

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Priscila Ribeiro Jankoski

**PROSPECÇÃO DE *Bacillus altitudinis* 1.4 ISOLADO DE SEDIMENTO DA
REGIÃO SUL DO BRASIL – PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E
POTENCIAL PROBIÓTICO**

Porto Alegre

2023

Priscila Ribeiro Jankoski

**PROSPECÇÃO DE *Bacillus altitudinis* 1.4 ISOLADO DE SEDIMENTO DA
REGIÃO SUL DO BRASIL – PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E
POTENCIAL PROBIÓTICO**

Tese 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 doutor(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

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

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Jankoski, Priscila Ribeiro
PROSPECÇÃO DE *Bacillus altitudinis* 1.4 ISOLADO DE
SEDIMENTO DA REGIÃO SUL DO BRASIL - PROMOÇÃO DO
CRESCIMENTO VEGETAL E POTENCIAL PROBIÓTICO / Priscila
Ribeiro Jankoski. -- 2023.
87 f.
Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Tese (Doutorado) -- 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, 2023.

1. *Bacillus altitudinis*. 2. Expressão gênica. 3.
Promoção do crescimento vegetal. 4. Probióticos. 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).

“Só existe saber na invenção, na reinvenção, na busca inquieta, impaciente, permanente, que os homens fazem no mundo, com o mundo e com os outros”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força e paciência para concluir esta etapa.

Agradeço imensamente a minha família, em especial à minha mãe, **Tania**, por todos os ensinamentos, por todo o incentivo e amor, que sempre me deu. À minha irmã **Camila** e a minha sobrinha **Isadora**! Obrigada por tudo! Amo vocês! Vocês três são a minha base.

Agradeço ao meu padrinho **Luis**, por ser tão presente na minha vida e por ter sempre me incentivado a não desistir dos meus objetivos.

À minha orientadora, Prof^a. **Amanda de Souza da Motta**, minha eterna gratidão, por ter me acolhido em um momento difícil. Agradeço ainda, por todos os ensinamentos e auxílios durante este tempo.

Agradeço ao meu companheiro de vida, meu amor, meu amigo, meu parceiro, **Rodrigo**! Obrigada por toda a ajuda desde o início desse processo, pela presença constante, pela paciência, obrigada por me fazer acreditar que posso mais do que imagino, por toda motivação, principalmente nesta reta final. Tu és maravilhoso!

Às minhas amigas do Laboratório 222-C, **Andréia, Fernanda, Nathasha e Vitória**! Gratidão! Obrigada, gurias, por todos os auxílios, pelos ensinamentos e pelos momentos de diversão.

Aos meus amigos, **Alberto, Dai, Jessica, Lu, Tiela**... Obrigada por toda a amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório. Vocês são incríveis! Agradeço a Deus por ter pessoas tão especiais comigo.

Ao meu amigo, **Mateus Camboim**! Exemplo de biólogo e professor! Tu és inspiração.

À minha irmã do coração, **Tais**! Obrigada por estar sempre por perto, por toda amizade e carinho.

Obrigada à minha segunda família... **Mara** (*in memorian*), **Gelci, Dudu, Victor, Rapha, Laís, Mata, Alice, Didier**! Vocês são maravilhosos, sou extremamente feliz em fazer parte desta família.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

PROSPECÇÃO DE *Bacillus altitudinis* 1.4 ISOLADO DE SEDIMENTO DA REGIÃO SUL DO BRASIL – PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E POTENCIAL PROBIÓTICO

Autor: Priscila Ribeiro Jankoski

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

RESUMO

Bactérias do gênero *Bacillus* são ubíquas na natureza e produzem diversos compostos antimicrobianos, sendo cada vez mais utilizadas na promoção do crescimento vegetal, no setor industrial e também como probióticos. O objetivo deste estudo foi identificar o isolado *Bacillus* sp. 1.4 em nível de espécie, estudar as suas propriedades probióticas e as propriedades como promotor do crescimento vegetal. O isolado bacteriano foi identificado como *Bacillus altitudinis* 1.4 pela análise da sequência do gene 16S rRNA e métricas genômicas. A substância antimicrobiana extraída com butanol inibiu *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Bradyrhizobium japonicum* CT 00345 com halos de inibição de 12 e 13 mm, respectivamente. No ensaio de produção de exopolissacarídeos, *B. altitudinis* 1.4 apresentou resultado negativo e na avaliação da motilidade pelo ensaio de *swarming*, halos de 90 mm foram observados em ambas as concentrações de ágar (0,3 e 0,7%). O isolado foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico, coexistir com *B. japonicum* CT 00345 e formar biofilme quando cultivado em conjunto. Também foi observado que *B. altitudinis* 1.4 foi parcialmente inócuo, seus esporos toleraram a passagem ao trato gastrointestinal, bem como aderiram as células Caco-2. O isolado foi capaz de se autoagregar e coagregar com patógenos. A análise genômica revelou genes potencialmente codificadores de características que podem ser benéficas para as plantas, como (*acdS*, *iaaM*, *iaaH*, *ipdC*, *trpA*, *B*, *C*, *D*, *upps*, *dxr*, *ispE,F*, *potA*, *potD*, *potE*, *speB*, *epsG*, *pgaA,B,C,D* e *exoZ*). Também foram identificados genes com características probióticas (*flgA-L*, *motA*, *B*, *pgaA-D*, *luxS*). Neste estudo, avaliou-se a expressão gênica de citocinas pró inflamatórias e anti inflamatórias para diferentes tratamentos. As células vegetativas viáveis de *B. altitudinis* 1.4, aumentaram a transcrição dos fatores pró-inflamatórios, como TNF α , NF κ B, TLR2, além de aumentar também a transcrição de IL-10, indicando a tendência de estimular um perfil pró-inflamatório. Diante dos resultados apresentados, *B. altitudinis* 1.4 apresentou potenciais de aplicação, tanto na área ambiental, como promotor do crescimento de plantas, como na área de probióticos.

Palavras-chave: *B. altitudinis*, expressão gênica, promotor do crescimento vegetal, probióticos.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (87 p.) agosto, 2023.

PROSPECT OF *Bacillus altitudinis* 1.4 ISOLATED FROM SEDIMENT FROM THE SOUTHERN BRAZIL REGION – PLANT GROWTH PROMOTION AND PROBIOTIC POTENTIAL

Author: Priscila Ribeiro Jankoski

Advisor: Prof. Dr. Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bacillus* are ubiquitous in nature and produce several antimicrobial compounds, being increasingly used to promote plant growth, in the industrial sector and also as probiotics. The aim of this study was to identify the isolated *Bacillus* sp. 1.4 at the species level, to study its probiotic properties and properties as a plant growth promoter. The bacterial isolate was identified as *Bacillus altitudinis* 1.4 by 16S rRNA gene sequence analysis and genomic metrics. The antimicrobial substance extracted with butanol inhibited *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Bradyrhizobium japonicum* CT 00345 with inhibition halos of 12 and 13 mm, respectively. In the exopolysaccharide production test, *B. altitudinis* 1.4 showed a negative result and in the motility evaluation by the swarming test, halos of 90 mm were observed in both agar concentrations (0.3 and 0.7%). The isolate was able to solubilize inorganic phosphate, coexist with *B. japonicum* CT 00345 and form a biofilm when cultivated together. It was also observed that *B. altitudinis* 1.4 was partially innocuous, its spores tolerated passage to the gastrointestinal tract, as well as adhered to Caco-2 cells. The isolate was able to self-aggregate and coaggregate with pathogens. Genomic analysis revealed genes potentially encoding traits that may be beneficial to plants, such as (*acdS*, *iaaM*, *iaaH*, *ipdC*, *trpA*, *B*, *C*, *D*, *upps*, *dxr*, *ispE,F*, *potA*, *potD*, *potE*, *speB*, *epsG*, *pgaA,B,C,D* and *exoZ*). Genes with probiotic characteristics were also identified (*flgA-L*, *motA*, *B*, *pgaA-D*, *luxS*). In this study, we evaluated the gene expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines for different treatments. Viable vegetative cells of *B. altitudinis* 1.4 increased the transcription of pro-inflammatory factors, such as TNF α , NF κ B, TLR2, in addition to also increasing the transcription of IL-10, indicating a tendency to stimulate a pro-inflammatory profile. In view of the results presented, *B. altitudinis* 1.4 showed potential for application, both in the environmental area, as a promoter of plant growth, and in the area of probiotics.

Key-words: *B. altitudinis*, gene expression, plant growth promoter, probiotics.

¹Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (87 p.) August, 2023.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Gênero <i>Bacillus</i>	4
3.1.1	<i>Bacillus altitudinis</i>	6
3.2	Potencialidades do gênero <i>Bacillus</i>	7
3.2.1	<i>Bacillus</i> como promotor do crescimento vegetal	8
3.2.2	<i>Bacillus</i> no controle biológico	10
3.2.3	Potencial probiótico de <i>Bacillus</i> sp.....	11
3.3	Aplicação de probiótico de <i>Bacillus</i> em rações.	13
3.4	Sequenciamento genômico de isolados de <i>Bacillus</i> com potencial probiótico.	14
3.5	Imunomodulação e probióticos	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Microrganismos e condições de cultivo.....	17
4.2	Identificação do isolado <i>Bacillus</i> sp. 1.4 por sequenciamento do gene 16S rRNA.....	17
4.3	Sequenciamento e análise do genoma de <i>Bacillus</i> sp. 1.4	18
4.4	Avaliação da inocuidade de <i>Bacillus</i> sp. 1.4	19
4.5	Curva de crescimento de <i>Bacillus</i> sp. 1.4 e produção da substância antimicrobiana.....	20
4.6	Potencial de <i>Bacillus</i> sp. 1.4 como promotor do crescimento de planta.....	21
4.6.1	Espectro de ação contra bactérias de importância ambiental.	21
4.6.2	Avaliação da motilidade bacteriana através do ensaio Swarming	21
4.6.3	Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS).	22
4.6.4	Solubilização do fosfato inorgânico por <i>Bacillus</i> sp. 1.4 e <i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i> CT 00345.....	22

