

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERANTES AO ESTRESSE
ABIÓTICO**

JUSSARA TAMIRES DE SOUZA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JULHO – 2023

JUSSARA TAMIRES DE SOUZA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERANTES AO ESTRESSE
ABIÓTICO**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal.”

Orientadora: Prof^ª.DSc. Aline Chaves Intorne

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JULHO – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586

Silva, Jussara Tamires de Souza.

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERANTES AO ESTRESSE ABIÓTICO / Jussara Tamires de Souza Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

105 f.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientadora: Aline Chaves Intorne.

1. interação bactéria- planta. 2. salinidade. 3. biorremediação. 4. estresses abióticos. 5. ambiente aquático. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO
VEGETAL E TOLERANTES AO ESTRESSE ABIÓTICO**

JUSSARA TAMIRES DE SOUZA SILVA

"Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal."

Aprovada em 31 de Julho de 2023

Comissão examinadora:



Drª Cristiane dos Santos Vergílio (D.Sc., Biociências e Biotecnologia)
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES



Drª Deborah Guerra Barroso (D.Sc., Produção Vegetal)
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF



Drª Érica de Oliveira Mello (D.Sc., Biociências e Biotecnologia)
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF



Drª Aline Chaves Intome (D.Sc., Biociências e Biotecnologia)
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ
(Orientadora)

Dedico à minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que faz por mim.

À minha família, a Dona Lourdes e Sr. Nilson (*in memoriam*) que mesmo distantes sempre fizeram questão de estarem presentes em todos os sentidos.

A Nelson Goulart por todo amor, momentos de alegrias, de aprendizado de compartilhamento do dia a dia. Serei sempre grata a você por ter me apresentado as várias faces que a vida científica-acadêmica tem a oferecer, você é o meu melhor exemplo.

Aos meus companheiros de moradia em Campos, meus sobrinhos e meu irmão José Rafael, pela amizade, pelo apoio, e por serem minha segunda família.

Às minhas amigas que se mantiveram presentes desde a graduação em 2013, Luana Pereira e Kissila Soares, foi com vocês que conheci a cidade de Campos, que vivenciei os melhores e piores momentos dentro da universidade, foram muitas trocas, alguns passeios e a amizade para a vida.

À professora DSc. Aline Chaves Intorne pela oportunidade de desenvolver pesquisa e extensão durante todos esses anos, pela orientação e pelo aprendizado.

Aos membros da banca, professoras DSc. Cristiane dos Santos Vergilio, DSc. Deborah Guerra Barroso e DSc. Érica de Oliveira Mello pelas contribuições no trabalho.

À Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF pela estrutura ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal (PPGBV) pela oportunidade de realizar os cursos de mestrado e doutorado, por todo apoio científico e institucional.

Ao laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos por ter me recebido na minha primeira experiência científica, aos colegas que conheci participando da rotina do laboratório, onde tive muitas trocas de aprendizado e onde também ensinei para outros colegas um pouco do conhecimento aprendido. Pela ajuda recebida dos colegas no momento de levar os materiais para casa de vegetação, pelas conversas, pela companhia, momentos de descontração e de muito trabalho. Aos técnicos, professores e pesquisadores do LFBM. Ao Laboratório de Biotecnologia - LBT pelo suporte estrutural, principalmente à Prof.^a DSc Marília Amorim Berbet de Molina por ter me recebido na reta final do doutorado.

Aos colegas do Grupo de Microbiologia Ambiental, tive excelentes experiências tanto pessoais quanto profissionais, com muitos que não compartilham mais a bancada, cada um deixou registrado um momento marcante, em especial a Anna Luiza que esteve comigo na bancada no último ano pela amizade, companhia e pelo apoio.

As parcerias que foram desenvolvidas: prof. DSc. Alessandro Coutinho e á Clarisse Arpini na Universidade Vila Velha, à profª. DSc. Cibele Maria Stivanin de Almeida (UENF) pelas análises com equipamento ICP OES. À Rebeca Dorneles e Gabriel Peixoto pela troca de experiências.

À Capes, Faperj, UENF pela concessão de bolsa de estudo. À Faperj pelo projeto aprovado para orientar pelo programa Jovens Talentos. Ao Cederj pela oportunidade de atuar como tutora presencial no curso de graduação em Ciências Biológicas.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização dessa conquista.

Sumário

1	Resumo.....	x
2	Abstract.....	xi
3	Introdução Geral.....	xii
3.1	Referências Bibliográficas.....	xiv
4	Capítulo 1 Coastal Agriculture in Latin America: typical abiotic stresses and the use of microbial inoculants.....	10
4.1	Abstract.....	10
4.2	Introduction.....	11
4.3	Abiotic stresses in coastal agriculture.....	13
4.4	The role of microorganisms in agriculture.....	16
4.5	The role and characteristics of the soil in coastal agriculture.....	19
4.6	Microbial inoculants as a sustainable alternative.....	22
4.7	Conclusions.....	28
4.8	References.....	29
5	Capítulo 2 Isolation and characterization of plant growth-promoting bacteria associated with <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.....	38
5.1	Abstract.....	38
5.2	Introduction.....	39
5.3	Materials and Methods.....	40
5.3.1	Cultivation of <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.....	40
5.3.2	Bacterial strains isolation and cultivation.....	40
5.3.3	Molecular Identification of Isolates.....	41
5.3.4	Atmospheric N ₂ fixation.....	41
5.3.5	Production of indole compounds.....	42
5.3.6	Phosphate solubilization.....	42
5.3.7	Plant growth promotion test.....	42
5.3.8	Statistical Analysis.....	43
5.4	Results.....	43
5.4.1	Bacteria associated with <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.....	43
5.4.2	Potential of bacteria to promote plant growth.....	46
5.4.3	Growth promotion of <i>S. auriculata</i> by <i>Enterobacter</i> sp.....	47
5.5	Discussion.....	48
5.6	Conclusion.....	52

5.7 References.....	53
6 Capítulo 3 A bactéria do gênero <i>Enterobacter</i> sp. protege <i>Salvinia auriculata</i> Aublet. do estresse causado pelo cobre.....	59
6.1 Resumo.....	59
6.2 Abstract.....	60
6.3 Introdução.....	61
6.4 Materiais e Métodos.....	63
6.4.1 Meio e condições de cultivo.....	63
6.4.2 Preparo do inóculo bacteriano e da solução estoque de Cobre.....	63
6.4.3 Curva de crescimento da bactéria.....	64
6.4.4 Cultivo da planta.....	64
6.4.5 Inoculação da bactéria na planta.....	64
6.4.6 Desenvolvimento da planta.....	65
6.4.7 Preparo das amostras para determinação do Cobre.....	65
6.4.8 Análise do Cobre na bactéria e na planta aquática.....	66
6.4.9 Análise estatística.....	66
6.5 Resultados e Discussão.....	67
6.6 Conclusão.....	71
6.7 Referências.....	72
7 Capítulo 4 Mitigação do estresse salino por bactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas da serapilheira da restinga.....	76
7.1 Resumo.....	76
7.2 Abstract.....	77
7.3 Introdução.....	78
7.4 Materiais e Métodos.....	80
7.4.1 Local da coleta.....	80
7.4.2 Isolamento de bactérias.....	80
7.4.3 Meio e condições de cultivo.....	81
7.4.4 Produção de compostos indólicos.....	82
7.4.5 Solubilização de fosfato.....	82
7.4.6 Triagem dos isolados para enzima celulase.....	82
7.4.7 Ensaio de estresse salino.....	83
7.4.8 Perfil de crescimento dos três isolados bacterianos selecionados. .	83
7.4.9 Curva de crescimento da bactéria.....	84
7.4.10 Microscopia Óptica.....	84

