana ao longo dos ensaios, se observou que que o cultivo de 24 horas *B. altitudinis* 1.4 inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644, contudo ao se aplicar o cultivo de 48 horas não houve formação de halo de inibição. A síntese de compostos antimicrobianos ao longo da curva de crescimento do microrganismo pode ser modificada modificado com base em outros fatores, assim influenciando diretamente o seu desempenho antimicrobiano (Liu et al., 2022; Samani et al., 2021). Enzimas com atividade proteolítica são capazes de degradar e consequentemente eliminar a atividade das bacteriocinas e outros antimicrobianos de natureza peptídica (Liu et al., 2022; Samani et al., 2021).

Durante os ensaios voltadas a atividade antimicrobiana ao longo da curva de crescimento de *P. fluorescens* 5.4 se registrou atividade frente a *C. albicans* ATCC 90022 durante os cultivos de 30 e 48 horas. O metabólito secundário 2,4-Diacetilfloroglucinol é um importante composto fenólico que pode ser sintetizado por *P. fluorescens* e possui ação antifúngica, sendo empregada em diferentes estudos (Lakshmikanthan et al., 2025; Suresh et al., 2022; Yang et al., 2025). No trabalho de Suresh et al (2022), a bactéria *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054, produtora de 2,4-Diacetilfloroglucinol, teve sua curva de crescimento associada à produção desse metabólito secundário, atingindo maiores concentrações entre 36 e 48 horas de cultivo. Novos estudos focados no isolamento desses compostos pelas bactérias é de essencial importância para optimizar a ação antimicrobiana de microrganismos biocontroladores.

Exopolissacarídeos são polímeros de carboidratos de baixo peso molecular excretados por microrganismos para auxiliar na aderência a superfícies e sobrevivência ao ambiente (Kumari et al., 2025). Nos ensaios utilizando meio de cultivo vermelho congo, não foi observada a formação de exopolissacarídeos nas condições empregadas. Contudo, foi constatada a presença de genes *exoZ/epsG* e o cluster relacionado a síntese de *pgaA-D* no genoma de *B. altitudinis* 1.4, que são relacionados a síntese de polissacarídeos e são identificados em diferentes isolados de *Bacillus* spp. (Jankoski et al., 2025; Wu et al., 2020). Além disso, a excreção de polissacarídeos antecede a formação de biofilme, habilidade que *Pseudomonas fluorescens* 5.4 demonstrou ao sintetizar biofilme em estudo anterior (Cruz & Motta, 2019). O motivo dos resultados constatados pode estar relacionado a condições às quais as bactérias foram submetidas, tendo em vista que variáveis como: fonte de carbono, pH e temperatura podem influenciar na produção desses polímeros (Jyoti et al., 2024). Além disso, outra possibilidade estaria relacionada a necessidade de estresses ambientais, para estimular determinadas bactérias a excretar exopolissacarídeos para sobreviver (Bhagat et al., 2021).

Durante a avaliação da síntese de biofilme pelas bactérias de trabalho, ambas demonstraram capacidade de formar biofilme, sendo *B.altitudinis* 1.4 e o consórcio bacteriano classificados como “moderados formadores de biofilme”, *P. fluorescens* 5.4 como “forte formador de biofilme”. Em trabalho de Jankoski et al (2025), *B. altitudinis* 1.4 foi classificado como “forte formador de biofilme” de acordo com a mesma classificação. Essa alteração de resultados provavelmente pode estar atrelada às condições de cultivo dos dois experimentos, em vista que no trabalho passado cultivou-se o isolado à 37 ºC, enquanto nesse ensaio utilizou-se temperatura de 28 ºC. O aumento da temperatura pode ter ação direta na formação da matriz do biofilme e na aceleração do metabolismo (ChavarriaQuicaño et al., 2025; Zhu et al., 2020). Desta maneira, a elevação da temperatura pode estimular a expressão de genes relacionados à produção de biofilme, auxiliando a sobrevivência das bactérias frente

a esse estresse (Chavarria-Quicaño et al., 2025; Zhu et al., 2020). Em estudo anterior realizado com *P. fluorescens* 5.4, por Cruz e Motta (2019), o biofilme da bactéria foi classificado como “moderado formador de biofilme” ao cultivar a bactéria em 23 ºC e 37 ºC. Nesse mesmo trabalho, observou-se variações na quantidade de células sésseis dos cultivos do isolado de acordo com alterações da temperatura (Cruz & Motta, 2019). Achados similares foram obtidos ao avaliar o biofilme da bactéria psicrotrófica *P. fluorescens* PF07 a qual teve aumento de sua biomassa durante 24 horas a temperatura de 25 ºC (Liu et al., 2023).

Ao analisar o biofilme produzido pelo consórcio, este demonstrou ser classificado como “moderado formador de biofilme”, com média de densidade óptica abaixo dos biofilmes catalogados em *P. fluorescens* 5.4 isoladamente. A provável forma de correlação ao resultado observado, está relacionado à competição das duas bactérias por recursos do meio de cultivo (Christensen et al., 2002; Rosenberg et al., 2016). Competição dentro do consórcio foi observado por Rosenberg et al. (2016) que ao analisar o biofilme de *Bacillus subtilis* e *Bacillus simplex*, constatou alteração no número de unidades formadoras de colônias das duas bactérias ao longo do tempo, onde se observou que *B.subtilis,* provavelmente por meio de flagelo e surfactina, inibiam o crescimento de *B. simplex* (Rosenberg et al., 2016).

Os sideróforos são quelantes de ferro com alta afinidade com íons de ferro, sendo provenientes do metabolismo secundário, podendo exercer controle biológico indireto e beneficiar a aquisição de ferro pelas plantas assim promovendo o crescimento vegetal (Niehus et al., 2017; Schalk, 2025). Sob as condições impostas, todos os tratamentos submetidos ao meio de cultivo com Cromo Azurol S sintetizaram sideróforos. Com o teste qualitativo, não se pode especificar quais sideróforos essas bactérias estão secretando, contudo, na literatura é possível inferir quais são as moléculas secretadas por essas bactérias. A pioverdina, sideróforo da classe dos hidroxamatos, é o principal quelante encontrado em isolados de *P. fluorescens,* contudo espécies do gênero já apresentaram capacidade de sintetizar diferentes

sideróforos de classes diferenciadas como pseudobactina e outros tipos de pioverdina, de acordo com a disponibilidade de ferro no ambiente (Chen et al., 2023b; Deb & Tatung, 2024; Timofeeva et al., 2022). Por outro lado, ao analisar o genoma de *B. altitudinis* 1.4 e comparar com o de outras espécies do gênero reforça que a produção de sideróforos como a bacilibactina esteja provavelmente atrelada as enzimas sintases pepsintetases de peptídeos não ribossômicos (Jankoski et al., 2025). A capacidade de sintetizar bacilibactina foi observada ao se identificar genes *dhb* em isolados como *B. altitudinis* GQYP101, 19RS3 e T5S-T4, sendo um sideróforo que pode atuar diretamente na membrana celular de outros microrganismos (Cortese et al., 2021; Timofeeva et al., 2022; Zhao et al., 2022). Além da sua possível atividade antimicrobiana, os resultados observados abrem a possibilidade para o uso dos isolados em outros setores, tendo em vista o potencial que estas moléculas possuem em diferentes áreas, como a da saúde e da biorremediação (Schalk, 2025; Soares, 2022).

A solubilização de fosfato tri cálcio é uma importante característica para a classificar uma bactéria como promotora de crescimento vegetal, permitindo que as plantas acessem fontes de nutrientes anteriormente indisponíveis (Elhaissoufi et al., 2022). Essa habilidade de solubilização foi observada em todos os ensaios, despertando interesse da aplicabilidade desses microrganismos. Enzimas como as fosfatases, genes *pqq* e *gcd*, e o óperon *pst*SCAB são fortes indicadores que estão diretamente correlacionadas a solubilização, sendo observadas em variados estudos isolados *B. altitudinis* 19RS3, T5S-T4, RJ-11, GQYP101 (Gaur et al., 2023; Mei et al., 2023; Shah et al., 2022; Zhao et al., 2022). Mecanismos semelhantes foram identificados em isolados de *P. fluorescens.* Além destes compostos ácidos orgânicos são importantes na complexação do cálcio, sendo observados dentro da espécie e do gênero (Oteino et al., 2015; Timofeeva et al., 2023; Yadav et al., 2016). O índice de solubilidade obtido a partir dos ensaios obtidos por *B. altitudinis* 1.4 foi de 1,94; *P. fluorescens* 5.4 de 2,51 e consórcio de 2,53. Resultados relacionados foram obtidos

por Gauer et al. (2023), que ao analisar os isolados de *B. altitudinis* RJ-2, RJ-5 e RJ-25 obtiveram índices de solubilização de 2,10, 2,09 e 2,10 respectivamente. Os valores médios referentes aos índices de solubilização de *P. fluorescens* 5.4 e consórcio foram semelhantes aos encontrados nos isolados PSM3 e PSM4, pertencentes ao grupo *P. fluorescens* isolados de trigo (*Triticum aestivum* L.), cujos índices tiveram valores médios de 2,50 e 2,56, respectivamente (Yadav et al., 2016).

