



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS CURITIBANOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E  
NATURAIS

Cíntia Faquin

**AVALIAÇÃO DE *Bacillus* para controle DE *Stromatinia cepivora* E *Setophoma terrestris* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ALHO CULTIVADO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

Curitibanos

2025

Cíntia Faquin

**Avaliação de *Bacillus* para controle de *Stromatinia cepivora* e *Setophoma terrestris* e promoção de crescimento de alho cultivado sob condições controladas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós - Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais (PPGEAN) do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina - Campus de Curitibanos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra  
Co-orientadora: Prof. Dra. Glória Regina Botelho

Linha de pesquisa: Manejo integrado de sistemas agrícolas e naturais.

Curitibanos

2025

Faquin, Cíntia

Avaliação de *Bacillus* para controle de *Stromatinia* cepivora e *Setophoma terrestris* e promoção de crescimento de alho cultivado sob condições controladas / Cíntia Faquin ; orientador, Miguel Pedro Guerra, coorientadora, Glória Regina Botelho, 2025.

125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2025.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. Controle Biológico. 3. Rizobactérias. 4. Propagação in vitro. I. Guerra, Miguel Pedro . II. Botelho, Glória Regina. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais. IV. Título.

Cíntia Faquin

**Avaliação de *Bacillus* para controle de *Stromatinia cepivora* e *Setophoma terrestris* e promoção de crescimento do alho cultivado sob condições controladas**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 17 de abril de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof., Dr.(a) Miguel Pedro Guerra  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Leocir José Welter  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra Marivaine da Silva Brasil Mansur Cardoso  
Universidade Federal do Pantanal Mato Grosso do Sul

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra  
Orientador(a)

Curitibanos/ 2025

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me concedeu força, sabedoria e saúde para concluir mais uma etapa.

A Família minha enorme gratidão, obrigada por serem meu alicerce, e nunca deixarem de me apoiar, principalmente meus pais, Cleuza e Vilmar, que sempre deram o melhor de si, para que eu pudesse chegar aqui.

As minhas irmãs, Cibele e Patrícia, por serem meu ponto de apoio e carinho, por escutar-me quando as coisas pareciam não estar bem. Aos meus sobrinhos, por serem minha alegria.

Ao meu namorado Bruno, por estar ao meu lado, me escutando e incentivando. Ao meu cunhado, por tornar momentos descontraídos deixando tudo mais leve.

Aos meus tios e primos (as), que abriram as portas de suas casas e me acolheram, me dando apoio durante essa caminhada.

Aos meus amigos, me ajudaram durante esse período e me mostraram que quando caminhamos com bons amigos, a vida se torna mais alegre e leve.

Ao meu orientador, Miguel Pedro Guerra, por todo conhecimento transmitido, paciência, e por ter aceitado caminhar nessa jornada comigo. A minha coorientadora Glória Regina Botelho, por aceitar essa jornada, seu conhecimento e incentivo foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Colegas do grupo LMPCP (Laboratório de Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas), pela troca de conhecimento, aprendizado e ajuda sempre que necessário. Aos docentes que contribuíram para minha formação.

Aos professores do PPGEAN, obrigada pelos ensinamentos, principalmente o Prof. Paulo e o Prof Cristian pelo suporte durante as análises desenvolvidas.

Aos técnicos e servidores, por terem feito parte da minha caminhada, sempre prestativos. A CAPES e ao CNPq pelo financiamento da minha bolsa de estudos e a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação.

Muito obrigada a todos.

## RESUMO EXPANDIDO

A cultura do alho (*Allium sativum* L.) tem grande importância econômica no Brasil e é fonte de emprego e geração de renda na região do planalto catarinense, principalmente por pequenos e médios produtores. Essa cultura sofre com diversos patógenos causadores de prejuízos. Dentre as suas principais doenças, a podridão branca causada por *Stromatinia cepivora* e podridão rosada (*Setophoma terrestris*) causam danos severos, podendo chegar a 100% de prejuízo. O controle químico é pouco eficiente para esses fitopatógenos e o controle biológico pode ser uma alternativa para o seu controle. Estudos evidenciam *Bacillus* spp. como agentes de biocontrole por apresentar mecanismos de inibição aos patógenos, além de apresentarem potencial de promover o crescimento de plantas por diferentes ações. Assim, objetivou-se avaliar isolados do gênero *Bacillus* no controle dos fungos fitopatogênicos *S. cepivora* e *S. terrestris*, além do seu potencial em estimular o crescimento de alho, gerando assim prática de manejo sustentáveis e a para otimização da cultura. No primeiro momento, utilizou-se 27 isolados de *Bacillus* spp. para testar o potencial em solubilizar fosfato de ferro e alumínio *in vitro*, adicionando-se cada isolado em pontos equidistantes da placa com meio específico. O mesmo procedimento foi realizado para o teste de produção de quitinase e celulase em que, a única fonte de carbono foi a quitina e o CMC (carboximetilcelulose), respectivamente. Após os testes, foram selecionados dois isolados (EB13 e EB18) para proceder às demais análises, referente a produção de antibióticos, especialmente do grupo das fenazinas, por meio de extrato celular e análise na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em seguida foram realizados testes de antibiose com *S. cepivora* e *S. terrestris*. Analisou-se a dinâmica de crescimento dos isolados selecionados, crescidos em meio LB (Luria Bertani) por 48h a 27 °C, em que se determinou o número de unidades formadoras de colônias (UFC) em diferentes intervalos de tempo. Para os experimentos de micropropagação, foram utilizadas como explantes, as gemas apicais dos bulbilhos de alho cv Chonan, que foram mantidas em 10 mL de meio líquido MS (Murashige & Skoog), sobre ponte de papel filtro. As culturas fúngicas foram mantidas em incubadora BOD com fotoperíodo de 12 horas a 19 °C (para *S. cepivora*) e 25 °C (para *S. terrestris*) e as bacterianas a 27 °C, sem fotoperíodo. Após 15 dias, efetuou-se a inoculação dos isolados bacterianos diluídos a  $10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup>. Após 15 dias da inoculação bacteriana foi adicionado um microescleródio de cada fungo patogênico separadamente. As avaliações foram realizadas aos 45 dias para os testes com *S. cepivora* e 42 dias para *S. terrestris*. Para o experimento em casa de vegetação, utilizou-se também a cv. Chonan e testou-se, apenas *S. cepivora*. O alho foi cultivado em vasos de 5 L, contendo solo da região de Curitiba/SC. As culturas fúngicas e bacterianas foram mantidas nas condições já descritas. O delineamento inteiramente casualizado continha seis tratamentos, sendo esses: testemunha, inoculação de EB13, inoculação de EB18, Inoculação somente do patógeno, EB13 + patógeno e EB18 + patógeno. Os vasos inoculados com *S. cepivora*, receberam 2044 microescleródios. Os bulbilhos de alho foram previamente vernalizados por 30 dias a 4 °C. Foram desinfestados e inoculados com os isolados bacterianos, de acordo com o tratamento. Aos 30, 60 e 90 DAS, avaliou-se as alturas das plantas. Aos 90 DAS, o número de folhas, o diâmetro da haste, as massas úmida e seca da parte aérea, de raiz e de bulbo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativo, realizou o teste de média Scott-Knott a 5% de significância em todos os experimentos. Dos 27 isolados testados, apenas EB13 demonstrou capacidade de solubilizar fosfatos de ferro. Dezesete isolados (63%) solubilizaram fosfato de alumínio. Todos os isolados apresentaram capacidade de produzir quitinase. Para a produção de celulase, apenas no isolado EB14 não foi detectado. As curvas de crescimento dos isolados mostraram que EB13 atinge o ápice da fase exponencial 24h após a inoculação ( $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>) e EB18, 12h ( $10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>). Os isolados EB13 e EB18 produziram compostos antimicrobianos. O extrato celular de EB13 controlou o 16,70 % do crescimento de *S. terrestris*

*in vitro*. Nos testes com alho micropropagado com *S. cepivora*, as inoculações com os isolados não apresentaram diferença em relação à testemunha. Nos ensaios com *S. terrestris*, a testemunha sobressaiu aos demais tratamentos. No experimento em casa-de-vegetação, não foi observado sintoma da podridão branca (*S. cepivora*). Entretanto, a inoculação com o isolado EB18 na presença do *S. cepivora* estimulou significativamente os parâmetros avaliados, com exceção da massa fresca e seca da raiz e do bulbo. Com base nos resultados obtidos, observou-se que dentre os mecanismos de crescimento testados *in vitro*, alguns isolados de *Bacillus* spp. testados apresentaram capacidade de solubilizar  $AlPO_4$  e de produzir enzimas hidrolíticas. Os isolados selecionados, EB13 e EB18, produziram o antibiótico fenazina, e o extrato celular de EB13 inibiu crescimento do *S. terrestris*. Esses resultados indicaram potencial de promoção/proteção ao crescimento de alho. Os experimentos de micropropagação indicaram que os isolados apresentaram comportamento neutro no experimento, sendo necessário ajustes na metodologia. Em casa de vegetação, o isolado EB18 apresentou efeito no estímulo ao crescimento do alho.

**Palavra - chave:** Rizobactérias, Fitopatógeno, Desenvolvimento, Mecanismos secundários, Micropropagação

## ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a major economic crop in Brazil and a source of employment and income generation in the Santa Catarina plateau region, primarily for small and medium-sized producers. This crop is affected by several pathogens that cause damage. Among its main diseases, white rot caused by *Stromatinia cepivora* and pink rot (*Setophoma terrestris*) cause severe damage, potentially reaching 100%. Chemical control is ineffective against these phytopathogens, and biological control may be an alternative. Studies highlight *Bacillus* spp. as biocontrol agents due to their pathogen-inhibiting mechanisms and potential to promote plant growth through various actions. Therefore, this study aimed to evaluate isolates of the genus *Bacillus* for controlling the phytopathogenic fungi *S. cepivora* and *S. terrestris*, as well as their potential to stimulate garlic growth, thus generating sustainable management practices and optimizing the crop. Initially, 27 *Bacillus* spp. isolates were used to test their potential to solubilize iron and aluminum phosphate in vitro, adding each isolate to equidistant points on the plate with specific medium. The same procedure was performed for the chitinase and cellulase production test, in which the sole carbon sources were chitin and CMC (carboxymethyl cellulose), respectively. After the tests, two isolates (EB13 and EB18) were selected for further analyses, regarding antibiotic production, especially from the phenazine group, through cell extract and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Antibiosis tests were then performed with *S. cepivora* and *S. terrestris*. The growth dynamics of the selected isolates were analyzed, grown in LB (Luria Bertani) medium for 48 h at 27 °C, and the number of colony-forming units (CFU) was determined at different time intervals. For the micropropagation experiments, the apical buds of garlic cv. Chonan bulbs were used as explants, maintained in 10 mL of MS liquid medium (Murashige & Skoog) on a filter paper bridge. Fungal cultures were maintained in a BOD incubator with a 12-h photoperiod at 19 °C (for *S. cepivora*) and 25 °C (for *S. terrestris*), and bacterial cultures were maintained at 27 °C, without photoperiod. After 15 days, bacterial isolates diluted to 10<sup>1</sup> CFU mL<sup>-1</sup> were inoculated. Fifteen days after bacterial inoculation, a microsclerotia of each pathogenic fungus was added separately. Evaluations were performed at 45 days for tests with *S. cepivora* and 42 days for *S. terrestris*. For the greenhouse experiment, cv. Chonan and only *S. cepivora* was tested. Garlic was grown in 5-L pots containing soil from the Curitiba region, Santa Catarina, region. Fungal and bacterial cultures were maintained under the conditions previously described. The completely randomized design contained six treatments: control, EB13 inoculation, EB18 inoculation, pathogen-only inoculation, EB13 + pathogen, and EB18 + pathogen. Pots inoculated with *S. cepivora* received 2,044 microsclerotia. Garlic bulblets were previously vernalized for 30 days at 4 °C. They were disinfested and inoculated with bacterial isolates, according to the treatment. At 30, 60, and 90 DAS, plant heights were evaluated. At 90 DAS, leaf number, stem diameter, and shoot, root, and bulb wet and dry weights were measured. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and, when significant, the Scott-Knott mean test was performed at 5% significance level in all experiments. Of the 27 isolates tested, only EB13 demonstrated the ability to solubilize iron phosphates. Seventeen isolates (63%) solubilized aluminum phosphate. All isolates showed the ability to produce chitinase. Cellulase production was not detected only in isolate EB14. The growth curves of the isolates showed that EB13 reached the peak of the exponential phase 24 h after inoculation (108 CFU mL<sup>-1</sup>) and EB18, 12 h (107 CFU mL<sup>-1</sup>). Isolates EB13 and EB18 produced antimicrobial compounds. The EB13 cell extract controlled 16.70% of *S. terrestris* growth in vitro. In tests with garlic micropropagated with *S. cepivora*, inoculations with the isolates showed no difference in relation to the control. In the tests with *S. terrestris*, the control stood out from the other treatments. In the greenhouse experiment, no symptoms of white rot (*S.*

*cepivora*) were observed. However, inoculation with the EB18 isolate in the presence of *S. cepivora* significantly stimulated the evaluated parameters, with the exception of fresh and dry weight of the root and bulb. Based on the results obtained, it was observed that among the growth mechanisms tested in vitro, some *Bacillus* spp. isolates tested presented demonstrated the ability to solubilize  $AlPO_4$  and produce hydrolytic enzymes. The selected isolates, EB13 and EB18, produced the antibiotic phenazine, and the EB13 cell extract inhibited the growth of *S. terrestris*. These results indicated potential for promoting/protecting garlic growth. Micropropagation experiments indicated that the isolates displayed neutral behavior in the experiment, requiring adjustments to the methodology. In a greenhouse, isolate EB18 demonstrated an effect on stimulating garlic growth.

**Keywords:** Rhizobacteria, Phytopathogen, Development, Secondary Mechanisms, Micropropagation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Bulbo de alho sobre o ataque de <i>Stromatinia cepivora</i> . -----	18
<b>Figura 2</b> - Ataque da <i>Setophoma terrestris</i> nas raízes do alho.-----	19
<b>Figura 3</b> - Esquema de diluição seriada para realização da curva de crescimento (1a) Diluição seriada (1b) plaqueamento para realizar a quantificação das unidades formadora de colônia (UFC) -----	38
<b>Figura 4</b> - Solubilização de fosfatos em meio sólido. (a) Solubilização de fosfato de ferro, evidenciada pelo crescimento bacteriano e formação de halo ao redor da colônia. (b) Solubilização de fosfato de alumínio, observada pelo crescimento bacteriano e presença do halo-----	45
<b>Figura 5</b> - Presença de crescimento bacteriano em meio sólido para avaliação de produção de enzimas hidrolíticas (a) Produção de quitinase. (b) Produção de celulase. -----	50
<b>Figura 6</b> - Dinâmica de crescimento dos isolados bacterianos de <i>Bacillus</i> spp. EB13 e EB18: variação de log <sub>10</sub> UFC em função do tempo -----	52
<b>Figura 7</b> - Efeito do extrato celular de isolados bacterianos contra <i>S.terrestris</i> em meio BDA. (a) Testemunha: crescimento do fitopatógeno. (b) Aplicação do extrato celular dos isolados EB13 (13), EB18 (18) e da solução controle (0).-----	55
<b>Figura 8</b> - Manejo do experimento com alho em casa de vegetação. (a) Reinoculação dos isolados com auxílio de uma pipeta volumétrica. (b) Desbaste após 15 DAS (c) Cavidade para adição de microescleródios do <i>S. cepivora</i> . (d) Adição dos microescleródios -----	79
<b>Figura 9</b> - Plantas de alho cv Chonan micropropagadas com 45 dias inoculadas com isolados de <i>Bacillus</i> spp e <i>S. cepivora</i> . -----	83
<b>Figura 10</b> - Efeito dos tratamentos: <i>Bacillus</i> spp EB13, <i>Bacillus</i> spp EB18, <i>S.terrestris</i> , EB13 + <i>S. terrestris</i> , EB18 + <i>S. terrestris</i> , e a testemunha na altura das plantas de alho cv Chonan em micropropagação aos 42 dias.-----	85
<b>Figura 11</b> - Efeito dos tratamentos utilizando isolados de <i>Bacillus</i> spp. (EB13 e EB18) na ausência e presença do <i>S. terrestris</i> no alho cv Chonan em micropropagação após 42 dias. -	88
<b>Figura 12</b> - Plantas de alho cv Chonan cultivadas em vasos de 5 L em cultivo protegido. (a) Testemunha aos 90 DAS (d) Tratamento EB18 associado ao <i>S. cepivora</i> aos 90 DAS. -----	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Análises quantitativas e qualitativas para seleção de isolados de <i>Bacillus</i> .....	37
<b>Tabela 2-</b> Mecanismos de promoção de crescimento direto de plantas por isolados de <i>Bacillus</i> spp. ....	43
<b>Tabela 3-</b> Teste post-hoc com Bootstrapping (95% IC Bca) para índice de solubilização (IS) de fosfato de ferro dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. ....	44
<b>Tabela 4 -</b> Teste post-hoc com Bootstrapping (95% IC Bca) para índice de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. ....	46
<b>Tabela 5-</b> Mecanismos de promoção de crescimento indireto de plantas por isolados de <i>Bacillus</i> spp. ....	51
<b>Tabela 6-</b> Picos com espectro UV/VIS semelhantes à fenazina integrados no cromatograma obtido por HPLC.....	54
<b>Tabela 7-</b> Teste post-hoc com Bootstrapping (95% IC Bca) para a inibição do extrato celular dos isolados EB13 e EB18.....	55
<b>Tabela 8-</b> Descrição dos tratamentos utilizados nos ensaios experimentais.....	76
<b>Tabela 9 -</b> Análise do solo utilizado no experimento de inoculação de isolados de <i>Bacillus</i> spp. Curitibaanos, SC. ....	78
<b>Tabela 10-</b> Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> spp no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com <i>S. cepivora</i> aos 45 dias. ....	81
<b>Tabela 11-</b> Efeito de isolados de <i>Bacillus</i> no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com <i>S. cepivora</i> .....	84
<b>Tabela 12-</b> Efeito de isolados de <i>Bacillus</i> no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com <i>S. terrestris</i> aos 42 dias. ....	86
<b>Tabela 13-</b> Efeito de isolados de <i>Bacillus</i> no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com <i>S. terrestris</i> aos 42 dias. ....	87
<b>Tabela 14-</b> Efeito dos tratamentos: <i>Bacillus</i> spp EB13, <i>Bacillus</i> spp EB18, <i>S.cepivora</i> , EB13 + <i>S. cepivora</i> , EB18 + <i>S. cepivora</i> , e a testemunha no alho cv Chonan em casa de vegetação, Curitibaanos/SC.....	89
<b>Tabela 15-</b> Efeito dos tratamentos: <i>Bacillus</i> spp EB13, <i>Bacillus</i> spp EB18, <i>S.cepivora</i> , EB13 + <i>S. cepivora</i> , EB18 + <i>S. cepivora</i> , e a testemunha no alho cv Chonan referente as biomassas fresca e seca em casa de vegetação, Curitibaanos/SC .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA Ácido Indol Acético

ANAPA Associação Nacional dos Produtores de Alho

BDA Batata Dextrose Ágar

CEPA Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina

CMC carboximetilcelulose

DAS Dias Após a Semeadura

DIC Delineamento Inteiramente Casualizado

EPAGRI Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

K Potássio

LB Luria Bertani

LMPCP Laboratório de Microrganismos Promotores de Crescimento em Plantas

LPS Lipopolissacarídeos

MS Murashige & Skoog

MPCP Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas

N Nitrogênio

P Fosfato

RPCP Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

SC Santa Catarina

UFC Unidade Formadora de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>SEÇÃO I - Mecanismos bioativos de <i>Bacillus</i> spp.....</b>	<b>31</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
2.1 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FERRO/ALUMÍNIO <i>in vitro</i> .....	35
2.2 PRESENÇA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: quitinase e celulase.....	36
2.3 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO DOS ISOLADOS SELECIONADOS ..	36
<b>2.3.1 Seleção dos isolados.....</b>	<b>36</b>
2.4 PRODUÇÃO DE EXTRATO CELULAR E QUANTIFICAÇÃO DE FENAZINAS POR ISOLADOS <i>Bacillus</i> spp. ....	38
<b>2.4.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....</b>	<b>39</b>
<b>2.4.2 Bioensaio com o extrato celular dos isolados <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
3.1 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FERRO/ALUMÍNIO.....	42
3.2 PRESENÇA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: quitinase e celulase.....	50
3.3 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO DOS ISOLADOS EB13 E EB18.....	52
3.4 PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR ISOLADOS <i>Bacillus</i> spp.....	53
<b>3.4.1 Bioensaio com o extrato celular dos isolados <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
4.1 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO/ALUMÍNIO POR ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> .....	56

4.2 PRESENÇA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: quitinase e celulase.....	57
4.3 CURVA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS EB13 e EB18 .....	58
4.4 PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR ISOLADOS <i>Bacillus</i> spp.....	59
4.5 BIOENSAIO COM O EXTRATO CELULAR DOS ISOLADOS <i>Bacillus</i> spp. ....	59
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>SEÇÃO II - Avaliação de <i>Bacillus</i> spp. no Controle Biológico de Patógenos (<i>Stromatinia cepivora</i> e <i>Setophoma terrestris</i>) do Alho em Diferentes Condições Experimentais.....</b>	<b>72</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>76</b>
2.1 USO DA MICROPROPAGAÇÃO DO ALHO PARA ANÁLISE DE BIOCONTROLE DE <i>S. cepivora</i> E <i>S. terrestris</i> .....	76
<b>2.1.1 Análise estatística .....</b>	<b>77</b>
2.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> EM ALHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	77
<b>2.2.1 Análise estatística .....</b>	<b>80</b>
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
3.1 AVALIAÇÃO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> COM <i>S. cepivora</i> EM ALHO MICROPROPAGADO .....	81
3.2 AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> INOCULADOS EM ALHO CULTIVADO <i>in vitro</i> COM <i>S. terrestris</i> .....	85
3.3 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> INOCULADOS EM ALHOS CULTIVADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	88
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> COM <i>S. cepivora</i> EM ALHO MICROPROPAGADO .....	92
4.2 AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> INOCULADOS EM ALHO CULTIVADO <i>in vitro</i> COM <i>S. terrestris</i> .....	93

4.3 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> INOCULADOS EM ALHOS CULTIVADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	95
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>
<b>APENDICE A – TABELA COMPLETA DO TESTE POST-HOC COM BOOTSTRAPPING (95% IC BCA) REFERENTE AO INDICE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> spp. ....</b>	<b>108</b>
<b>APENDICE B – TABELA COMPLETA DO TESTE POST-HOC COM BOOTSTRAPPING (95% IC BCA) REFERENTE AO INDICE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE ALUMÍNIO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> spp. ....</b>	<b>117</b>

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O alho (*Allium sativum L.*) é uma espécie do gênero *Allium* pertencente à família *Alliaceae* (So *et al.*, 2021). A planta pode chegar até um metro de comprimento. As raízes atingem aproximadamente 50 cm de profundidade e suas folhas são estreitas e alongadas e recobertas por uma camada protetora cerosa (Cruz, 2018). É uma espécie diploide e sua principal forma de propagação é a vegetativa, através do plantio dos bulbilhos (Malik; Dhatt; Malik, 2020).

A cultura exige temperaturas baixas para seu crescimento e desenvolvimento durante o ciclo (Atif *et al.*, 2019). O frio é essencial para ativar as atividades fisiológicas na planta, e assim obter rendimento esperado (Oliveira; Martins, 2022). O ciclo do alho varia de 90 a 180 dias, de acordo com a cultivar, época de plantio, com as condições de manejo da câmara fria, período de vernalização e condições ambientais (Resende *et al.*, 2024). As cultivares de alho necessitam realizar o processo de vernalização, no qual os bulbos permanecem em refrigeração em câmara fria, por um período de 30 a 60 dias, a uma temperatura de 4°C, antes do plantio, para atingir as horas de frio necessária para seu desenvolvimento (Luz *et al.*, 2023).

A planta produz um bulbo com formato redondo, no qual é dividido em bulbilhos. Os bulbilhos são compridos com formato arqueado, possuem folha protetora chamada de brácteas, podendo apresentar diferentes colorações (branca, vermelha, roxa, marrom) (Manfron; Garcia; Andriolo, 1992). O bulbo também tem uma proteção por várias túnicas esbranquiçadas que serve para a proteção (Parreño *et al.*, 2023).

A produção de alho no Brasil é dividida em duas categorias: uma formada por alho nobre roxo, que produz bulbos de alto valor comercial e outra, de alho comum ou semi nobre, que são mais rústicas e menos exigentes com condições ambientais (Resende *et al.*, 2013). Entretanto, apresenta produção de bulbos inferiores e que não agradam ao consumidor. Na região Sul do País, são utilizadas cultivares nobres, tais como Chonan, San Valentin, Ito, Caçador, entre outros (Hahn *et al.*, 2022).

O planalto catarinense tem expressivo potencial para o cultivo de alho, pois apresenta condições climáticas favoráveis para o seu desenvolvimento (Landau *et al.*, 2020). O estado é responsável pelo plantio de 1,098 há, contudo, a microrregião de Curitiba, Frei Rogério, Brunópolis e Ponte Alta é responsável por 70% da área plantada (IBGE, 2024). Como o frio que ocorre nessa região não é uniforme durante os anos, e não garante qualidade do alho, há a necessidade de expor o alho a temperaturas baixas (vernalização) por um determinado

período antes do plantio, para atender a necessidade do frio da cultura (Khokhar, 2022). A época do plantio do alho em Santa Catarina varia de maio até início de agosto, variando conforme a cultivar, e a colheita é realizada no final de novembro a dezembro (Águiar *et al.*, 2014). É importante registrar que o alho produzido no planalto catarinense também é utilizado como alho- semente nas regiões de Minas Gerais, Goiás, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e regiões de altitude do norte da Bahia e na Chapada Diamantina, também na própria região de cultivo (Santa Catarina) (ANAPA, 2018).

Essa cultura detém alto custo de produção. Para produzir um hectare de alho no estado de Santa Catarina, há um custo aproximado de R\$ 80.571,75 (EPAGRI/CEPA, 2022). Mesmo com alto custo, o alho tem importância relevante, pois contribui para o desenvolvimento da economia da região, pois a maioria são pequenos agricultores, com emprego de mão-de-obra familiar (Giehl *et al.*, 2018).

Dentro do alto custo de produção, os gastos com os controles das doenças que acometem a cultura são expressivos (Adorada *et al.*, 2023). Das doenças radiculares que mais atacam as aliáceas, estão a podridão branca, causada por *Stromatinia cepivora* e a podridão rosada, causada por *S. terrestris*, são as que mais se destacam (Sharma, 2023). O controle químico, além de onerar o cultivo, causa impactos ambientais e de saúde. Diversos produtores têm deixado de cultivar o alho em decorrência dos ataques dos patógenos nas lavouras, buscando-se alternativas para amenizar os prejuízos causados por essas doenças.

A podridão branca é uma doença característica em plantas da família Alliaceae, sendo considerada uma das mais destrutivas, causando perdas expressivas na produção (Lourenço Junior; Reis; Oliveira, 2016). A podridão branca se manifesta em regiões frias com temperatura entre 13°C a 19°C e com alta umidade no solo. O patógeno apresenta fácil dispersão dentro das lavouras ocorrendo uma quebra brusca da produtividade (Coley-smith; Mitche; Sansford, 1990).

Essa doença é causada por *Stomatina cepivora*, um patógeno necrotrófico que sobrevive no solo, formando pequenos microescleródios (200 a 500 µm) (Valdés-Santiago *et al.*, 2021). Essas estruturas podem permanecer no solo por mais de 20 anos, germinando apenas quando é detectada a presença de exsudatos radiculares das culturas do gênero *Allium*, os quais liberam compostos orgânicos voláteis que estimulam a germinação dos microescleródios (Coley-smith; Mitche; Sansford, 1990; Lopes; Michereff, 2018). O principal sintoma para fazer o diagnóstico da doença em campo é a presença de microescleródios sobre os bulbos afetados, pois os outros sintomas podem ser confundidos com ataque de outros patógenos (Mahmoud *et al.*, 2021). Os microescleródios são estruturas compactas de micélio

endurecidos, com coloração preta e formato arredondado (Karaca; Karaca, 2023). Quando ocorre a ativação desses microescleródios dormentes, as hifas do fungo crescem pelo solo e penetram na epiderme da raiz do alho por meio de apressórios (Wordell Filho *et al.*, 2006). As células atacadas são mortas e a produção de enzimas e ácidos pelo patógeno colabora para o apodrecimento dos tecidos infectados e sucede o desenvolvimento dos sintomas da doença (Fuga; Lopes; Vieira, 2012).

**Figura 1** – Bulbo de alho sobre o ataque de *Stromatinia cepivora*.



**Fonte:** Autora (2022)

A planta do alho é suscetível à podridão branca durante todo seu ciclo vegetativo, podendo observar sintomas após 15 dias do plantio (Souza & Macêdo, 2009). A ocorrência do ataque desse patógeno no Brasil é generalizada, principalmente, nas regiões de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e áreas serranas do estado de São Paulo (Marcuzzo & Schmoeller, 2017). Diversas áreas se tornaram impróprias para o cultivo do alho, por causa do patógeno *S. cepivora* e sua estrutura de resistência (Lourenço Junior; Reis; Oliveira, 2016).

O controle da podridão branca é complexo, pois há poucos produtos registrados para esse patógeno, mas muitos não se mostram eficientes (Elshahawy *et al.*, 2019). Diversos produtores aplicam defensivos agrícolas que não são recomendados para a doença ou para a

cultura, até mesmo superdosagem, ocasionando degradação ambiental por uso intenso desses produtos (Silva *et al.*, 2023).

Outra doença radicular causadora de grandes perdas na cultura do alho é a podridão rosada causada pelo fungo *Setophoma terrestris* (Wordell Filho *et al.*, 2006). Essa doença apresenta maior incidência, principalmente, em anos mais secos e quentes e seu ataque é facilitado quando as plantas se encontram em desequilíbrio nutricional (Reis; Oliveira; Lourenço Júnior, 2016).