7.4.11 Ensaio de promoção do crescimento vegetal.....	85
7.4.12 Análises Estatísticas.....	86
7.5 Resultados.....	87
7.5.1 3.1. Isolados da serapilheira de <i>Clusia hilariana</i>	87
7.5.2 Produção de compostos indólicos.....	87
7.5.3 Solubilização de fosfato.....	88
7.5.4 Ensaio de estresse salino.....	89
7.5.5 Triagem de bactérias degradadoras de celulose.....	89
7.5.6 Curva de crescimento dos isolados selecionados.....	90
7.5.7 Curva de crescimento bacteriana.....	90
7.5.8 Microscopia Óptica.....	91
7.5.9 Ensaio de promoção do crescimento vegetal.....	92
7.6 Discussão.....	94
7.7 Conclusão.....	97
8 Considerações finais e perspectivas futuras.....	98
8.1 Referências Bibliográficas.....	100

1 Resumo

A presente tese dedicou-se a explorar como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) na forma de inoculantes podem auxiliar na mitigação de estresses ambientais, utilizando a planta aquática *Salvinia auriculata* Aublet. como modelo de estudo. No capítulo 1 foi realizado um estudo da literatura, onde observou-se o desafio da salinidade em áreas agrícolas costeiras na América Latina. No capítulo 2, foi realizado o isolamento de bactérias da planta aquática *S. auriculata*, as bactérias foram identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA aos níveis de espécie e de gênero. Com a finalidade de encontrar bactérias com características de promoção do crescimento vegetal foram realizados testes qualitativos de fixação biológica de nitrogênio, de solubilização de fosfato e de produção de compostos indólicos. A *Enterobacter* sp apresentou essas características e foi selecionada para ensaio de inoculação in vivo na planta *S. auriculata* e após quatro dias de interação a planta apresentou aumento de biomassa fresca e seca quando comparada com as plantas sem a adição da bactéria. No capítulo 3, foi avaliado o nível de tolerância da bactéria *Enterobacter* sp a concentrações crescentes de cobre. A bactéria mostrou tolerância a cobre nas concentrações de 63 e 158 mgL⁻¹. Posteriormente, *Enterobacter* sp foi inoculada em *S. auriculata* em um ambiente contendo 0,635 mgL⁻¹ de Cu. Foi observado que a bactéria foi capaz de proteger a planta do estresse causado pelo cobre. No capítulo 4 foi realizado um isolamento em área de restinga, explorando a tolerância bacteriana a salinidade e testando tais bactérias para promoção do crescimento vegetal, e produção de celulose. O isolado S3103 foi selecionado e inoculado em *S. auriculata* em meio contendo 100 mmol⁻¹ de NaCl. O isolado testado foi capaz de minimizar o dano causado por NaCl nas plantas inoculadas. Os resultados apresentaram dados promissores com (BPCV) candidatas a inoculantes, a serem aplicadas para tratamentos de ambientes contaminados por cobre e altamente salinos.

Palavras-Chave: *Salvinia auriculata*, bactérias, promoção do crescimento vegetal, estresses ambientais, cobre, salinidade

2 Abstract

This thesis was dedicated to exploring how plant growth-promoting bacteria (PGPB) in the form of inoculants can help mitigate environmental stresses, using the aquatic plant *Salvinia auriculata* Aublet. as a study model. In Chapter 1, a literature review was conducted, where the challenge of salinity in coastal agricultural areas in Latin America was observed. In Chapter 2, bacteria were isolated from the aquatic plant *S. auriculata*, and these bacteria were identified through 16S rRNA gene sequencing at the species and genus levels. With the aim of finding bacteria with plant growth-promoting characteristics, qualitative tests for nitrogen fixation, phosphate solubilization, and production of indole compounds were conducted. The *Enterobacter* sp exhibited these characteristics and was selected for in vivo inoculation assay on the plant *S. auriculata*. After four days of interaction, the plant showed an increase in fresh and dry biomass compared to plants without the addition of the bacterium. In Chapter 3, the tolerance level of the *Enterobacter* sp to increasing copper concentrations was evaluated. The bacteria showed tolerance to copper at concentrations of 63 and 158 mg/L. Subsequently, *Enterobacter* sp was inoculated into *S. auriculata* in an environment containing 0.635 mg/L of Cu. It was observed that the bacterium was able to protect the plant from copper-induced stress. In Chapter 4, isolation was conducted in a sandcoast area, exploring bacterial tolerance to salinity and testing such bacteria for plant growth promotion and cellulose production. The isolate S3103 was selected and inoculated into *S. auriculata* in a medium containing 100 mmol⁻¹ of NaCl. The tested isolate was able to minimize the damage caused by NaCl in the inoculated plants. The results presented promising data with candidate plant growth-promoting bacteria (PGPB) as inoculants, to be applied for treating environments contaminated by copper and highly saline conditions.

Keywords: *Salvinia auriculata*, bacteria, plant growth promotion, environmental stresses, copper, salinity.

3 Introdução Geral

As plantas são organismos sésseis, devido a essa condição estão sujeitas a influência de estresses ambientais bióticos e abióticos durante todo o estágio do seu desenvolvimento (Leisner *et al.*, 2022; Knudsen, *et al.*, 2018). Os fatores bióticos incluem a colonização por insetos e microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários, que causam diferentes danos às plantas. Os fatores abióticos incluem salinidade, seca, radiação solar, inundação, temperatura e metais tóxicos (Zhang *et al.*, 2022; Roeber *et al.*, 2021; Suzuki *et al.*, 2014). Dentre esses, serão abordados no presente trabalho o aumento da biodisponibilidade de cobre e da salinidade.

A salinidade da água doce ocorre tanto de forma natural em zonas costeiras, regiões áridas e semiáridas, quanto de forma antrópica através da irrigação das culturas agrícolas e de processos industriais (Siegel *et al.*, 2022; Pulido-Bosch *et al.*, 2018). Considerando que ambientes dulcícolas estão entre as principais fontes de água para consumo humano e que fornecem habitat para diferentes espécies aquáticas, faz-se necessário buscar soluções sustentáveis para mitigar os efeitos negativos da salinidade nessas áreas.

No ambiente aquático, plantas aquáticas do gênero *Salvinia* foram analisadas sob estresse salino (GOMES *et al.*, 2017; OWENS *et al.*, 2014, GOMES, *et al.*, 2011 e JAMPEETONG *et al.*, 2009) e sob estresse causado pelo cobre (PANFILI, *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2017; BIZZO *et al.*, 2014) com isso são potenciais candidatas para contornar os efeitos prejudiciais desses estresses.