4.6.5	Ensaio de coexistência entre <i>Bacillus</i> sp. 1.4 e <i>B. japonicum</i> CT 00345	22
4.6.6	Avaliação da produção de biofilme por <i>Bacillus</i> sp. 1.4 e <i>B. japonicum</i> CT 00 345 pelo método de cristal violeta	23
4.6.7	Produção de sideróforos e fitohormônios.....	24
4.7	Avaliação do potencial probiótico de <i>Bacillus</i> sp. 1.4	24
4.7.1	Tolerância ao trato gastrointestinal de <i>Bacillus</i> sp. 1.4.....	24
4.7.2	Avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação	25
4.7.3	Adesão do <i>Bacillus</i> sp. 1.4 as células epiteliais Caco-2.....	26
4.7.4	Hidrofobicidade celular de <i>Bacillus</i> sp.1.4.....	27
4.8	Efeitos imunomoduladores de <i>Bacillus</i> sp. 1.4.....	28
4.8.1	Cultivo de macrófagos murinos.....	28
4.8.2	Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. 1.4 e preparo dos estímulos.....	28
4.8.3	Preparo e adição dos estímulos ao cultivo de macrófagos J774.....	29
4.8.4	Extração do RNA total.....	29
4.8.5	Síntese do DNA complementar.....	29
4.8.6	Avaliação da expressão relativa de RNA mensageiro através de PCR quantitativo (qPCR).....	30
5.	RESULTADOS	32
5.1	Identificação do isolado <i>Bacillus</i> sp. 1.4 por sequenciamento do gene 16S rRNA.....	32
5.2	Sequenciamento e análise do genôm.....	33
5.3	Avaliação da inocuidade de <i>B. altitudinis</i> 1.4	36
5.4	Curva de crescimento de <i>B. altitudinis</i> 1.4	37
5.5	Potencial de <i>B. altitudinis</i> 1.4 como promotor do crescimento de planta	37
5.5.1	Espectro de ação contra bactérias de importância ambiental	37
5.5.2	Avaliação da motilidade bacteriana e produção de exopolissacarídeos (EPS)	37
5.5.3	Solubilização do fosfato inorgânico por <i>B. altitudinis</i> 1.4 e <i>B. japonicum</i> CT 00345.....	38
5.5.4	Ensaio de coexistência entre <i>B. altitudinis</i> 1.4 e <i>B. japonicum</i> CT 00345	38
5.5.5	Avaliação da produção de biofilme por <i>B. altitudinis</i> 1.4 e <i>B. japonicum</i> CT 00345 pelo método do cristal violeta	38
5.5.6	Produção de sideróforos e fitohormônios.....	39
5.6	Avaliação do potencial probiótico de <i>B. altitudinis</i> 1.4.....	39
5.6.1	Tolerância ao trato gastrointestinal de <i>B. altitudinis</i> 1.4	39

5.6.2	Avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação de <i>B. altitudinis</i> 1.4.....	40
5.6.3	Adesão de <i>B. altitudinis</i> 1.4 a células Caco-2.....	40
5.6.4	Hidrofobicidade da superfície celular de <i>B. altitudinis</i> 1.4	41
5.6.5	Efeitos imunomoduladores de <i>B. altitudinis</i> 1.4	41
5.6.5.1	Avaliação da expressão gênica de imunomoduladores após tratamentos com <i>B. altitudinis</i> 1.4.....	41
6.	DISCUSSÃO GERAL	46
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados.....	31
Tabela 2. Metabólitos secundários identificados no genoma de <i>B. altitudinis</i> 1.4, usando a ferramenta antiSMASH.	34
Tabela 3. Clusters de genes putativos que codificam bacteriocinas e peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-traducionalmente (RiPPs) no genoma de <i>B. altitudinis</i> 1.4 previstos pelas ferramentas BAGEL4 e PRISM	35
Tabela 4. Densidade óptica (DO) a 600 nm e classificação de biofilmes microbianos.....	36
Tabela 5. Genes de fatores de virulência e com potencial probiótico previstos no genoma de <i>B. altitudinis</i> 1.4.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reconstrução filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA. Sequências de cepas tipo obtidas do banco de dados LPSN são seguidas por números de acesso, enquanto as aspas indicam espécies não validamente publicadas. O isolado em questão mostrado em negrito. Valores de bootstrap acima de 70 são mostrados. Cepas de *Bacillus subtilis* foram definidas como grupo externo.....32

Fig 2. Concentração celular de células vegetativas (azul) e esporos (vermelho) do isolado *B. altitudinis* 1.4 após exposição as condições do trato gástrico (TGI).
40

Fig 3. Expressão relativa de mRNA de TNF α , NF κ b, TLR2, IL10 e IL4 em 1, 8 e 24 horas em macrófagos murinos J 774 frente ao estímulo de células vegetativas viáveis (BV) de *B. altitudinis* 1.4 Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$). 42

Fig 4. Expressão relativa de mRNA de TNF α , NF κ b, TLR2, IL10 e IL4 em 1, 8 e 24 horas em macrófagos murinos J 774 frente ao estímulo de células vegetativas inativadas de *B. altitudinis* 1.4 (BI). Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$).43

Fig 5. Expressão relativa de mRNA de TNF α , NF κ b, TLR2, IL10 e IL4 em 1, 8 e 24 horas em macrófagos murinos J 774 frente ao estímulo de esporos viáveis de *B. altitudinis* 1.4 (EV). Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$).. 44

Fig 6. Expressão relativa de mRNA de TNF α , NF κ b, TLR2, IL10 e IL4 em 1, 8 e 24 horas em macrófagos murinos J 774 frente ao estímulo de esporos viáveis de *B. altitudinis* 1.4 (EI). Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$).. 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGCs	<i>Biosynthetic gene clusters</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
cDNA	DNA complementar
DO	Densidade óptica
DMEM	Meio Dulbecco MEM
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GAPDH	<i>Glyceraldeyde-3-Phosphate dehydrogenase</i>
GT	<i>Glycosyltransferases</i>
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IS	Índice de Solubilização
IgA	Imunoglobulina A
NBRIP	<i>National Botanical Research Institute</i>
NFkB	Fator nuclear kappa-beta
NK	<i>Natural Killer</i>
NRPS	Peptídeo não ribossomal
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
qPCR	PCR quantitativa
RPM	Rotações por minuto
RRPs	Receptores de reconhecimento de padrões
SIS	Suco intestinal simulado
SGS	Suco gástrico simulado
TGI	Trato gastrointestinal
TSB	Caldo triptona de soja
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
tRNA	RNA transportador

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Bacillus* são comuns na natureza e encontradas em diversos nichos ecológicos como solo, ar, água, sedimentos, fezes de animais e em alimentos. As espécies pertencentes a esse gênero são bactérias Gram-positivas em forma de bastonete, aeróbios ou anaeróbios facultativos, formadores de endósporos.

Este gênero é amplamente conhecido pelo seu potencial biotecnológico em diferentes áreas. No setor agrícola, seu uso como estratégia de biocontrole tem recebido grande atenção, isso porque fornece alternativas seguras, ecologicamente corretas, duradouras e econômicas. Algumas espécies do gênero *Bacillus* promovem a saúde e o desenvolvimento das plantas, estimulando o seu crescimento, aumento de nutrientes por meio da síntese de fitohormônios ou pela formação de biofilmes e pela supressão de doenças nas plantas.

Por sua ampla gama de características fisiológicas e produção de metabólitos secundários, as espécies de *Bacillus* também são usadas em outros setores, sendo reconhecidas como potenciais probióticos. Esses microrganismos exercem seus efeitos benéficos através de diferentes modos de ação, já foi relatado o uso na prevenção de diversas patologias, principalmente no sistema gastrointestinal. Além da modulação da resposta imune, foram encontradas propriedades antimicrobianas, melhora da secreção enzimática e aumento da eubiose ao melhorar a diversidade da microbiota.

Para que os microrganismos sejam considerados probióticos, é necessário realizar a comprovação da sua identidade, da sua segurança e dos benefícios oferecidos ao hospedeiro. Para comprovação da inocuidade do microrganismo, alguns parâmetros como suscetibilidade a antimicrobianos, atividade hemolítica e presença de genes de virulência devem ser avaliados. Além disso, outro aspecto que precisa ser abordado são os mecanismos envolvidos na tolerância às condições intestinais. O trato gastrointestinal é um ambiente dinâmico, e os microrganismos a ele expostos devem ser capazes de sobreviver a diversas condições de estresse, como ambiente ácido, alcalino e a presença de sais biliares

no fluido intestinal. Outro fator é a capacidade de adesão, o que vai conferir a capacidade de colonizar o epitélio intestinal e assim, promover os benefícios propostos.

Algumas bactérias probióticas exibiram propriedades imunomoduladoras, o que é ideal para o tratamento de doenças relacionadas à disbiose associadas à inflamação. Essas bactérias podem equilibrar respostas anti-inflamatórias e pró inflamatórias, através de diferentes mecanismos sendo um deles a capacidade de estimular as células a produzirem citocinas, que irão direcionar o desenvolvimento da resposta imune.

Diante do exposto, o presente estudo buscou expandir os conhecimentos quanto ao potencial biotecnológico de *Bacillus altitudinis* 1.4. O isolado foi prospectado de uma área úmida em 2016 e testado quanto às suas potencialidades, o microrganismo tem potencial de produção de substância antimicrobiana, sendo capaz de inibir bactérias do gênero *Listeria*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de *Bacillus altitudinis* 1.4 proveniente de sedimento de uma área úmida no Estado do Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Identificar o isolado bacteriano através do sequenciamento genômico total;

2.2.2 Avaliar a inocuidade do isolado através de ensaios *in vitro* e com a análise do genoma total;

2.2.3 Avaliar propriedades do isolado bacteriano relacionadas ao biocontrole de plantas;

2.2.4 Avaliar o potencial probiótico de *B. altitudinis* 1.4, através de ensaios *in vitro* e a partir do estudo do genoma;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Gênero *Bacillus*

Bacillus pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* e família *Bacillaceae*. O gênero foi descrito pela primeira vez em 1.872, e atualmente compreende mais de 400 espécies, que variam entre espécies patogênicas a importantes microrganismos produtores de metabólitos secundários, usados em diferentes setores (Dunlap, 2019; LPSN, 2021).

Microrganismos pertencentes a este gênero são Gram-positivos, em forma de bastonete, aeróbios ou anaeróbios facultativos com baixo conteúdo de guanina e citosina (GC), a locomoção geralmente acontece por meio de flagelos, são formadores de esporos, que podem ser cilíndricos, ovais, arredondados ou em forma de rim. Em meios não seletivos, *Bacillus* spp. geralmente exibem colônias grandes e planas e são frequentemente beta-hemolíticas. São resistentes a condições adversas, como ao calor, ausência de água, radiação e produtos químicos e são ubíquos na natureza (Comba et al., 2018; Fan et al., 2018; Li et al., 2018; Bukharin et al., 2019; Kuebutornye et al., 2019; Premkrishnan et al., 2021; Thapa et al., 2021). Alguns estudos demonstraram a capacidade de sobrevivência deste grupo de bactérias em ambientes inóspitos, como em sistemas quentes e salinos, desta forma podendo ser classificados como termofílicos e halofílicos (Dunlap et al., 2015; Mandic-Mulec et al., 2015; Verma et al., 2018). Há também espécies que podem ser classificadas como psicrófilicas, acidofílicas e alcalofílicas (Liu et al. 2019).

Bacillus spp. são conhecidos pela capacidade de sintetizar uma variedade de moléculas bioativas, incluindo enzimas e peptídeos antimicrobianos, sendo desta forma, de grande interesse das indústrias agrícolas, alimentícias e farmacêuticas (Elshaghabee et al., 2017; Ntushelo et al., 2019; Goswami et al., 2019).

No setor agrícola, *Bacillus* spp. vêm sendo estudado devido as funções ecológicas que este grupo de microrganismos apresenta, como ciclagem de nutrientes, capacidade de tolerância ao estresse das plantas e formação de

biofilmes (Saxena et al., 2019; Wang et al., 2019). *Bacillus* inclui as espécies de bactérias mais abundantes na rizosfera com a capacidade de promover o crescimento de plantas, e produção de metabólitos antibacterianos e antifúngicos, além disso, esses microrganismos são reconhecidos como a principal fonte de cepas para formulações comerciais registradas como bactérias biocontroladores na agricultura (Saxena et al., 2019; Sang-Mo et al., 2019).