Esse fungo apresenta capacidade de se desenvolver em diversos tipos de solos e climas, tanto temperados, quanto tropicais (Marcuzzo e Carvalho, 2020). As hifas progridem quando a temperatura do solo se encontra entre 24 °C e 28 °C. Fora dessas temperaturas, o fungo permanece no solo com os micélios dormentes (Reis; Oliveira; Lourenço Júnior, 2016). Quando encontram temperaturas ideais, as hifas invadem os tecidos epidérmicos e corticais das raízes das plantas, liberando enzimas responsáveis por romper os tecidos (Daimiel, 2020). Alguns sintomas da doença no alho são: raízes com coloração rosada, progredindo para coloração parda ou preta; sintomas de déficit hídrico; folhas com aspecto amarelado, murchas e secas; nanismo; bulbos pequenos; apodrecimento e a planta pode ser retirada do solo facilmente (Wordell Filho, 2006; Marcuzzo & Carvalho, 2020). O principal dano causado na cultura é a diminuição do peso dos bulbos e seu diâmetro, muitas vezes, não atingindo tamanho e peso para ser comercializado (Rivera-Méndez; Brenes-Madriz; Alvarado-Marchena, 2021).

**Figura 2-** Ataque da *Setophoma terrestris* nas raízes do alho.



**Fonte:** Autora (2022)

A busca por alternativas sustentáveis no controle de fitopatógenos tem impulsionado a utilização de microrganismos benéficos, tais como as rizobactérias (Botelho; Brasil, 2023; Koskey *et al.*, 2021). Essas bactérias vivem na rizosfera e podem atuar como agentes de biocontrole, inibindo o crescimento de patógenos (El-Saadony *et al.*, 2022). As rizobactérias são microrganismos presentes no solo, que têm capacidade de colonizar o sistema radicular das plantas e a rizosfera, podendo ser saprófitos ou simbiontes (Benaissa, 2023). Essas bactérias estimulam a saúde e a produtividade de planta por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo a solubilização de nutrientes minerais, estimulando o crescimento radicular e a supressão de doenças radiculares (Batista *et al.*, 2018).

Existem rizobactérias que promovem o crescimento das plantas e são frequentemente isoladas da rizosfera de várias culturas (Botelho *et al.*, 2019; Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020). As rizobactérias têm sido intensamente estudadas quanto ao papel de biocontroladores de doenças em diversas culturas (Bonaterra *et al.*, 2022). Dentre os gêneros mais estudados destacam-se: *Bacillus* e *Pseudomonas* (Mazzuco; Torres Júnior; Botelho, 2023; Botelho; Brasil, 2023). O uso de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) é uma forma ambientalmente correta de controlar doenças de plantas e aumentar o rendimento das culturas.

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam endósporos extremamente resistentes a agressões exógenas, permanecendo no solo por muitos anos (Cano; Borucki, 1995). Também podem ser responsáveis por aumentar a resistência de plantas a estresses ambientais e nutricionais (Tsoetsi *et al.*, 2022). Esse grupo de bactérias mostra uma extensa distribuição em todas as áreas geográficas do planeta, chegando a 24% do total das bactérias isoladas em solos (Raton *et al.*, 2005).

Esses microrganismos apresentam diversos mecanismos de promoção de crescimento de plantas, sejam aqueles classificados como diretos, por estimular o crescimento e nutrição (Kulkova *et al.*, 2023) ou indireto, por inibir patógenos (Akinsemolu *et al.*, 2024; Gupta *et al.*, 2024). A produção de compostos antibióticos é considerada um mecanismo indireto importante para diminuição de patógenos na rizosfera (Santoyo *et al.*, 2021). Dentre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), *Bacillus* spp. se destacam neste contexto para a produção de inoculantes, pois formam endósporos de resistência e grande capacidade de sobrevivência, quando comparados a gêneros como *Pseudomonas* (Melo; Azevedo, 1998; Lastochkina *et al.*, 2019), também de grande relevância para promoção de crescimento de plantas.

As pesquisas com o gênero *Bacillus* vem crescendo em todo o mundo, e cada vez mais se observa-se a diversidade desse gênero, e o quão importante é classificar/identificar essas cepas, pois muitas apresentam potencial para inúmeros fins, como por exemplo inibir ou controlar patógenos que afetam os sistemas de produção agrícolas.

A coleção de *Bacillus* do laboratório de microrganismos promotores de crescimentos de planta (LMPCP) da Universidade Federal de Santa Catarina conta com isolados, extraídos do solo de lavoura cultivada com alho na fazenda Dias, localizada em Horizolândia em Curitiba/SC (Botelho; Leôncio, 2017). Esses passaram por testes *in vitro* como produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato de cálcio, urease, lipase, catalase, teste de fermentação de glucose e sacarose e controle biológico de *S. cepivora* e *S. terrestris* (Botelho; Leôncio, 2017; Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020; Faquin, 2022). Dos 27 isolados testados, 85,2% foram capazes de liberar oxigênio do peróxido de hidrogênio, por meio do teste de catalase, 78% dos isolados foram capazes de fermentar glicose e 96 % a sacarose (Botelho; Leôncio, 2017). Todos os isolados apresentaram produção de AIA, 78% apresentam capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, 67% produzem lipase e urease, aproximadamente 48% apresentaram potencial de inibir o patógeno *S. cepivora in vitro* (Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020) e 33,33 % da coleção apresentou potencial de inibir a *S. terrestris in vitro* (Faquin, 2022). Das análises feitas pelos autores, cinco dos isolados dessa coleção (18,50%) conseguiram inibir os dois fungos fitopatogênicos *in vitro*, sendo esses: EB01, EB13, EB18, EB19 e EB24.

Faquin (2022) relatou que os isolados EB01, EB15, EB17 e EB21 apresentaram potencial de estimular o crescimento do alho em vasos do tipo Leonard em casa de vegetação, com acréscimos de 26,85 % (EB15) e 24,8% (EB21) para a massa úmida da parte aérea. Os isolados EB01 e EB15 apresentaram incremento de 41,80 % na massa seca das raízes e também foram observados incrementos na altura das plantas de alho, destacando esses *Bacillus* spp. com grande potencial de promotor de crescimento.

O isolado EB17 também foi testado em campo quanto à capacidade de solubilização de fosfato na cultura do alho e, quando combinado com um isolado de *Pseudomonas* spp. (CBS 02), promoveu aumento na altura da planta, maior massa seca e maior produtividade sem adubação fosfatada (Mazzuco; Torres Júnior; Botelho, 2023), indicando potencial de solubilização de fontes de P, já existentes no solo. Na cultura do milho Botelho e Leôncio (2017) observaram que outros isolados da coleção (EB02, EB16, EB14, EB23, EB26) apresentaram capacidade de estimular o crescimento da planta semelhante ao tratamento que

recebeu 100 % de adubação nitrogenada, sugerindo capacidade de auxiliar no fornecimento de N.

Diante desse cenário, visando avaliar o potencial desses isolados em minimizar o ataque de doenças da cultura do alho e estimular seu crescimento, o presente trabalho buscou avaliar seu uso no desenvolvimento de *Allium sativum* L., utilizando a micropropagação como forma de avaliar o potencial de biocontrole desses isolados. Dessa forma, a dissertação foi estruturada em duas seções, em que na primeira, apresenta-se a caracterização dos 27 isolados bacterianos, com relação a mecanismos de crescimento, como solubilização de fosfato de ferro e alumínio, produção de quitinase e celulase. A partir dessas análises, foram selecionados dois isolados para quantificar a produção de antibióticos, como fenazinas. A produção do antibiótico foi verificada a partir dos extratos celulares bacterianos. Esses foram avaliados em teste *in vitro* para controle *S. cepivora* e *S. terrestris*.

Na segunda seção, apresenta-se os resultados dos quatro ensaios de inoculação em alho com os isolados bacterianos selecionados. Três ensaios envolveram a micropropagação, para avaliar o potencial de estímulo ao crescimento do alho pelos isolados selecionados, especialmente para estudo do controle de *S. terrestris* e *S. cepivora*. Além desses, foi realizado um teste em casa de vegetação em que se utilizou apenas *S. cepivora*.

## REFERÊNCIAS

- ADORADA, Joel L.; BANDOJO, Glecly P.; TEPPER, Lorna M.; JAVIER, Michelle E.; MONDOÑEDO, Melinda O.; MERCADO, Mark Julius; RECUENCO, Monalisa O.. Problem Analysis of Garlic Cultivation in Major Production Areas in Luzon, Philippines. **Asian Research Journal Of Agriculture**, v. 16, n. 3, p. 74-84, 9 set. 2023. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/arja/2023/v16i3394>.
- AGUIAR, Adriano Tosoni da Eira; GONÇALVES, Charleston; PATERNIANI, Maria Elisa Ayres Guidetti Zagatto; TUCCI, Maria Luiza Sant'anna; CASTRO, Carlos Eduardo Ferreira de. **Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas**. Boletim 200, 7. ed. Campinas, São Paulo: Instituto Agrônômico (Iac), p. 452, 2014.
- AKINSEMOLU, Adenike A.; ONYEAKA, Helen; ODION, Samuel; ADEBANJO, Idris. Exploring *Bacillus subtilis*: ecology, biotechnological applications, and future prospects. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 64, n. 6, 20 mar. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202300614>.
- ANAPA. **Epagri inicia nova etapa de programa que garante alta produtividade do alho catarinense**. 2018. Disponível em: <http://anapa.com.br/epagri-inicia-nova-etapa-de-programa-que-garante-alta-produtividade-do-alho-catarinense/>. Acesso em: 25 ago. 2024.
- ATIF, Muhammad Jawaad; AMIN, Bakht; GHANI, Muhammad Imran; HAYAT, Sikandar; ALI, Muhammad; ZHANG, Yumeng; CHENG, Zhihui. Influence of Different Photoperiod and Temperature Regimes on Growth and Bulb Quality of Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars. **Agronomy**, v. 9, n. 12, p. 879, 11 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9120879>.
- BALBINOT, William Gilberto; RODRIGUES, Sabrina; BOTELHO, Glória Regina. Isolates of *Bacillus* sp. from garlic: effect on corn development and plant growth-promoting mechanisms. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, p. 1-17, 2020. Revista Brasileira de Ciencia do Solo. <http://dx.doi.org/10.36783/18069657rbc20200043>.
- BATISTA, Bruna Durante; LACAVA, Paulo Teixeira; FERRARI, Andrea; TEIXEIRA-SILVA, Natalia Sousa; BONATELLI, Maria Letícia; TSUI, Sarina; MONDIN, Mateus; KITAJIMA, Elliot Watanabe; PEREIRA, José Odair; AZEVEDO, João Lúcio. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33-42, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.
- BEISE, Dalvan Carlos; SILVA, Ana Kelly de Sousa; GUTERRES, Suelen Martinez; ZANATTA, Caroline Bedin; SCHNEIDER, Ketlin; ALMEIDA, Amanda Venturi Corrêa de; MAZZUCO, Volni; SOLDI, Cristian; WELTER, Leocir José; STEFENON, Valdir Marcos. Colorimetric, chemical, and genetic characterization of purple garlic in two producing

regions in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 59, p. 1, 2024. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2024.v59.03778>.

BENAISSA, Asmaa. Rhizosphere: role of bacteria to manage plant diseases and sustainable agriculture.: a review. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 14, 6 out. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202300361>.

BONATERRA, Anna; BADOSA, Esther; DARANAS, Núria; FRANCÉS, Jesús; ROSELLÓ, Gemma; MONTESINOS, Emilio. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1759, 31 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10091759>.

BOTELHO, Glória Regina; BRASIL, Marivaine. Rizobactérias: uma visão geral da importancia para plantas e agrossistemas. **Revista Ambientes em movimento**, v.1, n.3, pag. 22-46, 2023.

BOTELHO, Gloria Regina; LEONCIO, Mariane da Rosa. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria isolated from garlic (*allium sativum*). **Scientia Agraria**, v. 18, n. 3, p. 95, 29 set. 2017. Universidade Federal do Paraná. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i3.50630>.

BOTELHO, Gloria Regina; LEONCIO, Mariane R.; ORSI, Bruna; COSER, Elisa; EUTRÓPIO, Géssica R.; ARMAS, Rafael D. De; SOARES, Cláudio R. F. Sousa; ZILLI, Jerri E.. Plant growth promoting bacteria from garlic sowed at Curitibaanos micro-region-Santa Catarina-Brazil. **Ciencia del suelo**, v. 37, n. 1, pag. 51-65, 2019.

CANO, R.; BORUCKI, M.. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. **Science**, v. 268, n. 5213, p. 1060-1064, 19 maio 1995. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.7538699>.

COLEY-SMITH, J. R.; MITCHELL, Christine M.; SANSFORD, Claire E.. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. **Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 58-69, mar. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02476.x>.

CRUZ, Rafael França Pereira da. Morfofisiologia de folhas de alho cultivado nas condições edafoclimáticas de Curitibaanos, SC. **Revista Nosso Alho**, Brasília, v. 29, p. 40-48, out. 2018. Disponível em: <http://anapa.com.br/wp-content/uploads/2018/11/revista-nosso-alho-edicao-29.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2025.

DAIMIEL, Bodegas. **Raiz rosa**. 2020. Disponível em: <https://www.abonosyfitosanitarios.es/cultivos/cebolla-ajo-puerro/enfermedades-de-lacebolla,ajo-y-puerro/ra%C3%ADz-rosada.html>. Acesso em: 10 dez. 2024.

EL-SAADONY, Mohamed T.; SAAD, Ahmed M.; SOLIMAN, Soliman M.; SALEM, Heba M.; AHMED, Alshaymaa I.; MAHMOOD, Mohsin; EL-TAHAN, Amira M.; EBRAHIM,

Alia A. M.; EL-MAGEED, Taia A. Abd; NEGM, Shaimaa H.; SELIM, Sami; BABALGHITH, Ahmad O.; ELRYS, Ahmed S.; EL-TARABILY, Khaled A.; ABUQAMAR, Synan F.. Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: mechanisms, challenges and future perspectives. **Frontiers In Plant Science**, v. 13, p. 1, 6 out. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>.

ELSHAHAWY, I. E.; SAIED, Nehal; ABD-EL-KAREEM, F.; MORSY, A.. Effect of inoculum density of *Stromatinia cepivora* on the amount of white rot reduced by *Trichoderma* species in garlic. **Bulletin Of The National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1, 12 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s42269-019-0064-3>.

EPAGRI/CEPA. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola. **Custo de Produção**. Alho. 2022. Disponível em: <https://cepa.epagri.sc.gov.br/index.php/produtos/custos-de-producao/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

FAQUIN, Cíntia. **Controle de *Sclerotium cepivorum* e *Setophoma terrestris* por *Bacillus spp.* na cultura do alho (*Allium sativum* L.)**. 2022. 57 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2022.

FUGA, Cícero Augusto Guimarães; LOPES, Everaldo Antônio; VIEIRA, Bruno Sergio. Etiologia, epidemiologia e controle de doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* e *S. cepivorum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 278-322, 2012.

GIEHL, Alexandre Luís; PADRÃO, Glaucia; ELIAS, Haroldo Tavares; ALVES, João Rogério; GUGEL, Jurandi Teodoro; ARAUJO, Luis Augusto; MARCONDES, Tabajara. **Boletim Agropecuário nº 61**. Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola/EPAGRI. 2018. 47f. Florianópolis, 2018. Disponível em: [https://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cep/Boletim\\_agropecuario/boletim\\_agropecuario\\_n\\_61.pdf](https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cep/Boletim_agropecuario/boletim_agropecuario_n_61.pdf). Acesso em: 01 fev. 2025.

GUPTA, Rupali; KEPPANAN, Ravindran; LEIBMAN-MARKUS, Meirav; MATVEEV, Sabina; RAV-DAVID, Dalia; SHULHANI, Ran; ELAD, Yigal; MENT, Dana; BAR, Maya. *Bacillus thuringiensis* promotes systemic immunity in tomato, controlling pests and pathogens and promoting yield. **Food Security**, v. 16, n. 3, p. 675-690, 27 abr. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12571-024-01441-4>.

HAHN, Leandro; PARENT, Léon-Étienne; PAVIANI, Angela Cristina; FELTRIM, Anderson Luiz; WAMSER, Anderson Fernando; ROZANE, Danilo Eduardo; ENDER, Marcos Matos; GRANDO, Douglas Luiz; MOURA-BUENO, Jean Michel; BRUNETTO, Gustavo. Garlic (*Allium sativum*) feature-specific nutrient dosage based on using machine learning models. **Plos One**, v. 17, n. 5, p. 268516, 17 maio 2022. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0268516>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de alho. 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/alho/br>. Acessado em: 15 ago. 2024.

KARACA, Cansu; KARACA, Gürsel. Comparison of Fungi with Sclerotia as Sustainable Materials for Product Design. **E3S Web Of Conferences**, v. 436, p. 03004, 2023. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/e3sconf/202343603004>.

KHOKHAR, Khalid Mahmud. Bulb development in garlic – a review. **The Journal Of Horticultural Science And Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 432-442, 25 nov. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2022.2150326>.

KOSKEY, Gilbert; MBURU, Simon Wambui; AWINO, Richard; NJERU, Ezekiel Mugendi; MAINGI, John M.. Potential Use of Beneficial Microorganisms for Soil Amelioration, Phytopathogen Biocontrol, and Sustainable Crop Production in Smallholder Agroecosystems. **Frontiers In Sustainable Food Systems**, v. 5, 29 abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2021.606308>.

KULKOVA, Iryna; DOBRZYŃSKI, Jakub; KOWALCZYK, Paweł; BEŁSZECKI, Grzegorz; KRAMKOWSKI, Karol. Plant Growth Promotion Using *Bacillus cereus*. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9759, 5 jun. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24119759>.

LANDAU, Elena Charlotte; SILVA, Gilma Alves da; MOURA, Larissa; HIRSCH, André; GUIMARÃES, Daniel Perreira. Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas: sistemas agrícolas, paisagem natural e análise integrada do espaço rural. Brasília: **Embrapa**, v.2, p.297-322, 2020.

LASTOCHKINA, Oksana; SEFIKALHOR, Maryam; ALINIAEIFARD, Sasan; BAYMIEV, Andrey; PUSENKOVA, Ludmila; GARIPOVA, Svetlana; KULABUHOVA, Darya; MAKSIMOV, Igor. *Bacillus* Spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plants**, v. 8, n. 4, p. 97, 12 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8040097>.

LOPES, Ueder Pedro; MICHEREFF, Sami Jorge. **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Pernambuco: Edufrpe, 2018. 208 p. Disponível em: [http://www.ppgf.ufrpe.br/sites/ww3.ppgf.ufrpe.br/files/lopes\\_michereff\\_2018\\_-\\_desafios\\_manejo\\_doencas\\_radiculares.pdf](http://www.ppgf.ufrpe.br/sites/ww3.ppgf.ufrpe.br/files/lopes_michereff_2018_-_desafios_manejo_doencas_radiculares.pdf). Acesso em: 01 dez. 2024.

LOURENÇO JUNIOR, Valdir; REIS, Ailton, OLIVEIRA, Valter Rodrigues. Podridão-branca causa grandes prejuízos à produção de alho e cebola. **Campo e Negócios**, Minas Gerais, v. 1, n. 1, p. 27-27, jul. 2016. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1057703/1/digitalizar0120.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2024.

LUZ, José Magno Queiroz; OLIVEIRA, Carlos Inácio Garcia de; SILVA, Sérgio Macedo; OLIVEIRA, Túlio Garcia; CASTOLDI, Renata. Vernalization temperature and maturation

point of seed cloves on garlic production and quality. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 47, p. 2, 2023. Anual. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054202347015122>

MAHMOUD, Yehia A. G.; SAMMOUR, Reda H.; MUSTAFA, Abdel-Zaher M.A.; ALHOZEIM, Reem A.. Papel dos escleródios na agressividade e patogenicidade de *Sclerotium cepivorum*. **Asian J. Microbiol. Biotecnologia. Meio ambiente. Ciência**, v. 23, p. 16-23, 2021.

MALIK, Geetika; DHATT, Ajmer Singh; MALIK, Ajaz Ahmed. A Review of Genetic Understanding and Amelioration of Edible *Allium Species*. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 415-446, 5 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2019.1709202>.

MANFRON, Paulo Augusto; GARCIA, Danton Camacho; ANDRIOLO, Jerônimo Luiz. Aspectos morfo-fisiológicos da cebola. **Ciência Rural**, v. 22, n. 1, p. 101-108, abr. 1992. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84781992000100016>.

MARCUZZO, Leandro Luiz; CARVALHO, Jaqueline. **Solarização no controle da raiz rosada da cebolinha verde**. 2020. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/solarizacao-no-controle-da-raiz-rosada-da-cebolinhaverde/>. Acesso em: 15 nov. 2024

MARCUZZO, Leandro Luiz; SCHMOELLER, Josué. Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 161-163, jun. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/167306>.

MAZZUCO, Vinicius Rodrigo; TORRES JÚNIOR, Cláudio Da Cunha; BOTELHO, Glória Regina. Fluorescent *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. for phosphate solubilization and growth promotion of garlic. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 53, p. e75301, 2023. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632023v5375301>.

MELO, Itamar Soares de; AZEVEDO, João Lucio de. Ecologia microbiana. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 1998. 488 p. Disponível em: <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00064430.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2024.

OLIVEIRA, Ana Paula Cristina de; MARTINS, Karla Vilaça. Produção e qualidade de alho nobre submetido a diferentes períodos de pré-câmara. **Revista Cerrado Agrociências**, Patos de Minas, v. 12, p. 86-93, dez. 2022. Anual.

PARREÑO, Ricardo; RODRÍGUEZ-ALCOCER, Eva; MARTÍNEZ-GUARDIOLA, César; CARRASCO, Lucía; CASTILLO, Purificación; ARBONA, Vicent; JOVER-GIL, Sara; CANDELA, Héctor. Turning Garlic into a Modern Crop: state of the art and perspectives. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1212, 7 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12061212>.

RATON, T. Orberá; PORTUONDO, I. Pérez; SALAS, D. Ferrer; RAMOS, N. Cortés; GIRO, Z. González. Aislamiento de cepas del género *Bacillus* sp. Com potencialidades para a bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. **Revista Cubana de Química**, v. 17, pág. 189-195, 2005. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543685078>

REIS, Ailton.; OLIVEIRA, Valter Rodrigues; LOURENÇO JÚNIOR, Valdir. Raiz rosada. Revista Cultivar HF. Jun./Jul. 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/151029/1/digitalizar0122.pdf>

RESENDE, Francisco Vilela; HABER, Lenita Lima; PINHEIRO, Jadir Borges; LOURENÇO JUNIOR, Valdir; LIMA, Mirtes Freitas; MICHEREFF FILHO, Miguel; MALDONATE, Iriani Rodrigues. Sistema de produção alho: Cultivares. EMBRAPA Hortaliças. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalicas/alho/cultivares>. Acesso em: 4 ago. 2024.

RESENDE, Juliano Tadeu V de; MORALES, Rafael Gustavo F; ZANIN, Daniel s; RESENDE, Francisco V; PAULA, Juliana T de; DIAS, Diego M; GALVÃO, Alexandre G. Caracterização morfológica, produtividade e rendimento comercial de cultivares de alho. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 157-162, mar. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-05362013000100025>

RIVERA-MÉNDEZ, William; BRENES-MADRIZ, Jaime; ALVARADO-MARCHENA, Luis. Effect of *Setophoma terrestris*, *Sclerotium cepivorum*, and *Trichoderma* spp. on in vitro onion (*Allium cepa*) root tissues and the final yield at the field. **European Journal Of Plant Pathology**, v. 160, n. 1, p. 53-65, 3 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-021-02220-z>.

SANTOYO, Gustavo; URTIS-FLORES, Carlos Alberto; LOEZA-LARA, Pedro Damián; OROZCO-MOSQUEDA, Ma. del Carmen; GLICK, Bernard R.. Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). **Biology**, v. 10, n. 6, p. 475, 27 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology10060475>.

SHARMA, Dilip Kumar. *Estratégias para o manejo de doenças pós-colheita da cebola*. **Asian Journal of Research in Botany**, V. 6 n.2. p. 279-300, 2023.

SILVA, Daniela Martins; MEDEIROS, Maráina Souza.; CARDOSO, Alessandra Timóteo; GOULART, Simone Machado; SANTOS, João Paulo Victorino; GOULART, Adilson Correia. Microbacia do ribeirão Santa Maria: Diagnóstico ambiental e análise de carbofurano em água superficial. Revista Ifes Ciência, v. 9, n. 1, p. 01-12, 2023. DOI: 10.36524/ric.v9i1.2105. Disponível em: <https://ojs.ifes.edu.br/index.php/ric/article/view/2105>. Acesso em: 12 fev. 2025.

SO, Timothée Kouassi Agbo; ABDU, Rabiou; SANI, Idi Saidou; TOUDOU, Abdoul Karim; BAKASSO, Yacoubou. Garlic (*Allium sativum* L.): overview on its biology and genetic markers available for the analysis of its diversity in west africa. **Asian Journal Of Biochemistry, Genetics And Molecular Biology**, p. 1-10, 23 mar. 2021. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/ajbgmb/2021/v7i330173>.

SOUZA, Rovilson José; MACÊDO, Fábio Silva. **Cultura do alho: tecnologias modernas de produção**. Editora UFLA, p. 181, 2009.

TSOTETSI, Teboho; NEPHALI, Lerato; MALEBE, Motumiseng; TUGIZIMANA, Fidele. *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: what have we learned?. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2482, 22 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants11192482>.

VALDÉS-SANTIAGO, Laura; VARGAS-BERNAL, Rafael; HERRERA-PÉREZ, Gabriel; COLLI-MULL, Juan G.; ORDAZ-ARIAS, Ayabeth. Application of Two-Photon Microscopy to Study *Sclerotium cepivorum* Berk Sclerotia Isolated from Naturally Infested Soil and Produced In Vitro. **Current Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 749-755, 9 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-020-02341-4>.

WORDELL FILHO, João Américo; ROWER, Ernildo; GONÇALVES, Paulo Antonio de Souza; DEBARBA, João Favorito; BOFF, pedro; THOMAZELLI, Lucio Francisco. **Manejo fitossanitário na cultura da cebola**. Florianópolis: Epagri, 2006. 226p.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de isolados de *Bacillus* no controle dos fungos fitopatogênicos *Stromatinia cepivora* e *Setophoma terrestris* e de promoção de crescimento em alho.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade dos isolados bacterianos de solubilizar ferro e alumínio em condições controladas.
- Determinar a atividades enzimáticas para quitinase e celulase em diferentes isolados bacterianos *in vitro*.
- Analisar a produção de antibióticos, como fenazinas, e seu potencial antimicrobiano contra *Setophoma terrestris* e *Stromatinia cepivora*.
- Avaliar a micropropagação do alho para potencial estudo dos isolados bacterianos no controle biológico de fungos fitopatogênicos.
- Averiguar o desempenho de isolados bacterianos para controle biológico da *Stromatinia cepivora* e promoção de crescimento de alho submetidos a casa de vegetação.
- Desenvolver metodologia de controle biológico utilizando a técnica de micropropagação.

## SEÇÃO I - Mecanismos bioativos de *Bacillus* spp.

### RESUMO

Os *Bacillus* spp. desempenham um papel essencial na agricultura sustentável, atuando na solubilização de nutrientes, produção de enzimas e antibióticos. No presente trabalho, estudou-se a presença de mecanismos promotores de crescimento de plantas como a solubilização de fosfatos de ferro e alumínio, a produção de quitinase e celulase, antibióticos a síntese de antibióticos e a atividade antagonista contra *Setophoma terrestris* e *Stromatinia cepivora*. Dois isolados selecionados, estudou-se a curva de crescimento em meio de cultivo. Um total de 27 isolados de *Bacillus* spp. foram utilizados nos testes conduzidos neste estudo. Para avaliar a solubilização de fosfatos de ferro e alumínio foi utilizado meio específico. A produção de quitinase e celulase foi avaliada por meio seletivo, em que a única fonte de carbono foi a quitina e o CMC respectivamente. Avaliou-se produção de antibióticos e atividade antagonista dos extratos celulares dos isolados selecionados aos fitopatógenos. Os resultados mostraram que apenas isolado o EB13 foi capaz de solubilizar fosfatos de ferro e dezessete (63%) dos isolados foram capazes de solubilizar o fosfato de alumínio. Todos os isolados produziram quitinase e celulase, exceto EB14 que não apresentou esta última. Os isolados selecionados EB13 e EB18 produziram compostos antimicrobianos reconhecidos como fenazina e o extrato de EB13 controlou 16,70% do crescimento de *S. terrestris in vitro*. As curvas de crescimentos mostraram que o isolado EB18 apresentou o pico da fase exponencial após 12h de inoculação ( $10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>) e o isolado EB13 atingiu após 24h ( $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>). Os resultados indicaram que a maioria dos isolados de *Bacillus* spp. estudados apresentou capacidade de solubilização de AlPO<sub>4</sub> e produção das enzimas hidrolíticas, especialmente os isolados selecionados, escolhidos com base nas análises anteriores e presentes nesse estudo. O isolado EB13 como único a solubilizar FePO<sub>4</sub> e o EB18 por apresentar solubilização de CaPO<sub>4</sub>, sugerem potencial de estímulo ao crescimento de plantas.

**Palavras-chave:** Antibiose, Biofertilizantes, Rizobactérias, Controle Biológico, Mecanismos.

## ABSTRACT

*Bacillus* spp. play an essential role in sustainable agriculture, acting in nutrient solubilization and enzyme and antibiotic production. This study investigated the presence of plant growth-promoting mechanisms, such as iron and aluminum phosphate solubilization, chitinase and cellulase production, antibiotic synthesis, and antagonistic activity against *Setophoma terrestris* and *Stromatinia cepivora*. Two selected isolates had their growth curves studied in culture medium. A total of 27 *Bacillus* spp. isolates were used in the tests conducted in this study. A specific medium was used to evaluate iron and aluminum phosphate solubilization. Chitinase and cellulase production were assessed using a selective medium, in which the sole carbon sources were chitin and CMC, respectively. Antibiotic production and antagonistic activity of cell extracts from the selected isolates against phytopathogens were evaluated. The results showed that only isolate EB13 was able to solubilize iron phosphates, and seventeen (63%) of the isolates were able to solubilize aluminum phosphate. All isolates produced chitinase and cellulase, except EB14, which did not produce the latter. The selected isolates EB13 and EB18 produced antimicrobial compounds recognized as phenazine, and the EB13 extract controlled 16.70% of the growth of *S. terrestris in vitro*. The growth curves showed that isolate EB18 presented the peak of the exponential phase after 12 h of inoculation ( $107 \text{ CFU. mL}^{-1}$ ), and isolate EB13 reached it after 24 h ( $108 \text{ CFU. mL}^{-1}$ ). The results indicated that most of the *Bacillus* spp. isolates studied showed the ability to solubilize  $\text{AlPO}_4$  and produce hydrolytic enzymes, especially the selected isolates, chosen based on previous analyses and those present in this study. Isolate EB13, as the only one to solubilize  $\text{FePO}_4$ , and EB18, due to its ability to solubilize  $\text{CaPO}_4$ , suggest potential for stimulating plant growth.