De um modo geral, são encontradas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) associadas com plantas, que podem auxiliar na resposta a estresses ambientais, uma vez que algumas delas são capazes de tolerar altas concentrações de elementos tóxicos (BORAH *et al.*, 2023). Plantas aquáticas, porém, são ainda pouco estudadas no âmbito da sua microbiota. Além disso, ambientes que apresentam maior incidência salina como os ecossistemas costeiros, em especial as restingas, podem conter bactérias de grande valia para estudos de inoculação. Esse ambiente é pouco explorado do ponto de vista microbiológico (Magalhães *et al.*, 2017; CLACINO *et al.*, 2006).

Bactérias com características promotoras do crescimento vegetal e tolerantes a metais e à salinidade podem ser usadas como inoculantes nessas plantas sob condição de estresse. Os inoculantes são produtos que contém microrganismos (bactérias e fungos) com atuação favorável ao crescimento de plantas (Brasil, 2004). Eles têm potencial para oferecer benefício econômico e ecológico, ao preservar um ambiente das condições desfavoráveis quanto ao uso de fertilizantes químicos (Chaudhary *et al.*, 2020). Na agricultura, o uso de inoculantes está estabelecido para algumas culturas, um exemplo é o cultivo da soja no Brasil (; Riviezzi *et al.*, 2020; Salvagioti *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2003). Por outro lado, a aplicação ambiental dos inoculantes é incipiente e pouco se conhece sobre os efeitos interativos de BPCV inoculadas em plantas aquáticas mediante condições de estresse.

O presente trabalho buscou entender como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) na forma de inoculantes podem auxiliar na mitigação de estresses ambientais, utilizando *Salvinia auriculata* como modelo de estudo. Inicialmente, foi realizado um estudo da literatura, onde se observou o desafio da salinidade em áreas agrícolas costeiras na América Latina (Capítulo 1), em seguida foram exploradas bactérias isoladas da planta aquática *Salvinia auriculata* (Capítulo 2). Foi avaliada a resposta da bactéria *Enterobacter* sp a cobre (Capítulo 3). Então, foi realizado um novo isolamento em área de restinga, explorando a tolerância bacteriana a salinidade e testando a ação como inoculante de *Salvinia auriculata* (Capítulo 4). Os resultados apresentaram dados promissores com bactérias candidatas a inoculantes, que serão apresentados nos quatro capítulos a seguir. Após estes tópicos, foram feitas as considerações finais da tese com as contribuições e perspectivas futuras do trabalho.

3.1 Referências Bibliográficas

ALVES, Bruno JR; BODDEY, Robert M.; URQUIAGA, Segundo. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and soil**, v. 252, p. 1-9, 2003.

BORAH, Palakshi *et al.* An insight into plant growth-promoting rhizobacteria-mediated mitigation of stresses in plant. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 5, p. 3229-3256, 2023.

BRASIL. Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o regulamento da Lei no 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 jan. 2004.

CHAUDHARY, Twinkle *et al.* Techniques for improving formulations of bioinoculants. **Biotech**, v. 10, p. 1-9, 2020.

CLACINO, Barbosa Deyvison *et al.* Halotolerant spore-forming Gram-positive bacterial diversity associated with *Blutaparon portulacoides* (St. Hill.) Mears, a pioneer species in Brazilian coastal dunes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 193-199, 2006.

FADIJI, Ayomide Emmanuel *et al.* Understanding the plant-microbe interactions in environments exposed to abiotic stresses: An overview. **Microbiological Research**, p. 127368, 2023.

FREITAS, F. *et al.*, Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 133-139, 2017.

IZYDORCZYK, Grzegorz *et al.*, Potential environmental pollution from copper metallurgy and methods of management. **Environmental Research**, v. 197, p. 111050, 2021.

KIRK, Kevin A.; ANDREESCU, Silvana. Easy-to-use sensors for field monitoring of copper contamination in water and pesticide-sprayed plants. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 21, p. 13892-13899, 2019.

KNUDSEN, Camilla *et al.* Dynamic metabolic solutions to the sessile life-style of plants. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 11, p. 1140-1155, 2018.

LEISNER, Courtney P.; POTNIS, Neha; SANZ-SAEZ, Alvaro. Crosstalk and trade-offs: plant responses to climate change-associated abiotic and biotic stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 46, n. 10, p. 2946-2963, 2023.

MAGALHÃES, Valter Cruz *et al.* *Burkholderia* isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, v. 112, p. 41-48, 2017.

MIRLEAN, Nicolai; ROISENBERG, Ari; CHIES, Jaqueline O. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). **Environmental pollution**, v. 149, n. 1, p. 10-17, 2007.

PANDEY, Govind; MADHURI, S. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. **Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences**, v. 2, n. 2, p. 17-23, 2014.

PULIDO-BOSCH, Antonio *et al.* Impacts of agricultural irrigation on groundwater salinity. **Environmental earth Sciences**, v. 77, p. 1-14, 2018.

RIVIEZZI, Braulio *et al.* Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. **Rhizosphere**, v. 15, p. 100219, 2020.

ROEBER, Venja M. *et al.* Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 44, n. 3, p. 645-664, 2021.

SALVAGIOTTI, Fernando *et al.* Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, n. 1, p. 1-13, 2008.

SIEGEL, H. G. *et al.* Natural and anthropogenic processes affecting domestic groundwater quality within the northwestern Appalachian basin. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 19, p. 13761-13773, 2022.

SUZUKI, Nobuhiro *et al.* Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014.

ZHANG, Huiming *et al.* Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 2, p. 104-119, 2022.

4 Capitulo 1 Coastal Agriculture in Latin America: typical abiotic stresses and the use of microbial inoculants

4.1 Abstract

Coastal areas are employed for agriculture worldwide. Nonetheless, in comparison with other arable areas, these sites present typical challenges, especially abiotic stresses such as high salinity and drought. Even though cultivation types vary across different countries, beneficial microorganisms play a key role in helping plants tolerate these stresses. The microbes are naturally present in the soil and might be enriched in such environments through the use of inoculants designed to improve plant growth while decreasing or even eliminating the need for chemical fertilizers, which might be detrimental to soil and water quality. This represents a sustainable alternative to traditional methods in agriculture, which have, over the years, polluted water bodies and shifted soil quality through spikes in nutrient availability. In this chapter, we review the challenges of Latin American coastal agriculture and the perspectives for the use of microbial inoculants as a sustainable and effective technology in these areas.

Keywords: Agriculture 4.0, Salinity, Plant-Microbe Interaction.

4.2 Introduction

Coastal zones are the most populated and economically active regions worldwide, where despite the presence of places with lower population density and areas of environmental conservation (mangroves, estuaries, and sandy coast, for example), one can also find regions with great urbanization accompanied by industries, ports, tourist activities, and also large cultivated areas. Therefore, it is common to see problems of anthropogenic origin in these coastal areas, such as soil and water contamination [1]–[3].

In Latin America, some coastal ecosystems such as xeric shrublands (as the *matorrales* in Mexico and the *Caatinga* biome in Brazil) have aridity as their hallmark [4], [5]. In some cases, such as in the Chilean and Peruvian deserts and Patagonia to the south of the continent, this is due to the influence of the Andes Mountains, on the Pacific coast of South America, which is reflected in stressful environmental conditions for agriculture due to low rainfall and availability of nutrients in the soil [6]. Microorganisms residing in such ecosystems have specific mechanisms for the acquisition of nutrients (carbon, nitrogen, and phosphorus), which can help plant growth, playing a fundamental role in biogeochemical cycles [7] (Figure 1).