A produção de enzimas líticas por *Bacillus* spp., vêm sendo estudada como alternativa ao controle de doenças causadas por fungos. As quitinases, glicanases, lipases e proteases, são fundamentais para degradação de componentes da parede celular dos fungos como quitina e glicana, além do que, a produção de quitinase é indicadora de atividade bioinseticida (Berini et al. 2018; Rishad et al., 2017; Subbanna et al., 2019).

Na área farmacêutica, *Bacillus* spp. vêm sendo estudado por suas propriedades farmacológicas, antioxidantes e antimicrobianas. Jankoski et al. (2021) avaliaram bactérias isoladas de áreas úmidas, no Estado do Rio Grande do Sul, quanto a produção de compostos antimicrobianos. Constatou-se que o isolado *Bacillus* sp. sed 2.2 foi produtor de compostos antimicrobianos e produtor de enzimas hidrolíticas. O composto antimicrobiano estudado apresentou inibição da cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, além de outras espécies de *Listeria*.

Rajan et al. (2021) avaliaram bactérias associadas a sedimentos de mangue a fim de testar suas propriedades farmacológicas. Segundo os autores, um isolado de *Bacillus* MBMS5 foi capaz de inibir patógenos como *Vibrio parahemolyticus* MTCC 451, *Escherichia coli* MTCC 443, *Aeromonas caviae* MTCC 646, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias contra a enzima pró- inflamatória induzível 5-LOX.

Em alguns estudos, isolados de *Bacillus* vêm sendo usados como probióticos, em diferentes alimentos, como, iogurte, kefir, kimchi, alimentos fermentados (Sirokou et al., 2019; Ragul et al., 2017; Shivangi et l., 2020; Zhang et al., 2020; Jeong et al., 2020).

3.1.1 *Bacillus altitudinis*

A espécie *Bacillus altitudinis* foi isolada e caracterizada pela primeira vez em 2006 a partir de amostras de ar coletadas de tubos criogênicos (Shivaji et al., 2006). Posteriormente, a espécie foi encontrada em outros habitats, como solo, plantas, animais, sedimento e água (Yue et al., 2020; Cortese et al., 2021; Esakkiraj et al., 2012; Ohair et al., 2017; Khan et al., 2022).

B. altitudinis está inserido dentro de um complexo que consiste nas seguintes espécies: *Bacillus altitudinis*, *Bacillus australimaris*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus xiamenensis*, *Bacillus zhangzhouensis* (Liu et al., 2016).

As principais características fenotípicas de *B. altitudinis* são: crescimento em ágar nutriente, apresentando colônias brancas, convexas com margem regular, medindo de 2 a 3 mm de diâmetro. A temperatura para seu desenvolvimento é entre 8 e 45 °C, pH entre 5 – 8, e tolera até 2% de NaCl. Apresenta resultados negativos para atividades de urease e fenilalanina desaminase, redução de nitrato a nitrito, utilização de citrato e teste de Voges-Proskauer e produz ácido a partir do manitol (Shivaji et al., 2006).

Segundo alguns autores, a bactéria *B. altitudinis* é uma espécie que engloba cepas que interagem frequentemente com plantas, e essa associação resulta em produção de fitohormônios, aumento da nutrição mineral, inibição de fitopatógenos, produção de sideróforos e também auxiliam as plantas em sistemas de fitorremediação (Kumaravel et al., 2018; Budiharjo et al., 2017).

Na área industrial a espécie foi reconhecida como potencial produtora de enzimas (Shah et al., 2015; Zhang et al., 2021; Cortese et al., 2021). *B. altitudinis* pode ter importante aplicação na indústria devido à ampla gama de possibilidades em seus produtos: como na produção de enzimas xilanolíticas e a redução da fitotoxicidade induzida pelo cobre (Thite et al., 2021; Yue et al., 2021).

Khan et al. (2021) avaliaram a eficiência de degradação de lignina por *B. altitudinis* SL7 isolado de efluente de fábrica de celulose e papel. Os autores relatam que o isolado, reduziu a cor e teor da lignina em 26 e 44% respectivamente.

3.2 Potencialidades do gênero *Bacillus*

Atualmente, o gênero *Bacillus* é utilizado para fins industriais e algumas espécies são reconhecidas como seguras, ou seja, não apresentam toxinas e não são patogênicas (Harirchi et al., 2022). A diversidade metabólica, não patogenicidade (exceto para algumas espécies), taxas de crescimento rápido, notável resistência a condições adversas e produção de vários metabólitos, como enzimas, aminoácidos, vitaminas, surfactantes e compostos bioativos, tornam este microrganismo como potencial candidato em aplicações industriais (Sar et al., 2022).

Na indústria de alimentos, *Bacillus* é utilizado em produtos lácteos e fermentados. As β -glucanases de *Bacillus amyloliquefaciens*, podem ser utilizadas na indústria do vinho para reduzir o processo de maturação, na produção de cervejas, elas são utilizadas para prevenir “sedimentos” na bebida, e também para diminuir o teor de glúten em biscoitos (Tille et al., 2014; Ngalmat et al., 2021).

Outras espécies de *Bacillus* podem hidrolisar diferentes polissacarídeos produzindo diferentes enzimas, utilizadas na indústria alimentícia, que são usadas na fabricação de glicose concentrada ou xaropes de milho com alto teor de maltose usados na produção de doces e sorvetes, adoçantes em bebidas (Alagöz et al., 2016).

Na indústria farmacêutica, os microrganismos vêm sendo cada vez mais utilizados na produção de biofármacos, e no geral, os antibióticos, são um dos principais produtos farmacêuticos produzidos por microrganismos. O gênero *Bacillus* pode produzir diferentes classes de antibióticos, como, oligopeptídeos, peptídeos antimicrobianos e compostos aminoglicosídeos (Harwood et al., 2018; Xiang et al., 2021). Os peptídeos antimicrobianos produzidos por *Bacillus* são produtos de interesse para aplicações biotecnológicas (Vairagkar e Mirza, 2021). Esse grupo de microrganismos é reconhecido por produzir peptídeos antimicrobianos há mais de 50 anos, dedicando até 5% de seu genoma à produção desses compostos (Stein 2005; Sumi et al., 2015). Guo et al. (2022) estudaram compostos antifúngicos produzidos por *Bacillus altitudinis* Q7. Os autores relataram que o composto foi eficiente contra *Alternaria alternata*, indicando um potencial agente de controle biológico.

3.2.1 *Bacillus* como promotor do crescimento vegetal

As bactérias que estabelecem colônias na rizosfera e impulsionam o crescimento da planta são chamadas de rizobactérias promotoras do crescimento da planta. As cepas bacterianas do gênero *Bacillus* estão entre as bactérias mais conhecidas (Zhang et al., 2016; Saxena et al., 2019; Pranaw et al., 2020). Esses microrganismos promovem o crescimento das plantas por diferentes mecanismos, direto ou indiretos. Os de ação direta são definidos como, o uso de características bacterianas que resultam na promoção direta do crescimento da planta, incluindo a fixação biológica do nitrogênio, produção de auxinas, ácido indol-3-acético (IAA), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC deaminase), citocininas, giberelinas, solubilização de fósforo (Glick et al., 2012; Kudoyarova et al., 2014).

Já os de mecanismo indireto estão relacionados com as propriedades das bactérias em produzirem compostos, como compostos antimicrobianos, sideróforos, enzimas líticas, que inibem o funcionamento de microrganismos fitopatogênicos (Cuong e Hoa, 2021; Lipková et al., 2021; Shahid et al., 2021; Bessai et al., 2022; Mirskaya et al., 2022).

Os microrganismos podem estimular o crescimento e aumentar a resistência das plantas sintetizando fitohormônios, como: auxinas, etileno, citocininas, giberelinas (Kang-S et al., 2019). As auxinas incitam a diferenciação tecidual, o alongamento celular e a divisão celular em plantas. Já as giberelinas são uma classe de hormônios que exercem efeitos profundos no crescimento e desenvolvimento das plantas (Woodward et al., 2005). As giberelinas atuam no alongamento de raízes e brotos, germinação de sementes, floração e padrão de frutificação (Radhakrishnan et al., 2016).

As citocininas desempenham um papel fundamental nos processos fisiológicos, como a abertura dos estômatos (para as trocas gasosas da planta), além disso, participam da fotossíntese, divisão celular, metabolismo de nutrientes (Brenner et al., 2015).

O uso excessivo de fertilizantes fosfatados convencionais para melhorar a produtividade agrícola, causa poluição das águas superficiais e subterrâneas,

diminuição da fertilidade do solo e acúmulo de elementos tóxicos (Ribeiro et al. 2020). Diferentes microrganismos do solo são capazes de solubilizar o fosfato insolúvel do solo e liberar o fósforo solúvel e disponibilizá-lo para as plantas, como é o caso do *Bacillus* spp. No trabalho de Maharana e Dahl (2022) os autores obtiveram resultados positivos ao avaliar a solubilização de fosfato por *Bacillus cereus* S0B4, *Solibacillus isronensis* S0B8 e *Bacillus amyloliquefaciens* S0B17.

Em relação aos mecanismos indiretos de crescimento de plantas, podemos citar os sideróforos, que são compostos quelantes de metais de baixo peso molecular, que em condições de ferro limitado, são produzidos pelos microrganismos. O ferro (Fe) atua como um elemento-chave em vários tipos de processos biológicos, como, metabolismo do oxigênio, síntese de DNA e RNA, transferência de elétrons e processos enzimáticos. Os sideróforos têm a capacidade de diminuir a acessibilidade de Fe para patógenos, funcionando como agente de biocontrole, já que os microrganismos produtores de sideróforos restringem a propagação de doenças e promovem o crescimento da planta (Khan et al., 2018; Beneduzi et al., 2012; Goswami et al., 2016).

O potencial de *Bacillus altitudinis* HNH7 e *Bacillus velezensis* HNH9 foi avaliado quanto às suas características como promotoras de plantas. Foram realizados ensaios *in vitro* e ambos os isolados apresentaram resultados positivos para atividade proteolítica, celulolítica e amilolítica e também foram capazes de produzir sideróforos. (Hasan et al., 2022).

A produção de enzimas líticas é uma característica importante dos agentes de biocontrole, elas rompem as paredes celulares dos patógenos alvo, alterando a estabilidade estrutural e a integridade. A quitina é um dos principais constituintes das paredes celulares dos fungos. Algumas cepas bacterianas podem degradar as paredes celulares dos fungos produzindo enzimas hidrolíticas, incluindo quitinases, desidrogenases, exo e endopoligalacturonases, lipases, fosfatases, proteases, β -glucanases, hidrolases, pectinolases e celulases (Xie et al., 2016).

A capacidade de *Bacillus* spp. produzir diferentes tipos de compostos bioativos tem um impacto direto no desenvolvimento das plantas e no rendimento agrícola, aumentando os nutrientes disponíveis para os vegetais. A maioria dos

nutrientes necessários é aplicada às plantas por fertilização, contudo, essa técnica traz um impacto negativo para o meio ambiente (Bhattacharyya et al., 2016), diante disso, uma das melhores soluções para uma fertilização “mais limpa” seria o uso de fertilizantes a base de bactérias promotoras de crescimento vegetal, como cepas do gênero *Bacillus* (Cimo et al., 2020).

3.2.2 *Bacillus* no controle biológico

Segundo Stenberg et al. (2021) controle biológico é definido como “a exploração de agentes vivos (incluindo vírus) para combater organismos nocivos (pragas e patógenos), direta ou indiretamente, para o bem humano”. Essa estratégia pode diminuir as perdas de rendimento causadas por doenças foliares, entre outras, ao passo que não apresenta os riscos do controle químico (Hashem et al., 2019; Sharma et al., 2020).