A habilidade de sintetizar fitohormônios como as auxinas é uma das principais características ao se avaliar bactérias promotoras de crescimento vegetal (Al Raish et al., 2025; Gao et al., 2024; Guardado-Fierros et al., 2024). O triptofano é um dos aminoácidos essenciais para a elaboração desse fitohormônio em diferentes rotas metabólicas responsáveis pela síntese do ácido indol-3-acético (AIA) (Gao et al., 2024; Solanki & Shukla, 2023). Ao longo do trabalho observou-se que ambas as bactérias utilizadas no trabalho foram capazes de sintetizar compostos indólicos utilizando meio de cultivo suplementado com triptofano. Os resultados obtidos no trabalho corroboram com outros isolados encontrados na literatura. As bactérias *Bacillus altitudinis* AD134, *B*. *altitudinis* 19RS3, *B*. *altitudinis* T5S-T4, *P. fluorescens* BCPBMS-1 e *P. fluorescens* Ms-01 apresentaram capacidade de sintetizar este fitohormônio e influenciar sua produção endógena nas plantas (Khoso et al., 2024; Venkatraman et al., 2025; Zhang et al., 2023). Analisando o genoma de *B. altitudinis* 1.4, constatou-se a presença dos genes como *ipdC* e *acoR,* diretamente relacionado ao intermediário Indol-3-piruvato descarboxilase para a síntese do ácido indol-3-acético, sendo uma via dependente do triptofano (Batista et al., 2021; Gao et al., 2024). A partir desses achados, levanta-se a hipótese de que a concentração de aminoácidos no meio de cultivo esteja diretamente relacionada à produção de auxinas por essas bactérias, com base nisso, em experimentos futuros diferentes concentrações e tempos de cultivo possam ser aplicados para otimizar a produção do fitohormônio, como observado em trabalho anterior (Franções et al., 2025).

Na avaliação dos ensaios *in vivo*, os três tratamentos empregados demonstraram capacidade de colonizar as raízes das plantas de tomateiro, sendo observados por MEV. A utilização de técnicas como a microbiolização de sementes é amplamente aplicada para avaliar a habilidade de bactérias de se aderirem a região radicular de vegetais, pois esses ao formar sua rizosfera secretam exsudatos que são ótimas fontes de carbono para processos metabólitos essenciais, assim atraindo diferentes microrganismos (Silva et al., 2003; Vives-Peris et al., 2020). A habilidade de colonização de *B. altitudinis* e *P. fluorescens* também foi observada em estudos que avaliaram por meio da microscopia eletrônica de varredura a presença dessas bactérias em raízes de importantes cultivares agrícolas como o arroz e a banana (Gamez et al., 2019; Narayanasamy & Uthandi, 2024). Contudo, mesmo com a observada habilidade de colonizar a região das raízes das plantas, os tratamentos não alteraram significativamente os parâmetros de crescimento dos vegetais. Resultados como os observados, não necessariamente são negativos para uma possível relação entre bactérias e plantas, pois determinadas bactérias podem auxiliar plantas contra fatores abióticos e bióticos por meio de outras vias de ação. Exemplo disso foi observado por Sahu et al (2020) em que *B. altitudinis* GTS-16, ao se associar com arroz (*Oryza sativa L.*) induziu a sintetize de fenilalanina amônia-liase e peroxidase, importantes enzimas relacionadas à defesa vegetal (Sahu et al., 2020). Em trabalho realizado por Martin-Rivilla et al. (2019), foi realizada a purificação parcial de *P. fluorescens* N21.4 e essa foi aplicada em *Arabidopsis thaliana* contaminadas por *Pseudomonas syringae*. Ao final, foi observado aumento na expressão de vias responsáveis pela expressão de ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, possivelmente relacionados a redução de danos causados pelo fitopatógeno (MartinRivilla et al., 2019). Com base nisso, a possibilidade de empregar esses microrganismos para auxiliar plantas a enfrentarem fitopatógenos *in vivo* e estresses ambientais abre um novo leque de possibilidades de aplicabilidade. Quando falamos de estresses abióticos como salinidade e seca observamos interessantes trabalhos que empregaram bactérias desses grupos em associação com culturas de interesse

para resistirem a esses estresses. *B. altitudinis* CW-05, NKA32, WR10 e *P. fluorescens* DR7 e DR397 são apenas alguns dos exemplos que foram testados em associação com diferentes vegetais, usando mecanismos como (i) enzimas 1aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACCD); (ii) melhora na homeostasia de íons sódio e potássio; (iii) aumento da absorção de nutrientes como fósforo e cálcio, assim mitigando danos causados pelo etileno, por exemplo (Bharti et al., 2024; Chandwani & Amaresan, 2024; Nishu et al., 2022; Niu et al., 2018; Z. Yue et al., 2022).

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que *B*. *altitudinis* 1.4 e *P*. *fluorescens* 5.4, isoladamente e em consórcio, demonstraram ação antimicrobiana frente a microrganismos, e a aplicação individual das bactérias auxiliaram no controle de fitopatógenos relacionados a cultura do tomate e outras culturas agrícolas de interesse. Além disso, apresentaram características de outras bactérias promotoras de crescimento vegetal, sendo capazes de solubilizar fosfato de cálcio tribásico, sintetizar auxinas e sideróforos, e de colonizar a região radicular dos tomateiros. Contudo, a aplicação direta de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 não interferiu significativamente no crescimento dos tomateiros.

Com base neste trabalho, os isolados *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 poderiam ser explorados como agentes de controle biológico e como ingredientes ativos na formulação de bioinsumos, tanto de forma isolada quanto em consórcio bacteriano. Enquanto *P. fluorescens* 5.4 e o consórcio bacteriano demonstraram potencial de síntese de fitohormônios o que possibilita os empregar como inoculantes em tomateiros e outros cultivos.

Por fim, a aplicação dessas bactérias em ensaios *in vivo* é essencial em experimentos de campo, com foco no combate de infecções causadas por fitopatógenos e estresses abióticos, principalmente para melhorar a produtividade do tomate, assim como de outras culturas.

8. REFERÊNCIAS

Ajijah, N., Fiodor, A., Pandey, A. K., Rana, A., & Pranaw, K. (2023). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture. *Diversity*, *15*(1), 112. https://doi.org/10.3390/d15010112

Al Raish, S. M., Sourani, O. M., & Abu-Elsaoud, A. M. (2025). Plant GrowthPromoting Microorganisms as Biocontrol Agents: Mechanisms, Challenges, and Future Prospects. *Applied Microbiology*, *5*(2), 44. https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5020044

Ali, M. Y., Sina, A. A. I., Khandker, S. S., Neesa, L., Tanvir, E. M., Kabir, A., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2020). Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Tomatoes and Their Impact on Human Health and Disease: A Review. *Foods*, *10*(1), 45. https://doi.org/10.3390/foods10010045

Álvarez, B., Biosca, E. G., & López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum,* a destructive bacterial plant pathogen.

Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F. G., Vargas, L. K., & Passaglia, L. M. P. (2012). Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and Soil*, *356*(1–2), 245–264. https://doi.org/10.1007/s11104-011-1079-1

Anand, V., & Yadav, U. (2026). Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f . sp. *Lycopersici*—A review. *Canadian Journal of Microbiology*, *72*, 1–9. https://doi.org/10.1139/cjm-2025-0232

Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V., & Quezado-Duval, A. M. (2017). Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. Gardneri* in Brazil. *Plant Pathology*, *66*(1), 159–168. https://doi.org/10.1111/ppa.12543

Ashrafi-Saiedlou, S., Rasouli-Sadaghiani, M., Fattahi, M., & Ghosta, Y. (2025). Biosynthesis and characterization of iron oxide nanoparticles fabricated using cell-free supernatant of *Pseudomonas fluorescens* for antibacterial, antifungal, antioxidant, and photocatalytic applications. *Scientific Reports*, *15*(1), 1018. https://doi.org/10.1038/s41598-024-84974-0

Bach, E., Rangel, C. P., Ribeiro, I. D. A., & Passaglia, L. M. P. (2022). Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. *Molecular Genetics and Genomics*, *297*(4), 1063–1079. https://doi.org/10.1007/s00438-022-01907-0

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 493–496, abr. 1966. DOI: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493.

Baranov, D., & Timerbaev, V. (2024). Recent Advances in Studying the Regulation of Fruit Ripening in Tomato Using Genetic Engineering Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(2), 760. https://doi.org/10.3390/ijms25020760

Batista, B. D., Dourado, M. N., Figueredo, E. F., Hortencio, R. O., Marques, J. P. R., Piotto, F. A., Bonatelli, M. L., Settles, M. L., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2021). The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (Solanum lycopersicum cv. Micro-Tom). *Archives of Microbiology*, *203*(7), 3869–3882. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02361-z

Bettiol, W. (2009). Biocontrole De Doenças De Plantas: Uso E Perspectivas (1º ed., V. 1). Embrapa Meio Ambiente.

Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., & Bedi, N. (2021). Bacterial Exopolysaccharides: Insight into Their Role in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(8), 1045–1059. https://doi.org/10.4014/jmb.2105.05009

Bharti, C., Fatima, T., Mishra, P., Verma, P., Bhattacharya, A., Alaylar, B., & Arora, N. K. (2024). Salt-tolerant endophytic *Bacillus altitudinis* NKA32 with ACC deaminase activity modulates physiochemical mechanisms in rice for adaptation in saline ecosystem. *Environmental Sustainability*, *7*(2), 231–249. https://doi.org/10.1007/s42398-024-00316-w

Biniarz, P., Coutte, F., Gancel, F., & Łukaszewicz, M. (2018). High-throughput optimization of medium components and culture conditions for the efficient production of a lipopeptide pseudofactin by *Pseudomonas fluorescens* BD5.