Figure 1: Coastal regions of Latin America considered in this review. Colors vary in each country. In gray: Countries not included in USDA maps and continental regions. Coastal lines are for illus-

tration purposes only and are not to be scaled. Regions to the south of Los Lagos (Chile) were not represented in USDA maps and are thus not shown.

Temperature stress, especially high temperatures, is capable of causing irreversible damage to plant growth. The increase in temperature will inevitably lead to increased evaporation and more salinization. In the case of coastal areas, the influence of the salinity on crop growth is critical [8]. Other major challenges for advancing agriculture in these coastal environments are high sunlight intensity, soil pH (commonly acidic in tropical areas) [9], and different soil textures (sandy soils have difficulty retaining water) [10]–[12]. Water scarcity and increased temperature can have direct negative impacts on crops, as they limit plant development. Increased salinity in soils associated with low nutrient content and long periods of drought also cause a decrease in yield [12], [13].

The environmental conditions in a given space shape the associated living community. This dynamic poses one of the greatest ongoing challenges in agriculture, since microorganisms improve plant growth, and when their survival is threatened, yielding is equally at risk [12]–[14]. Thus, research on the association between the adverse conditions found in arid and desert regions and the native soil microorganisms is of great importance, as they are better adapted to these extreme conditions [15], [16]. This work is dedicated to reviewing agricultural activities in coastal areas of Latin America based on distribution maps made available by the United States Department of Agriculture (USDA – available on <<https://ipad.fas.usda.gov/ogamaps/cropproductionmaps.aspx>>, accessed on April 12, 2022), reviewing the advantages of microbial inoculants for crops under specific abiotic stresses such as salinity and drought, and the biotechnological potential of the application of inoculants composed of fungi and bacteria as a sustainable alternative to recurrent techniques with chemical fertilizers. Mainly, studies on so-called “commodity” crops are explored: wheat, sunflower, soybean, sorghum, rye, rice, rapeseed, peanuts, oats, corn, cotton, barley, and oil palm. It is important to note that the crop distribution maps by USDA do not include several countries in Latin America, especially the Caribbean islands, Honduras, El Salvador, Nicaragua, and Venezuela (Figure 1). For this reason, the scientific literature relating to these regions may be underrepresented in this material.

4.3 Abiotic stresses in coastal agriculture

Abiotic stresses strongly affect agricultural production [17]. In the case of coastal regions, the main stress factors for crops are drought, salinity, and high temperatures, which may be accentuated due to climate change [18]. For example, studies show that sea-level rise increased salinity in coastal areas of India from 1% to 33% over 25 years, directly impacting agricultural areas in the region [19].

In the 2017 book “Handbook of Drought and Water Scarcity”, Saeid Eslamian & Faezeh Eslamian review in depth the concepts and characteristics of drought. According to the authors, a consensus definition would be; “an extended period a season, a year, or several years of poor rainfall relative to the statistical multiyear mean for a region”. According to the authors, there are four types of drought: meteorological (dry weather that lasts long enough to unbalance the availability of water in a given region), hydrological (when the amount of water in reservoirs and water bodies is below average), agricultural (rainfall deficit capable of considerably affecting agricultural production), and socioeconomic and environmental drought (the latter being related to the effects of previous definitions on human activities). All these concepts are characterized by the combination of climate and soil factors, and in the case of agricultural drought, the crop itself directly impacts production [20].

Drastic decreases in the water supply are one of the most impacting abiotic stress factors in agriculture [20], [21]. Since plants absorb nutrients through the roots by capturing water, if there is a water deficit, this will also imply a lower absorption of these nutrients. Therefore, whether they occur in a short period or even months, droughts directly impact plant physiology, root structure, and architecture and can occur in any climate regime in the world [20], [22]. Drought is another frequent abiotic stress in coastal areas, resulting in uneven rainfall distribution [22]. According to Curtis (2019) [23], the rainfall regime in coastal areas is not well resolved, precisely because these are common areas where rain originates. The author also highlights that there is a significant drop in precipitation as we enter deeper into the continent. Research by Sousa Santos et al. (2020) [24] shows relevant nuances can be seen even in adjacent areas used for the cultivation of coconut in the Ceará State, in Brazil (Figure 1). According to the authors,

the palms closer to the coastline are more affected by salinity stress, but one area in which soil moisture is kept during dry seasons was also present, which alleviates the salt stress. The authors also highlight the decrease in yield in non-irrigated areas.

Salt stress in coastal and continental soils can be established by natural and anthropogenic forms [25]. Naturally, it is caused by weathering with the release of different types of salts (e.g. chlorides, sulfates, and bicarbonates of Na, Ca, and Mg) carried by water in the soil [26], and by marine spray from the ocean transported by winds and rainfall [17]. Anthropogenic forms include the deposition of saline water used for irrigation [25] and inadequate irrigation management, which leads to the elevation of salts present in underground water to the soil surface. Two relevant examples can be found in Peru; the aquifer La Yarada, in the Tacna region (Figure 1), one of the few water resources in that area, has been overexploited for agriculture and other activities, including the expansion of the Tacna city. Such overexploitation now causes the intrusion of seawater into the soil and undergrounds, intensifying the water salination and scarcity in that region [27]. Unusual salinity levels can also be found in the Nepeña Valley, region of Áncash (Figure 1), which according to [28] happens due to intensive agriculture, even though it is confusing if this salination is recent or from prehispanic times.

It is estimated that more than 830 million hectares of arable land are being affected by salinization worldwide [12]. This process is relatively common in arid and semi-arid coastal and continental regions, being related to the geological formation itself, low rainfall, soil type, and, in certain cases, due to the agricultural development of that given region [17]. For example, in Argentina alone, approximately 600,000 ha of irrigated soil is affected by salinity. In Brazil, 30% of the 500,000 ha of irrigated areas in the Northeast are in process of salinization. In Mexico, 20% of agricultural land is also undergoing salinization. In Ecuador and Cuba, the main cause of salinization is the use of poor-quality water or the use of saline water, and excessive use of chemical fertilizers [29].

Increased salinity due to maritime influence and groundwater overexploitation is common in coastal regions, which decreases the enzymatic activities in the soil, and microbial biomass and, consequently, reduces the microbial growth rate

[12]. As a result, salinity directly affects the concentration of organic matter in the soil in these regions, as well as its availability, since microorganisms are responsible for a large part of the processing of nutrients in biogeochemical cycles [30].

The predictive study by Gupta *et al.* (2020) [22] warns that by 2050 we will have a decrease in the supply of water for agriculture, while, in the same period, there will be a growing increase in the demand for arable land. This study describes that historically, drought has always been more influenced by low precipitation, but the authors also predict the influence, mainly, of the increase in temperature associated with climate change alternating with drought cycles. Such cycles are common, for example, in the Maipo River, and the Santiago region of Chile (Figure 1). Nonetheless, research by Peña-Guerrero *et al.* (2020) [31] highlights that the ever-growing demand for agricultural products in that region will likely be affected by the water availability and quality in the Maipo River basin. Loitzenbauer & Bulhões Mendes (2012) [32] describe a mathematical model to understand how much of the water in the Tramandaí River, in the State of Rio Grande do Sul, Brazil (Figure 1) can be used without harm to salinity dynamics, suggesting the application of licenses to regulate water use.