Agentes de biocontrole microbiano ajudam a controlar patógenos de plantas por meio de diferentes métodos, incluindo indução de resistência, competição por espaço e nutrientes e outros métodos que envolvem a interrupção das condições de crescimento necessárias para o crescimento de patógenos. Vários microrganismos são conhecidos por produzir antibióticos, enzimas e vários outros metabólitos e compostos que ajudam a controlar patógenos de plantas (Köhl et al., 2019).

Espécies bacterianas conhecidas como bactérias promotoras do crescimento de plantas são efetivamente usadas como biofertilizantes (Goswami et al., 2016). Dentre elas, podemos destacar: *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium* spp., etc. (Kaushal et al., 2017; Khabbaz et al. 2019; Dobrzynski et al., 2022). No trabalho de Jiang et al. (2018) foi avaliada uma espécie de *Bacillus velezensis* para ser usada em biocontrole do patógeno *Botrytis cinerea*, causador da doença do mofo cinzento na pimenta, os autores relataram que *B. velezensis* poderia suprimir o crescimento e a formação de esporos de *B. cinerea*,

através da secreção de metabólitos secundários.

Pranaw et al. (2020) avaliaram o efeito de bactérias promotoras de crescimento de plantas no aumento da biomassa de *Miscanthus giganteus*. No trabalho os autores observaram um efeito significativo de *B. altitudinis* KP – 14 nos parâmetros: altura da planta, dos caules, folhas e peso seco das raízes. *B. altitudinis* KP – 14 apresentou atividade antimicrobiana contra *F. culmorum* e *B. cinerea*, demonstrando que o isolado pode ser considerado um potencial agente de biocontrole contra esses fitopatógenos fúngicos. No trabalho de Zeng et al. (2021) foi avaliado o potencial biocontrole do isolado *B. altitudinis* GLB 197. Os resultados demonstraram que o isolado inibiu significativamente o micélio de nove fungos patogênicos.

3.2.3 Potencial probiótico de *Bacillus* sp.

Probióticos são definidos como “microrganismos vivos que quando administrados em doses adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO, 2002). Eles são frequentemente usados para melhorar o equilíbrio dinâmico da microbiota intestinal, contribuindo assim, para a saúde intestinal (Mörkl et al., 2020; Cui et al., 2020).

Esses microrganismos exercem seus efeitos benéficos através de diferentes modos de ação e já se relatou o uso na prevenção de várias patologias, incidindo principalmente nos sistemas gastrointestinal e imunitário (Wieers et al., 2019; Navarro-Lopez et al., 2019; Emre et al., 2020).

Os mecanismos de ação dos probióticos são diversos, como: produção de substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos ou bacteriocinas, regulação da resposta imune através da secreção de IgA contra possíveis patógenos, reduzem o risco de desenvolver alergia, melhoram a função da barreira da mucosa intestinal, modulam a expressão de genes do hospedeiro, liberam proteínas funcionais como lactase ou enzimas naturais e diminuem a adesão de patógenos (Plaza-Diaz et al., 2019).

Algumas das cepas probióticas mais comumente usadas incluem membros da família Lactobacillaceae, incluindo os gêneros *Lactiplantibacillus*,

Lacticaseibacillus, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. (Brutscher et al., 2022). Além disso, certas espécies de *Bacillus* foram relatadas como potenciais probióticos, como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *Bacillus siamensis* e *Bacillus subtilis* (JeżewskaFrąckowiak et al., 2019).

Os esporos de espécies de *Bacillus* são considerados responsáveis pela germinação ou persistência no intestino delgado e modulação das condições intestinais (Bernardeau et al., 2017). Essas características probióticas são específicas da cepa e variam entre as cepas.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020) forneceram diretrizes para a avaliação da segurança dos probióticos usados em alimentos. Nomeadamente é recomendado que as cepas probióticas sejam caracterizadas por uma série de testes (a especificidade da cepa está ligada aos efeitos probióticos) que irão determinar possíveis riscos à saúde. Os testes incluem, resistência a antibióticos, atividades metabólicas probióticas, produção de toxinas, atividade hemolítica.

Além da segurança, outro aspecto a ser abordado são os mecanismos envolvidos na tolerância às condições intestinais humanas durante a seleção de uma cepa probiótica. O trato gastrointestinal é um ambiente dinâmico, e os microrganismos a ele expostos, devem ser capazes de sobreviver a diversas condições de estresse, como o ambiente extremamente ácido, o ambiente alcalino e a presença de sais biliares no fluido intestinal (Alp e Hakan, 2019).

Geralmente se considera que, para aplicação em produtos alimentícios, os probióticos precisam ser capazes de sobreviver até que tenham alcançado a parte do trato gastrointestinal em que exercerão seus supostos efeitos no intestino (Breyer et al., 2020).

Jeon et al. (2017) investigaram as propriedades probióticas da bactéria *Bacillus subtilis* P223, isolado de kimchi. Os esporos da bactéria apresentaram alta tolerância ao suco gástrico e sais biliares, além de aderência às células intestinais e capacidade de autoagregação.

Bacillus paralicheniformis (SN-6) derivado do rúmen de búfalo foi avaliado quanto as suas propriedades probióticas. O isolado exibiu tolerância à

simulação do trato gastrointestinal, além de ser inócuo (Yang et al., 2022).

Zeng et al. (2022) avaliaram o potencial probiótico de dois isolados de *Bacillus licheniformis* e dois isolados de *Bacillus altitudinis*. De acordo com os autores, os quatro isolados apresentaram tolerância a ácidos e à bile, além de hidrofobicidade, autoagregação e sensibilidade aos antibióticos testados, características importantes para cepas potenciais probióticas. Mukherjee et al. (2016) avaliaram o potencial probiótico *Bacillus stratosphericus*, *B. aerophilus*, *B. licheniformis* e *Solibacillus silvestres*. O estudo revelou propriedades probióticas destas bactérias, além de exibir atividade antagonista contra patógenos de peixes.

3.3 Aplicação de probiótico de *Bacillus* em rações

Os aditivos alimentares e suplementos nutricionais estão ganhando cada vez mais importância na indústria, bem como nos sistemas de saúde, devido ao seu amplo espectro de impactos benéficos, como promoção do crescimento e produção, aprimoramento imunológico e proteção da saúde (Alagawany et al., 2018; Farag, et al., 2019). Fatores não nutricionais como higiene, processamento dos ingredientes da ração, temperatura ambiente, saúde animal e composição genética têm impacto no desempenho do animal (Chlebicz & Slizewska, 2020; Mohamed et al., 2019).

Os aditivos alimentares utilizados na alimentação de aves, com o objetivo de promoção de crescimento, são antibióticos, probióticos, oligossacarídeos, enzimas e ácidos orgânicos (Bin-Jumah et al., 2020; Elgeddawy et al., 2020). Desde a década de 1940, os antibióticos são amplamente utilizados para construir a imunocompetência das aves contra doenças infecciosas e como promotores de crescimento, contudo, o uso dessas drogas, pode levar ao desenvolvimento de bactérias resistentes e que podem ser transferidas geneticamente. Diante disso, o uso de probióticos surge como uma alternativa a substituição dos antimicrobianos. Bilal et al. (2021) avaliaram o impacto dos probióticos de *B. pumilus* e *B. subtilis* na diversidade e maturidade microbiana na microbiota cecal em diferentes fases da vida em frangos de corte. Os resultados

mostraram uma melhora da diversidade bacteriana em aves mais jovens e que os probióticos auxiliam a microbiota cecal a atingir a maturação precoce (14º dia) através de um aumento na abundância de membros de determinadas famílias bacterianas. Os benefícios dos probióticos se estendem a outros grupos de animais como os leitões, Lee et al. (2014) demonstraram que a suplementação de cepas probióticas de *Bacillus* poderia melhorar o desempenho de crescimento, reduzir a incidência de diarreia e melhorar a morfologia intestinal em leitões desmamados. He et al. (2020) avaliaram duas espécies, *B. subtilis* DSM 32540 e *B. pumilus* DSM 32539 no desempenho de crescimento, diarreia, saúde intestinal, microbioma e imunidade sistêmica de leitões desmamados experimentalmente infectados com *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). Os autores relataram que a suplementação melhorou o desempenho do crescimento, aliviou a gravidade da diarreia, melhorando a saúde intestinal e reduziu a inflamação sistêmica de leitões infectados com a cepa patogênica.

Diferentes estudos em suínos e aves demonstraram que os probióticos ajudaram a desenvolver uma microbiota saudável, impedindo a adesão de patógenos e a regulação do sistema imunológico (Wang et al., 2019; Chance et al., 2021).

3.4 Sequenciamento genômico de isolados de *Bacillus* com potencial probiótico

As tecnologias de sequenciamento de alto rendimento e análises *in silico* vem sendo aplicadas com sucesso na identificação de cepas potencialmente probióticas e na identificação de seus genes. Além disso, a tecnologia de alto rendimento pode conduzir a análises mais abrangentes, como os potenciais mecanismos probióticos de uma cepa (Li et al., 2020; Zhang et al., 2022).

Diversos estudos sobre as espécies de *Bacillus* e seu potencial probiótico foram realizadas utilizando ferramentas *in vitro* e *in vivo*, contudo, o sequenciamento completo do genoma pode fornecer dados adicionais na investigação de mecanismos potenciais do microrganismo probiótico. Diante disso, métodos

convencionais, como o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foi gradualmente substituído pelo sequenciamento genômico (Mardis, 2013).

Esta nova abordagem provou identificar com precisão e diferenciar efetivamente as espécies de *Bacillus*, o sequenciamento genômico compara a sequência anotada com um banco de dados conhecido, como o NCBI, calculando o valor de Identidade Nucleotídica Média (ANI) e/ou realizando a hibridação DNA- DNA. De acordo com Khullar et al. (2022) os resultados do estudo genômico melhoraram a análise das espécies de *Bacillus* e sua capacidade probiótica.

No estudo de Sam-on et al (2023) foi realizada uma mineração do genoma de *B. velezensis* para marcadores probióticos e metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas. Os autores relataram que foram identificados cinco grupos de metabólitos secundários, além de genes de adesão, com tolerância a ácidos e sais biliares. Já no estudo de Pereira et al. (2019) foi possível identificar sequências codificadoras envolvidas na biossíntese de antibióticos policetídeos e peptídeos.

Saroj et al. (2023) avaliaram o genoma da cepa *B. clausii* 088AE, foram identificados genes de resistência a antimicrobianos, como: resistência a beta-lactamase, resistência à vancomicina, à eritromicina, contudo, não foi identificado nenhum elemento móvel. Além disso, foram identificados genes para tolerância a ácidos e sais biliares, adesão e resistência ao estresse ambiental.

3.5 Imunomodulação e probióticos

Quando se fala de imunomodulação e probióticos, é indispensável mencionar o sistema intestinal e a microbiota que o compõe, sendo assim, a ação do sistema imunológico intestinal deve ser equilibrada para manter a homeostase (Wong-Chen et al., 2021). A microbiota é o conjunto de microrganismos comensais, residentes no organismo, que auxiliam no funcionamento dos órgãos e sistemas. O papel que a microbiota desempenha na manutenção da saúde é amplamente aceito, principalmente no sistema gastrointestinal, onde é fundamental para imunidade, desenvolvimento e conversão de nutrientes (Piccioni et al., 2021).