**Keywords:** Antibiosis, Biofertilizers, Rhizobacteria, Biological Control, Mechanisms.

## 1 INTRODUÇÃO

As rizobactérias são um grupo de microrganismos com potencial de colonizar o sistema radicular de plantas e sua rizosfera (Dias; Santos, 2022). Essas possuem diversos mecanismos que estimulam e protegem as plantas (Silva *et al.*, 2020), e entre as mais estudadas encontram-se as pertencentes ao gênero *Bacillus*. Esses microrganismos podem produzir substâncias estimuladoras ao crescimento das plantas, além de mecanismos antagônicos a fitopatógenos que afetam o crescimento e desenvolvimento das culturas (Chagas Junior *et al.*, 2021; Chaudhary *et al.*, 2024).

*Bacillus spp.* são bactérias gram-positivas, bastonetes e móveis no solo, que possuem um mecanismo de resistência a diversos fatores ambientais que é a capacidade de formar endósporos (Cheng *et al.*, 2019). Com isso, apresentam grande vantagem para formulação de inoculantes comerciais, com viabilidade mais prolongada e capacidade de se manter por mais tempo no solo (Mattei *et al.*, 2022). Produzem metabólitos diversos, tais como antibióticos, sideróforos, lipopolissacarídeos (LPS), solubilização de minerais e enzimas hidrolíticas (Rais *et al.*, 2017). Esses metabólitos são importantes para o desenvolvimento das plantas quando aplicados na agricultura, em virtude de diversos mecanismos que agem na planta de forma direta, como a fixação biológica do nitrogênio (Tsotetsi *et al.*, 2022), a biossíntese de fitohormônios (Poveda; González-Andrés, 2021), a captação de certos nutrientes do solo, tais como a solubilização do fósforo (Liang *et al.*, 2020; Naik *et al.*, 2019).

No geral, as rizobactérias solubilizam o fósforo por meio de três vias principais: acidificação (redução do pH), quelação (ligação com cátions) e processos enzimáticos (hidrólise de compostos orgânicos) (Billah *et al.*, 2019). Esses mecanismos não apenas aumentam a disponibilidade de fósforo, mas também contribuem para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Kour *et al.*, 2021). A agricultura atual é dependente da aplicação de fósforo (P), sendo necessário reduzir a dependência de fosfatos solúveis e com baixo efeito residual (Shanmugavel *et al.*, 2023). O uso permanente de fertilizantes minerais, promove o excesso e desbalanço de nutrientes no solo, tais como o P, o N, e o K levando à alteração da microbiota do solo e danos ao ecossistema (Pahalvi *et al.*, 2021).

A promoção de crescimento de forma indireta ocorre por diversos meios do controle de fitopatógenos e/ou pela indução de resistência sistêmica na planta (Dimkić *et al.*, 2022). A liberação de compostos orgânicos pelas plantas favorece a atividade microbiana que por sua vez, podem produzir enzimas, tais como as quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases que degradam

parede celular das células dos fitopatógenos (Rathore; Gupta, 2015), ou estimulam a produção de antibióticos (Miljaković; Marinković; Balelević-Tubić, 2020).

Algumas espécies de *Bacillus spp.* são eficazes em sintetizar as enzimas hidrolíticas (quitinase, celulase, glucanase e protease) sob várias condições ambientais, o que as qualifica como opções viáveis para estratégias de biocontrole (Martínez-Zavala *et al.*, 2020; Dimkić *et al.*, 2022). A produção de quitinases decorre com objetivo de degradar a quitina, presente na parede celular de fungos, para utilizar como fonte de energia, reciclagem de carbono e nitrogênio pelas bactérias (Choi *et al.*, 2004). Outro mecanismo importante dos *Bacillus spp.* é a capacidade de produzir mais de 167 tipos de antibióticos (Stoica *et al.*, 2019). Dentre eles a surfactina, bacitracina e iturinas são os mais comuns (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011). Alguns autores relataram que *Bacillus spp.* produziram fenazina, como um composto secundário (Padaria *et al.*, 2016). Esse grupo de antibiótico é importante para o controle de diversos fitopatógenos (Zeng *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2021). Contudo, os relatos de ocorrência de fenazinas são mais comuns em espécies do gênero *Pseudomonas* (Liu *et al.*, 2022).

Neste sentido, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) é uma alternativa promissora para incrementar a eficiência das plantas na absorção de nutrientes e/ou na redução de uso de fungicidas. Os testes *in vitro* são indispensáveis para conhecer as capacidades dos microrganismos. Assim, com o presente trabalho, o objetivo foi identificar mecanismos direto e indireto de promoção de crescimento de plantas, especialmente com potencial de controle biológico de doenças do alho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Bacillus* spp. utilizados neste trabalho, pertencem à coleção de bactérias do Laboratório de Microrganismos Promotores de Crescimento de Planta (LMPCP), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Curitibanos/SC. Esses isolados foram obtidos por Botelho e Leôncio (2017) a partir de amostras de solo e rizosfera de lavouras de alho na fazenda Dias, em Curitibanos/SC. Posteriormente foram submetidos a testes para caracterização fenotípica e avaliação do potencial de crescimento vegetal.

Alguns isolados já foram testados em trabalhos anteriores, no qual os mesmos mostraram potencial de inibir dois fitopatógenos (*S. cepivora* e *S. terrestris*) e alguns mecanismos de promoção de crescimento, sendo eles: AIA, solubilização de cálcio, urease e protease (Faquin, 2022; Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020).

### 2.1 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FERRO/ALUMÍNIO *in vitro*

Para o teste de solubilização de fosfato de ferro foi utilizada a metodologia descrita Silva Filho e Vidor (2001), no qual o meio é composto por 10 g de glicose; 2 g de extrato de levedura; 5 g de  $K_2HPO_4$ ; 100 mL de solução de  $FePO_4$  (4,33 g); 5 mL do corante azul de bromotimol para melhor visualização do halo e verificação a alteração do pH, caso ocorra e 18 g de ágar. O pH foi calibrado para 6,5, e a solução de  $FePO_4$  foi autoclavada separadamente antes de adicionar ao meio para posteriormente ser vertido em placas de petri.

Para a avaliação da solubilização do fosfato de alumínio foi utilizado o meio contendo 10 g de manitol, 2 g de extrato de levedura, 6 g de  $K_2HPO_4$ , 100 mL de solução  $AlCl_3$  (5,34 g), 5 ml do corante verde bromocresol e 18 g de ágar (Hara; Oliveira, 2004). O pH desse meio foi corrigido para 4,5. A solução de  $AlCl_3$  foi autoclavada separadamente antes de ser acrescida ao meio.

Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido, e incubados por 24 horas em 27 °C. Após o crescimento, os isolados foram adicionados em quatro pontos equidistantes da placa de Petri, com o auxílio de uma pipeta volumétrica (50 µL). Foram efetuadas seis repetições por isolado e as medidas foram realizadas em intervalos de 72 horas por 12 dias, começando com 144 horas (6 dias), foi avaliado a presença de crescimento bacteriano e o diâmetro do halo de solubilização ao redor da colônia bacteriana. O índice de solubilização foi descrito por Chagas Junior *et al.* (2010), sendo:

$$IS = \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro da Colônia (mm)}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como isolados com baixa ( $IS < 2$ ), média ( $2 \leq IS < 4$ ) e alta ( $IS > 4$ ) capacidade de solubilização conforme descrito por Hara e Oliveira (2004).

Os resultados foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA-*One Way*) com o objetivo de avaliar se havia diferenças entre os isolados. A normalidade dos resíduos foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. O pressuposto de homogeneidade de variância foi avaliado por meio do teste de Bartlett.

No post hoc, foram realizados procedimentos de *bootstrapping* (1000 re-amostragens; 95% IC BCa) para se obter uma maior confiabilidade dos resultados, para corrigir desvios de normalidade e homocedasticidade da distribuição dos resíduos da amostra e, também, para apresentar um intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as médias (Haukoos & Lewis, 2005).

## 2.2 PRESENÇA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: quitinase e celulase

A produção de quitinase ocorreu por meio de cultivo adaptado descrito por Yamaguchi (2003) retirando as fontes de carbono (extrato de levedura e tripton). O meio foi composto por 1,5% de quitina; 0,12% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,28% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,4% de  $\text{MgSO}_4$  e 1,5% de ágar. Para o teste de celulase, foi utilizado o meio de cultivo descrito por Apun, Jong e Salleh (2000), contendo por 0,5% de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,1% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5% de carboximetilcelulose de sódio (CMC) e 2% de ágar.

As aplicações dos testes foram as mesmas utilizadas nos testes de fosfatos. As avaliações das enzimas hidrolíticas foram realizadas através de análises quantitativas, se houve crescimento ou não dos isolados bacterianos após 48 horas da aplicação do teste.

## 2.3 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO DOS ISOLADOS SELECIONADOS

### 2.3.1 Seleção dos isolados

Os isolados EB13 e EB18 foram selecionados para prosseguir com os demais testes, com base em estudos anteriores e com os testes realizados até então. Dentre os cinco isolados que apresentaram grau de inibição dos fitopatógenos *S. cepivora* e *S. terrestris*, o isolado EB13

foi o único capaz de solubilizar fosfato de ferro. Porém o EB18, apresenta solubilização de fosfato de cálcio e de alumínio, além de ser o isolado com maior grau de inibição do *S. cepivora in vitro* (Tabela 1).

Além disso, os isolados apresentam alguns mecanismos diferentes como o EB13 produz lipase e o EB18 a urease, ambos apresentam capacidade de produzir quitinase e celulase, mecanismos importantes para controle de fitopatógenos. Ambos os isolados se mostraram positivos para promoção de crescimento de plantas e inibidoras de fitopatógenos.

**Tabela 1-** Análises quantitativas e qualitativas para seleção de isolados de *Bacillus*

Testes	EB13	EB18	Referências
<b>Testes Quantitativos</b>			
CaPO <sub>4</sub> (*)	0,00	0,87	Balbinot, Rodrigues, Botelho (2020)
FePO <sub>4</sub> (*)	0,26	0,00	Atual trabalho (seção 1/ Item 3.1)
AlPO <sub>4</sub> (*)	0,22	0,24	Atual trabalho (seção 1/ Item 3.1)
AIA (**)	6,36	13,01	Balbinot, Rodrigues, Botelho (2020)
<i>S. cepivora</i> (***)	12,96	27,44	Balbinot, Rodrigues, Botelho (2020)
<i>S. terrestris</i> (***)	23,81	21,85	Faquin (2022)
<b>Testes Qualitativos</b>			
Urease	-	+	Balbinot, Rodrigues, Botelho (2020)
Lipase	+	-	Balbinot, Rodrigues, Botelho (2020)
Quitinase	+	+	Atual trabalho (seção 1/ Item 3.2)
Celulase	+	+	Atual trabalho (seção 1/ Item 3.2)

**Fonte:** Elaborada pela autora (2025)

(\*)IS = Índice de solubilização

(\*\*)  $\mu\text{g mL}^{-1}$

(\*\*\*) GI (%) = Grau de inibição do patógeno

- Não apresenta os mecanismos testado

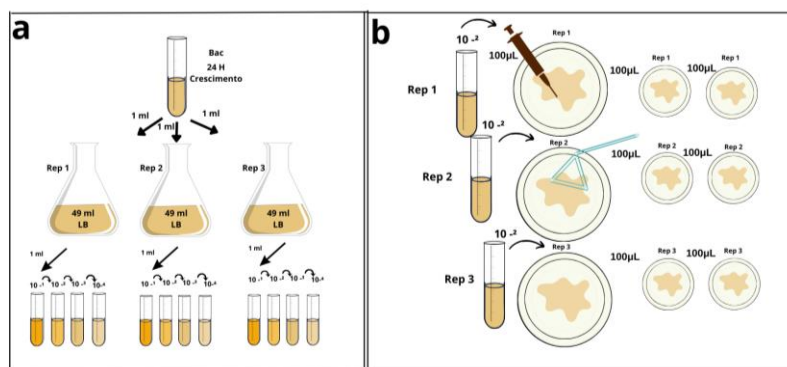
+ Apresenta o mecanismo testado

### 2.3.2 Curva de crescimento

No primeiro momento, os isolados EB13 e EB18 foram repicados em meio LB líquido em tubos de ensaio estéril, e incubados a 27 °C por 24 horas. Após esse período foi retirado

uma alíquota de 1 mL da cultura bacteriana crescida em cada um dos respectivos tubos de ensaio, e adicionado em 49 mL de meio LB líquido estéril e homogeneizado. Esse processo foi realizado em três erlenmeyers separados (três repetições) (Figura 3a).

**Figura 3-** Esquema de diluição seriada para realização da curva de crescimento (1a) Diluição seriada (1b) plaqueamento para realizar a quantificação das unidades formadora de colônia (UFC)



Fonte: Autora (2022)

Para definição da dinâmica de crescimento foram realizadas diluições seriadas (solução salina a 0,9%) nos respectivos horários: 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h. Em cada período, foi retirada uma alíquota de 1 mL para realização da diluição seriada ( $10^{-6}$ ). Da diluição seriada foram retirados 100 µL para quantificação das UFC (Unidades Formadoras de Colônia) através do plaqueamento em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) (Figura 3b). As placas foram mantidas por 24 h a 27 °C e posteriormente, realizadas as quantificações. Este procedimento foi realizado a cada período da análise.

Para realização da plotagem da curva de crescimento dos isolados, foi utilizado o software Excel versão 2411. Os dados do crescimento bacteriano (UFC/mL) foram transformados em logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) por se tratar de uma prática comum na determinação de curva de crescimento bacteriano. Facilitando a interpretação dos dados.

## 2.4 PRODUÇÃO DE EXTRATO CELULAR E QUANTIFICAÇÃO DE FENAZINAS POR ISOLADOS *Bacillus* spp.

Para verificar a produção de antibióticos dos isolados EB13 e EB18, os microrganismos foram submetidos ao cultivo para a preparação dos extratos das células, seguido de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizada no

Laboratório Multiusuário de Análise Instrumental (LAMAI), no Centro de Ciências Rurais (CCR), em Curitiba.

Para o cultivo, as bactérias foram repicadas previamente em 5 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido por 24 horas a 27 °C. Passado esse período, o cultivo bacteriano foi adicionado em 95 mL de meio LB líquido e posteriormente incubado na estufa a 27 °C por 6 dias. Após este período, as células bacterianas foram separadas do caldo de crescimento por decantação em centrífuga a 3000 rpm por 60 minutos.

Para a obtenção dos extratos brutos das células peletizadas, 5 mL de etanol (absoluto) foram adicionados ao material celular centrifugado. Em seguida, a suspensão celular foi submetida à extração em sonicador (Lucadema, SSBu - 3,8 L, 42 Hz[CS1] ) por 5 minutos (Nunes, 2014). Subsequentemente, o material passou centrifugação por 30 min a 3000 rpm para a decantação das células e separação do sobrenadante. Esse processo passou por três repetições. Os sobrenadantes foram reunidos e o solvente foi evaporado para a obtenção do extrato bruto das células bacterianas (ECB).

Após esses procedimentos, os extratos foram pesados e levados para a cromatografia líquida de alta eficiência para identificar se as bactérias produzem algum tipo de antibióticos. Para as análises no HPLC, foi adquirido o padrão fenazina com o intuito de tentar quantificar o teor total de fenazinas nas amostras, no entanto foi apenas utilizado o pico de absorção de 247 nm. As avaliações pertencem à quantificação de antibióticos do grupo das fenazinas presente no extrato celular dos isolados (Shanmugiah; Mathivanan; Varghese, 2010).

#### **2.4.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

As amostras de extrato EB13 (35,2 mg) e EB18 (31,8 mg) foram dissolvidas em uma mistura de acetonitrila, água e metanol com 0,2% de ácido fórmico, todos com grau de pureza HPLC, até chegar na concentração de 17,6 g L<sup>-1</sup>. Essas soluções foram então diluídas em H<sub>2</sub>O para 100 mg.L<sup>-1</sup> para análise no HPLC. Estas amostras foram analisadas quanto à composição de fenazinas usando um equipamento de HPLC (Agilent 1260, Agilent Technologies) acoplado a uma coluna de fase reversa (HPLC Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm) e detector por arranjo de diodos (DAD).

As amostras foram filtradas (0,45 µm, filtros de seringa de nylon, 15 mm, tecnologias Agilent, Alemanha) antes da injeção. O sistema de solvente utilizado foi baseado em 0,2% de ácido fórmico em água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) e 0,2% de ácido fórmico em Acetonitrila puro (grau HPLC, Merck,

Darmstadt, Alemanha) como fase A e B, respectivamente. Para a separação cromatográfica foi utilizado 100% de A por 2 min, seguido de aumento gradativo do solvente B para 100% até o tempo de 20 min. O fluxo de solvente B foi mantido em 100% por mais 3 min e em seguida retornou a 0% em 2 min. O solvente A foi mantido à 100% por 3 min para equilíbrio antes de iniciar a próxima análise. O tempo total de análise foi de 28 min. O fluxo de solvente foi mantido em  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  durante toda a análise, o volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$  e a temperatura do compartimento da coluna foi de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os picos foram monitorados no pico de absorção máxima do composto fenazina, 247 nm, para avaliar a presença de compostos pertencente à classe das fenazinas. Os picos com espectro UV/VIS semelhantes ao da fenazina foram integrados utilizando software Agilent OpenLAB CDS (EZChrom Edition), versão A.04.03, os quais foram expressos em área absoluta do pico.

#### **2.4.2 Bioensaio com o extrato celular dos isolados *Bacillus***

Ao obter o extrato das células bacterianas, foi realizado o teste de antibiose com os fungos *Stromatinia cepivora* e *Setophoma terrestris*.

Realizou-se o crescimento dos fungos em placa de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar). O fungo *S. cepivora* foi acrescido a  $19 \text{ }^\circ\text{C}$  e o *S. terrestris* foi incubado a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias com fotoperíodo de 12/12 horas. Em seguida, adicionou-se um disco de 5 mm de diâmetro do fungo crescido previamente no centro das placas de Petri. Passando 24 horas da repicagem do fungo, foi adicionada uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão do extrato das células bacterianas, no qual foram suspensas em solução contendo 50% de água destilada e 50% de etanol 99,9%. A concentração dos extratos obtidas foram de 24,4 mg/L.

As suspensões bacterianas e o controle foram adicionados em três pontos equidistantes da placa de Petri com o fungo, sendo o primeiro com solução 50 % de água destilada e 50 % de etanol 99,9 %, segundo com extrato celular EB13 e o terceiro ponto com o extrato celular EB18. Todas as placas foram incubadas em BOD conforme a temperatura ótima para o desenvolvimento de cada fungo.

As avaliações foram feitas a cada 24 horas por um período de quatro dias, nas quais apresentaram halos de inibição. Para os isolados que apresentaram halo de inibição ao fungo, foram submetidas a medições dos halos de inibição (mm), com auxílio de uma régua milimetrada. Com isso foi possível calcular o grau de inibição, conforme descrito por Balbinot, Rodrigues e Botelho (2020):

$$GI = \left[ \frac{\left( \frac{Dtf - Dcf}{Dtf} \right)}{HI} \right] \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que:

Dtf= Diferença entre o desenvolvimento do fungo na placa sem a presença do controle (bactéria);

Dcf=Diferença entre o desenvolvimento do fungo na placa com a presença do controle (bactéria);

Hi = Halo de Inibição, descontando o tamanho da colônia bacteriana;

O experimento foi conduzido em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizados) com cinco repetições para cada extrato celular dos isolados. Foi realizada uma análise de variância de uma via (ANOVA-*One Way*) com o objetivo de avaliar se havia diferenças no grau de inibição dos fungos utilizando os extratos celulares dos isolados bacterianos. A normalidade dos resíduos foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. O pressuposto de homogeneidade de variância foi avaliado por meio do teste de Bartlett.

No pos hoc, foram realizados procedimentos de *bootstrapping* (1000 re-amostragens; 95% IC BCa) para se obter uma maior confiabilidade dos resultados, para corrigir desvios de normalidade e homocedasticidade da distribuição dos resíduos da amostra e, também, para apresentar um intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as médias (Haukoos & Lewis, 2005).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FERRO/ALUMÍNIO

Os resultados do teste de Shapiro-Wilk ( $W = 0,22$ ,  $p < 0,01$ ) e teste de Bartlett ( $K^2(26) = \text{Inf}$ ,  $p < 0,01$ ) sugeriram ausência de normalidade e de homogeneidade de variância, respectivamente para a solubilização de fosfato de ferro. Os resultados descritivos dos índices de solubilização encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2-** Mecanismos de promoção de crescimento direto de plantas por isolados de *Bacillus* spp.

<b>Isolados</b>	<b>IS de FePO<sub>4</sub></b>	<b>IS de AlPO<sub>4</sub></b>
<b>EB01</b>	0,00	0,26
<b>EB02</b>	0,00	0,22
<b>EB03</b>	0,00	0,23
<b>EB04</b>	0,00	0,26
<b>EB05</b>	0,00	0,27
<b>EB06</b>	0,00	0,27
<b>EB07</b>	0,00	0,27
<b>EB08</b>	0,00	0,27
<b>EB09</b>	0,00	0,29
<b>EB10</b>	0,00	0,24
<b>EB11</b>	0,00	0,26
<b>EB12</b>	0,00	0,00
<b>EB13</b>	0,26	0,22
<b>EB14</b>	0,00	0,00
<b>EB15</b>	0,00	0,00
<b>EB16</b>	0,00	0,00
<b>EB17</b>	0,00	0,00
<b>EB18</b>	0,00	0,24
<b>EB19</b>	0,00	0,29
<b>EB20</b>	0,00	0,22
<b>EB21</b>	0,00	0,00
<b>EB22</b>	0,00	0,00
<b>EB23</b>	0,00	0,00
<b>EB24</b>	0,00	0,00
<b>EB25</b>	0,00	0,00
<b>EB26</b>	0,00	0,27
<b>EB27</b>	0,00	0,22

IS - Índice de Solubilização

**Fonte:** Elaborada pela autora (2025)

Os resultados da ANOVA demonstraram que havia diferenças entre os grupos [ $F(26, 135) = 74,11, p < 0,01; \omega^2 = 0.92$ ]. As diferenças encontradas entre os isolados seguem na Tabela 3. Destacando que apenas o isolado EB13 mostrou halo de solubilização, apresentando, IS (Índice de Solubilização) de 0,26 (Tabela 2). Os demais isolados não apresentaram crescimento no meio específico (Figura 4a), e o mesmo se diferiu dos demais de acordo com o teste post-hoc. O resultado completo do teste encontra-se detalhado no

Apêndice A. De acordo com Hara e Oliveira (2004), o isolado EB13 apresentou baixa capacidade de solubilização do fosfato de ferro.

**Tabela 3-** Teste post-hoc com Bootstrapping (95% IC Bca) para índice de solubilização (IS) de fosfato de ferro dos isolados de *Bacillus* spp.

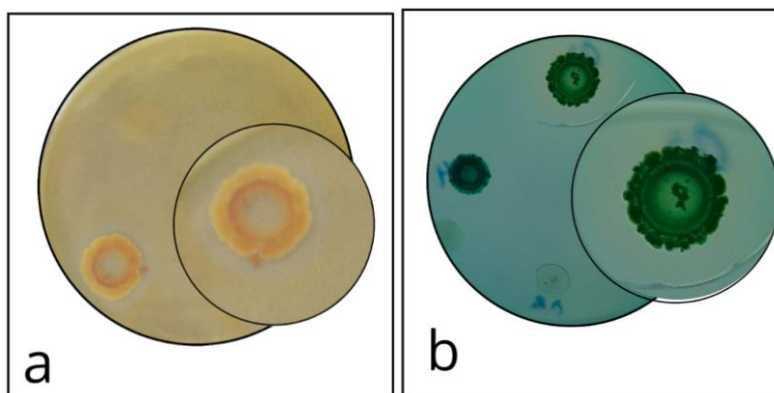
Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB01	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB02	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB03	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB04	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB05	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB06	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB07	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB08	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB09	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB10	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB11	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB12	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB13	EB14	0,26	0,19	0,32
	EB15	0,26	0,19	0,32
	EB16	0,26	0,19	0,32
	EB17	0,26	0,19	0,32
	EB18	0,26	0,19	0,32
	EB19	0,26	0,19	0,32
	EB20	0,26	0,19	0,32
	EB21	0,26	0,19	0,32
	EB22	0,26	0,19	0,32
	EB23	0,26	0,19	0,32
	EB24	0,26	0,19	0,32
	EB25	0,26	0,19	0,32
	EB26	0,26	0,19	0,32
	EB27	0,26	0,19	0,32

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

IC 95% BCa = Intervalo de Confiança de 95% calculado pelo método bootstrap com correção de viés e aceleração (Bias-Corrected and Accelerated).

Valores seguidos por sinais iguais (Limite superior e inferior) diferem significativamente entre si.

**Figura 4-** Solubilização de fosfatos em meio sólido. (a) Solubilização de fosfato de ferro, evidenciada pelo crescimento bacteriano e formação de halo ao redor da colônia. (b) Solubilização de fosfato de alumínio, observada pelo crescimento bacteriano e presença do halo



Fonte: Autora (2025)

Dentre os 27 isolados testados, 63% demonstraram capacidade de solubilizar fosfato de alumínio *in vitro* (Figura 4b), apresentando IS variando de 0,22 a 0,29, respectivamente (Tabela 2). Os resultados do teste de Shapiro-Wilk ( $W = 0,94, p < 0,01$ ) e teste de Bartlett ( $K^2 (26) = \text{Inf}, p < 0,01$ ) sugeriram ausência de normalidade e de homogeneidade de variância, respectivamente.

Os resultados da ANOVA demonstraram que havia diferenças entre os grupos [ $F (26, 135) = 50,5, p < 0,01; \omega^2 = 0.89$ ]. As diferenças encontradas entre os isolados seguem na Tabela 4. A análise detalhada foi incluída no Apêndice B, para fins de complementação.

Através da análise, foi possível observar que os isolados EB01, EB02, EB03, EB04, EBO5, EB06, EB07, EB09, EB10, EB11, EB13, EB18, EB19, EB20, EB26 e EB27, diferiram dos isolados que não apresentaram solubilização de fosfato de alumínio. No entanto os isolados EB07, EB09 e EB26 diferiram estatisticamente do isolado EB20, sobressaindo.

Com relação ao índice, os isolados apresentaram uma baixa solubilização ( $IS < 2$ ), de acordo com a classificação de Hara e Oliveira (2004).

**Tabela 4** - Teste post-hoc com Bootstrapping (95% IC Bca) para índice de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de *Bacillus* spp.

Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC Bca)	
			Limite inferior	Limite superior
EB01	EB12	0,26	0,23	0,31
	EB14	0,26	0,23	0,31
	EB15	0,26	0,23	0,31
	EB16	0,26	0,23	0,31
	EB17	0,26	0,23	0,31
	EB21	0,26	0,23	0,31
	EB22	0,26	0,23	0,31
	EB23	0,26	0,23	0,31
	EB24	0,24	0,23	0,31
	EB25	0,24	0,23	0,31
EB02	EB12	0,22	0,18	0,28
	EB14	0,22	0,18	0,28
	EB15	0,22	0,18	0,28
	EB16	0,22	0,18	0,28
	EB17	0,22	0,18	0,28
	EB21	0,22	0,18	0,28
	EB22	0,22	0,18	0,28
	EB23	0,22	0,18	0,28
	EB24	0,22	0,18	0,28
	EB25	0,22	0,18	0,28
EB03	EB12	0,23	0,19	0,27
	EB14	0,23	0,19	0,27
	EB15	0,23	0,19	0,27
	EB16	0,23	0,19	0,27
	EB17	0,23	0,19	0,27
	EB21	0,23	0,19	0,27
	EB22	0,23	0,19	0,27
	EB23	0,23	0,19	0,27
	EB24	0,23	0,19	0,27
	EB25	0,23	0,19	0,27
EB04	EB12	0,26	0,23	0,29
	EB14	0,26	0,23	0,29
	EB15	0,26	0,23	0,29
	EB16	0,26	0,23	0,29
	EB17	0,26	0,23	0,29
	EB21	0,26	0,23	0,29
	EB22	0,26	0,23	0,29
	EB23	0,26	0,23	0,29
	EB24	0,26	0,23	0,29
	EB25	0,26	0,23	0,29

(Continuação)

Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB05	EB12	0,27	0,22	0,33
	EB14	0,27	0,22	0,33
	EB15	0,27	0,22	0,33
	EB16	0,27	0,22	0,33
	EB17	0,27	0,22	0,33
	EB21	0,27	0,22	0,33
	EB22	0,27	0,22	0,33
	EB23	0,27	0,22	0,33
	EB24	0,27	0,22	0,33
	EB25	0,27	0,22	0,33
EB06	EB12	0,26	0,23	0,30
	EB14	0,26	0,23	0,30
	EB15	0,26	0,23	0,30
	EB16	0,26	0,23	0,30
	EB17	0,26	0,23	0,30
	EB21	0,26	0,23	0,30
	EB22	0,26	0,23	0,30
	EB23	0,26	0,23	0,30
	EB24	0,26	0,23	0,30
	EB25	0,26	0,23	0,30
EB07	EB12	0,28	0,24	0,32
	EB14	0,28	0,24	0,32
	EB15	0,28	0,24	0,32
	EB16	0,28	0,24	0,32
	EB17	0,28	0,24	0,32
	EB20	0,06	0,01	0,11
	EB21	0,28	0,24	0,32
	EB22	0,28	0,24	0,32
	EB23	0,28	0,24	0,32
	EB24	0,28	0,24	0,32
	EB25	0,28	0,24	0,32
	EB27	0,06	0,00	0,12
EB08	EB12	0,27	0,20	0,33
	EB14	0,27	0,20	0,33
	EB15	0,27	0,20	0,33
	EB16	0,27	0,20	0,33
	EB17	0,27	0,20	0,33
	EB21	0,27	0,20	0,33
	EB22	0,27	0,20	0,33
	EB23	0,27	0,20	0,33
	EB24	0,27	0,20	0,33
EB25	0,27	0,20	0,33	

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB09	EB12	0,29	0,25	0,33
	EB14	0,29	0,25	0,33
	EB15	0,29	0,25	0,33
	EB16	0,29	0,25	0,33
	EB17	0,29	0,25	0,33
	EB19	0,01	0,02	0,12
	EB20	0,08	0,02	0,12
	EB21	0,29	0,25	0,33
	EB22	0,29	0,25	0,33
	EB23	0,29	0,25	0,33
	EB24	0,29	0,25	0,33
	EB25	0,29	0,25	0,33
	EB10	EB12	0,24	0,19
EB14		0,24	0,19	0,31
EB15		0,24	0,19	0,31
EB16		0,24	0,19	0,31
EB17		0,24	0,19	0,31
EB21		0,24	0,19	0,31
EB22		0,24	0,19	0,31
EB23		0,24	0,19	0,31
EB24		0,24	0,19	0,31
EB25		0,24	0,19	0,31
EB11	EB12	0,26	0,24	0,29
	EB14	0,26	0,24	0,29
	EB15	0,26	0,24	0,29
	EB16	0,26	0,24	0,29
	EB17	0,26	0,24	0,29
	EB21	0,26	0,24	0,29
	EB22	0,26	0,24	0,29
	EB23	0,26	0,24	0,29
	EB24	0,26	0,24	0,29
	EB25	0,26	0,24	0,29
EB12	EB13	-0,22	-0,29	-0,18
	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,19
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB13	EB14	0,22	0,18	0,29
	EB15	0,22	0,18	0,29
	EB16	0,22	0,18	0,29
	EB17	0,22	0,18	0,29

(Continuação)

Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB13	EB21	0,22	0,18	0,29
	EB22	0,22	0,18	0,29
	EB23	0,22	0,18	0,29
	EB24	0,22	0,18	0,29
	EB25	0,22	0,18	0,29
EB14	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB15	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB16	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB26	-0,28	-0,34	-0,23
	EB27	-0,21	-0,26	-0,19
EB17	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB18	EB21	0,24	0,21	0,29
	EB22	0,24	0,21	0,29
	EB23	0,24	0,21	0,29
	EB24	0,24	0,21	0,29
	EB25	0,24	0,21	0,29
EB19	EB21	0,28	0,23	0,34
	EB22	0,28	0,23	0,34
	EB23	0,28	0,23	0,34
	EB24	0,28	0,23	0,34
	EB25	0,28	0,23	0,34
EB20	EB21	0,21	0,19	0,26
	EB22	0,21	0,19	0,26
	EB23	0,21	0,19	0,26
	EB24	0,21	0,19	0,26
	EB25	0,21	0,19	0,26
EB21	EB26	-0,05	-0,08	-0,01
	EB27	-0,27	-0,29	-0,25
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17

Comparações entre grupos		$\Delta M$	(Conclusão)	
			Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB22	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB23	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB24	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB25	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

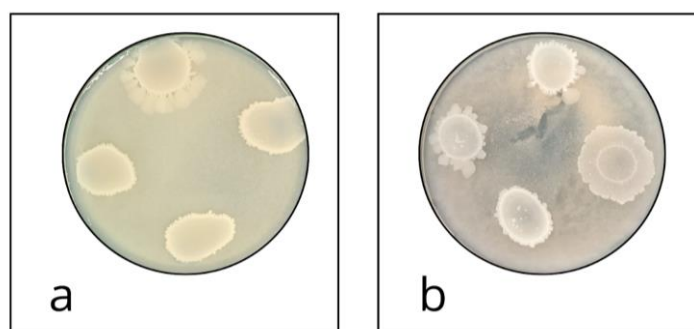
IC 95% BCa = Intervalo de Confiança de 95% calculado pelo método bootstrap com correção de viés e aceleração (Bias-Corrected and Accelerated).