Biotechnology is also increasingly used in agriculture, ranging from classical plant improvement through crossing wild and cultivated plant varieties to genetic engineering, using genetically modified, transgenic, and stress-adapted ecotypes of plants [33]. For example; in Chile, different ecotypes of quinoa, which is native to the Andes region, have different tolerance to salinity. Ruiz *et al.* (2016) [34] describes that the Salares ecotype, native to the salt flats of Bolivia, Chile, and Argentina, tolerates up to 500 mM (millimolar) of NaCl, while ecotypes native to the Andean lowlands are more sensitive to salinity.

As another example, using beneficial microorganisms in plants contributes to the sustainable development of crops and simultaneously influences economic development, as it is a low-cost tool. Paul & Nair (2008) [35] describe the potential of *Pseudomonas fluorescens* MSP-393 for use as a microbial inoculant in coastal areas, considering its high salt tolerance. For this research, the authors have applied sophisticated techniques such as HPLC and MALDI-TOF. Such experimental design raises the awareness that even though biotechnological techniques

might play an important role in achieving greater productivity and greater eco-efficiency, they require high technical skills for implementation and maintenance, which is a challenge for small farmers [36]. Thus, the application of PGPMs is a biotechnological tool with the potential to improve plant growth and mitigate the effects of abiotic stresses on crops [37]–[39]. The use of plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) in agricultural production systems has been used in specific crops such as soybeans [40]–[42], and sugarcane [43]–[45]. Coastal environments are a source of prospection for these microorganisms and can have their agricultural production improved through the formulation and application of microbial inoculants, which are biological preparations from cultures of beneficial microorganisms, which can help the host plant to control pathogens, acquire nutrients, and better resist environmental stresses [46], which we review over the next topics.

4.4 The role of microorganisms in agriculture

Microorganisms (bacteria, fungi, unicellular eukaryotes, and some groups of algae and metazoa) are the most diverse and abundant group of living beings in nature [47]. It is hypothesized that bacteria were the first organisms to appear on the planet, having colonized even the most inhospitable environments and playing important roles in biogeochemical cycles (Figure 2). Thus, microorganisms are required for the availability of macronutrients, such as nitrogen, through biological nitrogen fixation, nitrification, and denitrification [48]. Alongside fungi, bacteria also contribute to the solubilization of phosphate, potassium, and zinc [49]. Furthermore, microorganisms actively act in the metabolism of carbon dioxide, methane, and nitric dioxide, important greenhouse gases (GHGs) [48] (Figure 2).

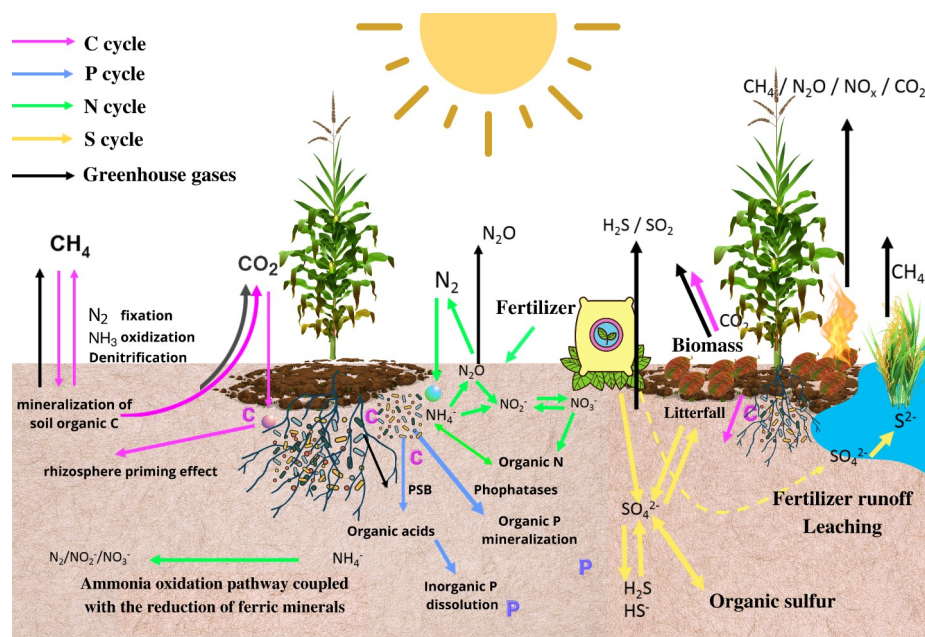


Figure 2: Biogeochemical cycles in the soil and greenhouse gases emissions. Pink arrows correspond to the processes of carbon cycling (C), considering the mineralization of organic C in the soil, fixation of carbon dioxide (CO_2), and oxidation of methane (CH_4). The green arrows correspond to the nitrogen (N) cycling processes, highlighting the fixation of atmospheric nitrogen (N_2), nitrification, denitrification, organic N mineralization, and ammonia (NH_3) oxidation associated with the reduction of ferric minerals. Blue arrows represent the phosphorus (P) cycling processes, from its dissolution into inorganic phosphorus and mineralization of organic phosphorus, including the action of Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB). Yellow arrows represent the Sulfur (S) cycling processes and black arrows highlight the emission of greenhouse gases, including gases emitted due to the heating of compounds that can occur in the burning processes that are eventually carried out in some agricultural systems, such as Nitrogen Oxides (NO_x).

Bacteria and fungi that exhibit beneficial traits for plant development are called plant growth-promoting microorganisms (PGPM). In addition to nutrient assimilation, they can help plants directly through the production of phytohormones (e.g. auxins and gibberellins); and siderophores to capture iron, thus covering the main limiting factors for plant growth [50]. Evermore studies are carried out on the prospection of these PGPMs and their potential to alleviate stress symptoms in plants. Zahir et al. (2008) [51] demonstrated a direct action of PGPM in *Pisum sativum* (peas); the action of ACC Deaminase, an enzyme responsible for the hydrolysis of 1-carboxylic acid 1-aminocyclopropane (ACC) into α -ketobutyrate and ammonia, allows the plant to become more tolerant to the effects of ethylene, when under conditions of salt and water stress. Meanwhile, PGPMs can also help plants indirectly by inhibiting the action of phytopathogens, synthesizing antimicrobial metabolites as active biocontrol agents, competing for nutrients, and even stimulating systemic plant resistance [50] (Figure 3). Such concepts are crucial to the development of microbial inoculants. Their use is an interesting

strategy in the context of Agriculture 4.0 and, if the included microorganisms are adapted to existing stressors, the chances of success increase considerably [52]–[54].