Cepas bacterianas específicas podem atuar no ambiente luminal do intestino, na barreira da mucosa intestinal e podem regular o sistema imunológico da mucosa. Os probióticos podem afetar diferentes células envolvidas na imunidade inata e adquirida, como, monócitos, células Natural Killer (NK), macrófagos, linfócitos e células epiteliais. Em particular, eles podem ativar os receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) expressos em células imunes e não imunes. Entre os RPPS, os TLR são os mais estudados, eles agem principalmente para iniciar uma resposta imune, e a inflamação é uma atividade de resposta, induzindo a expressão de genes necessários para a inflamação (Rohith et al., 2023).

Os macrófagos no intestino desempenham um papel fundamental no aumento da inflamação após uma infecção ou na diminuição da inflamação (Lee et al., 2019). No estudo de Pradhan et al. (2016) células vegetativas de *B. clausii* MTCC-8326 induziram uma resposta inflamatória em células de macrófagos murinos RAW 264.7.

7. CONCLUSÃO

Com o presente estudo, foi possível a identificação do isolado *B. altitudinis* 1.4, o qual apresentou características vantajosas tanto para a área ambiental, como na área de probióticos/paraprobióticos.

O isolado demonstrou ser capaz de se aderir a células Caco-2, sugerindo capacidade de adesão ao tecido do TGI e potencial colonização do mesmo, bem como, a capacidade de autoagregação e também de se coagregar com microrganismos patogênicos, impedindo a ligação dos mesmos ao tecido do hospedeiro.

Outra importante característica observada em *B. altitudinis* 1.4 é a sua capacidade em tolerar as condições adversas do TGI, característica essencial para microrganismos probióticos. Também foi possível observar que tanto as células vegetativas viáveis e inativadas, e os esporos viáveis e inativados de *B. altitudinis* 1.4 apresentaram capacidade imunomoduladora.

Na área ambiental, *B. altitudinis* 1.4 foi capaz de coexistir com o isolado *B. japonicum* CT 00345, esta aplicação poderia ser vantajosa para o cultivo de soja, sendo de grande importância econômica para o Brasil, uma vez que é considerado o maior produtor mundial de soja.

8. REFERÊNCIAS

- Ahire JJ, Kashikar MS, Madempudi RS. (2021). Comparative accounts of probiotic properties of spore and vegetative cells of *Bacillus clausii* UBBC07 and in silico analysis of probiotic function. *3 Biotech.* 11(3):116. doi: 10.1007/s13205-021-02668-0.
- Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Sachan S, Karthik K, Dhama K. 2018. The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 10611–10618. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1687-x>
- Alagöz D, Yildirim D, Güvenmez HK, Sihay D, Tükel SS. (2016). Covalent Immobilization and Characterization of a Novel Pullulanase from *Fontibacillus* sp. Strain DSHK 107 onto Florisil® and Nano-silica for Pullulan Hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 179:1262–1274. doi: 10.1007/s12010-016-2063-2.
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO (2017) Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front. Microbiol.* 8:971. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971
- Alp D, Hakan K. (2019) "Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35: 1-9.
- Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski, T, Pinheiro FG, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356, 245–264. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1079-1>
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al (2008) The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology. *BMC. Genomics* 9, 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Bach E, Rangel CP, Ribeiro IDA, et al (2022) Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. *Mol Genet Genomics* 297: 1063–1079. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01907-0>
- Balakrishna A. (2013). In vitro evaluation of adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic strains isolated from guppy (*Poecilia reticulata*). *Biological and Applied Sciences. Braz. Arch. Biol. Technol.* 56 (5). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000500010>
- Bankevich A, Nurk D, Antipov AA, Gurevich M, Dvorkin AS, Kulikov VM, Lesin SI, Nikolenko S, Pham AD, Prjibelski AS (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing, *J. Comput. Biol.* 19 (2012) 455–477
- Batista JEC, Ralph MT, Vaz RV, Souza RV, Silva PFC, Nascimento AB, Souza DCO, Ramos LT, Mastroeni P, Lima Filho JV. (2017). Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, proinflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Phytomedicine.* 25. p. 52–60.

- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol.* 35(4 (suppl)):1044-51. doi: 10.1590/s1415-47572012000600020
- Berini F, Katz C, Gruzdev N, Casartelli M, Tettamanti G, Marinelli F. 2018. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances* 36: 818–838
- Bernardeau M, Lehtinen MJ, Forssten SD, Nurminen P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of Food Science and Technology.* 54(8). p. 2570–2584.
- Bessai S. A., Bensidhoum L., Nabti E. H. (2022). Optimization of IAA production by telluric bacteria isolated from northern Algeria. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 41:102319. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102319
- Bezkorovainy A (2001) Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 73(2 Suppl):399S–405S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.399s>
- Bhattacharyya C, Bakshi U, Mallick I et al (2017) Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhatai* strain AB211. *Front Microbiol* 8:411
- Bilal M, Achard C, Barbe F, Chevaux E, Ronholm J, Zhao X. 2021. *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* Promote Early Maturation of Cecal Microbiota in Broiler Chickens. *Microorganisms.*9(9):1899
- Bin-Jumah M, Abd El-Hack ME, Abdelnour SA, Hendy YA, Ghanem HA, Alsafy SA, Khafaga AF, Noreldin AE, Shaheen H, Samak D, Momenah MA, Allam AA, AlKahtane AA, Alkahtani S, Abdel-Daim MM, Aleya L. 2020. Potential use of chromium to combat thermal stress in animals: A review. *Science of the Total Environment,* 707, 135996. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135996.
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY., et al (2019) AntiSMASH 5.0: Updates to the Secondary Metabolite Genome Mining Pipeline. *Nucleic Acids Res.* 47, W81–W87. doi:10.1093/nar/gkz310
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Douglas RC. (2003). Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *American Society for Microbiology.* 69(12):7336-7342
- Brenden R, Janda JM. (1987). Detection, quantitation and stability of the p haemolysin of *Aeromonas* spp. *Journal of Medical Microbiology.* 24: 247-251
- Breyer GM, Arechavaleta NN, Siqueira FM, de Souza da Motta A. (2021). Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics Antimicrob Proteins.*13(2):468-483. doi: 10.1007/s12602-020-09700-4. PMID: 32829420.
- Brutscher LM, Borgmeier C, Garvey SM, Spears JL. (2022). Preclinical Safety Assessment of *Bacillus subtilis* BS50 for Probiotic and Food Applications. *Microorganisms.* 17;10(5):1038. doi:10.3390/microorganisms10051038. PMID: 35630480; PMCID: PMC9144164
- Budiharjo A, Jeong H, Wulandari D, Lee S, Ryu CM. 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*

Announc. 30;5(48):e01388- 17. doi: 10.1128/genomeA.01388-17

Bukharin OV, Perunova NB, Andryuschenko SV, Ivanova EV, Bondarenko TA, Chainikova IN. 2019. Genome Sequence Announcement of *Bacillus paranthracis* Strain ICIS279, Isolated from Human Intestine. MicrobiolResour Announc. 2019;8(44):e00662- 19.

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes Database (CAZy): an Expert Resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res. 37, D233–D238. doi:10.1093/nar/gkn663

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME J. 6: 1621–1624. doi.org/10.1038/ismej.2012.8

Cavalini L, Jankoski PR, Correa APF, Brandelli A & Motta AS. (2021). Characterization of the antimicrobial activity produced by *Bacillus* sp. isolated from wetland sediment. Anais da Academia Brasileira de Ciências [online]. 93, 4

Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R. (2021). Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. Front Immunol.26;12:578386.

Elmansy EA, ElkadyEM, Asker MS, Abdou AM, Abdallah NA, Amer SK. (2022). Exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RO30 isolated from Romi cheese: characterization, antioxidant and burn healing activity. World J MicrobiolBiotechnol. 26;38(12):245. doi: 10.1007/s11274-022-03439-6.

Chaucheyras-Durand F., Durand H. (2016). Probiotics in Animal Nutrition and Health. Benef. Microbes. 1:3–9. doi: 10.3920/BM2008.1002.

Chen L, Shi H, Heng J, Wang D, Bian K. (2019). Antimicrobial, plant growthpromoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. Microbiol. Res. 218, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.002>.

Chlebicz A, Slizewska K. 2020. In vitro Detoxification of aflatoxin B1, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 12(1), 289–301

Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst EvolMicrobiol. 68(1):461-466.

Čimo J., Šinka K., Tárnik A., Aydin E., Kišš V., Toková L. (2020). Impact of climate change on vegetation period of basic species of vegetables in Slovakia. J. Water Land Dev. 47, 38–46. doi: 10.24425/jwld.2020.135030

Coil D, Jospin G, Darling, AE (2014) A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data, Bioinformatics. 31 587–58

Comba NG, Ramírez HML, López KL, Montoya CD. 2018. Production of enzymes and siderophores by epiphytic bacteria isolated from the marine macroalga *Ulva lactuca*. AquatBiol 27:107-118

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectiva para a agropecuária safra 2019/2020. Brasília: Conab, 2020. Disponível em:

<https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria>.

Connelly MB, Young GM, Sloma A. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 186(13):4159-4167

Cortese IJ, Castrillo ML, Onetto AL, Bich GÁ, Zapata PD, Laczeski ME. 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.* 11;16(3):e0248274.

Costa LC, Tavanti RFR, Ravanti TR, Pereira CS (2019) Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*. *Pesquisas Agrárias e Ambientais.* 2: 126-132

Cui Y, Wang S, Ding S, Shen J, Zhu K. (2020). Toxins and mobile Antimicrobial Resistance Genes in *Bacillus* Probiotics Constitute a Potential Risk for One Health. *J. Hazard. Mater.* 382, 121266. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121266

Cuong P. V., Hoa N. P. (2021). Optimization of culture condition for iaaroduction by *Bacillus* sp. isolated from cassava field of Vietnam. *Vietnam. J. Sci. Technol.* 59, 312–323. doi: 10.15625/2525-2518/59/3/15600

Dabiré Y, Somda NS, Somda MK, Compaoré CB, Mogmenga I, Ezeogu LI, Traoré AS, Ugwuanyi JO, Dicko MH. (2022). Assessment of probiotic and technological properties of *Bacillus* spp. isolated from *Burkinabe Soumbala*. *BMC Microbiol.* 29;22(1):228. doi: 10.1186/s12866-022-02642-7.

Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol* 31(6):438–442

Diale MO, Kayitesi E, Serepa-Dlamini. (2018). Genome In Silico and In Vitro Analysis of the Probiotic Properties of a Bacterial Endophyte, *Bacillus paranthracis* Strain MHSD3. *Front. Genet.* 12.

Dobrzyński J, Jakubowska Z, Dybek B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Front Microbiol.* 21;13:1069053. doi: 10.3389/fmicb.2022.1069053.

Domingos DF, de Faria AF, de Souza Galaverna R. et al (2015) Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 3155–3167

Do Rosario FAP, Lamb AP, Spence T, Stephens R, Lang A, Roers A, Muller W, Ogarrá A, Langhorne J. (2012). IL-27 Promotes IL-10 Production by Effector Th1 CD4 + T Cells: A Critical Mechanism for Protection from Severe Immunopathology during Malaria Infection . *The Journal of Immunology.* 188(3). p. 1178–1190.

Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology,* 70 (4) 2161-2171, 10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004

Duc LH, Hong HA, Cutting SM. (2003). Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery Vaccine, 21 (27) 4215-4224, 10.1016/S0264-410X(03)00492-4

Dunlap C. (2019). Phylogeny and Taxonomy of Agriculturally Important *Bacillus* Species. In: *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*, p.143–150

Elgeddawy SA, Shaheen HM, El-Sayed YS, Abd Elaziz M, Darwish

A, Samak D, Batiha GE, Mady RA, Bin-Jumah M, Allam AA, Alagawany M, Taha AE, El-Mleeh A, El-Sayed AS, Abd El-Hack, ME, Elnesr SS. (2020). Effects of the dietary inclusion of a probiotic or prebiotic on florfenicol pharmacokinetic profile in broiler chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(2), 549–557. <https://doi.org/10.1111/jpn.13317>

Emre IE, Eroglu Y, Kara A, Dinleyici EC, Ozen M. (2020). The effect of probiotics on prevention of upper respiratory tract infections in the paediatric community-A systematic review. *Benef. Microbes*. 11, 201–211

Esakkiraj P, Usha R, Palavesam A, Immanuel G. (2012). Solid-state production of esterase using fish processing wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU. *Food Bioprod Process* 90:370–376.

Eucast - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. valid from 2021. Disponível em: <http://www.eucast.org>

Fan B, Wang C, Song X, Ding X, Wu L, Wu H, Gao X e Borriss R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 em 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frente. Microbiol.* 9:2491. doi: 10.3389/fmicb.2018.02491

Farag MR, Alagawany M. (2019). The role of *Astragalus membranaceus* as immunomodulator in poultry. *World's Poultry Science Journal*. 75, 43-54.

Flores EM, Nguyen AT, Odem MA, Eisenhoffer GT, Krachler AM, Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1490.

Fong FLY, Shah NP, Kirjavainen P, El-Nezami H, (2015). Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. *Int. Rev. Immunol.* 25, 1–11. <http://dx.doi.org/10.3109/08830185.2015.1096937>

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2002. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.** Geneva, Switzerland: World Health Organization. https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology.*, 42: 872-874

Freitas-Silva J, de Oliveira BFR, Vigoder FM, Muricy G, Dobson ADW, LaportMS. (2021). Peeling the Layers Away: The Genomic Characterization of *Bacillus pumilus* 64-1, an Isolate With Antimicrobial Activity From the Marine Sponge *Plakinacyanorosea* (Porifera, Homoscleromorpha). *Front Microbiol.* 8;11:592735. doi: 10.3389/fmicb.2020.592735.

Garcia-Gutierrez E, Mayer MJ, Cotter PD, Nrabad A. (2019). Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes*. 10(1): 1-21

Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. (2010). Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell*. 140(6). p. 859–870.

Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. (2016). Probiotics *HistorJ. Clin. Gastroenterol.*, 50. 3.aspx

- Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*:1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glickmann E, Dessaux Y. (1995) A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* ;61:793–6.
- Grilc NK, Zidar A, Kocbek P, Rijavec T, Colja T, Lapanje A, Jeras M, Gobec M, Mlinarič-Raščan I, Gašperlin M, Kristl J, Zupančič Š. (2023). Nanofibers with genotyped *Bacillus* strains exhibiting antibacterial and immunomodulatory activity. *J Control Release.* 355:371-384. doi: 10.1016/j.jconrel.2023.01.082
- Goswami D., Thakker J. N., Dhandhukia P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food Agric.* 2:1127500 10.1080/23311932.2015.1127500
- 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
- Guan C, Chen X, Jiang X, Zhao R, Yuan Y, Chen D. et al. (2020). In Vitro studies of Adhesion Properties of Six Lactic Acid Bacteria Isolated from the Longevous Population of China. *RSC Adv.* 10, 24234–24240. doi:10.1039/d0ra03517c
- Guo P, Yang F, Ye S, Li J, Shen F, Ding Y. (2022). Characterization of lipopeptide produced by *Bacillus altitudinis* Q7 and inhibitory effect on *Alternaria alternata*. *J Basic Microbiol.* 63(1):26-38. doi: 10.1002/jobm.202200530.
- Gupta AK, Maity C. (2021). Efficacy and safety of *Bacillus coagulans* LBSC in irritable bowel syndrome: A prospective, interventional, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study [CONSORT Compliant]. *Medicine (Baltimore).* 22;100(3):e23641.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 29(8):1072-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Habil N, Al-Murrani W, Beal J, Foey AD. (2011). Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. *Benefic. Microbes* 2, 283–293. <http://dx.doi.org/10.3920/BM2011.0027>.
- Hasan N, Khan IU, Farzand A, Heng Z, Moosa A, Saleem M, Canming T. (2022). *Bacillus altitudinis* HNH7 and *Bacillus velezensis* HNH9 promote plant growth through upregulation of growth-promoting genes in upland cotton, *Journal of Applied Microbiology.* 132-(5)3812–3824, <https://doi.org/10.1111/jam.15511>
- Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients.* 2013 May 29;5(6):1869-912. doi:10.3390/nu5061869.
- Harirchi S, Sar T, Ramezani M, Aliyu H, Etemadifar Z, Nojoumi SA, Yazdian F, Awasthi MK, Taherzadeh MJ. Bacillales: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms.* 28;10(12):2355. doi: 10.3390/microorganisms10122355.
- Harwood C.R., Mouillon J.-M., Pohl S., Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus*

- subtilis* group. FEMS Microbiol. Rev. 2018;42:721–738. doi: 10.1093/femsre/fuy028.
- Hashem A, Tabassum B, Fathi Abd Allah E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi J Biol Sci.26(6):1291-1297. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.05.004.
- He Y, Jinno C, Kim K, et al. (2020). Dietary *Bacillus* spp. enhanced growth and disease resistance of weaned pigs by modulating intestinal microbiota and systemic immunity. J Anim Sci Biotechnol.11:101
- Hoang DT, Chernomor O, Von Haeseler A et al (2018) UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. Mol Biol Evol 35:518–522
- Huang JM, La Ragione RM, Cooley WA, Todryk S, Cutting SM. Cytoplasmic delivery of antigens, by *Bacillus subtilis* enhances Th1 responses. Vaccine. 2008;26:6043–6052. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.024
- Iraporda C, Rubel IA, Manrique GD, Abraham AG. (2019). Influence in inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. LWT-Food Sci Technol 101:738–746
- Jankoski PR, Correa APF, Brandelli A & Motta AS. (2021). Biological activity of bacteria isolated from wetland sediments collected from a conservation unit in the southern region of Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências [online]. 93, 3
- Jayakumar A, Nair IC, Radhakrishnan EK. (2021). Environmental adaptations of an extremely plant beneficial *Bacillus subtilis* Dcl1 identified through the genomic and metabolomic analysis. Microb. Ecol. 81 (3), 687–702
- Jeon HL, Lee NK, Yang SJ. et al. (2017). Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. Food Sci Biotechnol 26, 1641–1648
- Jeong DY, Jeong SY, Zhang T, Wu X, Qiu JY, Park S. (2020). Chungkookjang, a soy food, fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* protects gerbils against ischemic stroke injury, and post-stroke hyperglycemia. Food Res Int. 128:108769. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108769.
- Jeżewska-Frąckowiak J, Żebrowska J, Czajkowska E, Jasińska J, Pęksa M, Jędrzejczak G, Skowron PM. (2019). Identification of bacterial species in probiotic consortiums in selected commercial cleaning preparations. Acta Biochim Pol. 17;66(2):215-222.
- Ji J, Hu SL, Cui ZW, Li WF. (2013). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* mediate M1 macrophage polarization in mouse bone marrow-derived macrophages. Archives of microbiology. 195(5): 349-356. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-013-0877-7>
- Jia FF, Zheng, HQ, Sun SR, Pang XH, Liang Y, Shang JC, Zhu ZT, Meng XC (2018). Role of luxS in stress tolerance and adhesion ability in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. Biomed Res Int 4506829. <https://doi.org/10.1155/2018/4506829>
- Jiang C-H, Liao M-J, Wang H-K, Zheng M-Z, Xu J-J, Guo J-H. (2018). *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*, Biological Control. 126: 147-157
- Jin Y, Zhu H, Luo S. et al. (2019). Role of Maize Root Exudates in Promotion of Colonization of *Bacillus velezensis* Strain S3-1 in Rhizosphere Soil and Root Tissue. Curr Microbiol 76, 855–862
- Kamilya D, Baruah A, Sangma T, Chowdhury S, Pal P. (2015). Inactivated

- Probiotic Bacteria Stimulate Cellular Immune Responses of Catla, *Catla catla* (Hamilton) In Vitro. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 7(2):101-6
- Kang S-M, Khan AL, Waqas M, Asaf S, Lee KE, Park YG, Kim AY, Khan MA, You YH, Lee IJ (2019) Integrated phytohormone production by the plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. *J. Plant Interact*. 14, 416–423
- Kaushal M., Kumar A., Kaushal R. (2017). *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. *3 Biotech* 7, 90–99. doi: 10.1007/s13205-017-0732-7
- Khabbaz SE, Ladhalakshmi D, Babu M, Kandan A, Ramamoorthy V, Saravanakumar D, Al-Mughrabi T, Kandasamy S. (2019). Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)—A Versatile Tool for Plant Health Management *Can. J. Pestic. Pest Manag.* 1(1), 1–25; 10.34195/can.j.ppm.2019.05.001
- Khalil ES, Manap MY, Mustafa S, Amid M, Alhelli AM, Aljoubori A. (2018). Probiotic Characteristics of Exopolysaccharides-producing *Lactobacillus* isolated from Some Traditional Malaysian Fermented Foods. *CyTA - J. Food* 16, 287–298. doi:10.1080/19476337.2017.1401007
- Khan A., Singh P., Srivastava A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: a review. *Microbiol. Res.* 212–213 103–111. 10.1016/j.micres.2017.10.012
- Khan M, Ijaz M, Chotana GA, Murtaza G, Malik A, Shamim S (2021). *Bacillus altitudinis* MT422188: a potential agent for zinc bioremediation. *Bioremediation Journal*. DOI: 10.1080/10889868.2021.1927973
- Khan SI, Zarin A, Ahmed S, Hasan F, Belduz AO Çanakçı S, Khan S, Badshah M, Farman M, Shah AA. (2022). Degradation of lignin by *Bacillus altitudinis* SL7 isolated from pulp and paper mill effluent. *Water Sci Technol.* 85(1):420-432. doi: 10.2166/wst.2021.610.
- Khokhlova E, Colom J, Simon A, Mazhar S, García-Lainez G, Llopis S, Gonzalez N, Enrique-López M, Álvarez B, Martorell P, Tortajada M, Deaton J, Rea K. 2023. Immunomodulatory and Antioxidant Properties of a Novel Potential Probiotic *Bacillus clausii* CSI08. *Microorganisms*.11(2):240. doi: 10.3390/microorganisms11020240
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases Relevance Beyond Efficacy. *10: 1– 19.*
- Kosugi S, Hirakawa H, Tabata S (2015) GMcloser: closing gaps in assemblies accurately with a likelihood-based selection of contig or long-read alignments. *Bioinformatics*, 31(23): 3733-3741
- Krausova G, Hysrlova I, Hynstova I. (2019). In Vitro evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. *Fermentation* 5, 100. doi:10.3390/fermentation5040100
- Kudoyarova GR, Melentiev AI, Martynenko EV, Timergalina LN, Arkhipova TN, Shendel GV, et al. (2014). Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant Physiol. Biochem.* 83, 285–291. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.08.015
- Kuebutornye FKA, Abarike ED. Lu Y. (2019). Fish and Shellfish Immunology A

review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 87: 820–828

Kumaravel S, Thankappan S, Raghupathi S, Uthandi S. (2018). Draft Genome Sequence of Plant Growth-Promoting and Drought-Tolerant *Bacillus altitudinis* FD48, Isolated from Rice Phylloplane. *Genome Announc.* 6(9):e00019-18. doi:10.1128/genomeA.00019-18

Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30:3276–3278

Lee S, Lee J, Jin YI, Jeong JC, Chang YH, Lee Y, Jeong Y, Kim M. (2017) Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT - Food Sci Technol* 79:518–524. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.040>

Lee NK, Kim WS, Paik HD. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci Biotechnol.* 28(5):1297–1305. doi: 10.1007/s10068-019-00691-9.