Valores seguidos por sinais iguais (Limite superior e inferior) diferem significativamente entre si.

### 3.2 PRESENÇA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: quitinase e celulase

Todos os isolados demonstraram potencial para a produção da enzima quitinase (Tabela 5), evidenciada pelo crescimento em meio de cultura (Tabela 5, Figura 5a). Além disso, esses isolados apresentaram capacidade de quebra do CMC, demonstrando atividade celulolítica associada ao crescimento bacteriano (Figura 5b), com exceção do isolado EB14 que não apresentou crescimento. Esses mecanismos são importantes para o controle biológico, pois as enzimas quitinase e celulase degradam componentes das paredes celulares de fungos e pseudo-fungos (Riseh *et al.*, 2024; Reddy *et al.*, 2022).

**Figura 5-** Presença de crescimento bacteriano em meio sólido para avaliação de produção de enzimas hidrolíticas (a) Produção de quitinase. (b) Produção de celulase.



**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

**Tabela 5-** Mecanismos de promoção de crescimento indireto de plantas por isolados de *Bacillus* spp.

<b>Isolados</b>	<b>Quitinase</b>	<b>Celulase</b>
<b>EB01</b>	+	+
<b>EB02</b>	+	+
<b>EB03</b>	+	+
<b>EB04</b>	+	+
<b>EB05</b>	+	+
<b>EB06</b>	+	+
<b>EB07</b>	+	+
<b>EB08</b>	+	+
<b>EB09</b>	+	+
<b>EB10</b>	+	+
<b>EB11</b>	+	+
<b>EB12</b>	+	+
<b>EB13</b>	+	+
<b>EB14</b>	+	-
<b>EB15</b>	+	+
<b>EB16</b>	+	+
<b>EB17</b>	+	+
<b>EB18</b>	+	+
<b>EB19</b>	+	+
<b>EB20</b>	+	+
<b>EB21</b>	+	+
<b>EB22</b>	+	+
<b>EB23</b>	+	+
<b>EB24</b>	+	+
<b>EB25</b>	+	+
<b>EB26</b>	+	+
<b>EB27</b>	+	+

**Fonte:** Elaborada pela autora (2025)

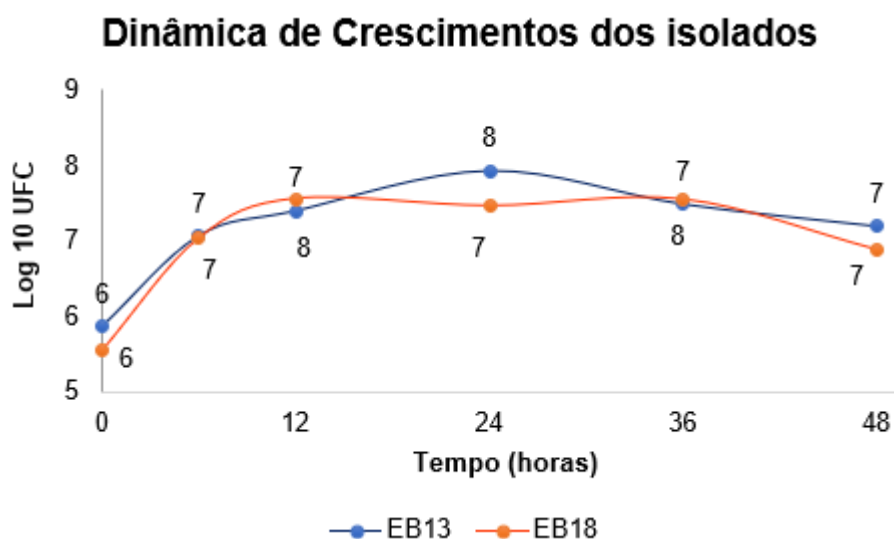
### 3.3 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO DOS ISOLADOS EB13 E EB18

Na Figura 6 estão demonstradas as curvas de crescimento dos isolados selecionados EB13 e EB18. O gráfico foi elaborado com base na população e tempo de incubação. Durante o período de avaliação, no desenvolvimento dos isolados não foi detectada fase lag.

Na primeira avaliação com 6 h de crescimento houve crescimento bacteriano expressivo para ambos os isolados, aumentando em cem vezes o número de células (Figura 6), pois o crescimento, iniciou-se a partir de  $10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup> para ambos os isolados. Esse comportamento, demonstrou que as bactérias, encontravam-se adaptadas rapidamente às condições de cultivo.

O isolado EB13 demonstrou crescimento exponencial por 24 horas. Entretanto, observou-se que entre 6 e 12 h de crescimento ocorreu pequena desaceleração. Após 24 horas, o número de células começou a diminuir, possivelmente por limitação de espaço e de nutrientes, observando-se um declínio entre 36 h a 48 horas. Não foi possível detectar a fase estacionária de forma definida, o que pode ter ocorrido pelo intervalo de tempo entre as análises.

**Figura 6-** Dinâmica de crescimento dos isolados bacterianos de *Bacillus* spp. EB13 e EB18: variação de log<sub>10</sub> UFC em função do tempo



Fonte: Autora (2025)

Entre 12 e 36 h, observou-se estabilização no crescimento do isolado EB18, seguido de redução, após 36 h, pois os recursos de nutrientes começaram a ficar limitados. Por fim,

ocorreu a fase de declínio, com uma redução gradativa das células viáveis, alcançando  $10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup> ao final do experimento.

Os resultados obtidos por ambos isolados mostraram fase exponencial definida. O isolado EB18 apresentou comportamento de crescimento diferente do isolado EB13, por ter um crescimento mais rápido nas primeiras 12h. Entretanto, o EB13 aumentou significativamente o número de células entre 12 e 24 h. Assim, é importante conhecer a dinâmica de cada isolado para padronizar protocolos e assegurar a consistência em usos experimentais.

### 3.4 PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR ISOLADOS *Bacillus* spp.

É conhecido que os microrganismos podem produzir diferentes compostos baseados na estrutura básica da fenazina e estes compostos podem apresentar espectro UV/VIS semelhantes. Os cromatogramas dos dois extratos são muito parecidos, apresentando quatro picos com espectro UV/VIS semelhantes ao da fenazina.

Para ter uma ideia das diferenças nas concentrações de cada pico entre as duas amostras, as áreas absolutas são mostradas na Tabela 6. Os resultados indicam que a concentração desses compostos é sempre maior no extrato EB13. Para a soma total da área absoluta dos compostos derivados da fenazina, foi encontrado o valor de 5.162.456 mAU x min para o EB13 e 1.025.866 para o EB18 o que corresponderia à 5 vezes mais fenazinas no EB13 do que no EB18. As análises realizadas no HPLC são preliminares e exigem confirmação da identidade dos compostos integrados por análise em equipamento Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas (LCMS).

**Tabela 6-** Picos com espectro UV/VIS semelhantes à fenazina integrados no cromatograma obtido por HPLC.

Pontos	TR (min)	Área Absoluta	
		EB13	EB18
1	3,130	1.670.877	785.719
2	3,357	1.308.028	162.335
3	3,900	614.538	370.723
4	4,790	1.569.013	778.012
Total	-	5.162.456	1.025.866

Fonte: Elaborada pela autora (2025)

TR = Tempo de retenção.

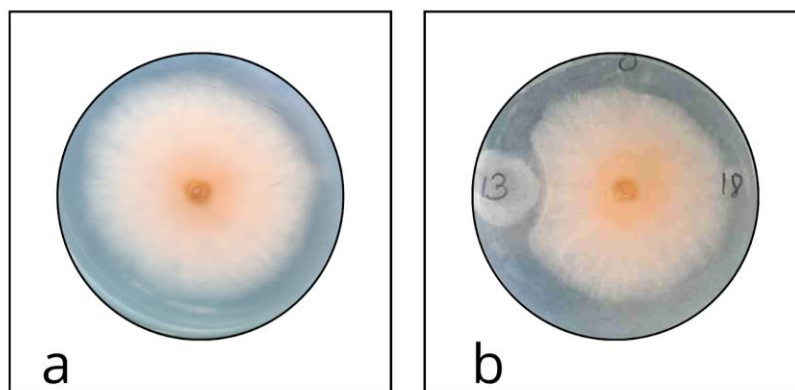
\*Área absoluta calculada pelo software com base na altura (resposta do detector em mAU) e na base (minutos) do pico.

### 3.4.1 Bioensaio com o extrato celular dos isolados *Bacillus*

Os resultados da atividade antagônica nos ensaios *in vitro* demonstraram que o extrato celular do EB13 apresentou potencial de suprimir o crescimento micelial da *S. terrestris*, inibindo 16,70% de sua colônia (Figura 7). O extrato celular apresentou uma massa de 24,4 mg/L. No entanto, o extrato não foi efetivo para inibir o crescimento de *S. cepivora*. O extrato celular do isolado EB18 não foi efetivo para nenhum dos fungos patogênicos (*S. cepivora* e *S. terrestris*).

Os resultados do teste de Shapiro-Wilk ( $W = 0,68$ ,  $p < 0,01$ ) e teste de Bartlett ( $K^2(26) = \text{Inf}$ ,  $p < 0,01$ ) sugeriram ausência de normalidade e de homogeneidade de variância, respectivamente. Os resultados da ANOVA demonstraram que há diferenças entre os grupos [ $F(2, 12) = 15,05$ ,  $p < 0,01$ ;  $\omega^2 = 0.65$ ]. As diferenças encontradas entre os isolados seguem na Tabela 7. Mostrando a eficiência do extrato do isolado EB13.

**Figura 7-** Efeito do extrato celular de isolados bacterianos contra *S.terrestris* em meio BDA. (a) Testemunha: crescimento do fitopatógeno. (b) Aplicação do extrato celular dos isolados EB13 (13), EB18 (18) e da solução controle (0).



Fonte: Autora (2025)

**Tabela 7-** Teste post-hoc com Bootstrapping (95% IC Bca) para a inibição do extrato celular dos isolados EB13 e EB18

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
		Limite inferior	Limite superior
EB13 – EB18	16,70	9,84	25,97
EB13- Testemunha	16,70	9,84	25,97
EB18- Testemunha	0,00	0,00	0,00

Fonte: Elaborada pela autora (2025)

IC 95% BCa = Intervalo de Confiança de 95% calculado pelo método bootstrap com correção de viés e aceleração (Bias-Corrected and Accelerated).

Valores seguidos por sinais iguais (Limite superior e inferior) diferem significativamente entre si.

Embora, o grau de inibição (16,70%) encontrado possa ser considerado uma inibição baixa, o resultado já indica uma atividade antifúngica. Tais dados são relevantes, por se tratar de um fitopatógeno agressivo e não possuir produtos químicos registrados para seu controle. Nesse contexto, os resultados obtidos servem como indicativo do potencial do extrato celular testado e reforçam a necessidade de estudos complementares, visando o aprimoramento das concentrações, a fim de potencializar a eficiência em estudos futuros.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO/ALUMÍNIO POR ISOLADOS DE *Bacillus*

O fósforo é o segundo nutriente essencial para plantas, depois do nitrogênio (Yahaya *et al.*, 2023). No entanto, nem sempre esse macronutriente está disponível no solo. A utilização de microrganismos solubilizadores de P nesse processo é fundamental para que as plantas possam absorver esse nutriente (Billah *et al.*, 2019). O gênero *Bacillus* apresenta a capacidade de solubilizar fosfatos (Rodríguez; Fraga, 1999). A utilização dessas bactérias se torna uma alternativa sustentável ao meio ambiente, no intuito de diminuir a utilização de fertilizantes químicos (Ajmal *et al.*, 2018).

Em estudos anteriores, Balbinot, Rodrigues e Botelho (2020) relataram que 81,5% dos 27 isolados solubilizaram fosfato de cálcio *in vitro*, apresentando índice de solubilização variando de 0,15 e 1,65. No presente estudo, 17 isolados apresentaram solubilização de  $AlPO_4$  e apenas um isolado (EB13) solubilizou o  $FePO_4$  *in vitro*. Aliyat *et al.* (2022) avaliaram capacidade de solubilizar três formas de fosfatos inorgânicos  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $FePO_4$  e  $AlPO_4$ , destacando-se nove linhagens com potencial solubilização *in vitro*. Pradhan *et al.* (2022) testaram cinco bactérias de solo ácido de Odisha *in vitro* e observaram que *B. amyloliquefaciens* CTC12 foi mais eficiente na solubilização de fosfatos de cálcio e ferro. Sugiharto *et al.* (2024) testaram 16 isolados em três fontes diferentes de fosfatos de solubilização *in vitro*, e todos os isolados foram capazes de solubilizar os três diferentes fosfatos inorgânicos em caldo de cultura. Destacou-se a cepa P4, *Priestia megaterium* com a maior solubilização tanto para cálcio, ferro e alumínio. No presente trabalho, nenhum dos isolados avaliados apresentou capacidade de solubilizar em três fontes diferentes de fosfatos.

Wan *et al.* (2020) obtiveram 18 bactérias solubilizadoras de fosfato que possuíam habilidades de utilizar múltiplas fontes de P *in vitro*, sendo seis isolados de *Bacillus* spp. Matos *et al.* (2017) relataram que nenhum dos 40 isolado de bactérias endofíticas de raízes de bananeira apresentaram capacidade de solubilização de P em meio suplementado com fosfato de ferro dos quarenta isolados testados e 67,5% dos isolados avaliados solubilizaram fosfato tricálcico. Resultados similares foram observados no presente trabalho, em que os isolados não mostraram capacidade de solubilizar todos os fosfatos testados.

As plantas só conseguem absorver P em duas formas iônicas solúveis: a monobásica ( $H_2PO_4^-$ ) e a dibásica ( $HPO_4^{2-}$ ) (Awasthi *et al.*, 2011). Apesar disso, grande parte do P no solo

encontra-se em formas insolúveis, como fosfatos de alumínio (Al), ferro (Fe) e cálcio (Ca), ou na forma orgânica, indisponível para as plantas (Pavinato *et al.*, 2020). É nesse contexto que as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) desempenham um papel crucial, solubilizando esses compostos e tornando o P disponível (Silva *et al.*, 2023). Dessa maneira, a inoculação de plantas com RPCP é uma estratégia promissora para o aumento da absorção de P pelas plantas e a utilização de *Bacillus* spp é uma alternativa mais estudada e implementada (Khursheed *et al.*, 2022).

#### 4.2 PRESENÇA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: quitinase e celulase

As enzimas hidrolíticas são agentes de biocontrole e entre essas estão incluídas quitinase, celulase, glucanase e protease, que realizam quebra dos componentes da parede celular alguns microrganismos (Mielich-Süss; Lopez, 2014, Dobrzyński *et al.*, 2023). Essas enzimas são produzidas por diversas bactérias tais como *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Streptomyces*, *Bacillus*, entre outros (Dobrzyński *et al.*, 2022).

Alguns estudos demonstraram o benefício das quitinases produzidas por *Bacillus* contra fitopatógenos (Maral-Gül; Eltem, 2024; Brzezinska *et al.*, 2020; Gomaa, 2012). De acordo com Saber *et al.* (2015), *Bacillus subtilis* ATCC 11774 produtor de quitinase foi eficiente no controle de *Fusarium oxysporum in vitro*. A cepa B25 de *Bacillus* spp. produz protease, glucanase e quitinase, as quais apresentaram grande potencial inibitório a *Fusarium verticillioides* (Douriet-Gámez *et al.*, 2017). Maral-Gül e Eltem (2024) testaram 77 isolados de *Bacillus* para a atividade de quitinase, observaram que 85,7 % dos isolados (66) exibiram níveis variados de produção. Na maioria dos trabalhos publicados, observou-se que as cepas de *Bacillus* spp. que apresentam habilidade de produzir hidrolases para parede celular demonstraram maior eficiência na redução de patógenos causadores de doenças em plantas (Miljaković; Marinković; Balelević-Tubić, 2020).

A destruição da parede celular de um patógeno microbiano está relacionada à necessidade da atividade de várias enzimas, para obter sua decomposição eficiente, resultando no controle antifúngico efetivo (Mardanov *et al.*, 2017). Neste contexto, sabe-se que celulases bacterianas são essenciais para a degradação de resíduos de celulose e hemicelulose (Thapa *et al.*, 2020). Alguns autores relataram que a fonte de carbono mais eficiente para avaliar a produção de CMCase (um tipo de celulase) é o CMC, o qual foi utilizado no presente trabalho. Thomas, Ram e Singh (2018) mostraram que a produção de CMCase em *Bacillus* spp. SV1 foi maior em caldo com CMC do que com Avicel (celulose microcristalina). A

produção de celulase pelos *Bacillus* sp. P3-1 e P4-6 em caldo com CMC foi mais elevada (Akaracharyana *et al.*, 2014). Dobrzyński, Wróbel, Górska (2022) mostraram que a cepa 8E1A do gênero *Bacillus* quando exposta ao caldo de cultivo com CMC induziu significativamente, a produção de CMCase.

Estudos realizados por Wang *et al.* (2024), Abada *et al.* (2021), Ejaz *et al.* (2020) demonstram que é comum *Bacillus* spp. apresentar produção de celulase, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo no qual 26 isolados apresentaram produção de celulase *in vitro*. As enzimas celulolíticas são utilizadas em materiais celulósicos (papel, embalagens, tecidos, alimentos, biocombustíveis, entre outros) promovendo sua hidrólise (Chukwuma *et al.*, 2020). Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam na liberação de açúcares (Castro; Pereira Junior, 2010).

#### 4.3 CURVA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS EB13 e EB18

A dinâmica de crescimento dos isolados EB13 e EB18 apresentou desenvolvimento típico do gênero *Bacillus*, que apresentam crescimento rápido, em até 48h (Souza; Freire; Almeida, 2018). Em ambos os isolados não foi possível observar fase lag definida, possivelmente, devido crescimento rápido e a primeira amostragem ocorrer 6 h após a inoculação no meio, sendo necessário avaliar com intervalo menor. O mesmo foi observado para isolados de *Bacillus cereus* e *Bacillus pumilus* (Alvarez e Sánchez, 2016), corroborando os resultados obtidos. O isolado EB13 apresentou fase exponencial mais longa, até 24 h. Em seguida, observou-se tendência de entrar em fase estacionária devido à queda no número de UFC. Entretanto, ressalta-se para confirmar essa fase, seriam necessárias estender o tempo de observação das culturas. Esse padrão é consistente com estudos anteriores realizados com *Bacillus xiamenensis* JA5 (Alias *et al.*, 2024), sugerindo que EB13 compartilha características semelhantes de adaptação e eficiência no uso de nutrientes. No entanto, o tempo de duplicação do EB13 foi inferior ao observado para *Bacillus megaterium* (Liu *et al.*, 2011), o que pode indicar uma vantagem competitiva em ambientes com recursos limitados.

Em estudos com *Bacillus cereus* cepa MEX 03 C, Quiñones-Muñoz *et al.* (2020) também observaram fase exponencial rápida, tal como observado no presente trabalho, sugerindo uma adaptação eficiente ao meio de cultura. A dinâmica de crescimento de *Lactobacillus rhaminosus* em condições controladas também mostrou padrão similar ao observado no presente trabalho. No entanto, *Lactobacillus rhaminosus* apresentou uma maior

concentração de UFC chegando a aproximadamente  $10^{11}$  UFC. mL<sup>-1</sup> (Lizardo e Tavaría, 2022).

Ooi *et al.* (2008), o *B. sphaericus* UPMB10 apresentou dinâmica de crescimento similar à verificada no presente trabalho para o isolado EB18, variando a concentração de UFC. *Bacillus* spp. parecem apresentar crescimentos diferentes conforme o meio de cultivo no qual foi inoculado, variando com o tempo das fases do desenvolvimento e a concentração celular (Miranda-Durán; Porras-Reyes; Schmidt-Durán, 2020).

#### 4.4 PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR ISOLADOS *Bacillus* spp.

Bactérias do gênero *Bacillus* manifestam a produção de alguns metabólitos secundários com efeito no controle de fitopatógenos, podendo ser: sideróforos, compostos orgânicos voláteis e antibióticos (Janakiev; Krušćić; Dimkić *et al.*, 2022; Kloepper; Ryu; Zhang, 2004). A fenazina é um dos antibióticos mais famosos produzidos por bactérias (Sousa *et al.*, 2024). As fenazinas são moléculas heterocíclicas ativas contendo nitrogênio, apresentam atividade antibiótica eficaz (Biessy; Fillion, 2018). Há cinco genes que todas as bactérias produtoras de fenazina manifestam: PhzE, PhzD, PhzF, PhzB e PhzG (Mavrodi *et al.*, 2010).

Na literatura, há diversos relatos de *Pseudomonas* spp. capazes de produzir fenazinas. A *Pseudomonas aureofaciens* S1Bt23 (Chi *et al.*, 2024). *Pseudomonas chlororaphis* (Yao *et al.*, 2018), *Pseudomonas* sp. CMR12a (Oni; Olorunleke; Höfte, 2019), entre outras. No entanto, não é comum encontrar relatos de *Bacillus* spp. capazes de produzir fenazina. Padaria *et al.* (2016) realizaram análises de HPLC do extrato bruto de *B. pumilus* MTCC7615 e confirmaram a presença de fenazina, mas não realizaram a sua quantificação. Li *et al.* (2007) isolaram a fenazina por meio do bioensaio do caldo de cultura de *Bacillus* spp. presente em águas profundas do mar. Para confirmar a produção de fenazinas em *Bacillus*,

#### 4.5 BIOENSAIO COM O EXTRATO CELULAR DOS ISOLADOS *Bacillus* spp.

Os resultados de antibiose utilizando os extratos celulares nos ensaios *in vitro* mostraram que a concentração de 24,4 mg/L de extratos de EB13 suprimiu o crescimento micelial da *S. terrestris* e esse controle pode estar relacionado com os compostos orgânicos presente no extrato celular, que indicam ser fenazinas. De acordo com Padaria *et al.* (2016), o extrato bruto de *B. pumilus* MTCC7615, contendo fenazina-1-carboxílico inibiu 57% do

crescimento micelial de *R. solani in vitro*. Castaldi *et al.* (2021) analisaram o extrato orgânico da cultura de *P. fluorescens* 9 para a produção de fenazina e ácido mesacônico (ácido 2-metil-1,4-butenóico). Apenas a fenazina exibiu a atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *M. phaseolina* (40%), *C. nicotianae* (100%) e *C. truncatum* (50%) e nesse caso a inoculação foi com 25 µg/mL do extrato orgânico, concentração relativamente próxima à utilizada no presente trabalho. Chi *et al.* (2024) observaram que a cepa S1Bt23 inibiu o crescimento de *Pythium ultimum* (66,70%) *in vitro* e relataram que o controle só ocorreu na presença do gene *phz B* (S1Bt23Δ *phz B*) ou *phz F* (S1Bt23Δ *phz F*), relacionado a fenazina.

Entretanto, outros antibióticos são mais comuns em *Bacillus*. De acordo com Dimkić *et al.* (2017), o extrato do caldo do *Bacillus* sp. SS-27.2 inibiu o crescimento de *L. monocytogenes*, indicando a iturina A como responsável desta inibição. Etchegaray *et al.* (2008) observaram por meio do extrato de lipopeptídeo a presença de iturina e surfactina (5 mg mL<sup>-1</sup>) isoladas de *B. subtilis* (cepa OG). Esses autores observaram também que dez isolados de *B. subtilis* apresentaram controle de 40% a *P. phaseoli*, e uma média 14% de inibição do *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* em placas de ágar.

De acordo com resultados obtidos com os extratos dos isolados selecionados, não foi possível observar inibição com o extrato celular do EB18. Para maior inibição dos fitopatógenos, é necessário testar concentração maiores dos extratos, em estudos futuros.

## CONCLUSÃO

Os isolados de *Bacillus* spp. testados detêm potencial como promotores de crescimento e agentes do controle de doenças, por apresentar mecanismos que estimulam as plantas e/ou inibem fitopatógenos. Dos 27 isolados testados, 63% apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de alumínio *in vitro*, sendo esses: EB01, EB02, EB03, EB04, EB05, EB06, EB07, EB08, EB09, EB10, EB11, EB13, EB18, EB19, EB20, EB26 e EB27. O isolado EB13 apresentou potencial de solubilização de fosfato de ferro.

Os isolados estudados foram eficientes na produção de quitinase e celulase com exceção do isolados EB14, que não produziu essa última enzima.

Os isolados selecionados EB13 e EB18 apresentaram produção de fenazina em seu extrato celular, sobressaindo o isolado EB13 por produzir cinco vezes mais o antibiótico que o isolado EB18. O EB13 inibiu *S. terrestris* em 16,70 %, mas não foi eficiente no controle de *S. cepivora*. O isolado EB18 não inibiu nenhum dos dois fungos.

Os resultados obtidos indicam que os isolados dispõem potencial para uso como bioinoculantes ou agentes de controle biológico. Entretanto, a necessidade de estudos adicionais *in vivo* para comprovar a eficácia em plantas.

## REFERÊNCIAS

- ABADA, Emad; ELBAZ, Reham; SONBOL, Hana; KORANY, Shereen. Optimization of Cellulase Production from *Bacillus albus* (MN755587) and Its Involvement in Bioethanol Production. **Polish Journal Of Environmental Studies**, v. 30, n. 3, p. 2459-2466, 16 abr. 2021. HARD Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.15244/pjoes/129697>.
- AKARACHARANYA, Ancharida; TAPRIG, Thanawan; SITDHIPOL, Jaruwan; TANASUPAWAT, Somboon. Characterization of cellulase producing *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from Thai soils. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n.5, p. 6-11, 2014. Open Science Publishers LLP. <http://dx.doi.org/10.7324/japs.2014.40502>.
- ALIAS, Jahira; HASAN, Hassimi Abu; ABDULLAH, Siti Rozaimah Sheikh; OTHMAN, Ahmad Razi. Flocculating activity and kinetic properties of bioflocculant produced by *Bacillus species* for wastewater treatment. **Journal Of Water Process Engineering**, v. 68, p. 106501, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106501>.
- ALIYAT, Fatima Zahra; MALDANI, Mohamed; GUILLI, Mohammed El; NASSIRI, Laila; IBIJBIJEN, Jamal. Phosphate-Solubilizing Bacteria Isolated from Phosphate Solid Sludge and Their Ability to Solubilize Three Inorganic Phosphate Forms: calcium, iron, and aluminum phosphates. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 980, 7 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10050980>.
- ALVAREZ, Estefania Castañeda; SÁNCHEZ, Ligia Consuelo. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. **Revista Nova publicación científica en ciencias biomédicas**, v. 14, n. 26, p. 53-62, 2016.
- APUN, Kasing; JONG, Bor Chyan; SALLEH, Mohd Azib. Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 263-267, 2000. Microbiology Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.46.263>.
- AWASTHI, Rashmi; TEWARI, R.; NAYYAR, Harsh. Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. **International Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 484-503, 2011.
- BALBINOT, William Gilberto; RODRIGUES, Sabrina; BOTELHO, Glória Regina. Isolates of *Bacillus* sp. from garlic: effect on corn development and plant growth-promoting mechanisms. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, p. 1-17, 2020. Revista Brasileira de Ciencia do Solo. <http://dx.doi.org/10.36783/18069657rbcS20200043>.
- BIESSY, Adrien; FILION, Martin. Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 11, p. 3905–3917, 2018. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.1439>
- BILLAH, Motsim; KHAN, Matiullah; BANO, Asghari; HASSAN, Tamoor UI; MUNIR, Asia; GURMANI, Ali Raza. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: keys for sustainable agriculture. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 10, p. 904-916, 23 ago. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>.