Microbial Cell Factories, *17*(1), 121. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0968-x

Bizjak-Johansson, T., Braunroth, A., Gratz, R., & Nordin, A. (2025). Inoculation with in vitro promising plant growth-promoting bacteria isolated from nitrogenlimited boreal forest did not translate to *in vivo* growth promotion of agricultural plants. *Biology and Fertility of Soils*, *61*(5), 925–940. https://doi.org/10.1007/s00374-025-01910-8

Bogo, M., Costa, G. A., & Frazzon, A. P. G. (2020). Evaluation of the adhesion potential of psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw buffalo milk: Simulating storage conditions. *Buffalo Bulletin*.

Bogo, M., Lauer Cruz, K., Gonzalez Revello, Ã., Frazzon, A. P. G., & De Souza Da Motta, A. (2017). An Investigation of Proteolytic, Lipolytic Activity and Biofilm Formation by Psychrotrophic Bacteria Isolated from Buffalo Milk. *Journal of Buffalo Science*, *6*(2), 54–60. https://doi.org/10.6000/1927-520X.2017.06.02.2

BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Brasil: BrCAST; 2025. Disponível em: <https://brcast.org.br>/. Acesso em: 9 mai. 2025.

Brenden, R., & Janda, J. M. (1987). Detection,quantitation and stability of the p haemolysin of *Aeromonas* spp. *1987*, *Vol. 24*, 4.

Budiharjo, A., Jeong, H., Wulandari, D., Lee, S., & Ryu, C.-M. (2017). Complete Genome Sequence of *Bacillus altitudinis* P-10, a Potential Bioprotectant against *Xanthomonas oryzae pv*. *Oryzae*, Isolated from Rice Rhizosphere in Java, Indonesia. *Genome Announcements*, *5*(48), e01388-17. https://doi.org/10.1128/genomeA.01388-17

Cabral, C. S., Gonçalves, A. M., Fonseca, M. E. N., Urben, A. F., Costa, H., Lourenço, V., Boiteux, L. S., & Reis, A. (2020). First detection of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Radicis–lycopersici* across major tomato–producing regions in Brazil. *Phytoparasitica*, *48*(4), 545–553. https://doi.org/10.1007/s12600-02000824-5

Cao, S., Chen, F., Dai, Y., Zhao, Z., Jiang, B., Pan, Y., & Gao, Z. (2024). Characterization and evaluation of *Bacillus altitudinis* BS-4 as a novel potential

biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean. *Tropical Plant Pathology*, *49*(3), 384–399. https://doi.org/10.1007/s40858-024-00637-5

Castaldi, S., Masi, M., Sautua, F., Cimmino, A., Isticato, R., Carmona, M., Tuzi, A., & Evidente, A. (2021). *Pseudomonas fluorescens* Showing Antifungal Activity against *Macrophomina phaseolina*, a Severe Pathogenic Fungus of Soybean, Produces Phenazine as the Main Active Metabolite. *Biomolecules*, *11*(11), 1728. https://doi.org/10.3390/biom11111728

Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 302. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302

Cavalini, L., Jankoski, P., Correa, A. P. F., Brandelli, A., & Motta, A. S. D. (2021). Characterization of the antimicrobial activity produced by *Bacillus* sp. Isolated from wetland sediment. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *93*(suppl 4), e20201820. https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201820

Chachar, Z., Xue, X., Fang, J., Chen, M., Jiarui, C., Chen, W., Ahmed, N., Chachar, S., Narejo, M.-N., Ahmed, N., Fan, L., Lai, R., & Qi, Y. (2025). Key mechanisms of plant-*Ralstonia solanacearum* interaction in bacterial wilt pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1521422. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1521422

Chandwani, S., & Amaresan, N. (2024). ACC deaminase producing bacteria alleviate the polyethylene glycol induced drought stress in black gram (*Vigna mungo L.*) by enhancing nutrient uptake and soil respiration activity. *Scientia Horticulturae*, *331*, 113111. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113111

Chavarria-Quicaño, E., Hernández-Oñate, M. A., Rodríguez-González, J. A., De La Torre-González, F., & Asaff-Torres, A. (2025). Thermal and shear stressinduced phenotypic changes in *Bacillus paralicheniformis* TB197 in submerged liquid cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *109*(1), 184. https://doi.org/10.1007/s00253-025-13571-6

Chen, J., Sun, Z., Jin, J., Wang, F., Yang, Q., Yu, H., Yu, J., & Wang, Y. (2023a). Role of siderophore in *Pseudomonas fluorescens* biofilm formation and spoilage potential function. *Food Microbiology*, *109*, 104151. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104151

Chen, J., Sun, Z., Jin, J., Wang, F., Yang, Q., Yu, H., Yu, J., & Wang, Y. (2023b). Role of siderophore in *Pseudomonas fluorescens* biofilm formation and spoilage potential function. *Food Microbiology*, *109*, 104151. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104151

Christensen, B. B., Haagensen, J. A. J., Heydorn, A., & Molin, S. (2002). Metabolic Commensalism and Competition in a Two-Species Microbial Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(5), 2495–2502. https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2495-2502.2002

Comba-González, N. B., Chaves-Moreno, D., Santamaría-Vanegas, J., & Montoya-Castaño, D. (2024). A pan-genomic assessment: Delving into the genome of the marine epiphyte *Bacillus altitudinis* strain 19_A and other very close Bacillus strains from multiple environments. *Heliyon*, *10*(7), e27820. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27820

Cortese, I. J., Castrillo, M. L., Onetto, A. L., Bich, G. Á., Zapata, P. D., & Laczeski, M. E. (2021). De novo genome assembly of *Bacillus altitudinis* 19RS3 and *Bacillus altitudinis* T5S-T4, two plant growth-promoting bacteria isolated from *Ilex paraguariensis St. Hil.* (Yerba mate). *PLOS ONE*, *16*(3), e0248274. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248274

Crivelli, X. B., Cundon, C., Bonino, M. P., Sanin, M. S., & Bentancor, A. (2024). The Complex and Changing Genus *Bacillus*: A Diverse Bacterial Powerhouse for Many Applications. *Bacteria*, *3*(3), 256–270. https://doi.org/10.3390/bacteria3030017

Cruz, K. L., & Motta, A. de S. da. (2019). Characterization of biofilm production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw buffalo milk. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(10), 4595–4604. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03924-1

Cucu, M. A., Choudhary, R., Trkulja, V., Garg, S., & Matić, S. (2025). Utilizing Environmentally Friendly Techniques for the Sustainable Control of Plant Pathogens: A Review. *Agronomy*, *15*(7), 1551. https://doi.org/10.3390/agronomy15071551

Deb, C. R., & Tatung, M. (2024). Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*, *165*, 153–162. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.12.031

Delgado-Baquerizo, M., Guerra, C. A., Cano-Díaz, C., Egidi, E., Wang, J.-T., Eisenhauer, N., Singh, B. K., & Maestre, F. T. (2020). The proportion of soilborne pathogens increases with warming at the global scale. *Nature Climate Change*, *10*(6), 550–554. https://doi.org/10.1038/s41558-020-0759-3

Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022). Plantassociated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms—A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *117*, 101754. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754

Dos Reis, G. A., Martínez-Burgos, W. J., Pozzan, R., Pastrana Puche, Y., Ocán-Torres, D., De Queiroz Fonseca Mota, P., Rodrigues, C., Lima Serra, J., Scapini, T., Karp, S. G., & Soccol, C. R. (2024). Comprehensive Review of Microbial Inoculants: Agricultural Applications, Technology Trends in Patents, and Regulatory Frameworks. *Sustainability*, *16*(19), 8720. https://doi.org/10.3390/su16198720

Elazzazy, A. M., Mobarki, M. O., Baghdadi, A. M., Bataweel, N. M., & Al-Hejin, A. M. (2024). Optimization of Culture Conditions and Batch Process Control for the Augmented Production of Bacteriocin by *Bacillus* Species. *Microorganisms*, *12*(4), 651. https://doi.org/10.3390/microorganisms12040651

Elhaissoufi, W., Ghoulam, C., Barakat, A., Zeroual, Y., & Bargaz, A. (2022). Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. *Journal of Advanced Research*, *38*, 13–28. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.08.014

Elnahal, A. S. M., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E.-S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., AbuQamar, S. F., & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*, *162*(4), 759–792. https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7

El-Sayed, N. M., Ismail, K. A., Ahmed, S. A.-E.-G., & Hetta, M. H. (2012). In vitro amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea L.*, *Curcuma longa L.* and *Pancratium maritimum L.* on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitology Research*, *110*(5), 1985–1992. https://doi.org/10.1007/s00436011-2727-3

El-Sheikh, E.-S. A.-M., & Shahein, N. M. M. (2025). *The Beneficial Microorganisms for Sustainable Plant Disease Management: A Systematic Review*.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0. Växjö: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2024. Disponível em: https://www.eucast.org. Acesso em: 15 mar. 2025.

Espinosa Bernal, M. A., Mena Navarro, M. P., Arvizu Gómez, J. L., Saldaña, C., Ramos López, M. Á., Amaro Reyes, A., Escamilla García, M., Pacheco Aguilar, J. R., Moreno, V. P., Rodríguez Morales, J. A., Álvarez Hidalgo, E., Nuñez Ramírez, J., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2024). Biocontrol Activity of *Bacillus altitudinis* CH05 and *Bacillus tropicus* CH13 Isolated from *Capsicum annuum L*. Seeds against Fungal Strains.