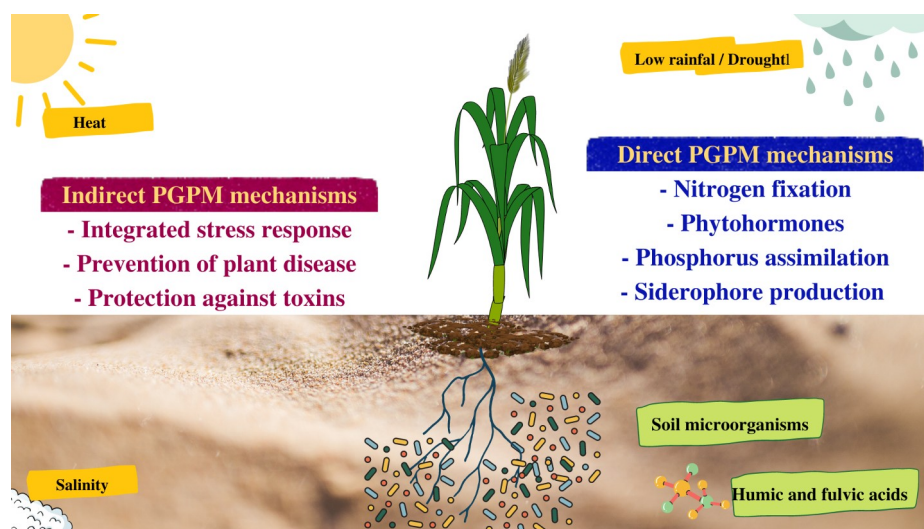


Figure 3: Direct and indirect mechanisms promoted by Plant Growth Promoting Microorganisms (PGPM) against the presence of abiotic stresses.

Changes in land use for agriculture and urbanization negatively impact soil quality [55]. GHG emissions, typical of anthropic activities and one of the main causes of climate change, also affect soil quality and harm the rainfall regime, whether due to drought or even flooding, which washes and breaks down soil aggregates [56]. Currently, about 40% of the habitable land worldwide (excluding deserts, glaciers, and rocks) has been transformed into agricultural (cultivated and/or pasture) areas. Nonetheless, currently cultivated areas correspond to approximately 25% of that total [57]–[59]. Land overexploitation causes a decrease in the soil organic matter content, directly impacting fertility and biodiversity, especially microbial diversity. Shifts in microbial diversity are indicators of soil degradation [60]. Land preparation processes in annual crops, for example, break down soil aggregates, causing an imbalance in the microbiota (e.g. bacteria and fungi involved in organic matter degradation processes) which, consequently, increases CO₂ consumption, decreasing soil organic carbon stocks [61].

How organic contaminants act on microbial communities in terms of carbon decomposition is still not very well understood [7]. However, it is known that the plant-microbe interactions are directly affected by environmental changes, both positively and negatively [62]. Studies have shown that high levels of CO₂

favor root colonization by mycorrhizae and improve the interaction between rhizobia and legumes [63]. The literature describes that the presence of symbiotic microorganisms can mitigate or even neutralize the effects of aridity or adverse temperatures on plants (native and cultivated), increasing their tolerance and allowing better development [64], [65]. Therefore, understanding the complex action of microorganisms in the soil is essential to ensure greater agricultural productivity. Throughout time, bacteria and fungi remain key elements for the availability of nutrients and the response of their plant hosts to the challenges presented by the environment.

4.5 The role and characteristics of the soil in coastal agriculture

Cultivation forms and main crops change according to the region across the Latin American coast, in large part due to different climatic conditions, nutrient availability, and ecosystem type. In coastal regions, these factors are influenced by rivers and seas, which change their dynamics and course over time on Earth [66]. This influence can be verified through the soil, in the local ecosystem, and even in geopolitical characteristics [67].

The Latin American coast has a great diversity of landscapes, with the influence of the Andes mountain range on the Pacific coast, which contributes to the formation of commonly arid regions through the blocking of winds and rain, in the region known as Diagonal Arid [6]. On the other hand, the Atlantic coast, mainly due to the tectonic movements of the South American plate, does not have comparable mountain ranges, being influenced by the deltas of large rivers, such as the Rio de la Plata, São Francisco, and Amazonas [68].

Among the coastal or predominantly continental biomes and ecosystems with coastal portions most affected coastal agriculture in Latin America (as seen in (Boit et al. (2016) [69] and Reis et al. (2020) [70]) are (i) savannas such as the pampas between Brazil, Uruguay, and Argentina and a portion the cerrado; (ii) tropical forests such as the Atlantic Forest, which covers most of the Brazilian coast, the Chocó-Darién Forest in Colombia, Forests in southern Mexico and a small coastal portion of the Amazon forest, and (iii) arid and semi-arid coastal regions, in Andean biomes in Colombia, Peru, Chile, and Mexico, and a small portion of the Brazilian Caatinga (Figure 1).

Historical maps from FAO [71] show different farming systems in Latin America, some of which are characteristic of coastal regions. In these more arid parts of the continent, irrigated farming systems predominate, including northern Mexico and the entire Andean chain; “Pampas and Campos” farms dedicated to the production of cereals and livestock, covering the Mar del Plata region and southern Brazil; mixed intensive agriculture, covering part of the Brazilian Atlantic Forest; and “Coastal plantation and mixed”, in most of the non-arid Latin American coast. Although such historical documents might be outdated, it is clear that a large part of this distribution of systems is maintained, considering the main areas of palm oil production [72], cocoa [73], and sugarcane [74], for example.

and provinces are multifaceted in crop distribution. For example, the province of Buenos Aires, Argentina (not to be confused with the Autonomous City of Buenos Aires, the capital of the country) concentrates the planting of nine of the 15 included crops, missing only the cultivation of peanuts, rice, cotton, and palm oil (Agricultural data is for all Argentina is available under <<https://datos.magyp.gob.ar/dataset>>, accessed on April 12, 2022). Other geographically close regions, especially the provinces of Colonia and San José in Uruguay, and the three states that make up southern Brazil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and Paraná), are united by the cultivation of wheat, corn, and soybeans, with exception to the state of Santa Catarina, where soybean planting in coastal regions was not detected [72]. These similarities can be partially explained by climatic conditions, soil formation in the Rio de la Plata basin, and the presence of the Pampa biome, common to Uruguay, parts of Rio Grande do Sul and Argentina. Some planting differences include the presence of sunflower and barley in Uruguayan regions, absent in neighboring regions in Brazil, and corn planting in Brazilian states, absent in Uruguayan regions.

Other agricultural hubs are present on the Pacific coast of northern Latin America, including the departments of Nariño, Cauca, and Valle del Cauca in Colombia and the departments of Áncash, Arequipa, La Libertad, and Lambayeque in Peru, which are major producers of wheat, rice, and corn. In Cauca and Nariño, peanuts and oil palm are also planted [75], [76]. These regions are quite geographically distinct; the Colombian coast has a greater presence of humid forests, where the soil can contain large amounts of organic matter in superficial layers, deposited by litter and other decaying elements [77]. Even so, deeper layers are often nutrient-poor, making them unsuitable for agriculture [78]. Meanwhile, the Peruvian coast, like the Chilean coast, is arid and bounded by the Andean mountain range.

4.6 Microbial inoculants as a sustainable alternative

The use of microbe-based agricultural inoculants is not a recent technology. According to Santos et al. (2019) [79], the first patent describing the use of microbial inoculants dates to 1896, which indicates its informal use years prior to that. Microorganisms participating in these formulations generally improve plant

growth through the increase in phosphorus and nitrogen uptake, macronutrients that are essential to all living beings, especially in the processes of nucleotide and amino acid synthesis. Thus, such elements are commonly limiting factors in plant growth and their supplementation brings better yields [21]. Likewise, other factors can limit agricultural production, such as diseases of various types caused by all domains of life, especially bacteria, fungi, nematodes, and viruses. The monoculture scheme, still widely used despite its known risks, has greater susceptibility to pests, since the cultivated plants are usually clonal or genetically similar. These factors can help to explain the need for fertilizers and pesticides, however, their wide use and difficulty of replacement bring great challenges in the field, because despite being profitable, chemical fertilizers have a high environmental cost.