BOTELHO, Gloria Regina; LEONCIO, Mariane da Rosa. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA ISOLATED FROM GARLIC (*allium sativum*). **Scientia Agraria**, v. 18, n. 3, p. 95, 29 set. 2017. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i3.50630>.

BOTELHO, Gloria Regina; LEONCIO, Mariane R.; ORSI, Bruna; COSER, Elisa; EUTRÓPIO, Gêssica R.; ARMAS, Rafael D. De; SOARES, Cláudio R. F. Sousa; ZILLI, Jerri E. Plant growth promoting bacteria from garlic sowed at Curitibaanos micro-region-Santa Catarina-Brazil. **Ciencia del suelo**, v. 37, n. 1, pag. 51-65, 2019.

CASTALDI, Stefany; MASI, Marco; SAUTUA, Francisco; CIMMINO, Alessio; ISTICATO, Rachele; CARMONA, Marcelo; TUZI, Angela; EVIDENTE, Antonio. *Pseudomonas fluorescens* Showing Antifungal Activity against *Macrophomina phaseolina*, a Severe Pathogenic Fungus of Soybean, Produces Phenazine as the Main Active Metabolite. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1728, 19 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom11111728>.

CASTRO, Aline Machado de; PEREIRA JUNIOR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000100031>.

CHAGAS JUNIOR, Aloisio Freitas; BORBA, Elias; MARTINS, Albert Lennon Lima; SOUZA, Manuella Costa; GOMES, Flávia Luane; DE OLIVEIRA, Rodrigo Silva; CHAGAS, Lillian França Borges. *Bacillus* sp. como promotor de crescimento em soja *Bacillus* sp. *Revista De Ciências Agrárias*, v. 44, 2021. <https://doi.org/10.19084/rca.22557>

CHAGAS JUNIOR, Aloisio Freitas; OLIVEIRA, Luiz Antonio de; OLIVEIRA, Arlem Nascimento de; WILLERDING, André Luiz. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia1. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 343-357, 29 abr. 2010. Universidade Estadual de Maringa. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i2.3185>.

CHAUDHARY, Rida; NAWAZ, Ali; KHATTAK, Zermine; BUTT, Muhammad Arslan; FOUILLAUD, Mireille; DUFOSSÉ, Laurent; MUNIR, Mariam; HAQ, Ikram Ul; MUKHTAR, Hamid. Microbial bio-control agents: a comprehensive analysis on sustainable pest management in agriculture. **Journal Of Agriculture And Food Research**, v. 18, p. 101421, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101421>.

CHENG, Xingkai; JI, Xiaoxue; GE, Yanzhen; LI, Jingjing; QI, Wenzhe; QIAO, Kang. Characterization of Antagonistic *Bacillus methylotrophicus* Isolated From Rhizosphere and Its Biocontrol Effects on Maize Stalk Rot. **Phytopathology®**, v. 109, n. 4, p. 571-581, abr. 2019. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-07-18-0220-r>.

CHI, Sylvia I.; AKUMA, Mercy; XU, Renlin; PLANTE, Véronique; HADINEZHAD, Mehri; TAMBONG, James T.. Phenazines are involved in the antagonism of a novel subspecies of *Pseudomonas chlororaphis* strain S1Bt23 against *Pythium ultimum*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 3 set. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-71418-y>.

CHOI, Yeon Jin; KIM, Eun Jung; PIAO, Zhe; YUN, Young Chul; SHIN, Yong Chul. Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and

Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4522-4531, ago. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.8.4522-4531.2004>.

CHUKWUMA, Ogechukwu Bose; RAFATULLAH, Mohd; TAJARUDIN, Husnul Azan; ISMAIL, Norli. Lignocellulolytic Enzymes in Biotechnological and Industrial Processes: a review. **Sustainability**, v. 12, n. 18, p. 7282, 4 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su12187282>.

DEKA, Deepmoni; BHARGAVI, P; SHARMA, Ashish; GOYAL, Dinesh; MANDIBULA, M; GOYAL, Arun. Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme research*, v. 2011, n. 1, p. 151656, 2011.

DIAS, Anderson dos Santos; SANTOS, Cleberton Correia. Bactérias promotoras de crescimento de plantas: conceitos e potencial de uso. **Pantanal Editora**, Nova Xavantina, MT: Pantanal, pag. 98. 2022.

DIMKIĆ, Ivica; JANAKIEV, Tamara; PETROVIĆ, Marija; DEGRASSI, Giuliano; FIRA, Djordje. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, v. 117, p. 101754, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>.

DIMKIĆ, Ivica; STANKOVIĆ, Slaviša; NIČAVIĆ, Marija; PETKOVIĆ, Marijana; RISTIVOJEVIĆ, Petar; FIRA, Djordje; BERIĆ, Tanja. The Profile and Antimicrobial Activity of *Bacillus* Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, 23 maio 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00925>.

DOBRZYŃSKI, Jakub; JAKUBOWSKA, Zuzanna; KULKOVA, Iryna; KOWALCZYK, Paweł; KRAMKOWSKI, Karol. Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. **Frontiers In Microbiology**, v. 14, 25 jul. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194606>

DOBRZYŃSKI, Jakub; WRÓBEL, Barbara; GÓRSKA, Ewa Beata. Cellulolytic properties of a potentially lignocellulose-degrading *Bacillus* sp. 8E1A strain isolated from bulk soil. **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 665, 2022.

DOURIET-GÁMEZ, Nadia R.; MALDONADO-MENDOZA, Ignacio E.; IBARRA-LACLETTE, Enrique; BLOM, Jochen; CALDERÓN-VÁZQUEZ, Carlos L.. Genomic Analysis of *Bacillus* sp. Strain B25, a Biocontrol Agent of Maize Pathogen *Fusarium verticillioides*. **Current Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 247-255, 19 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-017-1372-1>.

EJAZ, Uroosa; MUHAMMAD, Shoaib; HASHMI, Imran Ali; ALI, Firdous Imran; SOHAIL, Muhammad. Utilization of methyltrioctylammonium chloride as new ionic liquid in pretreatment of sugarcane bagasse for production of cellulase by novel thermophilic bacteria. **Journal Of Biotechnology**, v. 317, p. 34-38, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.013>.

ETCHEGARAY, Augusto; BUENO, Carolina de Castro; MELO, Itamar Soares de; TSAI, Siu Mui; FIORE, Marli de Fátima; SILVA-STENICO, Maria Estela; MORAES, Luiz Alberto Beraldo de; TESCHKE, Omar. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. **Archives Of Microbiology**, v. 190, n. 6, p. 611-622, 25 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-008-0409-z>.

FAQUIN, Cíntia. **Controle de Sclerotium cepivorum e Setophoma terrestris por Bacillus spp. na cultura do alho (Allium sativum L.)**. 2022. 57 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2022.

GOMAA, Eman Zakaria. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. **The Journal Of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 103-111, fev. 2012. The Microbiological Society of Korea. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>

HARA, Francisco Adilson dos Santos; OLIVEIRA, Luiz Antonio de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álidos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0044-59672004000300002>.

HAUKOOS, Jason S.; LEWIS, Roger J.. Advanced Statistics: bootstrapping confidence intervals for statistics with  $\therefore$ difficult $\therefore$  distributions. **Academic Emergency Medicine**, v. 12, n. 4, p. 360-365, abr. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1197/j.aem.2004.11.018>.

JANAKIEV, Tamara; KRULČIĆ, Katarina; DIMKIĆ, Ivica. Secondary metabolites of *Pseudomonas* and *Bacillus species* in plant disease management. **Microbiology**, v. 44, n. 1, mar. 2023. Serbian Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.63157/vgkq2736>.

KHURSHEED, Aadil; RATHER, Manzoor A.; JAIN, Vikrant; WANI, Ab Rouf; RASOOL, Shahid; NAZIR, Rukhsana; MALIK, Nisar Ahmad; MAJID, Sheikh Abdul. Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: a comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. **Microbial Pathogenesis**, v. 173, p. 105854, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105854>.

KLOEPPER, Joseph W.; RYU, Choong-Min; ZHANG, Shouan. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology®**, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, nov. 2004. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>.

KOUR, Divjot; RANA, Kusam Lata; KAUR, Tanvir; YADAV, Neelam; YADAV, Ajar Nath; KUMAR, Manish; KUMAR, Vinod; DHALIWAL, Harcharan Singh; SAXENA, Anil Kumar. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and -mobilizing microbes: a review. **Pedosphere**, v. 31, n. 1, p. 43-75, fev. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1002-0160\(20\)60057-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1002-0160(20)60057-1).

KUMAR, Manish; BRAR, Amandeep; YADAV, Monika; CHAWADE, Aakash; VIVEKANAND, V.; PAREEK, Nidhi. Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant

Resistance towards Fungal Pathogens. **Agriculture**, v. 8, n. 7, p. 88, 22 jun. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture8070088>.

LI, Dehai; WANG, Fengping; XIAO, Xiang; ZENG, Xiang; GU, Qian- Qun; ZHU, Weiming. A new cytotoxic phenazine derivative from a deep sea bacterium *Bacillus* sp. *Archives Of Pharmacal Research*, v. 30, n. 5, p. 552-555, maio 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02977647>.

LIANG, Jie-Liang; LIU, Jun; JIA, Pu; YANG, Tao-Tao; ZENG, Qing-Wei; ZHANG, Sheng-Chang; LIAO, Bin; SHU, Wen-Sheng; LI, Jin-Tian. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. **The Isme Journal**, v. 14, n. 6, p. 1600-1613, 23 mar. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-020-0632-4>.

LIU, Chen; HONGLI, Yuan; YANG, Jinshui; LI, Baozhen. Effective biosorption of reactive blue 5 by pH-independent lyophilized biomass of *Bacillus megaterium*. **African Journal Of Biotechnolog**, v. 10, n. 73, 21 nov. 2011. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb11.1824>.

LIU, Fengying; YANG, Shan; XU, Fenghua; ZHANG, Zhen; LU, Yifang; ZHANG, Juanmei; WANG, Gang. Characteristics of biological control and mechanisms of *Pseudomonas chlororaphis* zm-1 against peanut stem rot. **Bmc Microbiology**, v. 22, n. 1, 5 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-021-02420-x>.

LIU, Lirui; HUANG, Wen-Cong; LIU, Yang; LI, Meng. Diversity of cellulolytic microorganisms and microbial cellulases. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 163, p. 105277, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105277>.

LIU, Youzhou; ZHOU, Yaqui; QIAO, Junqing; YU, Wenjie; PAN, Xiayan; ZHANG, Tingting; LIU, Yongfeng; LU, Shi-En. Phenazine-1-carboxylic Acid Produced by *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 Is Effective against *Acidovorax citrulli*. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2012, 23 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9102012>.

LIZARDO, Mp; TAVARIA, Fk. Probiotic growth in skin-like conditions. **Aims Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 388-402, 2022. American Institute of Mathematical Sciences (AIMS). <http://dx.doi.org/10.3934/microbiol.2022027>

MARAL-GÜL, Derya; ELTEM, Rengin. Evaluation of *Bacillus* isolates as a biological control agents against soilborne phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, 20 fev. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-024-00490-1>.

MARDANOVA, Ayslu Mirkasimovna; HADIEVA, Guzel Fanisovna; LUTFULLIN, Marat Tafkilevich; KHILYAS, Irina Valer'evna; MINNULLINA, Leyla Farvazovna; GILYAZEVA, Adelya Gadelevna; BOGOMOLNAYA, Lidiya Mikhailovna; SHARIPOVA, Margarita Rashidovna. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. **Agricultural Sciences**, v. 08, n. 01, p. 1-20, 2017. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2017.81001>.

MARTÍNEZ-ZAVALA, Sheila A.; BARBOZA-PÉREZ, Uriel E.; HERNÁNDEZ-GUZMÁN, Gustavo; BIDESHI, Dennis K.; BARBOZA-CORONA, José E.. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: phylogeny, modular structure, and applied potentials. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p. 1-19, 14 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.03032>.

MATOS, Amanda D.M.; GOMES, Izabela C.P.; NIETSCHE, Silvia; XAVIER, Adélica A.; GOMES, Wellington S.; SANTOS NETO, José A. dos; PEREIRA, Marlon C.T.. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2945-2954, 4 set. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>.

MATTEI, Danielle; PAMPHILE, João Alencar; OLIVEIRA, João Arthur dos Santos de; BATTISTUS, André Gustavo. *Bacillus*: a eco-friendly source for plant development and sanity. **Research, Society And Development**, v. 11, n. 15, 17 nov. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i15.37199>

MAVRODI, Dmitri V.; PEEVER, Tobin L. ; MAVRODI, Olga V.; PAREJKO, James A. ; RAAIJMAKERS, Jos M. ; LEMANCEAU, Philippe. ; MAZURIER, Sylvie; HEIDE, Lutz; BHANKENFELDT, Wulf, WELLER, David M.; THOMASHOW, Linda S.. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Appl Environ Microbiol* v.76, p. 866 – 879, 2023. <https://doi.org/10.1128/AEM.02009-09>

MENGISTU, Anteneh Ademe. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. **International Journal Of Microbiology**, v. 2020, p. 1-8, 30 jul. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/6927219>.

MIELICH-SÜSS, Benjamin; LOPEZ, Daniel. Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 555-565, 7 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12527>.

MILJAKOVIĆ, Dragana; MARINKOVIĆ, Jelena; BALELEVIĆ-TUBIĆ, Svetlana. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1037, 13 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8071037>

MIRANDA-DURÁN, Sofia; PORRAS-REYES, Luis; SCHMIDT-DURÁN, Alexander. Evaluation of agro-industrial residues produced in Costa Rica for a low-cost culture medium using *Bacillus subtilis* 168. **Tecnología En Marcha**, v. 33, n. 4, dez. 2020. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v33i3.4807>.

NAIK, Kalyani; MISHRA, Snehasish; SRICHANDAN, Haragobinda; SINGH, Puneet Kumar; SARANGI, Prakash Kumar. Plant growth promoting microbes: potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101326, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>.

NUNES, Jéssica de Matos. **Xantonas, benzopiranos e floroglucinois diméricos em culturas de tecidos de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil**. 2014. 228 f. Tese (Doutorado em Farmacia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

ONI, Feyisara Eyiwumi; OLORUNLEKE, Oluwatoyin Faith; HÖFTE, Monica. Phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a are involved in the biological control of *Pythium myriotylum* on cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). **Biological Control**, v. 129, p. 109-114, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.005>.

OOI, T. C.; ARIFF, A. B.; HALIMI, M. S.; SHAMSUDDIN, Z. H.. Growth kinetics of diazotrophic *Bacillus sphaericus* UPMB10 cultured using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. **Malaysian Journal Of Microbiology**, dez. 2008. Malaysian Journal of Microbiology. <http://dx.doi.org/10.21161/mjm.11408>.

PADARIA, Jasdeep Chatrath; TARAFDAR, Avijit; RAIPURIA, Rajkumar; LONE, Showkat Ahmad; GAHLOT, Pallavi; SHAKIL, Najam A.; KUMAR, Jitendra. Identificação do gene do ácido fenazina-1-carboxílico (phcCD) de *Bacillus pumilus* MTCC7615 e seu papel no antagonismo contra *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, v.56, n.9,p. 999–1008, 2016. doi:10.1002/jobm.201500574.

PAHALVI, Heena Nisar; RAFIYA, Lone; RASHID, Sumaira; NISAR, Bisma; KAMILI, Azra N.. Chemical Fertilizers and Their Impact on Soil Health. **Microbiota And Biofertilizers, Vol 2**, p. 1-20, 2021. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4_1).

PAVINATO, Paulo S.; CHERUBIN, Maurício R.; SOLTANGHEISI, Amin; ROCHA, Gustavo C.; CHADWICK, Dave R.; JONES, Davey L.. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>.

POVEDA, Jorge; GONZÁLEZ-ANDRÉS, Fernando. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 105, n. 23, p. 8629-8645, 26 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>

PRADHAN, Madhusmita; DAS, Rajeswari; SAHOO, Ranjan Kumar; ADAK, Totan; PRADHAN, Chinmay; MOHANTY, Santanu. Comparative P solubilizing efficiencies of five acid soil bacteria incubated with calcium, aluminium and iron phosphates. **Indian Journal Of Biochemistry And Biophysics**, v. 59, n. 10, p. 947-955, 2022. CSIR-National Institute of Science Communication and Policy Research (NIScPR). <http://dx.doi.org/10.56042/ijbb.v59i10.67099> .

QUIÑONES-MUÑOZ, T. A.; VILLARES-BUENO, A. M.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, G.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.. *Bacillus* spp. characterization and his intervention as a possible non-traditional etiology of chronic renal insufficiency in Tierra Blanca, Veracruz, Mexico. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 9 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-61313-7>

RAGAZZO-SÁNCHEZ, Juan Arturo; ROBLES-CABRERA, Alejandra; LOMELÍ-GONZÁLEZ, Leopoldo; LUNA-SOLANO, Guadalupe; CALDERÓN-SANTOYO, Montserrat. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. **Revista Chapingo. Serie horticultura**, v. 17, n. SPE1, p. 5-11, 2011.

RAIS, Afroz; JABEEN, Zahra; SHAIR, Faluk; HAFEEZ, Fauzia Yusuf; HASSAN, Muhammad Nadeem. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. **Plos One**, v. 12, n. 11, p. 187412, 21 nov. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0187412>.

RATHORE, Abhishek Singh; GUPTA, Rinkoo D.. Chitinases from bacteria to human: Properties, applications, and future perspectives. *Enzyme Res.*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/791907>.

REDDY, Eddula Chengal; REDDY, Gari Surendranatha; GOUDAR, Vedavati; SRIRAMULA, Arava; SWARNALATHA, Gadde Venkata; TAWAHA, Abdel Rahman Mohammad Al; SAYYED, R. Z.. Hydrolytic Enzyme Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Secondary Metabolites And Volatiles Of Pgp In Plant-Growth Promotion**, p. 303-312, 2022. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-07559-9\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-07559-9_15).

RISEH, Roohallah Saberi; VATANKHAH, Masoumeh; HASSANISAADI, Mohadeseh; BARKA, Essaid Ait. Unveiling the Role of Hydrolytic Enzymes from Soil Biocontrol Bacteria in Sustainable Phytopathogen Management. **Frontiers In Bioscience-Landmark**, v. 29, n. 3, 15 mar. 2024. IMR Press. <http://dx.doi.org/10.31083/j.fbl2903105>.

RODRÍGUEZ, Hilda; FRAGA, Reynaldo. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, out. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00014-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00014-2).

SABER, Wesam I. A.; GHONEEM, Khalid M.; AL-ASKAR, Abdulaziz A.; RASHAD, Younes M.; ALI, Abeer A.; RASHAD, Ehsan M.. Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of Rhizoctoniadiseases of potato. **Acta Biologica Hungarica**, v. 66, n. 4, p. 436-448, dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1556/018.66.2015.4.8>.

SANTOS, Bernadete de Souza. **Estudo de doze sorovares de *Bacillus thuringiensis***: curva de crescimento, determinação da presença de genes cry 4 a/b e variabilidade genética. 2000. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SHANMUGAIAH, V.; MATHIVANAN, N.; VARGHESE, B.. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 703-711, fev. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04466.x>.

SHANMUGAVEL, Divya; RUSYN, Iryna; SOLORZA-FERIA, Omar; KAMARAJ, Sathish-Kumar. Sustainable SMART fertilizers in agriculture systems: a review on fundamentals to in-field applications. **Science Of The Total Environment**, v. 904, p. 166729, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166729>.

SILVA FILHO, Germano Nunes; VIDOR, Caio. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, dez. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2001001200007>.

SILVA, Leandro Israel da; PEREIRA, Marlon Correa; CARVALHO, André Mundstock Xavier de; BUTTRÓS, Victor Hugo; PASQUAL, Moacir; DÓRIA, Joyce. Phosphorus-solubilizing microorganisms: A key to sustainable agriculture. **Agriculture**, v. 13, n. 2, p. 1-30, 2023.

SOUZA, Rafael Limongi de; FREIRE, Kristerson Reinaldo de Luna; ALMEIDA, Andréa Farias de. Utilização da levedura residual de cervejaria como fonte de nitrogênio para cultivo de bacillus sp. *Revista Saúde e Ciência online*, v. 7, n. 2, p. 502, 2018.

STOICA, Roxana-Mădălina; MOSCOVICI, Mișu; TOMULESCU, Caterina; CășăRICĂ, Angela; BăBEANU, Narcisa; POPA, Ovidiu; KAHRAMAN, Hatice Ahu. Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: a review. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 24, n. 6, p. 1111-1119, 24 dez. 2019. University of Bucharest (Bucharest University Press). <http://dx.doi.org/10.25083/rbl/24.6/1111.1119>.

SUGIHARTO, Arwan; SULIASIH; WIDAWATI, Sri; IDRIS. Phosphate solubilizing bacteria associated with the rhizosphere of sandalwood (*Santalum album* L.) and their phosphate solubilizing ability. **Aip Conference Proceedings**, v. 2970, p. 050003, 2024. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/5.0208195>.

THAPA, Santosh; MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen; MISHRA, Priya; LI, Hui; O-HAIR, Joshua; BHATTI, Sarabjit; ZHOU, Suping. Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. **Reviews In Environmental Science And Bio/Technology**, v. 19, n. 3, p. 621-648, 29 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-020-09536-y>

THOMAS, Lebin; RAM, Hari; SINGH, Ved Pal. Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 429-442, abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.010>.

TSOTETSI, Teboho, NEPHALI, Lerato; MALEBE, Motumiseng; TUGIZIMANA, Fidele. *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned?" **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2482, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11192482>

WAN, Wenjie; QIN, Yin; WU, Huiqin; ZUO, Wenlong; HE, Huangmei; TAN, Jiadan; WANG, Yi; HE, Donglan. Isolation and Characterization of Phosphorus Solubilizing Bacteria With Multiple Phosphorus Sources Utilizing Capability and Their Potential for Lead Immobilization in Soil. **Frontiers In Microbiology**, v. 11, p. 2, 23 abr. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00752>

WANG, Jinjun; BAO, Fei; WEI, Huixian; ZHANG, Yang. Screening of cellulose-degrading bacteria and optimization of cellulase production from *Bacillus cereus* A49 through response surface methodology. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2 abr. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-58540-7>.

YAHAYA, Sharhabil Musa; MAHMUD, Aliyu Ahmad; ABDULLAHI, Mustapha; HARUNA, Abdurrashid. Recent advances in the chemistry of nitrogen, phosphorus and potassium as fertilizers in soil: a review. **Pedosphere**, v. 33, n. 3, p. 385-406, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.07.012>.

YAMAGUCHI, Margarida Masami. **Produção, purificação e caracterização da quitinase de *Cellulomonas cellulans* Fxx**. 2003. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. Cap. 4.

YAO, Ruilian; PAN, Keli; PENG, Huasong; FENG, Lei; HU, Hongbo; ZHANG, Xuehong. Engineering and systems-level analysis of *Pseudomonas chlororaphis* for production of phenazine-1-carboxamide using glycerol as the cost-effective carbon source. **Biotechnology For Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1, 4 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-018-1123-y>.

ZENG, Quan; CUI, Chao; WANG, Kaiyue; LI, Fang; LI, Chenyang; WEN, Shanshan; YANG, Mingming. *Pseudomonas fluorescens* HC1-07 transformed with phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis genes has improved biocontrol activity against *Rhizoctonia* root rot and *Fusarium* crown rot of wheat. **Biocontrol**, v. 68, n. 6, p. 669-679, dez. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-023-10227-0>.

ZUCARELI, Claudemir; BARZAN, Renan Ribeiro; SILVA, Josemeyre Bonifácio da; CHAVES, Danilo Pinceli. Associação de fosfatos e inoculação com *Bacillus subtilis* e seu efeito no crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro. **Revista Ceres**, v. 65, n. 2, p. 189-195, mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201865020011>

**SEÇÃO II - Avaliação de *Bacillus* spp. no Controle Biológico de Patógenos  
(*Stromatinia cepivora* e *Setophoma terrestris*) do Alho em Diferentes Condições  
Experimentais**

**RESUMO**

A podridão branca (*S. cepivora*) e a podridão rosada (*S. terrestris*), são responsáveis por grandes perdas nas lavouras de alho. Uma alternativa viável para reduzir impactos econômicos e ambientais é a utilização de *Bacillus* spp. por apresentarem mecanismos de inibição por meio de antibióticos e enzimas hidrolíticas, entre outros, para minimizar os danos causados por esses fitopatógenos. O presente estudo objetivou avaliar dois isolados de *Bacillus* no controle dos fungos fitopatogênicos *Stromatinia cepivora* e *Setophoma terrestris*, além do seu potencial em estimular o crescimento de plantas de alho, especialmente para avaliar a micropropagação como forma de aprofundar o estudo dessas interações. Para os experimentos de micropropagação, foram utilizadas como explantes as gemas apicais dos bulbilhos de alho cv Chonan, que foram mantidas em 10 mL de meio líquido MS (Murashige & Skoog), sobre ponte de papel filtro. As culturas fúngicas foram mantidas em incubadora BOD com fotoperíodo de 12 horas a 19 °C (para *S. cepivora*) e 25 °C (para *S. terrestris*) e as bacterianas a 27 °C, sem fotoperíodo. Após 15 dias, efetuou-se a inoculação dos isolados bacterianos diluídos a 10<sup>1</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Após 15 dias da inoculação bacteriana, foi adicionado um microescleródio de cada fungo patogênico separadamente. As avaliações foram realizadas aos 45 dias para os testes com *S. cepivora* e 42 dias para *S. terrestris*. Para o experimento em casa de vegetação, utilizou-se também a cv. Chonan e testou-se apenas *S. cepivora*. O alho foi cultivado em vasos de 5 L, contendo solo da região de Curitiba-SC. As culturas fúngicas e bacterianas foram mantidas nas condições já descritas. O delineamento inteiramente casualizado continha seis tratamentos, sendo esses: testemunha, inoculação de EB13, inoculação de EB18, inoculação somente do patógeno, EB13 + patógeno e EB18 + patógeno. Os vasos inoculados com *S. cepivora* receberam 2044 escleródios. Os bulbilhos foram desinfestados e inoculados com os isolados bacterianos, conforme o tratamento. Aos 30, 60 e 90 DAS foi a altura de planta. Aos 90 DAS, avaliou-se o número de folhas, o diâmetro da haste, as massas úmida e seca da parte aérea, de raiz e de bulbo. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativo, realizou o teste de média Scott-Knott a 5% de significância em todos os experimentos. Nos testes em micropropagação com *S. cepivora*, os isolados não diferiram da testemunha. Nos ensaios com *S. terrestris*, a testemunha sobressaiu aos demais tratamentos. No experimento em casa-de-vegetação, não foi observado sintoma da podridão branca (*S. cepivora*). Entretanto, a inoculação com o isolado EB18 na presença do *S. cepivora* contribuiu significativamente para o crescimento das plantas em todos os parâmetros avaliados.

**Palavra - chave:** Rizobactérias, Fitopatógeno, Desenvolvimento, Mecanismos secundários.

## ABSTRACT

White rot (*Stromatinia cepivora*) and pink rot (*Setophoma terrestris*) are responsible for significant losses in garlic crops. A viable alternative to reduce economic and environmental impacts is the use of *Bacillus* spp., as they exhibit inhibition mechanisms through antibiotics and hydrolytic enzymes, among others, to minimize the damage caused by these phytopathogens. This study aimed to evaluate two *Bacillus* isolates for controlling the phytopathogenic fungi *S. cepivora* and *Setophoma terrestris*, as well as their potential to stimulate garlic plant growth. This study aimed to evaluate micropropagation as a way to further study these interactions. For the micropropagation experiments, the apical buds of garlic cv. Chonan bulbs were used as explants, maintained in 10 mL of MS liquid medium (Murashige & Skoog) on a filter paper bridge. Fungal cultures were maintained in a BOD incubator with a 12-h photoperiod at 19 °C (for *S. cepivora*) and 25 °C (for *S. terrestris*), and bacterial cultures were maintained at 27 °C without photoperiod. After 15 days, bacterial isolates diluted to  $10^1$  CFU mL<sup>-1</sup> were inoculated. Fifteen days after bacterial inoculation, one microsclerotia of each pathogenic fungus was added separately. Evaluations were performed at 45 days for tests with *S. cepivora* and 42 days for *S. terrestris*. For the greenhouse experiment, cv. Chonan was also used, and only *S. cepivora* was tested. Garlic was grown in 5 L pots containing soil from the Curitibanos region, Santa Catarina. Fungal and bacterial cultures were maintained under the conditions previously described. The completely randomized design contained six treatments: control, EB13 inoculation, EB18 inoculation, pathogen-only inoculation, EB13 + pathogen, and EB18 + pathogen. Pots inoculated with *S. cepivora* received 2,044 sclerotia. The bulbils were disinfested and inoculated with bacterial isolates, depending on the treatment. Plant height was measured at 30, 60, and 90 DAS. At 90 DAS, the number of leaves, stem diameter, and wet and dry weights of the shoot, root, and bulb were evaluated. Data were subjected to analysis of variance, and when significant, the Scott-Knott mean test was performed at a 5% significance level in all experiments. In micropropagation tests with *S. cepivora*, the isolates did not differ from the control. In the tests with *S. terrestris*, the control outperformed the other treatments. In the greenhouse experiment, no symptoms of white rot (*S. cepivora*) were observed. However, inoculation with isolate EB18 in the presence of *S. cepivora* significantly contributed to plant growth across all parameters evaluated.

**Keywords:** Rhizobacteria, Phytopathogen, Development, Secondary Mechanisms.

## 1 INTRODUÇÃO

Em Santa Catarina, a produção de alho é realizada majoritariamente pela agricultura familiar. Esses pequenos produtores sofrem com condições climáticas divergentes ao longo do ano e de um ano para outro, que dificulta a sua produção e comercialização (Lucini, 2008). A produção do alho possui alto custo de implementação (sementes, irrigação, mão de obra, câmara fria, adubos, defensivos, agrícolas, serviços mecanizados etc.) e está sujeito à ocorrência de diversas doenças (ANAPA, 2019).

A ocorrência de doenças na lavoura vem causando preocupações pelas quedas de produção (Marcuzzo; Malikoski, 2022). Das principais doenças que atacam a cultura, a podridão branca causada pelo fungo *Stromatinia cepivora* é responsável por grandes perdas na lavoura (Baquero; Cotes, 2023). Esse fungo apresenta resistência em campo, sobrevivendo nos solos por vários anos, tornando difícil seu controle (Marcuzzo; Schmoeller, 2017).