Microorganisms, *12*(10), 1943. https://doi.org/10.3390/microorganisms12101943

Fan, X., Saleem, T., & Zou, H. (2022). Copper resistance mechanisms in plant pathogenic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, *61*(1), 129–138. https://doi.org/10.36253/phyto-13282

Fanai, A., Bohia, B., Lalremruati, F., Lalhriatpuii, N., Lalrokimi, Lalmuanpuii, R., Singh, P. K., & Zothanpuia. (2024). Plant growth promoting bacteria (PGPB)induced plant adaptations to stresses: An updated review. *PeerJ*, *12*, e17882. https://doi.org/10.7717/peerj.17882

Andreata F. L., M., Mian, S., Andrade, G., De Freitas Bueno, A., Ventura, M. U., Marcondes De Almeida, J. E., Fonseca Ivan, E. A., Mosela, M., Simionato, A. S., Robaina, R. R., & Gonçalves, L. S. A. (2025). The current increase and future perspectives of the microbial pesticides market in agriculture: The Brazilian example. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1574269. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1574269

Franções, M. V., Kenichi Hosaka, G., Ramos, L. M., Fernández Campos, J. F., Santarém, E. R., & Astarita, L. V. (2025). Optimization of auxin production by *Streptomyces californicus* CLV91 for plant growth promotion. *International Microbiology*, *28*(8), 2913–2927. https://doi.org/10.1007/s10123-025-00732-w

Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, *42*(8), 872–874. https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872

Gaboardi, S. C., Candiotto, L. Z. P., & Panis, C. (2023). Agribusiness in Brazil and its dependence on the use of pesticides. *Hygiene and Environmental Health Advances*, *8*, 100080. https://doi.org/10.1016/j.heha.2023.100080

Gamez, R., Cardinale, M., Montes, M., Ramirez, S., Schnell, S., & Rodriguez, F. (2019). Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and B*acillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata Colla*). *Microbiological Research*, *220*, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.006

Gao, J., Zhuang, S., & Zhang, W. (2024). Advances in Plant Auxin Biology: Synthesis, Metabolism, Signaling, Interaction with Other Hormones, and Roles under Abiotic Stress. *Plants*, *13*(17), 2523. https://doi.org/10.3390/plants13172523

Gaur, P., Arora, S., Prakash, V., & Sood, G. (2023). Bioprospecting of Multi Trait Plant Growth Promoting *Bacillus altitudinis* from Phosphate Rich Soil. *Geomicrobiology Journal*, *40*(3), 255–263. https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2155889

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 793–796. https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995

Gobbi, A., Kyrkou, I., Filippi, E., Ellegaard-Jensen, L., & Hansen, L. H. (2020). Seasonal epiphytic microbial dynamics on grapevine leaves under biocontrol and copper fungicide treatments. *Scientific Reports*, *10*(1), 681. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56741-z

Goswami, M., & Deka, S. (2019). Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *178*, 285–296. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.003

Guardado-Fierros, B. G., Tuesta-Popolizio, D. A., Lorenzo-Santiago, M. A., Rodriguez-Campos, J., & Contreras-Ramos, S. M. (2024). Comparative study

between Salkowski reagent and chromatographic method for auxins quantification from bacterial production. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1378079. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1378079

Haque, M. A., Hu, H., Liu, J., Islam, M. A., Hossen, F., Rahman, M. A., Ahmed, F., & He, C. (2024). Emergence of multidrug-resistant *Bacillus* spp. Derived from animal feed, food and human diarrhea in South-Eastern Bangladesh. *BMC Microbiology*, *24*(1), 61. https://doi.org/10.1186/s12866-024-03199-3

Hudson, L. K., Orellana, L. A. G., Bryan, D. W., Moore, A., Munafo, J. P., Den Bakker, H. C., & Denes, T. G. (2021). Phylogeny of the *Bacillus altitudinis* Complex and Characterization of a Newly Isolated Strain with Antilisterial Activity. *Journal of Food Protection*, *84*(8), 1321–1332. https://doi.org/10.4315/JFP-20-498

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tomate — Produção agropecuária. Rio de Janeiro: IBGE; 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/br>. Acesso em: 29 jan. 2026

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tomate — Produção agropecuária no Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: IBGE; 2024. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/rs. Acesso em: 29 jan. 2026.

Iqbal, S., Begum, F., Rabaan, A. A., Aljeldah, M., Al Shammari, B. R., Alawfi, A., Alshengeti, A., Sulaiman, T., & Khan, A. (2023). Classification and Multifaceted Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* Group: A Comprehensive Review. *Molecules*, *28*(3), 927. https://doi.org/10.3390/molecules28030927

Jacobs, B., Bogaerts, B., Verhaegen, M., Vanneste, K., De Keersmaecker, S. C. J., Roosens, N. H. C., Rajkovic, A., Mahillon, J., Van Nieuwenhuysen, T., & Van Hoorde, K. (2025). Whole-genome sequencing of soil- and foodborne Bacillus cereus sensu lato indicates no clear association between their virulence repertoire, genomic diversity and food matrix. *International Journal of Food Microbiology*, *439*, 111266. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111266

Jankoski, P. R., Bach, E., Bald, D. R. Q., Passaglia, L. M. P., De Carvalho, J. B., De Oliveira, R. R., Omori, W. P., & De Souza Da Motta, A. (2025).

Prospecting the Functional Potential of *Bacillus altitudinis* 1.4 Isolated from Sediment in Association with *Bradyrhizobium japonicum*. *Current Microbiology*, *82*(3), 132. https://doi.org/10.1007/s00284-025-04108-1

Jankoski, P. R., Bach, E., Da Fonseca, R. N., Hübner, S., De Carvalho, J. B., & De Souza Da Motta, A. (2024). *Bacillus altitudinis* 1.4 genome analysis—Functional annotation of probiotic properties and immunomodulatory activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(10), 293. https://doi.org/10.1007/s11274-024-04096-7

Juntarawijit, C., & Juntarawijit, Y. (2018). Association between diabetes and pesticides: A case-control study among Thai farmers. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *23*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s12199-018-0692-5

Jyoti, K., Soni, K., & Chandra, R. (2024). Optimization of the production of Exopolysaccharide (EPS) from biofilm-forming bacterial consortium using different parameters. *The Microbe*, *4*, 100117. https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100117

Kadiri, M., Sevugapperumal, N., Nallusamy, S., Ragunathan, J., Ganesan, M. V., Alfarraj, S., Ansari, M. J., Sayyed, R. Z., Lim, H. R., & Show, P. L. (2023). Pan-genome analysis and molecular docking unveil the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* VB7 against *Phytophthora infestans*. *Microbiological Research*, *268*, 127277. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127277

Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., & Daraz, U. (2022). *Bacillus* spp. as Bioagents: Uses and Application for Sustainable Agriculture. *Biology*, *11*(12), 1763. https://doi.org/10.3390/biology11121763

Khoso, M. A., Wang, M., Zhou, Z., Huang, Y., Li, S., Zhang, Y., Qian, G., Ko, S. N., Pang, Q., Liu, C., & Li, L. (2024). *Bacillus altitudinis* AD13−4 Enhances Saline–Alkali Stress Tolerance of Alfalfa and Affects Composition of Rhizosphere Soil Microbial Community. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(11), 5785. https://doi.org/10.3390/ijms25115785

Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. *Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes*. In: Proc. 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, France, 1978. v. 2, p. 879–882. Angers: Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie, INRA

Kumar, A., Verma, H., Singh, V. K., Singh, P. P., Singh, S. K., Ansari, W. A.,

Yadav, A., Singh, P. K., & Pandey, K. D. (2017). Role of *Pseudomonas* sp. In Sustainable Agriculture and Disease Management. Em V. S. Meena, P. K. Mishra, J. K. Bisht, & A. Pattanayak (Org.), *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* (p. 195–215). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5343-6_7

Kumar, S., Tiwari, R. K. S., Nirmalkar, V. K., Dayasagar, & Singh, Y. (2024). Ecological Niches of *Bacillus* Species and their Multifaceted Mechanisms in Combatting Plant Pathogens. *Journal of Scientific Research and Reports*, *30*(12), 514–525. https://doi.org/10.9734/jsrr/2024/v30i122696

Kumari, J., Kumawat, R., Prasanna, R., Jothieswari, D., Debnath, R., Ikbal, A. M. A., Palit, P., Rawat, R., Gopikrishna, K., & Tiwari, O. N. (2025). Microbial exopolysaccharides: Classification, biosynthetic pathway, industrial extraction and commercial production to unveil its bioprospection: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *297*, 139917. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139917

Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Bandzo Oreshkovikj, K., & Jankulovska, M. (2023). *Bacillus* spp. – a potent biological control agents against downy mildew of grapevine. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, *77*(2), 26–32. https://doi.org/10.55302/JAFES23772026k

Lafuente, I., Sevillano, E., Peña, N., Cuartero, A., Hernández, P. E., Cintas, L. M., Muñoz-Atienza, E., & Borrero, J. (2024). Production of Pumilarin and a Novel Circular Bacteriocin, Altitudin A, by *Bacillus altitudinis* ECC22, a SoilDerived Bacteriocin Producer. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(4), 2020. https://doi.org/10.3390/ijms25042020

Lakshmikanthan, M., Muthu, S., Krishnan, K., Duraisamy, N., & Abdi, G. (2025). Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens*: Phenazine mediated antifungal activity against phytopathogens. *Molecular Biology Reports*, *52*(1), 806. https://doi.org/10.1007/s11033-025-10697-8

Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. *Genes*, *11*(2), 139. https://doi.org/10.3390/genes11020139

Lamrabet, O., Medie, F. M., & Drancourt, M. (2012). *Acanthamoeba polyphaga*Enhanced Growth of *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS ONE*, *7*(1), e29833. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029833

Li, X., Wu, S., Dong, Y., Fan, H., Bai, Z., & Zhuang, X. (2021). Engineering Microbial Consortia towards Bioremediation. *Water*, *13*(20), 2928. https://doi.org/10.3390/w13202928

Li, Z., Song, C., Yi, Y., & Kuipers, O. P. (2020). Characterization of plant growthpromoting rhizobacteria from perennial ryegrass and genome mining of novel antimicrobial gene clusters. *BMC Genomics*, *21*(1), 157. https://doi.org/10.1186/s12864-020-6563-7

Liu, G., Nie, R., Liu, Y., & Mehmood, A. (2022). Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemic and microbiome to prolong shelf life of food: A review. *Science of The Total Environment*, *825*, 154058. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154058

Liu, J., Wu, S., Feng, L., Wu, Y., & Zhu, J. (2023). Extracellular matrix affects mature biofilm and stress resistance of psychrotrophic spoilage *Pseudomonas* at cold temperature. *Food Microbiology*, *112*, 104214. https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104214

Maciag, T., Kozieł, E., Rusin, P., Otulak-Kozieł, K., Jafra, S., & Czajkowski, R. (2023). Microbial Consortia for Plant Protection against Diseases: More than the Sum of Its Parts. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(15), 12227. https://doi.org/10.3390/ijms241512227

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung De Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, *8*(1), 39–45. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002

Marra, A., Dib-Hajj, F., Lamb, L., Kaczmarek, F., Shang, W., Beckius, G., Milici, A. J., Medina, I., & Gootz, T. D. (2007). Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *58*(1), 59–65. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.024

Martin-Rivilla, H., Garcia-Villaraco, A., Ramos-Solano, B., Gutierrez-Mañero, F. J., & Lucas, J. A. (2019). Extracts from cultures of *Pseudomonas fluorescens* induce defensive patterns of gene expression and enzyme activity while depressing visible injury and reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* challenged with pathogenic *Pseudomonas syringae*. *AoB PLANTS*, *11*(5), plz049. https://doi.org/10.1093/aobpla/plz049

Maurya, S., Thakur, R., Vighnesh, R., Suresh, S., Dang, A., Raj, D., & Srivastava, S. (2024). Eco-friendly Management of Plant Pathogens through Secondary Metabolites Released by Fluorescent Pseudomonads. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *18*(3), 1471–1488. https://doi.org/10.22207/JPAM.18.3.40

Mazumdar, P. (2021). Sclerotinia stem rot in tomato: A review on biology, pathogenicity, disease management and future research priorities. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *128*(6), 1403–1431. https://doi.org/10.1007/s41348-021-00509-z

Mei, J., Zhao, F., Hou, Y., Ahmad, S., Cao, Y., Yang, Z., Ai, H., & Sheng, L. (2023). Two novel phosphorus/potassium-degradation bacteria: *Bacillus aerophilus* SD-1/*Bacillus altitudinis* SD-3 and their application in two-stage composting of corncob residue. *Archives of Microbiology*, *205*(1), 17. https://doi.org/10.1007/s00203-022-03357-z

Meng, Q., Song, L., Chi, S., Wang, H., Li, J., Chen, Y., Liu, Z., Zhang, X., Jia, Z., Cui, J., & Wang, X. (2025). Effect of environmental stress factors on the expression of virulence genes and pathogenicity of lethal *Bacillus cereus* of bovine origin. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1519202. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1519202

Meshram, S., & Adhikari, T. B. (2024). Microbiome-Mediated Strategies to Manage Major Soil-Borne Diseases of Tomato. *Plants*, *13*(3), 364. https://doi.org/10.3390/plants13030364

Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology and Infection*, *38*(6), 732–749. https://doi.org/10.1017/S002217240001158X

Minchev, Z., Kostenko, O., Soler, R., & Pozo, M. J. (2021). Microbial Consortia for Effective Biocontrol of Root and Foliar Diseases in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 756368. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.756368

Missau LZ. 2023. Avaliação de rizobactérias *Streptomyces* para o controle do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) — Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 2023.

Mogrovejo, D. C., Perini, L., Gostinčar, C., Sepčić, K., Turk, M., AmbrožičAvguštin, J., Brill, F. H. H., & Gunde-Cimerman, N. (2020). Prevalence of
Antimicrobial Resistance and Hemolytic Phenotypes in Culturable Arctic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 570. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00570

Monnerat, R., Montalvão, S. C. L., Martins, E. S., & Queiroz, P. R. M. (2020). Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura.

Moreno-Velandia, C. A., Izquierdo-García, L. F., García-Arias, F. L., & PatiñoMoscoso, M. A. (2024). Bacterial consortium based on *Pseudomonas fluorescens, Lysinibacillus xylanilyticus* and *Bacillus velezensis* reduces clubroot disease in broccoli. *European Journal of Plant Pathology*, *169*(1), 171–186. https://doi.org/10.1007/s10658-024-02817-0

Motta, A. S., & Brandelli, A. (2002). Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, *92*(1), 63–70. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01490.x

Moura, T. M. D., Campos, F. S., Caierão, J., Franco, A. C., Roehe, P. M., d'Azevedo, P. A., Frazzon, J., & Frazzon, A. P. G. (2015). Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *48*(5), 617–621. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0017-2015

Naqvi, S. A. H., Farhan, M., Ahmad, M., Kiran, R., Shahbaz, M., Abbas, A., Hakim, F., Shabbir, M., Tan, Y. S., & Sathiya Seelan, J. S. (2025). Fungicide resistance in *Fusarium* species: Exploring environmental impacts and sustainable management strategies. *Archives of Microbiology*, *207*(2), 31. https://doi.org/10.1007/s00203-024-04219-6

Narayanasamy, S., & Uthandi, S. (2024). Plant growth promoting signatory volatiles emitted by a drought-tolerant bacterium *Bacillus altitudinis* FD48 and its role in moisture stress alleviation in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Stress*, *14*, 100621. https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100621

Nautiyal, C. S. (1998). An encient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms.

Neto, W. P., Guterres, J. B., Da Luz, L. A., Barros, I. A., Berleze, F. D. B., Ramos, L. M., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2025). Co-inoculation with *Streptomyces* isolates promotes plant growth and modulates root exudation in maize. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, *37*(1), 24. https://doi.org/10.1007/s40626-025-00366-3

Niehus, R., Picot, A., Oliveira, N. M., Mitri, S., & Foster, K. R. (2017). The evolution of siderophore production as a competitive trait: the competitive evolution of siderophores. *Evolution*, *71*(6), 1443–1455. https://doi.org/10.1111/evo.13230

Nishu, S. D., No, J. H., & Lee, T. K. (2022). Transcriptional Response and Plant Growth Promoting Activity of *Pseudomonas fluorescens* DR397 under Drought Stress Conditions. *Microbiology Spectrum*, *10*(4), e00979-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.00979-22

Niu, X., Song, L., Xiao, Y., & Ge, W. (2018). Drought-Tolerant Plant GrowthPromoting Rhizobacteria Associated with Foxtail Millet in a Semi-arid Agroecosystem and Their Potential in Alleviating Drought Stress. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2580. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02580

Nunes, P. S. O., Lacerda-Junior, G. V., Mascarin, G. M., Guimarães, R. A., Medeiros, F. H. V., Arthurs, S., & Bettiol, W. (2024). Microbial consortia of biological products: Do they have a future? *Biological Control*, *188*, 105439. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105439

Ons, L., Bylemans, D., Thevissen, K., & Cammue, B. P. A. (2020). Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms*, *8*(12), 1930. https://doi.org/10.3390/microorganisms8121930

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745

PAHO - Pan American Health Organization. Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion)**.** 2004. Washington, DC: PAHO; 2004. Disponível em: <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2003.htm>. Acesso em: 23 abr. 2024.