Lee SY, Kang B, Bok SH, Cho SS, Park DH. (2019). Macmoondongtang modulates Th1-/Th2-related cytokines and alleviates asthma in a murine model. *PLoS ONE.* 14(12). p. E0224517.

Lei J, Ran X, Guo M. et al. 2023. Screening, Identification, and Probiotic Properties of *Bacillus pumilus* From Yak. *Probiotics&Antimicro. Prot.* <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10054-w>

Lipková N, Cinkocki R, Maková J, Medo J, Javoreková S. (2021). Characterization of endophytic bacteria of the genus *Bacillus* and their influence on the growth of maize (*Zea mays*) in vivo. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 10:e3602. doi: 10.15414/jmbfs.3602

Lisboa MP, Bonatto D, Bizani D, Henriques JA, Brandelli A. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic Forest. *Int Microbiol.* 9(2):111-8

Liu B, Liu GH, Wang XY, Wang JP, Chen Z, Chen MC, et al. (2019). *Bacillus urbisdiaboli* sp. Nov., isolated from soil sampled in xinjiang. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69: 1591–1596

Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. (2019). VFDB 2019: a Comparative Pathogenomic Platform with an Interactive Web Interface. *NucleicAcids Res.* 47, D687–D692. doi:10.1093/nar/gky1080

Lv J, Da R, Cheng Y, Tuo X, Wei J, Jiang K, et al. (2020). Mechanism of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 lipopeptide toward anaerobic *Clostridium difficile*. *Biomed. Res. Int.* 1–12. doi: 10.1155/2020/3104613

Maharana R, Dhal NK. (2022). Solubilization of rock phosphate by phosphate solubilizing bacteria isolated from effluent treatment plant sludge of a fertilizer plant. *Folia Microbiol* 67, 605–615. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00953-w>

Maldonado Galdeano C, Cazorla S, I, Lemme Dumit J, M, Vélez E, Perdigón G (2019). Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Ann NutrMetab.* 74:115-124. doi: 10.1159/000496426

Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. (2015). Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum* 3. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0017- 2013.

Manhar AK, Saikia D, Bashir Y, Mech RK, Nath D, Konwar BK, Mandal M. 2015. In vitro evaluation of cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* AMS1 isolated from

traditional fermented soybean (Churpi) as an animal probiotic. *Res Vet Sci.* 99:149-56. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.01.008

Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I, Gootz TD. (2007). Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58: 54-59 – 65

M6attã J, Sissala , Dimova EY, Serpi ., Moore LG, Koivunen P. (2018). Hypoxia causes reductions in birth weight by altering maternal glucose and lipid metabolism. *Scientific Reports.* 8(1). p. 1–10. Available at: www.nature.com/scientificreports/ [Accessed July 1, 2021].

Mayr-Harting A, Hedjes AJ, Berkeley CW. (1972). Methods for studying bacteriocins. In: Norris JB, Ribbons D (eds) *Methods in microbiology*, 7: 315–412

Miljaković, D. et al. (2020). The significance of *Bacillus* spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, v.8, n.7, p. 1-19, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>

Milles AA, Mirsa SS, Irwin JO. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond).* 38(6): 732-49

Mirskaya GV, Khomyakov YV, Rushina NA, Verteby VE, Chizhevskaya EP, Chebotar VK, et al.. (2022). Plant development of early-maturing spring wheat (*Triticum aestivum* L.) under inoculation with *Bacillus* sp. V2026. *Plan. Theory* 11:1817. doi: 10.3390/plants11141817,

Mohamed LA, El-Hindawy MM, Alagawany M, Salah AS, ElSayed SA. (2019). Effect of low- or high-CP diet with cold-pressed oil supplementation on growth, immunity and antioxidant indices of growing quail. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(5), 1380–1387. <https://doi.org/10.1111/jpn.13121>

Mörkl S, Butler MI, Holl A, Cryan JF, Dinan TG. (2020). Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Focus on Psychiatry. *Curr Nutr Rep.* (3):171-182. doi: 10.1007/s13668-020-00313-5.

Motta AS, Brandelli A. (2002). Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology.* 92:63-71

Moura TM, et al. (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: 617-621.

Mukherjee A, Dutta D, Banerjee S, Ringo E, BreinesEM, Hareide E, Chandra G, Ghosh K. (2016). Potential probiotics from Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. Characterization, pathogen inhibitory activity, partial characterization of bacteriocin and production of exoenzymes. *Research in Veterinary Science.* 108: 76-84

Myhill LJ, Stolzenbach S, Mejer H, Krych L, Jakobsen SR, Kot W, Skovgaard K, Canibe N, Nejsum P, Nielsen DS, Thamsborg SM, Williams AR. (2021). Parasite-Probiotic Interactions in the Gut: *Bacillus* sp. and *Enterococcus faecium* Regulate Type-2 Inflammatory Responses and Modify the Gut Microbiota of Pigs During Helminth Infection. *Front Immunol.* 12:793260. doi: 10.3389/fimmu.2021.793260.

Nautiyal CS. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS MicrobiolLett* 170:265–270. doi:

10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x

Navarro-Lopez V, Martinez-Andres A, Ramirez-Bosca A, Ruzafa-Costas B, Nunez-Delegido E, Carrion-Gutierrez MA, Prieto-Merino D, Codoner-Cortes F, Ramon-Vidal D, Genoves-Martinez S. et al. (2019). Efficacy and Safety of Oral Administration of a Mixture of Probiotic Strains in Patients with Psoriasis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Acta Derm. Venereol.* 99, 1078–1084

Ngalimat M, Yahaya R, Baharudin M, Yaminudin S, Karim M, Ahmad S, Sabri S. (2021). A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms.* 9:614. doi: 10.3390/microorganisms9030614.

Nguyen L-T, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 32:268–274

Ntushelo K, Ledwaba LK, Rauwane ME, Adebo OA, Njobeh PB. (2019). The Mode of Action of *Bacillus* Species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation, and Future Prospects. *Toxins (Basel).* 11(10):606. doi: 10.3390/toxins11100606.

Ohair JA, Li H, Thapa S, Scholz M, Zhou S. (2017). Draft genome sequence of *Bacillus altitudinis* YNP4-TSU, isolated from Yellowstone National Park. *Genome Announc* 5:e00631-17.

Pan M, Kumaree KK, Shah NP. (2017). Physiological Changes of Surface Membrane in *Lactobacillus* with Prebiotics. *J. Food Sci.* 82, 744–750. doi:10.1111/1750-3841.13608

Papadimitriou K, Zoumpopoulou G, Foligne B, Alexandraki V, Kazou M, Pot B, Tsakalidou E (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Front Microbiol* 6:58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>

Paparo L, Tripodi L, Bruno C, Pisapia L, Damiano C, Pastore L, BerniCanani R. (2020). Protective action of *Bacillus clausii* probiotic strains in an in vitro model of Rotavirus infection. *Sci Rep.* 10(1):12636. doi: 10.1038/s41598-020-69533-7.

Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25(7):1043-55. doi: 10.1101/gr.186072.114

PeluzioMdCG, de Moura e Dias M, Martinez J, Milagro FI. (2021). Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. *Front. Nutr.* 2021;8:638740. doi: 10.3389/fnut.2021.638740.

Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics [published correction appears in *Adv Nutr.* 2020 Jul 1;11(4):1054]. *Adv Nutr.* 2019;10(suppl_1):S49-S66. doi:10.1093/advances/nmy063

Pradhan B, Guba D, Ray P, Das D, Aich P. (2016). Comparative Analysis of the Effects of Two Probiotic Bacterial Strains on Metabolism and Innate Immunity in the RAW 264.7 Murine Macrophage Cell Line. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 8: 73-84

Pradhan D, Mallappa RH, Grover S. (2020). Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control.* 108:106872.

Prakamhang J, Tittabutr P, Boonkered N, Teamtisong K, Uchiumi T, Abe M,

- Teaumroong N (2015) Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. *Applied Soil Ecology* 85: 38-49
- Pranaw K, Pidlisnyuk V, Trögl J, Malinská H. (2020). Bioprospecting of a Novel Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus altitudinis* KP-14 for Enhancing *Miscanthus × giganteus* Growth in Metals Contaminated Soil. *Biology (Basel)*. 9(9):305. doi:10.3390/biology9090305
- Qurashi AW, Sabri AN. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz J Microbiol*. 43(3):1183-91. doi: 10.1590/S1517-838220120003000046. Epub 2012 Jun 1. PMID: 24031943;
- Radhakrishnan R, Lee IJ. (2016). Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiol. Biochem*. 2016;109:181–189. doi: 10.1016/j.plaphy.09.018.
- Rajan L, Chakraborty K, Chakraborty RD. (2021). Pharmacological properties of some mangrove sediment-associated *Bacillus* isolates. *Arch Microbiol* 203, 67–76. doi.org/10.1007/s00203-020-01999-5
- Rajavel M, Mitra A, Gopal B. (2009) Role of *Bacillus subtilis* BacB in the Synthesis of Bacilysin. *The Journal of Biological Chemistry*. 284: 46; 31882- 31892
- Rajput IR, Li WF, Li YL, Jian L, Wang M.Q. (2013). Application of probiotic (*Bacillus subtilis*) to enhance immunity, antioxidation, digestive enzymes activity and hematological profile of Shaoxing duck. *Pak. Vet. J*.33(1):69–72.
- Ratz RJ, Palácio SM, Espinoza-Quinones FR, Vicentino RC, Michelim HJ, Richter LM (2017). Potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de milho e soja. *Engevista*.19(4): 890-905
- Ribeiro IDA, Bach E, Moreira FS, Müller AR, Rangel, CP, Wilhelm CM, Barth AL, Passaglia LMP. (2021). Antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities of *Bacillus* isolates from canola (*Brassic napus L.*) roots *Microbiological Research*. 248. 126754, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126754>
- Ribeiro IDA, Volpiano CG, Vargas LK, Granada CE, Lisboa BB e Passaglia LMP (2020) Use of Mineral Weathering Bacteria to Enhance Nutrient Availability in Crops: A Review. *Front. Plant Sci*11:590774. doi: 10.3389/fpls.2020.590774
- Rishad KS, Rebello S, Shabanamol PS, Jisha MS. 2017. Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 137: 36– 41
- Rodrigues NPA, Garcia EF, de Souza EL. (2021) Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Braz J Microbiol*. 52(4):2257-2269. doi: 10.1007/s42770-021-00543-x
- Rohith HS, Halami PM. (2021). In vitro validation studies for adhesion factor and adhesion efficiency of probiotic *Bacillus licheniformis* MCC 2514 and *Bifidobacterium breve* NCIM 5671 on HT-29 cell lines. *Arch Microbiol* 203, 2989– 2998. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02257-y>

Rungsirivanich P, Parlindungan E, O'Connor PM, Field D, Mahony J, Thongwai N, van Sinderen D (2021) Simultaneous Production of Multiple Antimicrobial Compounds by *Bacillus velezensis* ML122-2 Isolated From Assam Tea Leaf [Camellia sinensis var. assamica (J.W.Mast.) Kitam.]. Front. Microbiol. 12:789362. doi: 10.3389/fmicb.2021.789362

Sabaté DC, Audisio MC. (2013). Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. Microbiol. Res. 168, 125–129. doi: 10.1016/j.micres.2012.11.004

Sabo SDS, Mendes MA, Araújo EDS et al. (2020). Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. Sci Rep 10, 7235

Saggese A, Culurciello R, Casillo A, Corsaro MM, Ricca E, Baccigalupi L. A (2018) Marine Isolate of *Bacillus pumilus* Secretes a Pumilacidin Active against *Staphylococcus aureus*. Mar Drugs. 24;16(6):180.