Outra doença que causa prejuízos na cultura do alho, principalmente na fase final do ciclo, é a podridão rosada, causada pelo fungo *Setophoma terrestris*, o qual ataca exclusivamente as raízes, diminuindo os bulbos, tornando-os impróprios para comercialização ou até a perda total, dependendo do grau de ataque do patógeno (Yoshida, 2021). Esses patógenos possuem escleródios, que são estruturas de resistência e em função disso, várias áreas se tornam impróprias para espécies do gênero *Allium* (Lourenço Junior; Reis; Oliveira, 2016; Valdés-Santiago *et al.*, 2021). O controle químico, mostra-se pouco eficiente (Lourenço Junior; Reis; Oliveira, 2016) e assim, o controle biológico é uma alternativa promissora, pois utiliza microrganismos, especialmente as rizobactérias, que possuem potencial de colonizar o sistema radicular de plantas e sua rizosfera (Dias; Santos, 2022).

Os estudos apontam que as rizobactérias possuem diversos mecanismos que estimulam e protegem as plantas, dentre esses a produção de antibióticos capazes de inibir patógenos vegetais (Silva *et al.*, 2020). Das rizobactérias mais estudadas, encontram-se as pertencentes ao gênero *Bacillus*, que apresentam potencial para produzir substâncias que podem inibir microrganismos que afetam o crescimento e desenvolvimento da cultura (Chagas Junior *et al.*, 2021).

As modificações causadas nos tecidos de plantas de alho pelo ataque de patógenos como *S. cepivora* e *S. terrestris* assim como da inoculação de rizobactérias como *Bacillus*, ainda não foram estudados mais aprofundadamente. Uma das técnicas para estudar essas modificações é a micropropagação (Ornellas *et al.*, 2022), a qual possibilita a propagação em larga escala e em condições controladas de propágulos de plantas, livres de microrganismos

(Erig; Schuch, 2005, Santos *et al.*, 2015). No presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dois isolados de *Bacillus* em plantas de alho, especialmente quanto a supressão dos patógenos *Setophoma terrestris* e *Stromatinia cepivora* em plantas micropropagadas e cultivadas em casa de vegetação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 USO DA MICROPROPAGAÇÃO DO ALHO PARA ANÁLISE DE BIOCONTROLE DE *S. cepivora* E *S. terrestris*

O material vegetal utilizado foi a cultivar Chonan, a qual pertence à classe nobre com 9 a 15 dentes por bulbo. Gemas apicais de  $\pm 1$  mm retiradas dos bulbilhos e previamente vernalizadas por 30 dias, foram utilizadas como explantes. O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com seis tratamentos (Tabela 8) e dez repetições para *S. cepivora* e nove para *S. terrestris*.

**Tabela 8-** Descrição dos tratamentos utilizados nos ensaios experimentais

Tratamento	Especificação
T1	Testemunha
T2	Isolado EB13
T3	Isolado EB18
T4	Fungo
T5	EB13 + Fungo
T6	EB18 + Fungo

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

Os bulbilhos foram submetidos ao seguinte processo de desinfestação: primeiramente, foram lavados com detergente Twen 20® e enxaguados com água destilada esterilizada. Após essa etapa, as películas que protegem os bulbilhos foram retiradas e cortados ao meio. Em sequência, no fluxo laminar, realizaram-se novas lavagens com detergente Twen 20® e água destilada esterilizada. Em seguida, os bulbilhos foram imersos em álcool 90 °GL por 2 min. Posteriormente, adicionou-se hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% até cobrir o material vegetal, deixando-a na solução por 30 min. Por fim, realizou-se tríplice lavagens com água destilada esterilizada (Longo, 2009).

Após a descontaminação, as gemas dos bulbilhos foram removidas e colocadas em tubo de ensaio contendo ponte de papel filtro e 10 mL de meio líquido MS (Murashige; Skoog, 1962) para o desenvolvimento vegetal. As culturas foram incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 a 19 °C (*S. cepivora*) e 25 °C (*S. terrestris*).

Com o surgimento das raízes e brotamento das folhas, o que ocorreu aos 15 dias após a implementação do experimento, efetuou-se a inoculação com 100 µL do crescimento bacteriano diluída à concentração de 10 UFC. mL<sup>-1</sup>, previamente crescidas por 24 h em meio LB líquido, pH 7,0 a 27 °C. Aos 15 dias após a inoculação dos isolados bacterianos, foi adicionado um microescleródio do respectivo fungo, por se tratar de patógenos extremamente agressivos e com crescimento rápido. Para isto, foi feita a diluição do crescimento do fungo, previamente cultivado em BDA por sete dias, a 19 °C (*S. cepivora*) ou 25 °C (*S. terrestris*) e fotoperíodo de 12 horas. Os microescleródios foram quantificados em câmara Neubauer.

Após adição do fungo, as culturas foram mantidas em incubadora BOD a 19 (*S. cepivora*) ou 25 °C (*S. terrestris*), com fotoperíodo de 12 horas. Esse processo foi realizado com os fungos separadamente (*S. cepivora* e *S. terrestris*).

As plantas foram avaliadas aos 45 dias após a inoculação com *S. cepivora* e 42 dias com *S. terrestris*. Os parâmetros analisados foram: comprimento da parte aérea da maior folha (altura), número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento médio das raízes, massa fresca aérea e raiz, massa seca aérea e raiz.

### 2.1.1 Análise estatística

A ANOVA foi realizada através do software RStudio e havendo significância, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott em nível de 5 %. Os dados de número de folhas passaram por transformação logarítmica, e a avaliação da massa fresca das raízes foram transformados por meio de Box-Cox, utilizado a função lambda para o experimento com *S. cepivora*. Para as análises do teste com *S. terrestris* foi necessário transformar os dados referente a comprimento médio das raízes, massa fresca da parte aérea e massa seca das raízes utilizando Box-Cox com a função lambda.

## 2.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Bacillus* EM ALHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O experimento foi realizado na casa de vegetação da UFSC - Curitibanos (27°17'04,7"S; 50°31'58,7"W), utilizando os isolados de *Bacillus* spp. EB13 e EB18, selecionados a partir das avaliações *in vitro*. Para compor os demais tratamentos, foi utilizado um tratamento inoculado apenas com *S. cepivora* e a testemunha (sem inoculação

fúngica/bacteriana). Foram avaliados também cada isolado, associado com *S. cepivora* previamente inoculado conforme descrito na Tabela 8.

Foram utilizadas nove repetições por tratamento e o ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Utilizou-se vasos de 5 L contendo solo da região classificado como Cambissolo Húmico (EMBRAPA, 2011), coletado na área agroecológica da fazenda experimental da UFSC-Curitibanos, retirando a vegetação da camada superficial, e coletando porções de solo da camada de 0,00 - 0,20 m. Nessa área, não são utilizados agrotóxicos e fertilizantes químicos.

Primeiramente, o solo foi analisado (Tabela 9) e adubado com base no manual de adubação e calagem recomendado para cultura do alho (CQFS, 2016). Foram acrescentados nitrogênio (N: 1,09 g de ureia) em cada vaso antes da semeadura. Fósforo e potássio, não foi necessária a aplicação.

**Tabela 9** - Análise do solo utilizado no experimento de inoculação de isolados de *Bacillus* spp. Curitibanos, SC.

M.O (%)	P (mg.dm <sup>-3</sup> )	K (mg.kg <sup>-1</sup> )	Al (cmol.dm <sup>-3</sup> )	pH 1:1
4,03	56,96	252	0,0	6,25

Fonte: Elaborado pela Autora (2025)

Cada vaso, 24 h antes do plantio, foram inoculados 22 microescleródios de *S. cepivora*, a partir de uma suspensão aquosa, quantificada através da câmara de Neubauer.

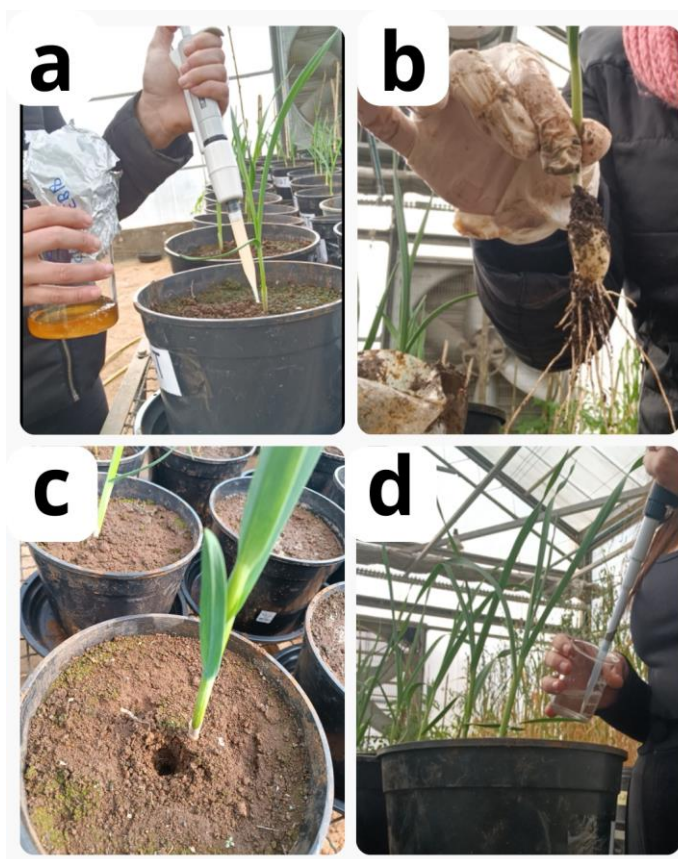
Para realizar o preparo dos inóculos bacterianos foram preparados 200 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido para cada isolado (EB13 e EB18), que foram mantidos na estufa a 27 °C por 24 h.

Após esse período, realizou-se a desinfestação dos bulbilhos de alho cultivar Chonan, classe 6, os quais foram imersos em álcool 92 °GL por dois minutos, e em seguida em hipoclorito de sódio (NaClO) a 3%, por um minuto e meio e depois foram realizadas dez lavagens em água destilada esterilizada (Calazans *et al.*, 2010). Os bulbilhos foram secados em fluxo laminar, por 45 minutos.

Em câmara de fluxo laminar foram adicionados 40 bulbilhos de alho em cada tratamento, imersos por 30 minutos. Em seguida, com auxílio de uma pinça, foram transferidos para placas de Petri esterilizadas por 45 minutos, até a secagem. Todos os vasos

receberam dois bulbilhos e aos 15 DAS, foi efetuado o desbaste (Figura 8b). Neste dia, foi realizado a reinoculação dos isolados bacterianos que foram previamente crescidos em 200 mL de LB líquido a 27 °C por 24 h. Com auxílio de uma pipeta volumétrica, adicionou-se 5 mL da suspensão bacteriana referente ao tratamento, sendo adicionados próximo à planta (Figura 8a).

**Figura 8-** Manejo do experimento com alho em casa de vegetação. (a) Reinoculação dos isolados com auxílio de uma pipeta volumétrica. (b) Desbaste após 15 DAS (c) Cavidade para adição de microescleródios do *S. cepivora*. (d) Adição dos microescleródios



Fonte: Autora (2025)

Como não houve sintoma da doença até 30 DAS, aplicou-se mais 22 microescleródios de *S. cepivora* (Figura 8c e d) por vaso. Nova aplicação foi feita aos 45 DAS, em que foram adicionados 200 microescleródios por vaso. Ainda não havendo sintoma, aos 60 DAS foram acrescentados 1800 microescleródios por vaso. Neste ponto, totalizaram-se 2044 microescleródios de *S. cepivora* por vaso, com densidade de 0,314 microescleródios g<sup>-1</sup> de solo, considerado uma classificação média de infecção por Nunes (1992). Aos 55 DAS foi realizado mais uma reinoculação, da mesma forma que descrito anteriormente. Foi realizada

diluição seriada dos tratamentos do dia do plantio e das reinoculações para permitir a quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC).

Realizou-se a coleta do experimento aos 90 DAS. Os parâmetros avaliados foram: número de folhas, diâmetro da haste, massa fresca da parte aérea, raiz e bulbo e massa seca da parte aérea, raiz e bulbo. A medida da altura das plantas foi realizada aos 30, 60 e 90 DAS.

### **2.2.1 Análise estatística**

O experimento foi conduzido em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizados) com nove repetições para cada tratamento. A ANOVA foi realizada através do software RStudio e havendo significância, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott em nível de 5%. Os dados referentes ao diâmetro da haste, biomassa fresca da parte aérea, raiz e bulbo e biomassa seca do bulbo passaram por transformação de dados utilizando o logaritmo, para atender os pressupostos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Bacillus* COM *S. cepivora* EM ALHO MICROPROPAGADO

O experimento foi avaliado após 45 dias após a implementação. Para a altura das plantas de alho, observou-se diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 10). O isolado EB18 e a testemunha não apresentaram diferença estatística entre si, destacando-se quando comparados aos demais tratamentos. A inoculação do isolado EB18 resultou em plantas com maior altura, com um incremento de 16,47% quando comparado à testemunha. Já os tratamentos com a presença do *S. cepivora* resultaram em alturas significativamente menores, indicando que a adição de patógeno afetou o crescimento da planta. A inoculação de EB13 sem o fungo também resultou em altura reduzida (- 24,61%) em comparação à testemunha.

Quando comparados apenas os tratamentos com a presença do patógeno, observou-se que os tratamentos contendo isolados bacterianos mesmo não diferindo estatisticamente, apresentaram incremento de 18,37% (EB13) e 24,61% (EB18), respectivamente, em comparação ao *S. cepivora*.

**Tabela 10-** Efeito dos isolados de *Bacillus* spp no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com *S. cepivora* aos 45 dias.

Tratamentos	Altura (cm)	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Comp. maior raiz (cm)	Comp. médio das raízes (cm)
Testemunha	10,93 a	2,90 a	8,80 a	5,43 a	3,75 a
EB13	8,24 b	2,40 a	7,10 a	4,35 a	2,60 a
EB18	12,76 a	2,80 a	9,20 a	4,94 a	3,09 a
<i>S. cepivora</i>	5,77 b	1,6 b	3,50 b	2,13 b	1,22 b
EB13+ <i>S. cepivora</i>	6,83 b	2,00 a	3,70 b	2,52 b	1,81 b
EB18+ <i>S. cepivora</i>	7,19 b	1,50 b	2,90 b	2,21 b	1,40 b
CV (%)	37,18	62,57	43,00	58,30	62,24
P-valor	4,32 10 <sup>-5</sup>	1,19 10 <sup>-3</sup>	3,68 10 <sup>-8</sup>	3,60 10 <sup>-4</sup>	9,53 10 <sup>-4</sup>

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

Comp. = Comprimento

CV = Coeficiente de variação

As barras indicam médias erro padrão ( $P < 0,05$ ) positivo.

Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste SK.

A avaliação com base no número de folhas possibilitou a formação de dois grupos, na qual a testemunha, isolado EB13, isolado EB18 e o EB13 associado com *S. cepivora* não apresentaram diferenças, com médias variando de 2,00 a 2,90. O outro grupo composto pelos tratamentos apenas com *S. cepivora* e EB18 associado com o patógeno mostraram médias significativamente menores para essa variável (1,60 e 1,50), mostrando que esses afetaram negativamente o desenvolvimento foliar em comparação aos demais, provocando redução de 44,83% e 48,28% quando comparado a testemunha.

Em relação ao número de raízes (Tabela 10), os tratamentos apresentaram comportamentos distintos, com diferenças significativas entre os grupos. Os tratamentos testemunha, inoculado com EB13 e inoculado com EB18 não apresentaram diferenças significativas entre si, com médias variando de 7,10 a 9,20. Os tratamentos com a presença do *S. cepivora* mostraram médias significativamente menores (3,50, 3,70, 2,90 respectivamente), revelando que o patógeno afetou consideravelmente o desenvolvimento radicular, apresentando uma redução de 60,23%; 57,95% e 67,05% em comparação a testemunha.

Na análise do comprimento da maior raiz (Tabela 10), os tratamentos apresentaram diferenças significativas, ocorrendo a formação de dois grupos. Os tratamentos sem a presença do patógeno não apresentaram diferenças estatística entre si, com comprimento da raiz variando de 4,35 a 5,43 cm, destacando a testemunha. Os tratamentos com a *S. cepivora* apresentaram médias relativamente menores (2,13 cm; 2,52 cm; 2,21 cm), mas não houve diferença entre esses.

Observou para o parâmetro referente ao comprimento médio das raízes (Tabela 10), a formação de dois grupos. O maior valor ocorreu para a testemunha e a menor média para o tratamento apenas com *S. cepivora*.

Aspectos gerais do desenvolvimento *in vitro* das plantas podem ser observados na Figura 9.

**Figura 9-** Plantas de alho cv Chonan micropropagadas com 45 dias inoculadas com isolados de *Bacillus* spp e *S. cepivora*.



**Fonte:** Autora (2025)

Para os parâmetros de massa fresca da parte aérea (Tabela 11), o maior valor foi encontrado para a testemunha e quando inoculado com EB18, com a mesma média (0,27 g), que diferiu das plantas inoculadas com EB13 (0,18 g), apenas *S. cepivora* (0,13 g), EB13 associados a *S. cepivora* (0,13 g), EB18 com o patógeno (0,17 g). Entretanto, o menor valor foi encontrado para o tratamento apenas o *S. cepivora* e EB13 associado com o patógeno (0,13 g). O EB18 associado ao *S. cepivora* apresentou média de 0,17 g, 30,77% de incremento quando comparado com apenas o patógeno.

**Tabela 11-** Efeito de isolados de *Bacillus* no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com *S. cepivora*

Tratamentos	Massa Fresca da Parte Aérea	Massa Fresca da Raiz *	Massa Seca da Parte Aérea	Massa seca da Raiz
Testemunha	0,27 a	0,15 a	0,03 a	0,02 a
EB13	0,18 b	0,15 a	0,02 a	0,02 a
EB18	0,27 a	0,19 a	0,02 a	0,02 a
<i>S. cepivora</i>	0,13 b	0,12 b	0,01 b	0,01 b
EB13+ <i>S. cepivora</i>	0,13 b	0,09 b	0,01 b	0,01 b
EB18+ <i>S. cepivora</i>	0,17 b	0,13 b	0,01 b	0,01 b
CV (%)	43,13	36,47	44,85	36,85
P – valor	1,63 10 <sup>-4</sup>	6,82 10 <sup>-4</sup>	5,23 10 <sup>-5</sup>	5,85 10 <sup>-7</sup>

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

CV = Coeficiente de variação

\*Dados passaram por transformação

As barras indicam médias erro padrão (P < 0,05) positivo.

Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste SK.

Referente à massa seca da parte aérea, ocorreu a formação de dois grupos, como já observado em outras avaliações. A maior média foi registrada no grupo da testemunha (0,03 g) e dos isolados sem a presença do fungo, destacando-se dos tratamentos, com a presença do patógeno (0,01 g).

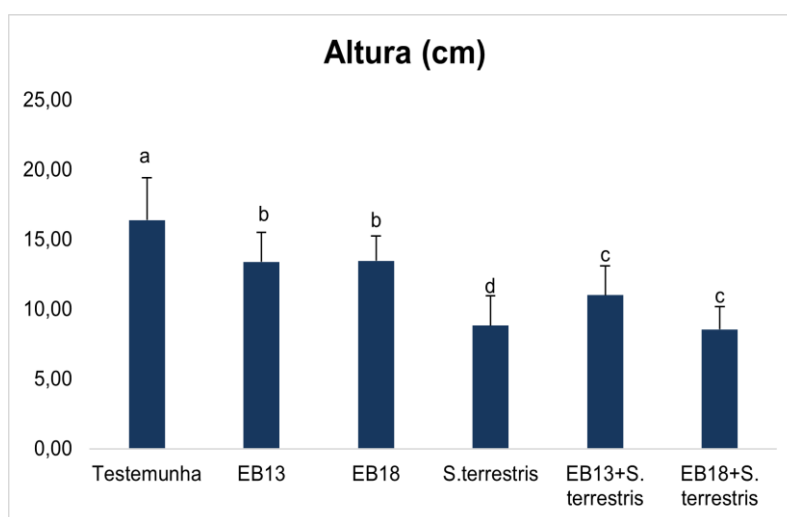
Para a massa fresca da raiz, o maior valor encontrado foi quando inoculado com EB18 (0,19 g), que diferiu dos tratamentos com *S. cepivora*. No entanto, não se diferenciou da testemunha e do isolado EB13, mas apresentou um incremento de 28,57% quando comparado com a testemunha.

Para a massa seca da raiz os tratamentos sem a presença do fungo apresentaram os maiores valores (0,02 g) e os tratamentos com *S. cepivora* apresentaram as menores médias (0,01 g), diferindo estatisticamente.

### 3.2 AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* INOCULADOS EM ALHO CULTIVADO *in vitro* COM *S. terrestris*

A avaliação do experimento ocorreu aos 42 dias após a implementação. Em relação ao parâmetro da altura das plantas de alho, foi possível notar diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Figura 10). A testemunha demonstrou média superior (16,39 cm). Os tratamentos inoculados com EB13 e EB18 dos tratamentos com a presença da *S. terrestris*, com médias de 13,40 e 13,47 cm de altura. O tratamento EB13 associado com *S. terrestris* se diferenciou dos tratamentos com apenas o *S. terrestris* e EB18 com o patógeno, no qual exibiu um incremento de 24,69 % quando comparado com o apenas o *S. terrestris*. Porém, a menor média foi dada pelo EB18 associada *S. terrestris* com uma altura de 8,56 cm.

**Figura 10-** Efeito dos tratamentos: *Bacillus* spp EB13, *Bacillus* spp EB18, *S. terrestris*, EB13 + *S. terrestris*, EB18 + *S. terrestris*, e a testemunha na altura das plantas de alho cv Chonan em micropropagação aos 42 dias.



**Fonte:** Autora (2025)

As barras indicam médias de erro padrão ( $P < 0,05$ ) positivas.

CV: 19,35%

Letras iguais não se diferem estatisticamente.

Com relação ao número de folhas e raízes, houve a formação de dois grupos distintos. Os sem a presença do patógeno sobressaíram aos demais tratamentos, apresentando médias de número de folhas 3,11; 2,89 e 2,89 respectivamente e folhas e número de raízes 5,78; 5,67 e 5,56 respectivamente.

**Tabela 12-** Efeito de isolados de *Bacillus* no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com *S. terrestris* aos 42 dias.

Tratamentos	Nº de Folhas	Nº de Raízes	Comp. da maior raiz (cm)	Comp. médio das raízes (cm)*
Testemunha	3,11 a	5,78 a	6,32 a	4,22 a
EB13	2,89 a	5,67 a	2,14 c	1,57 b
EB18	2,89 a	5,56 a	4,34 b	2,89 b
<i>S. terrestris</i>	1,89 b	3,56 b	1,93 c	1,53 c
EB13+ <i>S. terrestris</i>	1,67 b	2,78 b	2,04 c	1,36 c
EB18+ <i>S. terrestris</i>	1,44 b	2,89 b	1,94 c	1,16 c
CV (%)	31,66	40,51	34,46	49,50
P-valor	4,99 10 <sup>-6</sup>	2,15 10 <sup>-4</sup>	1,47 10 <sup>-11</sup>	2,36 10 <sup>-7</sup>

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

CV = Coeficiente de variação

\* Dados passaram por transformação

As barras indicam médias erro padrão (P < 0,05) positivo.

Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste SK.

Em relação ao comprimento da maior raiz, os tratamentos apresentaram comportamentos distintos, com diferenças significativas entre os grupos (Tabela 12). A testemunha destacou-se dos demais tratamentos com comprimento da raiz de 6,32 cm. O isolado EB18 obteve média de 4,34 cm, diferindo apenas da testemunha. O inoculado com EB13, e os tratamentos com a presença de *S. terrestris* obtiveram médias inferiores (2,14 a 1,93 cm).

Referente ao comprimento médio das raízes, notou-se que os tratamentos apresentaram diferenças significativas (Tabela 12). A testemunha destacou-se quando comparados aos demais tratamentos, apresentando a maior média (4,22 cm). Os inoculados com os isolados EB13 e EB18 se sobressaíram aos tratamentos com a presença do patógeno.

Para a biomassa da parte aérea, notou-se a formação de quatro grupos estatisticamente distintos. A maior média foi relatada para a testemunha com 0,35 g. Logo após, sobressaíram os tratamentos utilizando os isolados EB13 e EB18 (0,22 g e 0,24 g). O EB18 associado a *S. terrestris* obteve resultados negativos quando comparados aos demais, com média de 0,05 g, uma redução de 67,36%, quando comparado com *S. terrestris*.

**Tabela 13-** Efeito de isolados de *Bacillus* no alho cv Chonan em micropropagação inoculado com *S. terrestris* aos 42 dias.

Tratamentos	Massa Fresca da Parte Aérea (g)*	Massa Fresca da Raiz (g)	Massa Seca da Parte Aérea (g)	Massa seca da Raiz (g) *
Testemunha	0,35 a	0,16 a	0,03 a	0,02 a
EB13	0,22 b	0,12 b	0,03 a	0,02 a
EB18	0,24 b	0,11 b	0,02 a	0,02 a
<i>S. terrestris</i>	0,14 c	0,12 b	0,01 b	0,01 b
EB13+ <i>S. terrestris</i>	0,13 c	0,10 b	0,01 b	0,01 b
EB18+ <i>S. terrestris</i>	0,05 d	0,08 b	0,01 b	0,01 b
CV (%)	21,00	35,12	34,46	2,71
P-valor	1,99 10 <sup>-11</sup>	8,98 10 <sup>-3</sup>	4,90 10 <sup>-12</sup>	9,73 10 <sup>-14</sup>

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

CV = Coeficiente de variação

\* Dados passaram por transformação.

As barras indicam médias erro padrão (P < 0,05) positivo.

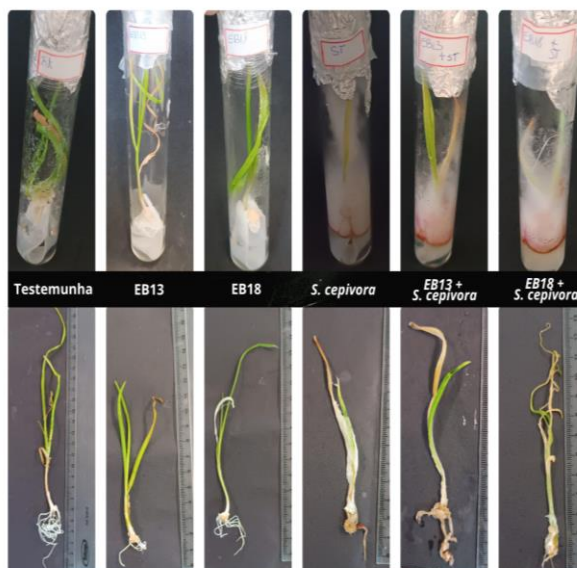
Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste SK.

Com relação à massa seca da parte aérea, ocorreu a formação de dois grupos (Tabela 12). Os sem a presença do patógeno diferiu-se dos tratamentos com *S. terrestris*.

Para a biomassa fresca da raiz das plantas em micropropagação, o maior valor encontrado foi para a testemunha (0,16 g), que se diferenciou dos demais tratamentos. O menor valor foi encontrado para o isolado EB18 com o patógeno (0,08 g) (Tabela 12). Para a biomassa seca, os tratamentos sem a presença do fungo patogênico apresentaram as maiores médias. Os tratamentos com a presença do fungo mostraram médias significativamente inferiores (0,01 g).

Na Figura 11, podem ser observados os aspectos gerais do desenvolvimento *in vitro* das plantas.

**Figura 11-** Efeito dos tratamentos utilizando isolados de *Bacillus* spp. (EB13 e EB18) na ausência e presença do *S. terrestris* no alho cv Chonan em micropropagação após 42 dias.



Fonte: Autora (2025)

### 3.3 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Bacillus* INOCULADOS EM ALHOS CULTIVADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Durante o experimento, não foram observados sintomas de ataque do patógeno *S. cepivora* às plantas. Entretanto, observou-se incremento em alguns parâmetros avaliados.

Referentes a quantificação de UFC. mL<sup>-1</sup> dos inóculos no dia do plantio. Observou-se uma semelhança entre os valores das UFC de cada tratamento. O isolado EB13 apresentou 36.10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> e o isolado EB18 12.10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Valores aproximados foram encontrados nas reinoculações, apresentando uma quantificação de 45. 10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> (EB13) e 34.10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> (EB18) aos 15 DAS e 57.10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup> (EB13) e 48.10<sup>6</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>(EB18) para a reinoculação aos 55 dias. O isolado EB13 apresentou UFC maior que o isolado EB18. As quantidades de UFC. mL<sup>-1</sup> podem afetar o desenvolvimento da planta, podendo ser positivamente ou negativamente, com base na concentração aplicada.

Na Tabela 14, observou-se que não houve diferença estatística para a altura das plantas, nos períodos de 30 e 60 DAS entre os tratamentos. No entanto, aos 90 DAS, foi possível identificar diferenças significativas. A inoculação do isolado EB18 associada ao *S. cepivora* destacou-se com altura média de 73,58 cm, representando um incremento de 27,43% em relação à testemunha. Os tratamentos inoculados com EB18 e EB13 com o patógeno também

apresentaram resultados superiores, com alturas de 64,89 cm e 67,13 cm, respectivamente, correspondendo a aumentos de 10,47% e 14,28% em comparação à testemunha.

**Tabela 14-** Efeito dos tratamentos: *Bacillus* spp EB13, *Bacillus* spp EB18, *S.cepivora*, EB13 + *S. cepivora*, EB18 + *S. cepivora*, e a testemunha no alho cv Chonan em casa de vegetação, Curitiba/SC

Altura (cm)					
Tratamentos	30 DAS	60 DAS	90 DAS	Nº de Folhas	Ø da haste (cm)*
Testemunha	53,27 a	67,30 a	58,74 c	6,44 b	4,44 b
EB13	53,18 a	69,30 a	58,54 c	6,67 b	5,22 b
EB18	54,91 a	72,18 a	64,89 b	7,33 a	5,89 b
<i>S. cepivora</i>	52,52 a	68,52 a	59,04 c	6,44 b	5,33 b
EB13+ <i>S. cepivora</i>	55,13 a	70,33 a	67,13 b	7,44 a	5,56 b
EB18+ <i>S. cepivora</i>	54,98 a	72,32 a	73,58 a	8,11 a	7,67 a
CV (%)	8,74	8,51	10,83	15,83	14,19
P- valor	0,76	0,41	8,96 10 <sup>-5</sup>	0,015	0,0037

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

Ø = Diâmetro

\* Dados passaram por transformação

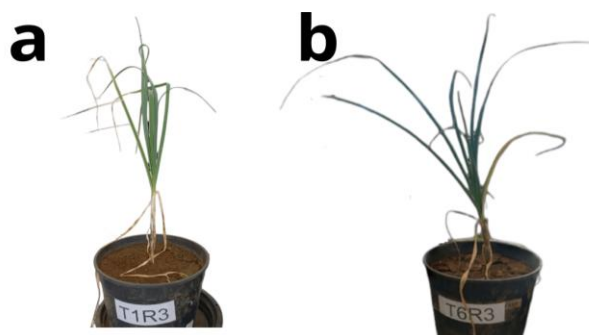
CV = Coeficiente de variação

As barras indicam médias erro padrão (P < 0,05) positivo.

Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste SK.

Em relação ao número de folhas, os tratamentos com EB18, EB13 e EB18 com patógeno destacaram-se estatisticamente com médias de 7,33, 7,44 e 8,11, respectivamente, representando incrementos de 13,82%, 15,53% e 25,93% em relação à testemunha (Tabela 14). Quanto ao diâmetro da haste, apenas o EB18 associado com *S. cepivora* apresentou diferença estatística significativa, com um diâmetro médio de 7,67 cm, correspondendo a um aumento de 72,74 % em comparação à testemunha, como observado nas Figura 12a e Figura 12b.

**Figura 12-** Plantas de alho cv Chonan cultivadas em vasos de 5 L em cultivo protegido. (a) Testemunha aos 90 DAS (d) Tratamento EB18 associado ao *S. cepivora* aos 90 DAS.



Fonte: Autora (2025)

Para o parâmetro de avaliação massa fresca da parte aérea, se destacou a inoculação EB18 com *S. cepivora* apresentando valor médio de 33,37 g, acréscimo de 110,40 % quando comparado à testemunha (Tabela 15). Mesmo não havendo diferença estatística entre os demais tratamentos, os tratamentos com inoculação EB13, EB18 e EB13 associado com *S. cepivora* apresentaram massa fresca aérea de 18,44 g; 23,13 g e 22,85 g, incremento de 16,27%, 45,84% e 44,07% em relação à testemunha.

**Tabela 15-** Efeito dos tratamentos: *Bacillus* spp EB13, *Bacillus* spp EB18, *S.cepivora*, EB13 + *S. cepivora*, EB18 + *S. cepivora*, e a testemunha no alho cv Chonan referente as biomassas fresca e seca em casa de vegetação, Curitiba/SC

Tratamentos	Biomassa Fresca			Biomassa seca		
	Aérea *	Raiz	Bulbo *	Aérea	Raiz	Bulbo*
<b>Testemunha</b>	15,86 b	14,83 a	12,43 a	2,58 b	0,96 a	4,62 a
<b>EB13</b>	18,44 b	15,96 a	14,11 a	3,09 b	0,95 a	5,12 a
<b>EB18</b>	23,13 b	15,35 a	16,78 a	3,33 b	1,40 a	6,26 a
<b><i>S. cepivora</i></b>	19,37 b	11,45 a	13,09 a	3,31 b	0,87 a	4,52 a
<b>EB13+<i>S.cepivora</i></b>	22,85 b	13,24 a	14,11 a	3,49 b	0,95 a	4,70 a
<b>EB18+<i>S.cepivora</i></b>	33,37 a	13,20 a	15,18 a	4,84 a	1,00 a	3,94 a
CV (%)	11,22	27,69	7,66	36,77	27,69	21,10
P – valor	0,0025	0,1561	0,0702	0,0139	0,1560	0,1079

**Fonte:** Elaborado pela autora (2025)

CV = Coeficiente de variação

\* Dados passaram por transformação

As barras indicam médias erro padrão ( $P < 0,05$ ) positivo.

Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste SK.

Para os demais parâmetros de massa fresca não se observou diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, a menor média foi obtida pela testemunha com 12,43 g para o peso fresco do bulbo, mostrando um incremento dos demais tratamentos para esse parâmetro.

Com relação a massa seca da parte aérea, a inoculação com o isolado EB18 associado com *S. cepivora* se destacou quando comparado aos demais tratamentos, com 4,84 g apresentando acréscimo de 87,59% quando comparado à testemunha, entretanto a menor média foi da testemunha com 2,58 g. Referente à massa seca da raiz e dos bulbos, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Porém, a inoculação com o isolado EB18 apresentou as maiores médias, um acréscimo de 45,83% e 35,50% em relação à testemunha.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Bacillus* COM *S. cepivora* EM ALHO MICROPROPAGADO

Os dois isolados bacterianos utilizados nesta investigação foram estudados por suas propriedades de promoção do crescimento vegetal e biocontrole baseados em estudos prévios de Balbinot, Rodrigues e Botelho (2020), Faquin (2022) e resultados obtidos neste estudo (Seção 1).

Os parâmetros analisados demonstraram respostas distintas conforme o tratamento aplicado. Para altura e massa fresca da parte aérea, a testemunha e o isolado EB18 sem o patógeno se destacam dos demais tratamentos. Para os demais parâmetros, a testemunha e os tratamentos com os isolados EB13 e EB18 não diferiram entre si. No entanto, diferiram dos tratamentos com o *S. cepivora*.

Por se tratar de cultivo *in vitro*, o espaço é limitado, os isolados se igualarem à testemunha, é uma resposta positiva, pois mostra uma ação neutra, não havendo prejuízos às plantas de alhos. Obteve-se esses resultados possivelmente devido a características bioestimulantes, como produção de AIA, fitohormônio que estimula a produção de raízes, e consequentemente a absorção de nutrientes (Ranjan *et al.*, 2024), o qual estimula o alongamento e a proliferação das raízes (Spaepen, Vanderleyden e Remans, 2007). Estudo anterior mostrou que o isolado EB18 apresentou produção de AIA de  $13,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto o EB13 produziu  $6,36 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020). Além disso, esses isolados possuem capacidade de solubilizar de fosfatos (Seção 1).

Essa produção de AIA nas raízes das plantas afeta também o desenvolvimento da parte aérea, consequentemente maior captação da luz, sendo assim, importante para realizar a fotossíntese (Simkin *et al.*, 2022). Na cultura do alho, quanto maior o número de folhas verdes ao final do ciclo, consequentemente haverá maior área foliar, estimulando assim o desenvolvimento do bulbo (Resende *et al.*, 2013).

Estudos como de Silva (2022), também observou que os isolados de *Bacillus megaterium* 21N e 33N, não apresentaram efeito no desenvolvimento inicial (30 dias) de plantas de acácia-negra *in vitro*, igualando a testemunha. Também relatou que os isolados apresentaram capacidade de produzir de AIA. Resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo, indicando que isolados que apresentam esse tipo de mecanismo, quando aplicados em cultivo *in vitro*, pode estar ocorrendo produção em excesso, que acaba limitando

o desenvolvimento da planta nesse sistema. Exercendo um efeito neutro no crescimento das plantas.

Os tratamentos com a presença da *S. cepivora*, resultaram em médias significativamente menores (Tabela 10 e 11), em todos os parâmetros avaliados, mesmo quando inoculado com os isolados, não apresentaram diferença significativas. Isso indicou que a presença do patógeno inibiu o crescimento das plantas, o que era esperado. No entanto, foi possível observar que os tratamentos com os isolados apresentaram incrementos nos parâmetros avaliados em comparação apenas com o *S. cepivora*. Podendo ter apresentado uma possível proteção à planta, entretanto, é necessário estudos futuros para confirmar esse indício. Em estudos anteriores, os isolados apresentaram inibição do *S. cepivora* de 12,96% (EB13) e 27,44% (EB18) *in vitro*, mostrando que apresentam mecanismos capazes de inibir o patógeno (Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020). Os isolados apresentaram também produção de enzimas de quitinase e celulase e produção de antibióticos demonstrado na seção 1. Mecanismos esses importantes para o controle de fitopatógenos (Dobrzyński *et al.*, 2023; Dimkić *et al.*, 2022).

Além disso, pelos isolados apresentarem mecanismos capazes de inibir os patógenos, o que pode ter ocorrido durante o cultivo *in vitro*, também apresentam mecanismos de promoção de crescimento, que podem ter potencializado com quando adicionado o patógeno ao cultivo. Para possível confirmação, é necessário realizar novos testes e ajustes na metodologia.

Na literatura, não há trabalhos parecidos, embora existam estudos utilizando aplicação RPCP em cultivo *in vitro* em diferentes espécies, é a primeira vez que é realizada a utilização de micropropagação com intuito de identificar o controle de fitopatógenos através da inoculação de *Bacillus* spp. e conseqüentemente a sua capacidade em promover o crescimento de plantas. No entanto, é necessário ajustes de metodologia para melhor observar essas ações de estímulo da planta e capacidade de proteção.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* INOCULADOS EM ALHO CULTIVADO *in vitro* COM *S. terrestris*

Observou-se diferenças significativas no crescimento das plantas de alho entre os tratamentos testados. A testemunha sobressaiu em relação à altura, comprimento da maior raiz, comprimento médio das raízes, massa fresca da parte aérea e da raiz.

Os resultados deste experimento indicaram que os isolados de *Bacillus* spp. não agiram como promotores de crescimento do alho em micropropagação, apresentando desempenho inferior à testemunha nos parâmetros avaliados.

Os isolados provavelmente acabaram competindo com a planta, devido apresentarem crescimento rápido (Seção 1/ item 3.3) com grande quantidade celular. O isolado EB18 apresenta um crescimento mais rápido, no entanto ele desacelera, diminuindo o número de células entre 36 e 48 horas. O isolado EB13 apresenta um crescimento inicial mais prolongado, porém o número de células é relativamente maior que o EB18. Por se tratar de um ambiente limitado de cultivo, há indicativos que houve competição por nutrientes, afetando o desenvolvimento das plantas.

Além de apresentarem crescimento rápido, os isolados também apresentam produção de antibióticos do grupo fenazinas em seu extrato celular (Seção 1/ Item 3.4). Esses compostos conhecidos por apresentarem efeitos inibitório de patógenos (Xun *et al.*, 2023; Biessy *et al.*, 2021), porém em altas concentrações podem se tornar tóxicos para plantas (Perry; Newman, 2022; Toohey; Nelson; Krotkov, 1965). Podendo ter ocorrido essa produção de antibióticos pelos isolados, afetando o desenvolvimento da planta pela presença desse composto no meio de cultivo. Principalmente, o isolado EB13 por apresentar cinco vezes mais concentração do que o isolado EB18 conforme observado na Tabela 6.

Para o parâmetro referente ao número de folhas/raízes, massa seca da parte aérea e radicular, não foi possível observar diferença entre os isolados e a testemunha, indicando que não houve promoção do crescimento nas plantas de alhos micropropagadas. Esses resultados estão em consonância com trabalhos anteriores, como da Belincanta *et al.* (2021) relataram que nenhum tratamento bacteriano (*S. marcescens*, *B. subtilis*, *B. parabrevis*) promoveu efeito relevante no crescimento *in vitro* do bambu *Guadua chacoensis*. Esses resultados sugerem que os isolados testados, naquelas condições, apresentaram ação neutra, em comparação ao tratamento controle.

Os tratamentos com a *S. terrestris*, não diferiram entre si, apresentando crescimento inferior quando comparado com a testemunha. Já era o esperado, por se tratar de um fitopatógeno do alho. Principalmente, tratando-se de cultivo *in vitro*, com meio rico em sais, ótimo para o crescimento.

Os resultados obtidos demonstram que é necessário adaptar a metodologia para estudos futuros, testar em diferentes concentrações do meio MS, pois é rico em nutrientes, além do meio em outras formas de estado físico como semi-sólido, cultivo em recipientes maiores como

frascos de cultivo e retardar o período de aplicação dos isolados com intuito da planta se estabelecer melhor no ambiente de cultivo.

### 4.3 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Bacillus* INOCULADOS EM ALHOS CULTIVADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Durante o experimento, não foi possível observar o ataque do patógeno *S. cepivora* nas plantas. Uma das principais causas pode estar relacionada às condições ambientais da casa de vegetação, onde a temperatura variou entre 23 °C a 28 °C. Essas temperaturas estão acima da faixa ideal para o desenvolvimento do patógeno, que geralmente requer temperatura em torno de 13 °C a 19 °C para infectar as plantas (Coley-smith; Mitche; Sansford, 1990). Assim, a temperatura pode ter inibido a atividade do patógeno, impedindo que esse causa-se danos visíveis às plantas.

Entretanto, observou-se incremento nos diversos parâmetros avaliados, quando houve a inoculação dos isolados. A altura das plantas é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o crescimento vegetal e a eficácia de promotores de crescimento. No presente estudo, observou-se que, nos períodos de 30 e 60 dias após a semeadura (DAS), não houve diferenças estatísticas significativas. Esse resultado pode estar associado ao tempo necessário para que ocorra a interações entre as bactérias e a planta em ambiente edáfico (Tsotetsi *et al.*, 2022). No entanto, aos 90 DAS, foram detectadas diferenças significativas, com destaque para o tratamento com EB18 associado a *S. cepivora*, que apresentou incremento de 27,43% em relação à testemunha, diferiu dos demais tratamentos. Esse resultado pode estar relacionado aos mecanismos apresentados pelo isolado (Seção I). Algumas RPCP estimulam mecanismos de defesa das plantas, e indiretamente, estimulam o crescimento vegetal (Sood *et al.*, 2021).

O isolado com patógeno apresentou incrementos significativos em quase todos os parâmetros (Tabela 14 e 15). Isto indicou o potencial estímulo do isolado ao crescimento da planta, apontando o isolado para novas análises.

Na literatura é comum encontrar testes utilizando *Bacillus* como promotor de crescimento de plantas em diversas culturas. Ratnaningsih *et al.* (2023) observaram que plantas de soja inoculadas com *Bacillus* sp. NCTB5I, obteve aumento significativo para a massa seca da raiz de soja em comparação ao controle. Oliveira *et al.* (2023) em seu estudo obtiveram resultados favoráveis com a utilização de *Bacillus subtilis* em alface, apresentando os maiores número de folhas (18,8 e 18,6 folhas planta<sup>-1</sup>) em concentrações de 15,6.10<sup>3</sup> e 31,2.10<sup>3</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Jinal e Amaresan (2020), relataram que plantas de tomate inoculadas

com *Bacillus subtilis* (SSR21) na presença dos patógenos com *R. solanacearum* e *F. oxysporum* separadamente, se mostrou efetivo em todos os parâmetros avaliados em relação ao controle (somente o patógeno). Esses estudos mostram a eficiência dos *Bacillus* em estimular o crescimento das plantas e possível controle de fitopatógenos, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. No entanto, não há muitos trabalhos mostrando esse efeito quando associado a fungos patogênicos.

O isolado EB18 e EB13 com *S. cepivora* também apresentou aumento significativo na altura das plantas aos 90 DAS (14,28%), indicando que ambos os isolados possuem capacidade de estimular o crescimento vegetal. Esses achados estão em concordância com estudos anteriores, que demonstraram a eficácia de *Bacillus* spp. na promoção do crescimento de plantas por meio da produção de fitormônios (Chobotarov *et al.* 2017; Wagi; Ahmed, 2019) e solubilização de nutrientes (Sousa *et al.*, 2020). Mecanismos esses presentes nos isolados utilizados. O isolado EB13 pode ter produzido compostos que inibem o desenvolvimento do fungo, mesmo ele não apresentando o ataque às plantas, estava presente no solo, contudo, na seção 1/ item 3.4, mostra que ambos os isolados apresentam produção de compostos que indicam ser fenazinas, podendo ser esse um dos mecanismos que fez sobressair com relação à testemunha. Juntamente, com outros mecanismos que os isolados apresentam como: solubilização de fosfato, enzimas hidrolíticas, e produção de AIA (Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020).

Referente às massas fresca e seca da parte aérea, o tratamento com EB18 associado a *S. cepivora*, apresentou incremento de 110,40% e 87,60% quando comparado à testemunha, sugerindo, mais uma vez, seu papel como promotor do crescimento de plantas de alho. Isto indica que o acúmulo de biomassa se deu pela atividade fotossintética, plantas com maior área foliar ampliam a capacidade de fotossintetizar (Gotoh *et al.*, 2018). Quantidade de material orgânico acumulado pela planta, é a resposta do carbono fixado na fotossíntese (Lambers; Oliveira, 2019) refletindo nos resultados observados. Algum mecanismo isolado EB18 produziu estimulando o crescimento da planta, conseqüentemente o desenvolvimento da parte aérea mesmo na presença do fungo, indicando que algum mecanismo de controle ao *S. cepivora*.

A produção de AIA, podendo ter induzido o desenvolvimento da raiz do alho, desse modo, absorveu mais nutrientes do solo e conseqüentemente promoveu desenvolvimento aéreo da planta com superioridade. Esse mecanismo já foi relatado nos isolados (Balbinot; Rodrigues; Botelho, 2020).

A massa seca de raízes e bulbos é um parâmetro fundamental para avaliar a eficiência de tratamentos promotores de crescimento, pois reflete diretamente o acúmulo de biomassa e a alocação de recursos pela planta (Wang *et al.*, 2023). No presente estudo, o tratamento com o isolado EB18, apresentou os maiores valores de massa seca tanto de raízes quanto bulbos, os incrementos em cada órgão do vegetal foram de 45,83 % em relação às raízes e 35,50 % para bulbo, quando comparado à testemunha, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos.

O incremento na massa seca das raízes pode ser um indicativo de que o isolado EB18 promoveu sistema radicular mais abundante, o que é essencial para a absorção eficiente de água e nutrientes. Esse resultado está em concordância com estudos como Chagas Junior *et al.* (2022) também observaram que as estirpes de *Bacillus subtilis* (Bs05, Bs06 e Bs10) foram superiores às demais estirpes com relação a massa seca da raiz da soja aos 52 DAS. Estudos do Ahmed *et al.* (2022) mostraram que plantas de tabaco, quando inoculadas com *Bacillus* sp.WS-10 apresentam acúmulo de matéria seca nas raízes com relação controle, mostrando a eficiência desses *Bacillus* em induzir o desenvolvimento do sistema radicular das plantas inoculadas.

O aumento na massa seca dos bulbos pode estar relacionado à maior disponibilidade de nutrientes, como fósforo, proporcionada pela atividade do EB18, como observado na Seção I. Estudos como os de Mounir *et al.* (2020) demonstraram que *Bacillus* spp. são eficientes na solubilização de fosfatos e na fixação de nitrogênio, o que pode resultar em maior acúmulo de biomassa nas partes aéreas e subterrâneas das plantas. Mazzuco, Torres Júnior e Botelho (2023) observaram que o tratamento composto por *Pseudomonas* spp. CBS02 e *Bacillus* spp. EB17 sem adubação fosfatada foi superior aos demais tratamentos com relação à produtividade do alho (11,93 t ha<sup>-1</sup>). Younes *et al.* (2023) relataram que plantas de cebolas tratadas com *Bacillus megaterium* manifestaram aumentos significativos no peso do bulbo (68,92%) e rendimento total de cebola (28,57%), quando comparado com o controle. Jędrszczyk *et al.* (2018) notaram que alhos inoculados com *Bacillus subtilis* apresentaram maior teor de matéria seca dos bulbos. Os resultados obtidos podem estar relacionados com a concentração de UFC de cada tratamento, como descrito no Item 3.3, destacando, o isolado EB13 apresentou concentração maior de células que o isolado EB18, limitando o desenvolvimento da planta de alho quando comparado ao isolado EB18. Levando em consideração a utilização do solo não estar esterilizado, e a microbiota presente no mesmo pode ter exercido influência sobre o desenvolvimento da planta, direta ou indiretamente, por meio de mecanismos como competição por nutrientes, produção de hormônios e toxinas, entre

outros.

Dessa forma, os resultados obtidos sugerem-se que a inoculação com isolado EB18 estimula o crescimento da planta, aumentando a produtividade da cultura do alho, através dos mecanismos citados anteriormente.

## CONCLUSÃO

Os isolados EB13 e EB18 apresentaram comportamentos distintos de acordo com as condições experimentais. No experimento em micropropagação, a inoculação dos isolados não apresentou estímulo ou proteção à planta, com ou sem a inoculação dos patógenos (*S. cepivora* e *S. terrestris*). Entretanto, são necessários ajustes na metodologia para que alguns incrementos notados sejam evidenciados.

Em casa de vegetação, *S. cepivora* não manifestou ataque às plantas, mas foi possível observar que o isolado EB18 estimulou o crescimento do alho.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para trabalhos futuros, a necessidade de aprimoramento da metodologia experimental previamente desenvolvida, baseada na técnica de micropropagação, sendo interessante testar diferentes concentrações do meio de cultivo, utilizar frascos de vidro (340 mL) por apresentar maior espaço diminuindo a competição, com intuito de observar os efeitos com precisão. Utilizar explantes de 30 DAA para que a planta esteja bem adaptada para inoculação dos isolados bacterianos e posteriormente o fitopatógeno.

Sugere-se avaliar a potencialidade desses isolados quanto a influência na fisiologia do desenvolvimento vegetal, a síntese energética dos isolados com os fitopatogênicos e realizar testes utilizando solos de lavouras contaminados com os fitopatógenos, pois a chance de manifestação é maior.

## REFERÊNCIAS

AHMED, Waqar; ZHOU, Guisu; YANG, Jun; MUNIR, Shahzad; AHMED, Ayesha; LIU, Qi; ZHAO, Zhengxiong; JI, Guanghai. *Bacillus amyloliquefaciens* WS-10 as a potential plant growth-promoter and biocontrol agent for bacterial wilt disease of flue-cured tobacco. **Egyptian Journal Of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, 19 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s41938-022-00527-5>.

ANAPA - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. **Nosso Alho**. Brasília, n. 20, p.52, agosto 2019.

BALBINOT, William Gilberto; RODRIGUES, Sabrina; BOTELHO, Glória Regina. Isolates of *Bacillus* sp. from garlic: effect on corn development and plant growth-promoting mechanisms. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, p. 1-17, 2020. Revista Brasileira de Ciencia do Solo. <http://dx.doi.org/10.36783/18069657rbc20200043>.

BAQUERO, Christian David Vargas; COTES Alba Marina. Consórcios microbianos como uma opção para o biocontrole de *Stromatinia Cepivora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.46, n.1, p. 1–10, 2023. doi:10.1080/07060661.2023.2262959.

BELINCANTA, Cristina; BOTELHO, Gloria; ORNELLAS, Thiago Sanches; ZAPPELINI, Julia; GUERRA, Miguel Pedro. Characterization of the endophytic bacteria from in vitro cultures of *Dendrocalamus asper* and *Bambusa oldhamii* and assessment of their potential effects in in vitro co-cultivated plants of *Guadua chacoensis* (Bambusoideae, Poaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 58, n. 1, p. 122-132, 15 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-021-10204-1>.

BIESSY, Adrien; NOVINSKAK, Amy; ST-ONGE, Renée; LÉGER, Geneviève; ZBORALSKI, Antoine; FILION, Martin. Inhibition of Three Potato Pathogens by Phenazine-Producing *Pseudomonas* spp. Is Associated with Multiple Biocontrol-Related Traits. **Mosphere**, v. 6, n. 3, 30 jun. 2021. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00427-21>.

CABRAL, Juliana Silva Rodrigues. **Otimização de parâmetros físico-químicos e microbiológicos no estabelecimento *in vitro* de explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e na sua promoção do crescimento**. 2012. 155 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, Cap. 8. 2012.

CALAZANS, Giovanna Moura; CRUZ, José Carlos; MOREIRA, José Aloísio Alves; MARRIEL, Ivanildo Evódio. Isolamento e seleção de estirpes de Rizóbios para espécies de adubo verde. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/BIC JÚNIOR, 1., 2010. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. .

CASSANI, Nahieli Silva -; MANCERA, Karen Fabiola; CANUL, Jorge; AVILES, Luis Ramirez; SOLORIO, Javier; GÜERCA, Patricia; GALINDO, Francisco. EVALUATION OF THE SUSTAINABLE PERFORMANCE OF NATIVE AND INTENSIVE SILVOPASTORAL SYSTEMS IN THE MEXICAN TROPICS USING THE MESMIS

FRAMEWORK. **Tropical And Subtropical Agroecosystems**, v. 25, n. 3, p. 1, 17 ago. 2022. Universidad Autonoma de Yucatan. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.3556>.

CHAGAS JUNIOR, Aloisio Freitas; BORBA, Elias; MARTINS, Albert Lennon Lima; SOUZA, Manuella Costa; GOMES, Flávia Luane; OLIVEIRA, Rodrigo Silva de; CHAGAS, Lillian França Borges. *Bacillus* sp. como promotor de crescimento em soja *Bacillus* sp. Revista de Ciências Agrárias, 23 out. 2021. Revista de Ciências Agrárias. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA.22557>.

CHAGAS JUNIOR, Aloísio Freitas; BRAGA JUNIOR, Gaspar Moreira; ; LIMA, Celso Afonso; MARTINS, Albert Lennon Lima; SOUZA, Manuella Costa; CHAGAS, Lillian França Borges. *Bacillus subtilis* as a vegetable growth promoter inoculant in soybean. Diversitas journal, v. 7, n. 1, p. 1 - 16, 2022.

CHAGAS, Lillian França Borges; MARTINS, Albert Lennon Lima; CARVALHO FILHO, Magno Rodrigues de; MILLER, Luciane de Oliveira; OLIVEIRA, José Cláudio de; CHAGAS JUNIOR, Aloisio Freitas. *Bacillus subtilis* E *Trichoderma* sp. NO INCREMENTO DA BIOMASSA EM PLANTAS DE SOJA, FEIJÃO-CAUPI, MILHO E ARROZ. **Agri-Environmental Sciences**, v. 3, n. 2, p. 10-18, 22 mar. 2018. Agri-Environmental Sciences - AGRIES. <http://dx.doi.org/10.36725/agries.v3i2.430>.

CHOBOTAROV, Andrii; VOLKOGON, Mykola; VOYTENKO, Lesya; KURDISH, Ivan. Accumulation of phytohormones by soil bacteria *azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* under the influence of nanomaterials. Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences, v. 7, n. 3, p. 271-274, 1 dez. 2017. Slovak University of Agriculture in Nitra. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.271-274>.

CQFS - Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Manual de calagem e adubação para os Estados de Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 376p, 2016.

DIAS, Anderson dos Santos; SANTOS, Cleberton Correia. Bactérias promotoras de crescimento de plantas: conceitos e potencial de uso. **Pantanal Editora**, Nova Xavantina, MT: Pantanal, pag. 98, 2022.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Serviço nacional de pesquisa de solos: manual de métodos de análise de solo. 3. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos; 2011. 230 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/990374/1/ManualdeMtodosdeAnilisedeSolo.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2024.

ERIG, Alan Cristiano; SCHUCH, Márcia Wulff. Morfogênese in vitro de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 575-581, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542005000300010>.

FAN, Di; SMITH, Donald L.. Characterization of Selected Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Non-Host Growth Promotion Effects. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 1, p. 1, 3 set. 2021. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.00279-21>.

FARIA, Paula Sperotto Alberto; MARQUES, Vinicius de Oliveira; SELARI, Priscila Jane Romano Gonçalves; MARTINS, Paula Fabiane; SILVA, Fabiano Guimarães; SALES, Juliana de Fátima. Multifunctional potential of endophytic bacteria from *Anacardium othonianum* Rizzini in promoting in vitro and ex vitro plant growth. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126600, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2020.126600>.

GORSHKOV, Vladimir; TSERS, Ivan. Plant susceptible responses: the underestimated side of plant-pathogen interactions. **Biological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 45-66, 26 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12789>.

GOTOH, Eiji; SUETSUGU, Noriyuki; YAMORI, Wataru; ISHISHITA, Kazuhiro; KIYABU, Ryota; FUKUDA, Masako; HIGA, Takeshi; SHIROUCHI, Bungo; WADA, Masamitsu. Chloroplast Accumulation Response Enhances Leaf Photosynthesis and Plant Biomass Production. **Plant Physiology**, v. 178, n. 3, p. 1358-1369, 28 set. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.18.00484>

JęDRSZCZYK, Elżbieta; KOPEĆ, Aneta; BUCKI, Piotr; AMBROSZCZYK, Anna M.; SKOWERA, Barbara. The Enhancing Effect of Plants Growth Biostimulants in Garlic Cultivation on the Chemical Composition and Level of Bioactive Compounds in the Garlic Leaves, Stems and Bulbs. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 1, p. 81-91, 26 jul. 2018. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. <http://dx.doi.org/10.15835/nbha47111074>.

JINAL, Naik Hardik; AMARESAN, Natarajan. Evaluation of biocontrol *Bacillus species* on plant growth promotion and systemic-induced resistant potential against bacterial and fungal wilt-causing pathogens. **Archives Of Microbiology**, v. 202, n. 7, p. 1785-1794, 7 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-01891-2>.

LAMBERS, Hans; OLIVEIRA, Rafael S. Fotossíntese, Respiração e Transporte de Longa Distância: Fotossíntese. In: *Ecologia Fisiológica Vegetal*. 2019. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-29639-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-29639-1_2)

LONGO, Ana Elisa de Oliveira e. Micropropagação de alho e ginogênese in vitro de cebola. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico, Campinas, 2009.

LOURENÇO JUNIOR, Valdir; REIS, Ailton, OLIVEIRA, Valter Rodrigues. Podridão-branca causa grandes prejuízos à produção de alho e cebola. **Campo e Negócios**, Minas Gerais, v. 1, n. 1, p. 27-27, jul. 2016. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1057703/1/digitalizar0120.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2024.

LUCINI, Marco Antônio . **Alho Roxo no Brasil: um pouco da história dos números desse nobre**. Nosso Alho, Brasília-DF, 1 ed., dezembro 2008. Disponível em: [http://anapa.com.br/wp-content/uploads/2017/01/Nosso\\_Alho\\_N1.pdf](http://anapa.com.br/wp-content/uploads/2017/01/Nosso_Alho_N1.pdf). Acesso em: 21 jul. 2024.

MARCUZZO, Leandro Luiz; MALIKOSKI, Edilson. Efeito de indutores de resistência no manejo da queima bacteriana do alho. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 6, n. 2022. Revista Agronomia Brasileira. <http://dx.doi.org/10.29372/rab202209>.

MARCUZZO, Leandro Luiz; SCHMOELLER, Josué. Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 161-163, jun. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/167306>.

MAZZUCO, Vinicius Rodrigo; TORRES JÚNIOR, Cláudio Da Cunha; BOTELHO, Glória Regina. Fluorescent *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. for phosphate solubilization and growth promotion of garlic. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 53, 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632023v5375301>.