Palkina, K. A., Choob, V. V., Yampolsky, I. V., Mishin, A. S., & Balakireva, A. V. (2025). Pros and Cons of Interactions Between Crops and Beneficial Microbes. *Agriculture*, *15*(24), 2526. https://doi.org/10.3390/agriculture15242526

Pandey, A. K., Samota, M. K., Kumar, A., Silva, A. S., & Dubey, N. K. (2023). Fungal mycotoxins in food commodities: Present status and future concerns. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *7*, 1162595. https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1162595

Papin, M., Polrot, A., Breuil, M.-C., Czarnes, S., Dreux-Zigha, A., Roux, X. L., Taibi, A., Spor, A., & Philippot, L. (2025). Pre-sowing recurrent inoculation with *Pseudomonas fluorescens* promotes maize growth. *Biology and Fertility of Soils*, *61*(1), 125–140. https://doi.org/10.1007/s00374-024-01873-2

Patel, M., Islam, S., Glick, B. R., Vimal, S. R., Bhor, S. A., Bernardi, M., Johora, F. T., Patel, A., & De Los Santos Villalobos, S. (2024). Elaborating the multifarious role of PGPB for sustainable food security under changing climate conditions. *Microbiological Research*, *289*, 127895. https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127895

Pawar, S., Chaudhari, A., Prabha, R., Shukla, R., & Singh, D. P. (2019). Microbial Pyrrolnitrin: Natural Metabolite with Immense Practical Utility. *Biomolecules*, *9*(9), 443. https://doi.org/10.3390/biom9090443

Piel, C., Pouchieu, C., Carles, C., Béziat, B., Boulanger, M., Bureau, M., Busson, A., Grüber, A., Lecluse, Y., Migault, L., Renier, M., Rondeau, V., Schwall, X., Tual, S., Pierre, L., Baldi, I., Arveux, P., Bara, S., Bouvier, A. M., … Woronoff, A. S. (2019). Agricultural exposures to carbamate herbicides and fungicides and central nervous system tumour incidence in the cohort AGRICAN. *Environment International*, *130*, 104876. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.070

Pirttilä, A. M., Mohammad Parast Tabas, H., Baruah, N., & Koskimäki, J. J. (2021). Biofertilizers and Biocontrol Agents for Agriculture: How to Identify and Develop New Potent Microbial Strains and Traits. *Microorganisms*, *9*(4), 817. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040817

Polat, Z. A., Vural, A., Tepe, B., & Cetin, A. (2007). *In vitro* amoebicidal activity of four Allium species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Parasitology Research*, *101*(2), 397–402. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0487-x

Poveda, J., & González-Andrés, F. (2021). *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(23), 8629–8645. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8

Quezado-Duval, A. M., Inoue-Nagata, A. K., Reis, A., Monteiro, P., Pinheiro, J. B., & Lopes, C. A. (2022). Doenças e seu controle.

Rabbee, M. F., Hwang, B.-S., & Baek, K.-H. (2023). *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, *13*(3), 840. https://doi.org/10.3390/agronomy13030840

Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., Van Der Knaap, E., & Caicedo, A. L. (2020). Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(4), 1118–1132. https://doi.org/10.1093/molbev/msz297

Reis, A., Costa, H., Boiteux, L. S., & Lopes, C. A. (2005). First report of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, *30*(4), 426–428. https://doi.org/10.1590/S010041582005000400017

Rosenberg, G., Steinberg, N., Oppenheimer-Shaanan, Y., Olender, T., Doron, S., Ben-Ari, J., Sirota-Madi, A., Bloom-Ackermann, Z., & Kolodkin-Gal, I. (2016). Not so simple, not so subtle: The interspecies competition between *Bacillus* simplex and *Bacillus subtilis* and its impact on the evolution of biofilms. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *2*(1), 15027. https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.27

Sahu, P. K., Singh, S., Gupta, A. R., Gupta, A., Singh, U. B., Manzar, N., Bhowmik, A., Singh, H. V., & Saxena, A. K. (2020). Endophytic bacilli from medicinal-aromatic perennial Holy basil (*Ocimum tenuiflorum L.*) modulate plant growth promotion and induced systemic resistance against *Rhizoctonia solani* in rice (Oryza sativa L.). *Biological Control*, *150*, 104353. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104353

Saleh, I., Zeidan, R., & Abu-Dieyeh, M. (2024). The characteristics, occurrence, and toxicological effects of alternariol: A mycotoxin. *Archives of Toxicology*, *98*(6), 1659–1683. https://doi.org/10.1007/s00204-024-03743-0

Samani, M., Noormohammadi, Z., Fazeli, M. R., & Samadi, N. (2021). Bacteriocin activity of various iranian honey-associated bacteria and

development of a simple medium for enhanced bacteriocin activity. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, *19*(1), 427–435. https://doi.org/10.1007/s40201-021-00615-y

Sanches, S. M; Nogueira, M. A.; Hungria, M. A. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. AMB Express, v. 9, art. 205, 21 dez. 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0932-0.

Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, *33*(8), 1523–1538. https://doi.org/10.1007/s10529-0110617-5

Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, *9*(1), 205. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0

Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F. I., Santos-Villalobos, S. D. L., Orozco-Mosqueda, Ma. D. C., & Glick, B. R. (2021). Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agronomy*, *11*(2), 219. https://doi.org/10.3390/agronomy11020219

Schalk, I. J. (2025). Bacterial siderophores: Diversity, uptake pathways and applications. *Nature Reviews Microbiology*, *23*(1), 24–40. https://doi.org/10.1038/s41579-024-01090-6

Schmey, T., Tominello-Ramirez, C. S., Brune, C., & Stam, R. (2024). *Alternaria* diseases on potato and tomato. *Molecular Plant Pathology*, *25*(3), e13435. https://doi.org/10.1111/mpp.13435

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, *160*(1), 47–56. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9

Serafim, B., Bernardino, A. R., Freitas, F., & Torres, C. A. V. (2023a). Recent Developments in the Biological Activities, Bioproduction, and Applications of *Pseudomonas* spp. Phenazines. *Molecules*, *28*(3), 1368. https://doi.org/10.3390/molecules28031368

Serafim, B., Bernardino, A. R., Freitas, F., & Torres, C. A. V. (2023b). Recent

Developments in the Biological Activities, Bioproduction, and Applications of *Pseudomonas* spp. Phenazines. *Molecules*, *28*(3), 1368. https://doi.org/10.3390/molecules28031368

Shah, S. H., Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Haq, T. U., & Matloob, A. (2022). Thermal Plasticity and Cotton Production Enhancing Attributes of PhosphateSolubilizing Bacteria from Cotton Rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *22*(3), 3885–3900. https://doi.org/10.1007/s42729-022-00937-2

Shahid, I., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2018). A decade of understanding secondary metabolism in *Pseudomonas* spp. For sustainable agriculture and pharmaceutical applications. *Environmental Sustainability*, *1*(1), 3–17. https://doi.org/10.1007/s42398-018-0006-2

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Kohli, S. K., Yadav, P., Bali, A. S., Parihar, R. D., Dar, O. I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, *1*(11), 1446. https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1

Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar, J. V., & Bhargava, P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. Nov., *Bacillus aerophilus* sp. Nov., *Bacillus stratosphericus* sp. Nov. And *Bacillus altitudinis* sp. Nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(7), 1465–1473. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0

Shukla, V., Kumar, S., Tripathi, Y. N., & Upadhyay, R. S. (2022). *Bacillus subtilis*- and *Pseudomonas fluorescens*-Mediated Systemic Resistance in Tomato Against *Sclerotium rolfsii* and Study of Physio-Chemical Alterations. *Frontiers in Fungal Biology*, *3*, 851002. https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.851002

Silva, H. S. A., Romeiro, R. D. S., & Mounteer, A. (2003). Development of a Root Colonization Bioassay for Rapid Screening of Rhizobacteria for Potential Biocontrol Agents. *Journal of Phytopathology*, *151*(1), 42–46. https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00678.x

Silva, R. S. D., Menezes Filho, A. C. P. D., Batista-Ventura, H. R. F., Côrrea, F. R., & Ventura, M. V. A. (2022). *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* aplicados via foliar em sorgo cultivar Nucover 100. *Brazilian Journal of Science*, *1*(11), 82–90. https://doi.org/10.14295/bjs.v1i11.221

Silverio, M. P., Kraychete, G. B., Rosado, A. S., & Bonelli, R. R. (2022). *Pseudomonas fluorescens* Complex and Its Intrinsic, Adaptive, and Acquired Antimicrobial Resistance Mechanisms in Pristine and Human-Impacted Sites. *Antibiotics*, *11*(8), 985. https://doi.org/10.3390/antibiotics11080985

Silverio, M. P., Schultz, J., Parise, M. T. D., Parise, D., Viana, M. V. C., Nogueira, W., Ramos, R. T. J., Góes-Neto, A., Azevedo, V. A. D. C., Brenig, B., Bonelli, R. R., & Rosado, A. S. (2025). Genomic and phenotypic insight into antimicrobial resistance of *Pseudomonas fluorescens* from King George Island, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1535420. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1535420

Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: Current trends and future perspective. *3 Biotech*, *7*(4), 255. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0896-1

Soares, C. R. F. S., Hernández, A. G., Da Silva, E. P., De Souza, J. E. A., Bonfim, D. F., Zabot, G. L., Ferreira, P. A. A., & Brunetto, G. (2023). Applications and Market of Micro-Organism-Based and Plant-Based Inputs in Brazilian Agriculture. *Plants*, *12*(22), 3844. https://doi.org/10.3390/plants12223844

Soares, E. V. (2022). Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(11), 3985–4004. https://doi.org/10.1007/s00253-022-11995-y

Sokra, I. (2025). *Pseudomonas spp.:* Taxonomy, physiology, and functional diversity from environmental to industrial systems (I. Sokra, Org.). Journal of Agriculture and Technology. https://doi.org/10.5281/ZENODO.18032149

Solanki, M., & Shukla, L. I. (2023). Recent advances in auxin biosynthesis and homeostasis. *3 Biotech*, *13*(9), 290. https://doi.org/10.1007/s13205-023-037096

Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., Chandra Nayaka, S., &

Srivastava, R. K. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(7), 1315–1324. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002

Stegelmeier, A. A., Rose, D. M., Joris, B. R., & Glick, B. R. (2022). The Use of PGPB to Promote Plant Hydroponic Growth. *Plants*, *11*(20), 2783. https://doi.org/10.3390/plants11202783

Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., & Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, *38*(5), 428–432. https://doi.org/10.1111/j.1472765X.2004.01513.x

Stockwell, V. O., Davis, E. W., Carey, A., Shaffer, B. T., Mavrodi, D. V., Hassan, K. A., Hockett, K., Thomashow, L. S., Paulsen, I. T., & Loper, J. E. (2013). pA506, a Conjugative Plasmid of the Plant Epiphyte *Pseudomonas fluorescens* A506. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5272–5282. https://doi.org/10.1128/AEM.01354-13