Estimated emissions of NO_2 (nitrous dioxide) indicate that agriculture is responsible for the emission of 86.6% of this gas, which means that the fertilizer industry is a considerable emitter of GHGs [80]. During the application of nitrogen fertilizers, N_2O (nitrous oxide) is released into the atmosphere. This greenhouse gas is 300 times more potent than carbon dioxide [81]. The use of phosphate fertilizers also has limitations; taken from rocks, phosphate reserves are currently running out [82]. In this scheme, it is estimated that only 15 to 25% of applied phosphorus is absorbed by plants [83] that part of the fertilizers not used by the plants leaches into water bodies (rivers, lakes, estuaries, and finally, the sea), which then become eutrophic due to the increase in nutrients load (especially nitrogen and phosphorus), which profoundly unbalances the community of microorganisms, and therefore, all the fauna and flora of these environments [84]. Eutrophication also leads to the proliferation of cyanobacteria and dinoflagellates, causing the so-called algal blooms. In addition to preventing the entry of light by covering the surface of water bodies and consequently corrupting the oxygen cycle, these microorganisms commonly produce harmful toxins for human and environmental health [85]. In summary, microbial inoculants bring positive perspectives to the agricultural sector, since they generate an increase in productivity and present a low risk of environmental contamination, in addition to affordable selling prices [86] or being a nature-based solution that optimizes the role already played by beneficial microorganisms in biogeochemical cycles.

Some studies propose complementing chemical fertilization with microbial inoculants; for example, offering rock phosphate together with phosphate-solubilizing microorganisms, ensuring the gradual release of that nutrient, as required by the plant, thus reducing costs and avoiding problems with leaching and eutrophication [87]. A study conducted by Ditta *et al.* (2018) [88] compared the effectiveness of organic fertilizers enriched with natural phosphate, associated with phosphate-solubilizing microorganisms, and the use of diammonium phosphate used in legumes, showing very similar results between the two treatments, especially when there is an association of the organic fertilizer with PSM and diammonium phosphate, with an increase in soil aggregate stability by up to 37%, an increase of up to 24% in the nodules and an increase in the aerial part by up to 19%.

Another interesting strategy is the formulation of microbial inoculants using microorganisms native to that given environment where they will be applied. In this case, a previous phase of bioprospecting for PGPM strains is necessary. In this way, the survival of microorganisms is not compromised, as they are already adapted to the environment. Two examples are available in the Northeastern region of Brazil; Fernandes & Fernandes (2000) [89] characterized rhizobia from coastal flatlands in the city of Aracaju, in the State of Sergipe (Figure 1) with biological nitrogen fixation capacity when associated with pigeon pea (*Cajanus cajan*). The native rhizobia of coastal tablelands showed great potential for use as pigeon pea inoculant, as they have a high capacity for biological nitrogen fixation and characteristics that favor survival in the soil. Souza & Martins (2010) [4] selected isolates of native rhizobia from agricultural soils in the municipality of Areia, State of Paraíba (Figure 1), and found native nitrifying bacteria capable of nodulating and fixing nitrogen in *Vigna unguiculata*.

Studies carried out in several countries with microorganisms from coastal regions with dunes have revealed potential microorganisms for use in agriculture, mainly due to the production of Indole Acetic Acid (IAA), increasing the yield of bean seedlings, production of gibberellin used in the production of rice demonstrating root growth. Rhizobia isolated from legumes from dune regions on the west coast of India demonstrated the ability to increase nodulation and nitrogen fixation, in addition to increasing the development of cowpea roots and shoots.

The biggest difficulties in the implantation of microbial inoculants in world agriculture have been mainly the competition of traditional methods already widely used of chemical fertilization and, to a lesser extent, the need for more resilient protocols, which serve different cultures in different regions worldwide [90]–[92]. However, we hypothesize that this technology will become progressively more widely used and well established, due to unsustainability and environmental damage caused by years of chemical fertilizer use. The excessive use of agrochemicals, mainly in coastal areas causes damage because the high amount of these products make the soil even more salinized, causing losses in agricultural production [93]. To minimize these losses and improve soil quality, new sustainable and non-toxic alternatives need to be explored. Thus, the use of microorganisms (bacteria and fungi) that maintain, at the same time, beneficial associations with plants and resistance to different abiotic stresses is a viable alternative [21], [94], [95]. Some products have been developed and commercialized as microbial inoculants. As an example, some plant growth-promoting bacteria were listed by [96]: *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus fimus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Delftia acidovorans*, *Paenobacillus macerans*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas syringae*, *Serratia entomophila*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces spp.*, *Streptomyces lydicus* and various *Rhizobia* spp.

Microbial inoculants can be composed of single microorganisms or microbial consortia. They can be applied either to seeds [97] to the plant or directly to the soil [98]. Generally, microbial inoculants used in agriculture are classified into three categories depending on the microorganisms involved: Bacterial inoculants involve nitrogen-fixing bacteria, phosphorus-solubilizing bacteria and symbiotic (fixing with the host plant), non-symbiotic (free-living) or associative (free-living with the host plant) bacteria (i), Fungal inoculants: arbuscular mycorrhizae and phosphorus-solubilizing fungi (ii), or Compound inoculants and consortia: a combination of two or more microbial inoculants (iii) [99]. Some countries in Latin

America were cited by Basu et al. (2021) [100] as manufacturers of microbial inoculants based on nitrogen-fixing bacteria (Table 1).

Table 1: An overview of PGPM-based biofertilizer products available in Latin America available.

Name	PGPR Strains	Country	Crops
Zadspirillum	<i>Azospirillum brasilense</i>	Argentina	Corn
Rizo-Liq	<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Mesorhizobium ciceri</i> , <i>Rhizobium</i> spp.	Argentina	Soybean
Rizo-Liq Top	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Argentina	Soybean
BiAgro 10®	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Argentina Brazil Bolivia	Soybean
Dimargon®	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Colômbia	Cotton Soybean
Nitrasec	<i>Rhizobium</i> sp.	Uruguay	Soybean

Table 2 presents commodities crops that make use of commercial microbial inoculants, as well as research papers that showed microorganisms with potential for future application. The microbial inoculants presented are mostly formulated by bacteria, with an emphasis on the genus *Bradyrhizobium*. The main cultures that make use of these microbial inoculants are soy and sugarcane, while most of the related research was conducted in Brazil, followed by Argentina. In sugarcane, we also highlight the isolation of PGPM with great biotechnological implications, such as *Gluconacetobacter diazotrophicus* [101], [102] and *Herbaspirillum seropedicae* [103]. Research works were found with other cultures such as (*Zea mays*, *Oryza* sp) related to microorganisms that promote plant growth and which are less represented in research, even though these cultures are economically and culturally important. More information regarding other cultures was also found, but with fewer results obtained in the search, (e.g. cotton, banana, peanut, sunflower, and wheat). This shows that there is a lot of room for the growth of research related to these cultures and the formulation of microbial inoculants to improve the cultivation, mainly, to alleviate the abiotic stresses that affect coastal areas in Latin America.