MOUNIR, Amr M.; OSMAN, Yasser MM; KHALIL, Ola AA. Impact of potassium solubilizing bacteria on growth and yield of garlic. *Plant Archives*, v. 20 N. 2, p. 8374-8388, 2020.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

NUNES, Maria Edna Tenório. Solarização do solo e seleção de microrganismos antagônicos para o controle de *Sclerotium cepivorum* Berk. agente causal da podridão branca da Cebola (*Allium cepa* L.). 1992. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

OLIVEIRA, Carlos Eduardo da Silva; JALAL, Arshad; AGUILAR, Jailson Vieira; CAMARGOS, Liliane Santos de; ZOZ, Tiago; GHALEY, Bhim Bahadur; ABDEL-MAKSoud, Mostafa A.; ALARJANI, Khaloud Mohammed; ABDELGAWAD, Hamada; TEIXEIRA FILHO, Marcelo Carvalho Minhoto. Yield, nutrition, and leaf gas exchange of lettuce plants in a hydroponic system in response to *Bacillus subtilis* inoculation. **Frontiers In Plant Science**, v. 14, 25 out. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2023.1248044>

ORNELLAS, Thiago Sanches; FRITSCHÉ, Yohan; CARDONA-MEDINA, Edison; GUERRA, Miguel Pedro. Somatic embryogenesis from young spikelets of the giant bamboo *Dendrocalamus asper* (Schult f.) Backer ex Heyne. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (Pctoc)**, v. 149, n. 3, p. 635-644, 19 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-022-02311-7>.

PERRY, Elena K.; NEWMAN, Dianne K.. Prevalence and Correlates of Phenazine Resistance in Culturable Bacteria from a Dryland Wheat Field. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 88, n. 6, 22 mar. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02320-21>.

RANJAN, Anuj; RAJPUT, Vishnu D.; PRAZDNOVA, Evgeniya V.; GURNANI, Manisha; SHARMA, Shikha; BHARDWAJ, Pallavi; SHENDE, Sudhir S.; MANDZHIEVA, Saglara S.; SUSHKOVA, Svetlana; MINKINA, Tatiana. Augmenting abiotic stress tolerance and root architecture: the function of phytohormone-producing pgpr and their interaction with nanoparticles. **South African Journal Of Botany**, v. 167, p. 612-629, abr. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2024>

RATNANINGSIH, Hanim R.; NOVIANA, Zahra; DEWI, Tirta Kumala; LOEKITO, Supriyono; WIYONO, Suryo; GAFUR, Abdul; ANTONIUS, Sarjiya. IAA and ACC deaminase producing-bacteria isolated from the rhizosphere of pineapple plants grown under different abiotic and biotic stresses. **Heliyon**, v. 9, n. 6, p. 16306, jun. 2023. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16306>.

RESENDE, Juliano Tadeu V de; MORALES, Rafael Gustavo F; ZANIN, Daniel S; RESENDE, Francisco V; PAULA, Juliana T de; DIAS, Diego M; GALVÃO, Alexandre G. Caracterização morfológica, produtividade e rendimento comercial de cultivares de alho. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 157-162, mar. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-05362013000100025>.

RYU, Choong-Min; FARAG, Mohamed A.; HU, Chia-Hui; REDDY, Munagala S.; KLOEPPER, Joseph W.; PARÉ, Paul W.. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 134, n. 3, p. 1017-1026, 1 mar. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.026583>.

SANTOS, Cristiane dos; FRANCO, Octávio Luiz. Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. **Plants**, v. 12, n. 11, p. 2226, 5 jun. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12112226>.

SANTOS, Priscila Bezerra dos; BARBOSA, Felipe de Sousa; VIEIRA, Cinthya Fontenele; CARVALHO, Ana Cristina Portugal Pinto. Number of explants, culture medium and photoperiod in ornamental pineapple micropropagation. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 4, p. 749-754, 2015. GNI Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150062>.

SILVA, Franquiéle Bonilha da. **Seleção de bactérias do microbioma rizosférico de acácia-negra, com potencial como promotoras de crescimento vegetal**. 2022. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Ufrgs), Porto Alegre, 2022. Cap. 6.

SILVA, Nelrilene Pereira da; FILIPPI, Marta Cristina Corsi de; GONÇALVES, Fábio José; SOUZA, Alan Carlos Alves de. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento na cultura do girassol com o uso de *Trichoderma* sp. e rizobactérias. **Ipê Agronomic Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 24 mar. 2021. Associação Educativa Evangélica. <http://dx.doi.org/10.37951/2595-6906.2021v5i1.6544>.

SIMKIN, Andrew J.; KAPOOR, Leepica; DOSS, C. George Priya; HOFMANN, Tanja A.; LAWSON, Tracy; RAMAMOORTHY, Siva. The role of photosynthesis related pigments in light harvesting, photoprotection and enhancement of photosynthetic yield in planta. **Photosynthesis Research**, v. 152, n. 1, p. 23-42, 22 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-021-00892-6>.

SOOD, Monika; KAPOOR, Dhriti; KUMAR, Vipul; KALIA, Namarta; BHARDWAJ, Renu; SIDHU, Gagan Preet Singh; SHARMA, Anket. Mechanisms of Plant Defense Under Pathogen Stress: a review. **Current Protein & Peptide Science**, v. 22, n. 5, p. 376-395, maio 2021. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389203722666210125122827>.

SOUSA, Sylvania Morais de; OLIVEIRA, Christiane Abreu de; ANDRADE, Daniele Luiz; CARVALHO, Chainheny Gomes de; RIBEIRO, Vitória Palhares; PASTINA, Maria Marta; MARRIEL, Ivanildo Evódio; LANA, Ubiraci Gomes de Paula; GOMES, Eliane Aparecida. Tropical *Bacillus* Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight,

Nutrient Uptake and Grain Yield. **Journal Of Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 2, p. 867-877, 29 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>.

SPAEPEN, Stijn; VANDERLEYDEN, Jos; REMANS, Roseline. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Fems Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, jul. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>.

TAHIR, Hafiz A. S.; GU, Qin; WU, Huijun; RAZA, Waseem; HANIF, Alwina; WU, Liming; COLMAN, Massawe V.; GAO, Xuewen. Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, 7 fev. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>.

TARIQ, Shiza; BANO, Asghari; KHAN, Naeem. Comparative Analysis of Various Strains of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on the Physiology of Garlic (*Allium sativum*). **Natural Science**, v. 15, n. 03, p. 79-90, 2023. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2023.153007>.

TOOHEY, J. I.; NELSON, C. D.; KROTKOV, G. Toxicity of phenazine carboxylic acids to some bacteria, algae, higher plants, and animals. **Canadian Journal of Botany**, 1965, 43.9: 1151-1155.

TSOTETSI, Teboho; NEPHALI, Lerato; MALEBE, Motumiseng; TUGIZIMANA, Fidele. Bacillus for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: what have we learned?. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2482, 22 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants11192482>.

VALDÉS-SANTIAGO, Laura; VARGAS-BERNAL, Rafael; HERRERA-PÉREZ, Gabriel; COLLI-MULL, Juan G.; ORDAZ-ARIAS, Ayabeth. Application of Two-Photon Microscopy to Study *Sclerotium cepivorum* Berk Sclerotia Isolated from Naturally Infested Soil and Produced In Vitro. **Current Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 749-755, 9 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-020-02341-4>.

WAGI, Shabana; AHMED, Ambreen. Bacillus spp.: potent microfactories of bacterial iaa. **PeerJ**, v. 7, p. 7258, 23 jul. 2019. **PeerJ**. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7258>.

WANG, Xianxian; CHEN, Xiaohong; XU, Jiali; JI, Yuhui; DU, Xiaoxuan; GAO, Jie. Precipitation Dominates the Allocation Strategy of Above- and Belowground Biomass in Plants on Macro Scales. **Plants**, v. 12, n. 15, p. 2843, 1 ago. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12152843>.

XUN, Weizhi; GONG, Bing; LIU, Xingxin; YANG, Xiuju; ZHOU, Xia; JIN, Linhong. Antifungal Mechanism of Phenazine-1-Carboxylic Acid against *Pestalotiopsis kenyana*. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11274, 10 jul. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241411274>.

YOSHIDA, Naoto. Seasonal dynamics of the pink root fungus (*Setophoma terrestris*) in rhizosphere soil: effect of crop species and rotation. **Plant Pathology**, v. 71, n. 2, p. 361-372, 8 set. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.13464>.

YOUNES, Nabil A.; ANIK, Touhidur Rahman; RAHMAN, Md. Mezanur; WARDANY,

Ahmed A.; DAWOOD, Mona F.A.; TRAN, Lam-Son Phan; LATEF, A.A.H. Abdel; MOSTOFA, Mohammad Golam. Effects of microbial biostimulants (*Trichoderma album* and *Bacillus megaterium*) on growth, quality attributes, and yield of onion under field conditions. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. 14203, mar. 2023. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14203>.

**APENDICE A – TABELA COMPLETA DO TESTE POST-HOC COM  
BOOTSTRAPPING (95% IC BCA) REFERENTE AO INDICE DE  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO DOS ISOLADOS DE *Bacillus* spp.**

(Continua)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB01	EB02	0,00	0,00	0,00
	EB03	0,00	0,00	0,00
	EB04	0,00	0,00	0,00
	EB05	0,00	0,00	0,00
	EB06	0,00	0,00	0,00
	EB07	0,00	0,00	0,00
	EB08	0,00	0,00	0,00
	EB09	0,00	0,00	0,00
	EB10	0,00	0,00	0,00
	EB11	0,00	0,00	0,00
	EB12	0,00	0,00	0,00
	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
	EB14	0,00	0,00	0,00
	EB15	0,00	0,00	0,00
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	-0,05	0,04
	EB27	0,00	0,00	0,00
	EB02	EB03	0,00	0,00
EB04		0,00	0,00	0,00
EB05		0,00	0,00	0,00
EB06		0,00	0,00	0,00
EB07		0,00	0,00	0,00
EB08		0,00	0,00	0,00
EB09		0,00	0,00	0,00
EB10		0,00	0,00	0,00
EB11		0,00	0,00	0,00
EB12		0,00	0,00	0,00
EB13		-0,26	-0,32	-0,19

Comparações entre grupos		$\Delta M$	(Continuação)		
			Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
			Limite inferior	Limite superior	
EB02	EB14	0,00	0,00	0,00	
	EB15	0,00	0,00	0,00	
	EB16	0,00	0,00	0,00	
	EB17	0,00	0,00	0,00	
	EB18	0,00	0,00	0,00	
	EB19	0,00	0,00	0,00	
	EB20	0,00	-0,05	0,07	
	EB21	0,00	0,00	0,00	
	EB22	0,00	0,00	0,00	
	EB23	0,00	0,00	0,00	
	EB24	0,00	0,00	0,00	
	EB25	0,00	0,00	0,00	
	EB26	0,00	0,00	0,00	
	EB27	0,00	0,00	0,00	
EB03	EB04	0,00	0,00	0,00	
	EB05	0,00	0,00	0,00	
	EB06	0,00	0,00	0,00	
	EB07	0,00	0,00	0,00	
	EB08	0,00	0,00	0,00	
	EB09	0,00	0,00	0,00	
	EB10	0,00	0,00	0,00	
	EB11	0,00	0,00	0,00	
	EB12	0,00	0,00	0,00	
	EB13	-0,26	-0,32	-0,19	
	EB14	0,00	0,00	0,00	
	EB15	0,00	0,00	0,00	
	EB16	0,00	0,00	0,00	
	EB17	0,00	0,00	0,00	
	EB18	0,00	0,00	0,00	
	EB19	0,00	0,00	0,00	
	EB20	0,00	0,00	0,00	
	EB21	0,00	0,00	0,00	
	EB22	0,00	0,00	0,00	
	EB23	0,00	0,00	0,00	
	EB24	0,00	0,00	0,00	
	EB25	0,00	0,00	0,00	
	EB26	0,00	0,00	0,00	
	EB27	0,00	0,00	0,00	
	EB04	EB05	0,00	0,00	0,00
		EB06	0,00	0,00	0,00
		EB07	0,00	0,00	0,00
EB08		0,00	0,00	0,00	

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB04	EB09	0,00	0,00	
	EB10	0,00	0,00	
	EB11	0,00	0,00	
	EB12	0,00	0,00	
	EB13	-0,26	-0,32	
	EB14	0,00	0,00	
	EB15	0,00	0,00	
	EB16	0,00	0,00	
	EB17	0,00	0,00	
	EB18	0,00	0,00	
	EB19	0,00	0,00	
	EB20	0,00	0,00	
	EB21	0,00	0,00	
	EB22	0,00	0,00	
	EB23	0,00	0,00	
	EB24	0,00	0,00	
	EB25	0,00	0,00	
	EB26	0,00	0,00	
	EB27	0,00	0,00	
	EB05	EB06	0,00	0,00
		EB07	0,00	0,00
		EB08	0,00	0,00
		EB09	0,00	0,00
		EB10	0,00	0,00
		EB11	0,00	0,00
		EB12	0,00	0,00
		EB13	-0,26	-0,32
EB14		0,00	0,00	
EB15		0,00	0,00	
EB16		0,00	0,00	
EB17		0,00	0,00	
EB18		0,00	0,00	
EB19		0,00	0,00	
EB20		0,00	0,00	
EB21		0,00	0,00	
EB22		0,00	0,00	
EB23		0,00	0,00	
EB24		0,00	0,00	
EB25		0,00	0,00	
EB26		0,00	0,00	
EB27		0,00	0,00	
EB06		EB07	0,00	0,00
		EB08	0,00	0,00

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB06	EB09	0,00	0,00	
	EB10	0,00	0,00	
	EB11	0,00	0,00	
	EB12	0,00	0,00	
	EB13	-0,26	-0,32	
	EB14	0,00	0,00	
	EB15	0,00	0,00	
	EB16	0,00	0,00	
	EB17	0,00	0,00	
	EB18	0,00	0,00	
	EB19	0,00	0,00	
	EB20	0,00	0,00	
	EB21	0,00	0,00	
	EB22	0,00	0,00	
	EB23	0,00	0,00	
	EB24	0,00	0,00	
	EB25	0,00	0,00	
	EB26	0,00	0,00	
	EB27	0,00	0,00	
	EB07	EB08	0,00	0,00
		EB09	0,00	0,00
		EB10	0,00	0,00
		EB11	0,00	0,00
		EB12	0,00	0,00
		EB13	-0,26	-0,32
		EB14	0,00	0,00
		EB15	0,00	0,00
EB16		0,00	0,00	
EB17		0,00	0,00	
EB18		0,00	0,00	
EB19		0,00	0,00	
EB20		0,00	0,00	
EB21		0,00	0,00	
EB22		0,00	0,00	
EB23		0,00	0,00	
EB24		0,00	0,00	
EB25		0,00	0,00	
EB26		0,00	0,00	
EB27		0,00	0,00	
EB08		EB09	0,00	0,00
		EB10	0,00	0,00
		EB11	0,00	0,00

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB08	EB12	0,00	0,00	0,00
	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
	EB14	0,00	0,00	0,00
	EB15	0,00	0,00	0,00
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
EB09	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
	EB10	0,00	0,00	0,00
	EB11	0,00	0,00	0,00
	EB12	0,00	0,00	0,00
	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
	EB14	0,00	0,00	0,00
	EB15	0,00	0,00	0,00
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
EB10	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
	EB11	0,00	0,00	0,00
	EB12	0,00	0,00	0,00
	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
EB14	0,00	0,00	0,00	
EB15	0,00	0,00	0,00	
EB16	0,00	0,00	0,00	
EB17	0,00	0,00	0,00	
EB18	0,00	0,00	0,00	
EB19	0,00	0,00	0,00	

(Continuação)

Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB10	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
EB11	EB27	0,00	0,00	0,00
	EB12	0,00	0,00	0,00
	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
	EB14	0,00	0,00	0,00
	EB15	0,00	0,00	0,00
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
EB12	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
	EB13	-0,26	-0,32	-0,19
	EB14	0,00	0,00	0,00
	EB15	0,00	0,00	0,00
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
EB13	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
EB13	EB14	0,26	0,19	0,32
	EB15	0,26	0,19	0,32
	EB16	0,26	0,19	0,32
	EB17	0,26	0,19	0,32

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB13	EB18	0,26	0,19	0,32
	EB19	0,26	0,19	0,32
	EB20	0,26	0,19	0,32
	EB21	0,26	0,19	0,32
	EB22	0,26	0,19	0,32
	EB23	0,26	0,19	0,32
	EB24	0,26	0,19	0,32
	EB25	0,26	0,19	0,32
	EB26	0,26	0,19	0,32
	EB27	0,26	0,19	0,32
EB14	EB15	0,00	0,00	0,00
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
EB15	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
EB16	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
EB24	0,00	0,00	0,00	

(Continuação)

Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB16	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
EB17	EB18	0,00	0,00	0,00
	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
EB18	EB19	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
EB19	EB27	0,00	0,00	0,00
	EB20	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
EB20	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
EB21	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	-0,06	0,05
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00

		(Conclusão)		
Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB22	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
EB23	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
EB24	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
EB25	EB26	0,00	0,00	0,00
	EB27	0,00	0,00	0,00
EB26	EB27	0,00	0,00	0,00

**APENDICE B – TABELA COMPLETA DO TESTE POST-HOC COM  
BOOTSTRAPPING (95% IC BCA) REFERENTE AO INDICE DE  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE ALUMÍNIO DOS ISOLADOS DE *Bacillus*  
spp.**

(Continua)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB01	EB02	0,04	-0,03	0,09
	EB03	0,03	-0,02	0,08
	EB04	-0,00	-0,05	0,05
	EB05	-0,02	-0,08	0,05
	EB06	0,00	-0,05	0,06
	EB07	-0,02	-0,07	0,03
	EB08	-0,01	-0,08	0,07
	EB09	-0,04	-0,09	0,03
	EB10	0,02	-0,05	0,09
	EB11	-0,00	-0,04	0,04
	EB12	0,26	0,23	0,31
	EB13	0,04	-0,04	0,10
	EB14	0,26	0,23	0,31
	EB15	0,26	0,23	0,31
	EB16	0,26	0,23	0,31
	EB17	0,26	0,23	0,31
	EB18	0,01	-0,04	0,07
	EB19	-0,03	-0,09	0,04
	EB20	0,04	-0,01	0,09
	EB21	0,26	0,23	0,31
	EB22	0,26	0,23	0,31
	EB23	0,26	0,23	0,31
	EB24	0,24	0,23	0,31
	EB25	0,24	0,23	0,31
	EB26	0,00	-0,05	0,04
	EB27	0,04	-0,02	0,10
	EB02	EB03	-0,01	-0,06
EB04		-0,03	-0,10	0,02
EB05		-0,05	-0,12	0,03
EB06		-0,04	-0,10	0,02
EB07		0,06	-0,12	0,01
EB08		-0,05	-0,13	0,03
EB09		-0,07	-0,13	0,00
EB10		-0,01	-0,10	0,06
EB11		-0,04	-0,09	0,02
EB12		0,22	0,18	0,28
EB13	0,00	-0,08	0,07	

Comparações entre grupos		$\Delta M$	(Continuação)	
			Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB02	EB14	0,22	0,18	0,28
	EB15	0,22	0,18	0,28
	EB16	0,22	0,18	0,28
	EB17	0,22	0,18	0,28
	EB18	-0,02	-0,08	0,04
	EB19	-0,06	-0,14	0,01
	EB20	0,00	-0,05	0,07
	EB21	0,22	0,18	0,28
	EB22	0,22	0,18	0,28
	EB23	0,22	0,18	0,28
	EB24	0,22	0,18	0,28
	EB25	0,22	0,18	0,28
	EB26	-0,04	-0,06	0,07
	EB27	0,00	-0,06	0,07
EB03	EB04	-0,03	-0,08	0,02
	EB05	-0,04	-0,10	0,03
	EB06	-0,03	-0,08	0,02
	EB07	-0,05	-0,09	0,01
	EB08	-0,04	-0,11	0,04
	EB09	-0,06	-0,12	0,00
	EB10	0,00	-0,09	0,06
	EB11	-0,03	-0,07	0,01
	EB12	0,23	0,19	0,27
	EB13	0,01	-0,07	0,07
	EB14	0,23	0,19	0,27
	EB15	0,23	0,19	0,27
	EB16	0,23	0,19	0,27
	EB17	0,23	0,19	0,27
EB18	0,01	-0,07	0,04	
EB19	-0,05	-0,13	0,01	
EB20	0,02	-0,04	0,06	
EB21	0,23	0,19	0,27	
EB22	0,23	0,19	0,27	
EB23	0,23	0,19	0,27	
EB24	0,23	0,19	0,27	
EB25	0,23	0,19	0,27	
EB26	-0,03	-0,08	0,01	
EB27	0,01	-0,06	0,07	
EB04	EB05	-0,01	-0,08	0,05
	EB06	0,00	-0,05	0,04
	EB07	-0,02	-0,07	0,03
	EB08	-0,01	-0,08	0,06

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)			
		Limite inferior	Limite superior		
EB04	EB09	-0,03	-0,09	0,02	
	EB10	0,02	-0,05	0,08	
	EB11	0,00	-0,04	0,04	
	EB12	0,26	0,23	0,29	
	EB13	0,04	-0,04	0,10	
	EB14	0,26	0,23	0,29	
	EB15	0,26	0,23	0,29	
	EB16	0,26	0,23	0,29	
	EB17	0,26	0,23	0,29	
	EB18	0,02	-0,05	0,07	
	EB19	-0,02	-0,09	0,04	
	EB20	0,04	-0,01	0,08	
	EB21	0,26	0,23	0,29	
	EB22	0,26	0,23	0,29	
	EB23	0,26	0,23	0,29	
	EB24	0,26	0,23	0,29	
	EB25	0,26	0,23	0,29	
	EB26	0,00	-0,04	0,03	
	EB27	0,04	-0,02	0,10	
	EB05	EB06	0,01	-0,05	0,08
		EB07	0,00	-0,07	0,06
		EB08	0,00	-0,08	0,08
		EB09	-0,02	-0,08	0,05
		EB10	0,03	-0,05	0,12
		EB11	0,01	-0,04	0,07
		EB12	0,27	0,22	0,33
		EB13	0,05	-0,04	0,12
EB14		0,27	0,22	0,33	
EB15		0,27	0,22	0,33	
EB16		0,27	0,22	0,33	
EB17		0,27	0,22	0,33	
EB18		0,03	-0,04	0,09	
EB19		0,00	-0,09	0,06	
EB20		0,06	0,00	0,12	
EB21		0,27	0,22	0,33	
EB22		0,27	0,22	0,33	
EB23		0,27	0,22	0,33	
EB24		0,27	0,22	0,33	
EB25		0,27	0,22	0,33	
EB26		0,00	-0,05	0,06	
EB27		0,05	-0,03	0,12	
EB06		EB07	-0,02	-0,07	0,03
		EB08	0,00	-0,08	0,07

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)			
		Limite inferior	Limite superior		
EB06	EB09	-0,03	-0,08	0,02	
	EB10	0,03	-0,06	0,09	
	EB11	0,00	-0,04	0,04	
	EB12	0,26	0,23	0,30	
	EB13	0,04	-0,04	0,10	
	EB14	0,26	0,23	0,30	
	EB15	0,26	0,23	0,30	
	EB16	0,26	0,23	0,30	
	EB17	0,26	0,23	0,30	
	EB18	0,02	-0,04	0,07	
	EB19	-0,02	-0,09	0,04	
	EB20	0,05	0,00	0,09	
	EB21	0,26	0,23	0,30	
	EB22	0,26	0,23	0,30	
	EB23	0,26	0,23	0,30	
	EB24	0,26	0,23	0,30	
	EB25	0,26	0,23	0,30	
	EB26	0,00	-0,05	0,03	
	EB27	0,04	-0,02	0,10	
	EB07	EB08	0,00	-0,07	0,08
		EB09	-0,02	-0,07	0,04
		EB10	0,04	-0,04	0,10
		EB11	0,02	-0,03	0,07
		EB12	0,28	0,24	0,32
		EB13	0,06	-0,02	0,11
		EB14	0,28	0,24	0,32
		EB15	0,28	0,24	0,32
EB16		0,28	0,24	0,32	
EB17		0,28	0,24	0,32	
EB18		0,03	-0,02	0,09	
EB19		0,00	-0,07	0,06	
EB20		0,06	0,01	0,11	
EB21		0,28	0,24	0,32	
EB22		0,28	0,24	0,32	
EB23		0,28	0,24	0,32	
EB24		0,28	0,24	0,32	
EB25		0,28	0,24	0,32	
EB26		0,01	-0,03	0,06	
EB27		0,06	0,00	0,12	
EB08		EB09	-0,02	-0,10	0,05
		EB10	0,03	-0,06	0,11
		EB11	0,00	-0,06	0,11

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB08	EB12	0,27	0,20	0,33
	EB13	0,05	-0,05	0,12
	EB14	0,27	0,20	0,33
	EB15	0,27	0,20	0,33
	EB16	0,27	0,20	0,33
	EB17	0,27	0,20	0,33
	EB18	0,03	-0,05	0,10
	EB19	-0,01	-0,10	0,07
	EB20	0,05	-0,02	0,12
	EB21	0,27	0,20	0,33
	EB22	0,27	0,20	0,33
	EB23	0,27	0,20	0,33
	EB24	0,27	0,20	0,33
	EB25	0,27	0,20	0,33
EB09	EB26	0,00	-0,07	0,07
	EB27	0,05	-0,04	0,13
	EB10	0,06	-0,03	0,12
	EB11	0,03	-0,02	0,08
	EB12	0,29	0,25	0,33
	EB13	0,08	-0,01	0,14
	EB14	0,29	0,25	0,33
	EB15	0,29	0,25	0,33
	EB16	0,29	0,25	0,33
	EB17	0,29	0,25	0,33
	EB18	0,01	-0,07	0,08
	EB19	0,01	0,02	0,12
	EB20	0,08	0,02	0,12
	EB21	0,29	0,25	0,33
EB10	EB22	0,29	0,25	0,33
	EB23	0,29	0,25	0,33
	EB24	0,29	0,25	0,33
	EB25	0,29	0,25	0,33
	EB26	0,03	-0,02	0,07
	EB27	0,07	-0,01	0,13
	EB11	-0,02	-0,08	0,05
	EB12	0,24	0,19	0,31
	EB13	0,02	-0,07	0,10
EB14	0,24	0,19	0,31	
EB15	0,24	0,19	0,31	
EB16	0,24	0,19	0,31	
EB17	0,24	0,19	0,31	
EB18	0,00	-0,07	0,08	
EB19	-0,05	-0,12	0,05	

(Continuação)

Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB10	EB20	0,02	-0,04	0,10
	EB21	0,24	0,19	0,31
	EB22	0,24	0,19	0,31
	EB23	0,24	0,19	0,31
	EB24	0,24	0,19	0,31
	EB25	0,24	0,19	0,31
	EB26	-0,03	-0,08	0,04
EB11	EB27	0,02	-0,05	0,09
	EB12	0,26	0,24	0,29
	EB13	0,04	-0,04	0,09
	EB14	0,26	0,24	0,29
	EB15	0,26	0,24	0,29
	EB16	0,26	0,24	0,29
	EB17	0,26	0,24	0,29
	EB18	0,02	-0,04	0,06
	EB19	-0,02	-0,09	0,04
	EB20	0,05	0,00	0,08
EB12	EB21	0,26	0,24	0,29
	EB22	0,26	0,24	0,29
	EB23	0,26	0,24	0,29
	EB24	0,26	0,24	0,29
	EB25	0,26	0,24	0,29
	EB26	0,00	-0,04	0,03
	EB27	0,04	-0,02	0,09
	EB13	-0,22	-0,29	-0,18
	EB14	0,00	0,00	0,00
	EB15	0,00	0,00	0,00
EB13	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,19
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
EB13	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
	EB14	0,22	0,18	0,29
	EB15	0,22	0,18	0,29
EB13	EB16	0,22	0,18	0,29
	EB17	0,22	0,18	0,29

(Continuação)

Comparações entre grupos	$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)		
		Limite inferior	Limite superior	
EB13	EB18	-0,03	-0,09	0,06
	EB19	-0,06	-0,14	0,02
	EB20	0,00	-0,05	0,09
	EB21	0,22	0,18	0,29
	EB22	0,22	0,18	0,29
	EB23	0,22	0,18	0,29
	EB24	0,22	0,18	0,29
	EB25	0,22	0,18	0,29
	EB26	-0,05	-0,09	0,03
	EB27	0,00	-0,07	0,08
EB14	EB15	0,00	0,00	0,00
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
EB15	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
	EB16	0,00	0,00	0,00
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
EB16	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
	EB17	0,00	0,00	0,00
	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB21	0,00	0,00	0,00
EB22	0,00	0,00	0,00	
EB23	0,00	0,00	0,00	
EB24	0,00	0,00	0,00	

(Continuação)

Comparações entre grupos		$\Delta M$	Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB16	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,28	-0,34	-0,23
	EB27	-0,21	-0,26	-0,19
EB17	EB18	-0,24	-0,29	-0,21
	EB19	-0,28	-0,34	-0,23
	EB20	-0,21	-0,26	-0,19
	EB21	0,00	0,00	0,00
	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
EB18	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
	EB19	-0,04	-0,11	0,03
	EB20	0,03	-0,03	0,08
	EB21	0,24	0,21	0,29
	EB22	0,24	0,21	0,29
EB19	EB23	0,24	0,21	0,29
	EB24	0,24	0,21	0,29
	EB25	0,24	0,21	0,29
	EB26	-0,02	-0,07	0,03
	EB27	0,02	-0,04	0,09
	EB20	0,07	0,00	0,13
	EB21	0,28	0,23	0,34
EB20	EB22	0,28	0,23	0,34
	EB23	0,28	0,23	0,34
	EB24	0,28	0,23	0,34
	EB25	0,28	0,23	0,34
	EB26	0,02	-0,03	0,08
	EB27	0,06	-0,01	0,13
	EB21	EB21	0,21	0,19
EB22		0,21	0,19	0,26
EB23		0,21	0,19	0,26
EB24		0,21	0,19	0,26
EB25		0,21	0,19	0,26
EB26		-0,05	-0,08	-0,01
EB27		0,00	-0,06	0,05
EB21	EB22	0,00	0,00	0,00
	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17

Comparações entre grupos		$\Delta M$	(Conclusão)	
			Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)	
			Limite inferior	Limite superior
EB22	EB23	0,00	0,00	0,00
	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB23	EB24	0,00	0,00	0,00
	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB24	EB25	0,00	0,00	0,00
	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB25	EB26	-0,27	-0,29	-0,25
	EB27	-0,22	-0,27	-0,17
EB26	EB27	0,05	-0,01	0,09