Stockwell, V. O., Johnson, K. B., Sugar, D., & Loper, J. E. (2011). Mechanistically Compatible Mixtures of Bacterial Antagonists Improve Biological Control of Fire Blight of Pear. *Phytopathology®*, *101*(1), 113–123. https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0098

Sun, L., Chen, J., Xiao, K., & Yang, W. (2017). Origin of the Domesticated Horticultural Species and Molecular Bases of Fruit Shape and Size Changes during the Domestication, Taking Tomato as an Example. *Horticultural Plant Journal*, *3*(3), 125–132. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.007

Sun, X., Xu, Z., Xie, J., Hesselberg-Thomsen, V., Tan, T., Zheng, D., Strube, M. L., Dragoš, A., Shen, Q., Zhang, R., & Kovács, Á. T. (2022). *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions. *The ISME Journal*, *16*(3), 774–787. https://doi.org/10.1038/s41396-021-01125-3

Suresh, P., Rekha, M., Gomathinayagam, S., Ramamoorthy, V., Sharma, M. P., Sakthivel, P., Sekar, K., Valan Arasu, M., & Shanmugaiah, V. (2022). Characterization and Assessment of 2, 4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)Producing *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054 for the Management of

Tomato Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microorganisms*, *10*(8), 1508. https://doi.org/10.3390/microorganisms10081508

Tagyan, A. I., Elghoul, O., Hozzein, W. N., Rabie, W., Alkhalifah, D. H. M., & ElFar, N. A. (2025). Implications for agricultural sustainability: Predicting the global distribution of *Ralstonia solanacearum* under current and future climate scenarios. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1548640. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1548640

Tao, C., Li, R., Xiong, W., Shen, Z., Liu, S., Wang, B., Ruan, Y., Geisen, S., Shen, Q., & Kowalchuk, G. A. (2020). Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression. *Microbiome*, *8*(1), 137. https://doi.org/10.1186/s40168-02000892-z

Tepe, B., Malatyali, E., Degerli, S., & Berk, S. (2012). In vitro amoebicidal activities of *Teucrium polium* and *T. chamaedrys* on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Parasitology Research*, *110*(5), 1773–1778. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2698-4

Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants*, *11*(22), 3065. https://doi.org/10.3390/plants11223065

Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant GrowthPromoting Soil Bacteria: Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization, Siderophore Production, and Other Biological Activities. *Plants*, *12*(24), 4074. https://doi.org/10.3390/plants12244074

Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., & Tugizimana, F. (2022). *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? *Plants*, *11*(19), 2482. https://doi.org/10.3390/plants11192482

Venkatraman, V., Ramasamy, L., & Singaram, J. L. (2025). Sustainable Carbon Source Utilization for Indole-3-Acetic Acid Production by Marine *Pseudomonas fluorescens* BCPBMS-1 Using the One-Factor-at-a-Time Approach. *Asian Journal of Biological Sciences*, *18*(2), 300–307. https://doi.org/10.3923/ajbs.2025.300.307

Vidal, M. C., Amaral, D. F. S., Nogueira, J. D., Mazzaro, M. A. T., & Lira, V. M. C. (2022). Bioinsumos: A Construção de um Programa Nacional pela

Sustentabilidade do Agro Brasileiro. *Economic Analysis of Law Review*, *12*(3), 557. https://doi.org/10.31501/ealr.v12i3.12811

Vishwakarma, K., Kumar, N., Shandilya, C., Mohapatra, S., Bhayana, S., & Varma, A. (2020). Revisiting Plant–Microbe Interactions and Microbial Consortia Application for Enhancing Sustainable Agriculture: A Review. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 560406. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560406

Vives-Peris, V., De Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: From plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, *39*(1), 3–17. https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5

Wockenfuss, A., Chan, K., Cooper, J. G., Chaya, T., Mauriello, M. A., Yannarell, S. M., Maresca, J. A., & Donofrio, N. M. (2024). A *Bacillus velezensis* strain shows antimicrobial activity against soilborne and foliar fungi and oomycetes. *Frontiers in Fungal Biology*, *5*, 1332755. https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1332755

Wu, R., Qin, Y., Shen, Q., & Li, P. (2020). The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LPL061, an exopolysaccharide-producing bacterium. *3 Biotech*, *10*(6), 243. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02228-y

Xu, X., & Kovács, Á. T. (2024). How to identify and quantify the members of the *Bacillus* genus? *Environmental Microbiology*, *26*(2), e16593. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16593

Yadav, A., Yadav, K., & Vashistha, A. (2016). Phosphate solubilizing activity of *Pseudomonas fluorescens* PSM1 isolated from wheat rhizosphere. *Journal of Applied and Natural Science*, *8*(1), 93–96. https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.754

Yang, D., Zhang, X., Li, Z., Chu, R., Shah, S., Wang, X., & Zhang, X. (2024). Antagonistic effect of *Bacillus* and *Pseudomonas* combinations against *Fusarium oxysporum* and their effect on disease resistance and growth promotion in watermelon. *Journal of Applied Microbiology*, *135*(5), lxae074. https://doi.org/10.1093/jambio/lxae074

Yang, R., Du, X., Khojasteh, M., Ali Shah, S. M., Peng, Y., Zhu, Z., Xu, Z., & Chen, G. (2025). Green guardians: The biocontrol potential of *Pseudomonas*derived metabolites for sustainable agriculture. *Biological Control*, *201*, 105699. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2025.105699

Yin, Y., Miao, J., Shao, W., Liu, X., Zhao, Y., & Ma, Z. (2023). Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management. *Phytopathology*®, *113*(4), 707–718. https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-22-0370-KD

Yue, Y., Wang, Z., Zhong, T., Guo, M., Huang, L., Yang, L., Kan, J., Zalán, Z., Hegyi, F., Takács, K., & Du, M. (2023). Antifungal mechanisms of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX as biological fumigants against *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, *267*, 127253. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127253

Yue, Z., Chen, Y., Wang, Y., Zheng, L., Zhang, Q., Liu, Y., Hu, C., Chen, C., Ma, K., & Sun, Z. (2022). Halotolerant *Bacillus altitudinis* WR10 improves salt tolerance in wheat via a multi-level mechanism. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 941388. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.941388

Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z., & Zhu, J. (2020). Antifungal Effects of Volatiles Produced by Bacillus subtilis Against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1196. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196

Zhang, W., Mao, G., Zhuang, J., & Yang, H. (2023). The co-inoculation of *Pseudomonas chlororaphis* H1 and *Bacillus altitudinis* Y1 promoted soybean [*Glycine max* (L.) *Merrill*] growth and increased the relative abundance of beneficial microorganisms in rhizosphere and root. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1079348. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1079348

Zhao, D., Ding, Y., Cui, Y., Zhang, Y., Liu, K., Yao, L., Han, X., Peng, Y., Gou, J., Du, B., & Wang, C. (2022). Isolation and Genome Sequence of a Novel Phosphate-Solubilizing Rhizobacterium *Bacillus altitudinis* GQYP101 and Its Effects on Rhizosphere Microbial Community Structure and Functional Traits of Corn Seedling. *Current Microbiology*, *79*(9), 249. https://doi.org/10.1007/s00284-022-02944-z

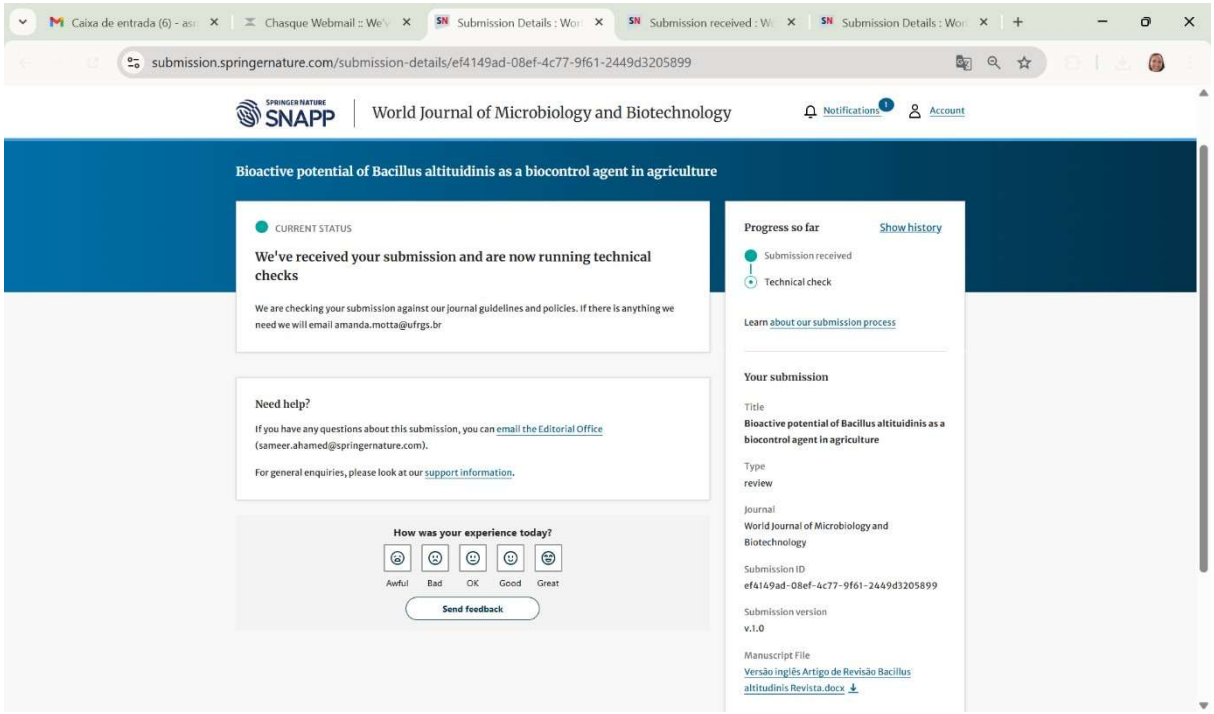
Zhu, M.-L., Wang, Y.-H., Dai, Y., Wu, X.-Q., & Ye, J.-R. (2020). Effects of Different Culture Conditions on the Biofilm Formation of *Bacillus pumilus* HR10. *Current Microbiology*, *77*(8), 1405–1411. https://doi.org/10.1007/s00284-02001944-1