Sang-Mo K, Abdul LK, Muhammad W, Sajjad A, Ko-Eun L, Yeon-Gyeong P, Ah-Yeong K, Muhammad AK, Young-Hyun Y, In-Jung L. (2019) Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean, Journal of Plant Interactions, 14:1, 416-423

Sant'Anna FH, Bach E, Porto RZ, Guella F, Sant'Anna EH, Passaglia LMP (2019). Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy. Crit. Rev. Microbiol., 0:1-19, 10.1080/1040841X.2019.1569587

Sar T, Ozturk M, Stark BC, Akbas MY. 2022. Improvement in Desulfurization of Dibenzothiophene and Dibenzothiophene Sulfone by *Paenibacillus* Strains Using Immobilization or Nanoparticle Coating. J. Appl. Microbiol. 133:1040–1051. doi: 10.1111/jam.15637

Saroj DB, Gupta AK. (2020). Genome based safety assessment for *Bacillus coagulans* strain LBSC (DSM 17654) for probiotic application. Int J Food Microbiol. 2020 318:108523. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.108523.

Saxena AK, Kumar M, Chakdar H, Anuroopa N, Bagyaraj DJ. (2019). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. Journal of Applied Microbiology 128: 1583–1594.

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).

Shah Mahmud R, Ulyanova V, Malanin S, Dudkina E, Vershinina V, Ilinskaya O. (2015). Draft whole-genome sequence of *Bacillus altitudinis* strain B-388, a producer of extracellular RNase. Genome Announc 3(1):e01502-14. doi:10.1128/genomeA.01502-14

Shahid I, Han J, Hanoq S, Malik KA, Borchers CH, Mehnaz S. (2021). Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. Front. Sustain. Food. Syst. 5:605195. doi: 10.3389/fsufs.2021.605195

Shida, K, Nanno M, Nagata S. (2011). Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by

which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. *Gut Microbes* 2, 109–114

Shinde T, Vemuri R, Shastri MD et al. (2019). Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *J Funct Foods* 52:100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.031>

Shivaji S, Chaturvedi P, Suresh K, Reddy GS, Dutt CB, Wainwright M, Narlikar JV, Bhargava PM. (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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:1465–1473. doi:10.1099/ijs.0.64029-0.

Syrokou MK, Papadelli M, Ntaikou I, Paramithiotis S, Drosinos E.H. (2019). Sugary kefir: microbial identification and biotechnological properties. *Beverages*, 5(4), 61.

Skinnider MA, Merwin NJ, Johnston CW, Magarvey NA (2017) PRISM 3: expanded prediction of natural product Chemical structures from microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* 45: 49-54

Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., MacLellan, R. J., et al. (2020). Comprehensive Prediction of Secondary Metabolite Structure and Biological Activity from Microbial Genome Sequences. *Nat. Commun.* 11. doi:10.1038/s41467-020-19986-1

Spanhol DP (2017) **Potencial de bactérias para promoção do crescimento vegetal e produção de compostos relacionados ao sistema de defesa em plantas de soja.** Dissertação. Defesa Sanitária Vegetal. Universidade Federal de Viçosa

Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, [s.l.], v. 56, n. 4, p. 845-857.

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.* 38:428-432.

Subbanna ARNS, Chandrashekara C, Stanley J, Mishra KK, Mishra PK, Pattanayak A. (2019). Bio-e fficacy of chitinolytic *Bacillus thuringiensis* isolates native to northwestern Indian Himalayas and their synergistic toxicity with selected insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 158: 166– 174.

Sumi CD, Yang BW, Yeo I-C, Hahm YT. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Can. J. Microbiol.* 61:93–103. doi: 10.1139/cjm-2014-0613.

Sun GW, Qiu ZD, Wang WN, Sui X, Sui DJ (2016). Flavonoids Extraction from Propolis Attenuates Pathological Cardiac Hypertrophy through PI3K/AKT Signaling Pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2016.

Tanaka J, Sugimoto K Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K. Takei Y. (2010). Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *International Journal of Oncology*, 37(4), 805-814

Tavares MB, Souza RD, Luiz WB, Cavalcante RCM, Casaroli C, Martins EG, Ferreira RCC, Ferreira LCS. (2013). *Bacillus subtilis* endospores at

high purity and recovery yields: Optimization of growth conditions and purification method. *Current Microbiology*. 66(3). 279–285.

Thapa P, Thapa A, Khadka S, et al. 2021. Screening and characterization of potent poly glutamic acid producing *Bacillus* sp. isolated from Kinema, water and soil samples. *Heliyon*.7(8):e07715. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07715

Thite VS, Nerurkar AS, Baxi NN. (2021). Optimization of concurrent production of xylanolytic and pectinolytic enzymes by *Bacillus safensis* M35 and *Bacillus altitudinis* J208 using agro-industrial biomass through response surface methodology. *Sci. Rep.* 10:3824

Tille PM. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2014.

Todorov SD, Dicks LMT. (2008) Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Ann Microbiol* 58(4):661–670.

Vairagkar U, Mirza Y. (2021). Antagonistic Activity of Antimicrobial Metabolites Produced from Seaweed-Associated *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 10456 Against *Malassezia* spp. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, [s.l.], 2021

Van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J, Kuipers OP (2018) BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Res.* 46(W1):W278-W281.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 3(7). p. 1–12. <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T et al (2016) Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules* 21:573

Verma JP, Jaiswal DK, Krishna R, Prakash S, Yadav J, Singh V. (2018). Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh region of India. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–15

Wang Z, Zhu F. (2018). The expression profiles of immune genes in *Mus musculus* macrophages during *Staphylococcus aureus* infection. *PLoS ONE*. 13(1). p. E0190490.

Wang DC, Jiang CH, Zhang LN, Chen L, Zhang XY, Guo JH. (2019). Biofilms Positively Contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced Drought Tolerance in Tomato Plants. *International journal of molecular sciences*, 20(24)

Wang Y, Qian P-Y (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009;4: e7401. 10.1371/journal.pone.0007401

Wang Y, Zhang H, Zhang L, Liu W, Zhang Y, Zhang X, et al. (2010). In Vitro assessment of Probiotic Properties of *Bacillus* Isolated from Naturally Fermented Congee from Inner Mongolia of China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1369–1377. doi:10.1007/s11274-010-0309-7

Wieers G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, De Foy PJM, Dequenne I, de Timary P, Cani PD. 2019. How Probiotics Affect the Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 454

- Woodward AW, Bartel B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot.* 95(5):707-35. doi: 10.1093/aob/mci083.
- Wong-Chew RM, De Castro JÁ, Morelli L, Perez M, Ozen M. (2022). Gut immune homeostasis: the immunomodulatory role of *Bacillus clausii*, from basic to clinical evidence, *Expert Review of Clinical Immunology*, 18:7, 717-729.
- Xiang Y.-Z., Li X.-Y., Zheng H.-L., Chen J.-Y., Lin L.-B., Zhang Q.-L. (2021). Purification and antibacterial properties of a novel bacteriocin against *Escherichia coli* from *Bacillus subtilis* isolated from blueberry ferments. *LWT.*146:111456. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111456.
- Xie J, Shi H, Du Z et al. (2016). Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Sci Rep* 6:1–12
- Xu H, Jeong HS, Lee HY, Ahn J. (2009). Assessment of Cell Surface Properties and Adhesion Potential of Selected Probiotic Strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 434–442. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x
- Yahya G, Ebada A, Khalaf EM Mansour B, Nouh NA, Mosbah RA, Saber S, Moustafa M, Negm S, El-Sokkary MMA, El-Baz AM (2021) Soil-Associated *Bacillus* Species: A Reservoir of Bioactive Compounds with Potential Therapeutic Activity against Human Pathogens. *Microorganisms.* 24:9(6):1131.
- Yelin I, Flett KB, Merakou C, Mehrotra P, Stam J, Snesrud E, Hinkle M, Lesho E., McGann P., McAdam A.J., et al. (2019). Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. *Nat. Med.*25:1728–1732. doi: 10.1038/s41591-019-0626-9
- Yousten AA. (1984). *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv. Biotechnol. Process.* 3, 315–343
- Yue Z, Chen Y, Chen C, Ma K, Tian E, Wang Y, Liu H, Sun Z. (2020). Endophytic *Bacillus altitudinis* WR10 alleviates Cu toxicity in wheat by augmenting reactive oxygen species scavenging and phenylpropanoid biosynthesis. *J Hazard Mater.* 5;405:124272. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124272
- Zeng Q, Xie J, Li Y, Gao T, Zhang X, Wang Q. (2021). Comprehensive Genomic Analysis of the Endophytic *Bacillus altitudinis* Strain GLB197, a Potential Biocontrol Agent of Grape Downy Mildew. *Frontiers in Genetics* 12. DOI=10.3389/fgene.2021.729603
- Zhang, Wenqing, et al. (2020). "Directional design of a starter to assemble the initial microbial fermentation community of baijiu." *Food Research International* 134: 109255.
- Zhang D, Xu H, Gao J, Portieles R, Du L, Gao X, BorrotoNordelo C and Borrás-Hidalgo O. (2021). Endophytic *Bacillus altitudinis* Strain Uses Different Novelty Molecular Pathways to Enhance Plant Growth. *Front. Microbiol.* 12: 692313
- Zhang N, Yang D, Kendall JR, et al. (2016). Comparative genomic analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* reveals evolutionary traits for adaptation to plant associated habitats. *Front Microbiol* 7: 2039
- Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, et al. (2018). dbCAN2: a Meta Server for Automated Carbohydrate-Active Enzyme Annotation. *Nucleic Acids Res.* 46, W95–W101. doi:10.1093/nar/gky418

Zhu ML, Wang YH, Dai Y, Wu XQ, Ye JR (2020) Effects of Different Culture Conditions on the Biofilm Formation of *Bacillus pumilus* HR10. *CurrMicrobiol.* 77 (8): 1405-1