Zulfiqar, F., Moosa, A., Chen, J., Jabeen, R., & Ali, H. M. (2024). Synergistic suppression of grey mold on cut rose flower by combined application of methyl jasmonate and lipopeptides from *Bacillus altitudinis*. *Physiological and*

Molecular Plant Pathology, *134*, 102417. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102417

9. APÊNDICES

No apêndice desse trabalho, está inserido o artigo de revisão sistemática “Bioactive potencial of *Bacillus altitudinis* as a biocontrole agente in agriculture”, que foi submetido a revista “World Journal of Microbiology and Biotechnology”



Bioactive potential of *Bacillus altituidinis* as a biocontrol agent in agriculture

Thiago Rosa Pianetti[1] and Amanda de Souza da Motta[1*]

T.R.P. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. https://orcid.org/0009-0000-6714-1578

A.S.M. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, R. Ramiro Barcelos 2600, cep 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. https://orcid.org/0000-0001-8637-3868

*Correspondence: Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

R. Ramiro Barcelos 2600, 538, cep 90035-003 Porto Alegre, RS, BR

phone +55-51-991824898

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

Abstract

The practice of agriculture has been fundamental to the development of modern society. Over the years, the adoption of new techniques has improved agricultural crop production, enabling the supply of the human population. However, factors biotics and abiotics seriously threaten agricultural practice, making it necessary to identify new sustainable sources and strategies to maintain these practices while minimizing damage to ecosystems and human health. The use of beneficial microorganisms in agriculture is an alternative method that has been recently developed. These microorganisms can be applied as biocontrol agents, act as biological factories to produce molecules of interest, contributing to plant health and biodegradation processes. The genus *Bacillus* is a well-known group of bacteria widely used in agricultural practices. However, not all species in the *Bacillus* genus have been studied as beneficial microorganisms in agriculture, and many still lack comprehensive investigation in this field of research. One example is *Bacillus altitudinis*, which was recently described in 2006 and remains far less studied than other species within the genus. Therefore, there is a necessary need to explore the species as a potential biocontrol agent and a source of novel bioproducts, representing an important step to developing new sustainable practices.

Keywords: agriculture, *Bacillus*, bioproducts, microorganisms, phytopathogens

10. ANEXO

Neste anexo apresentamos experimentos complementares a aplicação dos microrganismos *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 em associação com amebas de origem clínica e ambiental. Os ensaios realizados objetivaram avaliar a atividade das bactérias de maneira isolada e em consórcio bacteriano de controlar as amebas *Acanthamoeba* spp., “HCPA2”, e *Acanthamoeba castellani* “ATCC 30010”

10.1 Condição de microrganismos de trabalho

O isolado *Bacillus altitudinis* 1.4 foi isolado em Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo - RS, Brasil, em 2016. Enquanto *Pseudomonas fluorescens* P.L 5.4 foi isolado de tanque de refrigeração com leite de búfala cru em propriedade localizada no município de Glorinha - RS, Brasil, entre 2012 e 2013. Ambos isolados foram cultivados em caldo TSB 28 ºC. A ameba “HCPA2” do gênero *Acanthamoeba* spp.de origem clínica, e *Acanthamoeba castellani* “ATCC 30010” de origem ambiental foram empregadas na forma de trofozopitos. As amebas foramo cultivadas em meio de cultivo PYG (Proteose - Peptona - Extrato de LeveduraGlicose) em garrafas de cultivo contendo Penicilina-Estreptomicina (8,75 µL/mL) e incubados a 30 ºC, a fim de garantir a manutenção das amebas o meio de cultivo foi trocado a cada dois dias

10.2 Determinação das unidades arbitrárias (UA/mL)

Para avaliação da atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células, as unidades arbitrárias foram determinadas seguindo a metodologia descrita por Motta e Brandelli (2002). As culturas de *B. altitudinis* 1.4 e *P. fluorescens* 5.4 cultivadas isoladas e em consórcio, foram centrifugadas à 5000 rpm por 30 minutos. Para remoção das células bacterianas, o sobrenadante foi filtrado com membrana de 0,22

µm. Após, o sobrenadante livre de células foi diluído seriadamente em solução salina 0,85% em placas de 96 poços. As culturas indicadoras *Candida albicans* ATCC 90022 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foram ajustadas à escala 0.5 de Mcfarland e semeadas em tapete em placas de Mueller-Hinton. Após 10 minutos, as alíquotas de 20 uL do sobrenadante e suas diluições foram pipetadas em gota. As placas foram incubadas em temperatura de 28 ºC, e avaliadas quanto a formação de halos de inibição após 24 e 48 horas de cultivo. A expressão das unidades arbitrárias por mililitro, foi realizada a partir da multiplicação do inverso da diluição pelo fator de correção e expressa em UA/mL.

10.3 Ensaio de atividade amebicida *in vitro*

Este experimento buscou avaliar o efeito amebicida de *Bacillus altitudinis* 1.4 e *Pseudomonas fluorescens* 5.4 sobre as amebas do gênero. Os ensaios foram preparados utilizando as bactérias *B. altitudinis* 1.4, *P. fluorescens* 5.4 nas formas ativas, inativadas e sobrenadantes obtidas das culturas que foram cultivadas em TSB durante períodos de 24 e 48 horas. Usando membrana de 0,22 µM, as culturas foram bacterianas foram filtradas para se obter o sobrenadante livre de células. Para a inativação das bactérias, utilizou-se autoclave para esterilização do material (121 ºC por 30 minutos).

Após o preparo dos extratos, o plaqueamento foi feito em microplaca de cultivo celular de 96 poços, em primeiro lugar foram plaqueados 100 µL da cultura dos trofozoítos viáveis em meio PYG na concentração de 3,0 x 10^5 mL^{-1} (Tepe et al., 2012). Em seguida a placa permaneceu em repouso por trinta minutos (Polat et al., 2007). Depois foram adicionados os 100 µL de cada um dos extratos produzidos anteriormente, como controle positivo adicionou-se 100 µL de clorexidina (Digluconato de Clorexidina, 20% solubilizado em Água, C-9394, Sigma Aldrich) por ser um fârmaco referenciado no tratamento da ceratite amebiana, sendo empregado na concentração

de 0,02% (El-Sayed et al., 2012). Após o término do plaqueamento a placa foi incubada a 30 °C em estufa. Os ensaios foram realizados em períodos de incubação de 24 horas para a avaliação de atividade para cada tipo de extrato (ElSayed et al., 2012).

Para analisar a viabilidade amebiana após às 24h de incubação, foi utilizado a solução corante de azul de tripano (Sigma Aldrich) a 0,4% segundo Lamrabet *et al*. (2012), e o número de amebas contado em câmara de Neubauer (Lamrabet et al., 2012). O cálculo do percentual de viabilidade foi realizado em razão do controle. Foi adotado como controle positivo a clorexidina. Além disto, o meio PYG (2% protease de peptona, 0,2% extrato de levedura e 1,8% glicose) e o solvente utilizado nos extratos, TSB foram adotados como controles não tratados. Para cada extrato, havia um poço como branco, contendo apenas o meio PYG e o TSB, sem os trofozoítos. Cada amostra foi testada em triplicata.

A bactéria *P. fluorescens* 5.4, foi cultivada em triplicata, com erlenmeyers de 250 mL de TSB sendo cultivados ao longo de 24 horas. Passado o período, as culturas foram passadas para falcons de 50 mL estéreis e centrifugados a 4000 RPM, durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo usando a membrana de 0,22 µM e a solução obtida foi distribuída em potes estéreis. Os potes foram liofilizados ao longo de 5 dias, assim obtendo-se um pó solúvel. O liofilizado foi ressuspenso em solução salina estéril 0,85% nas concentrações de 1g para 10 mL; 2g para 10mL; 1g para 5mL e 2g para 5 mL (m/v) e homogeneizada para os ensaios frente a amebas e culturas bacterianas de interesse.

10.4 Resultados preliminares da determinação das unidades arbitrárias (UA/mL)

Ao se testar o sobrenadante livre de células das bactérias de trabalho frente aos microrganismos indicadores citados anteriormente, *Bacillus altitudinis* 1.4 apresentou atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 de 50 UA/mL, nas condições de cultivo empregadas. Contudo, ao determinar as unidades arbitrárias referentes aos cultivos de *P. fluorescens* 5.4 e do consórcio bacteriano não foi registrada atividade antimicrobiana do sobrenadante obtido. Não foi observada atividade antimicrobiana ao utilizar o sobrenadante de *P.fluorescens* 5.4 e do consórcio.