Table 2: Microbe-mediated benefits to plant growth and yield. “Yield” means biomass, the aerial part of the plant, or grain size.

Crops	Microorganism	Main Impacts	Country	Reference
Soybean Cotton	<i>R. clarus</i>	+20% root coloni- zation	Brazil	[104]
Soybean Corn	<i>R. clarus</i>	+16,3% yield (soy- bean) +20% yield (corn)	Brazil	[105]
Soybean	<i>B. japonicum</i>	+6,39% yield	Argentina	[106]
Soybean	<i>B. elkanii</i>	+40% beans yield	Uruguay	[42]
Corn	<i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Staphylo- coccus</i> , <i>Paenibacillus</i>	+56-86% yield	Brazil	[107]
Corn Wheat	<i>A. brasilense</i> <i>A. lipoferum</i>	+16-30% yield	Brazil	[108]
Rice	<i>A. brasilense</i> <i>P. fluorescens</i>	+11% yield	Argentina	[109]
Wheat	<i>Bacillus</i> sp	+38% height in aerial parts	Mexico	[110]
Peanut	<i>O. intermedium</i> , <i>Pantoea</i> sp	+92% dry biomass in aerial parts	Argentina	[111]
Sunflower	<i>A. xylosoxidans</i> <i>Alcali- genes</i> sp <i>B. pumilus</i>	Increase in dry biomass of roots	Argentina	[112]

4.7 Conclusions

Agriculture is one of the oldest human activities and it is always innovating to meet the food needs of the population. As our growth has been exponential, it is an activity with high demand, which increasingly seeks to be productive, offering quality products to people. However, we are experiencing times of profound change, especially concerning climate change, which intensifies abiotic stresses such as salinity and water deficit, bringing challenges to the era of Agriculture 4.0. One perspective to circumvent such negative effects is to complement the use of non-renewable chemical fertilizers and pesticides with microbial inoculants. In this way, it will be possible to improve the quality of soils, avoid the loss of diversity, and conserve water bodies, promoting sustainable and safe agriculture. Abiotic stresses, including environments with high salinity and water deficit, adversely affect the structure, composition, and physiological activities of crops and soil microorganisms. In addition, these stresses disrupt the physiological and metabolic processes of crops, leading to large crop losses worldwide. Habitats with these characteristics, such as coastal areas, are, however, a source of MPCVs that, in addition to providing nutrients to plants and soil, can improve the response to abiotic stresses of crops, maintaining agricultural productivity. The ability to facilitate plant growth by providing important nutrients such as nitrogen and phosphorus, especially in soils with these deficiencies, is one of the functional properties of abiotic stress-tolerant MPCV. Microbial inoculants are biotechnological products used for several purposes, the main one being the complementation or even replacement of chemical fertilizers. Interest in the use of microbial inoculants containing bacteria and fungi, which promote plant growth, is likely to increase in the coming years, due to the higher costs of fertilizers, and mainly with concerns about pollution and emphasis on sustainable agriculture. So, to guarantee food security for the population, it is necessary to explore new ways and microbial inoculants are a successful practice, which can bring a solution to the problems of agriculture in the 21st century.

4.8 References

- [1] S. Scholvin and A. Malamud, *Is Brazil a Geoeconomic Node? Geography, Public Policy, and the Failure of Economic Integration in South America*, vol. 14, no. 2. 2020.
- [2] M. Scherer, M. F. Costa, T. Boski, U. M. Azeiteiro, and J. A. Dias, "Integrated Coastal Management in Latin America: the ever New World," *Rev. Gestão Costeira Integr.*, vol. 14, no. 4, pp. 663–668, 2014, doi: 10.5894/rgci575.
- [3] J. M. Barragán Muñoz, "Progress of coastal management in Latin America and the Caribbean," *Ocean Coast. Manag.*, vol. 184, no. October 2019, 2020, doi: 10.1016/j.ocecoaman.2019.105009.
- [4] J. da S. Souza and A. F. Martins, "Caracterização e seleção de rizóbios nativos de solos paraibanos associados à *Vigna unguiculata* (L.) Walp.," *Agropecuária Técnica*, vol. 40, no. 3–4, pp. 71–81, 2010.
- [5] J. G. Garcia-Franco, "Distribución de epífitas vasculares en matorrales costeros de Veracruz, México," *Acta Bot. Mex.*, no. 37, p. 1, 1996, doi: 10.21829/abm37.1996.764.
- [6] M. E. de Porras and A. Maldonado, "Metodologías y avances del tardío a lo largo de la diagonal árida Sudamericana," *Asoc. Paleontológica Argentina*, vol. 18, no. 2, pp. 18–38, 2018.
- [7] R. Vicuña and B. González, "The microbial world in a changing environment," *Rev. Chil. Hist. Nat.*, vol. 94, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s40693-021-00099-y.
- [8] D. L. Corwin, "Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas," *Eur. J. Soil Sci.*, vol. 72, no. 2, pp. 842–862, 2021, doi: 10.1111/ejss.13010.
- [9] N. K. Fageria and A. S. Nascente, *Management of soil acidity of South American soils for sustainable crop production*, vol. 128. Elsevier, 2014.
- [10] Y. Tapia-Torres, J. J. Elser, V. Souza, and F. García-Oliva, "Ecoenzymatic stoichiometry at the extremes: How microbes cope in an ultra-oligotrophic desert soil," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 87, pp. 34–42, 2015, doi: 10.1016/j.soilbio.2015.04.007.
- [11] G. Santoyo, C. Hernández-Pacheco, J. Hernández-Salmerón, and R. Hernández-León, "The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review," *Spanish J. Agric. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–15, 2017, doi: 10.5424/sjar/2017151-9990.
- [12] W. wen Zhang, C. Wang, R. Xue, and L. jie Wang, "Effects of salinity on the soil microbial community and soil fertility," *J. Integr. Agric.*, vol. 18, no. 6, pp. 1360–1368, 2019, doi: 10.1016/S2095-3119(18)62077-5.
- [13] R. Balestrini, W. Chitarra, and V. Fotopoulos, "Soil Biological Communities and Ecosystem Resilience," *Soil Biol. Communities Ecosyst. Resil.*, pp. 191–207, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-63336-7.
- [14] A. K. A. Suleiman *et al.*, "Organic amendment strengthens interkingdom associations in the soil and rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare*)," *Sci. Total Environ.*, vol. 695, p. 133885, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133885.

- [15] W. Alsharif, M. M. Saad, and H. Hirt, "Desert Microbes for Boosting Sustainable Agriculture in Extreme Environments," *Front. Microbiol.*, vol. 11, no. July, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01666.
- [16] V. S. Meena, P. K. Mishra, J. K. Bisht, and A. Pattanayak, *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture*, vol. 2. 2017.
- [17] A. Pedrotti, R. M. Chagas, V. C. Ramos, A. P. do N. Prata, A. A. T. Lucas, and P. B. dos Santos, "Causas e consequências do processo de salinização dos solos," *Rev. Eletrônica em Gestão, Educ. e Tecnol. Ambient.*, vol. 19, no. 2, pp. 1308–1324, 2015, [Online]. Available: <http://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/16544/pdf>.
- [18] A. Ullah, A. Bano, and N. Khan, "Climate Change and Salinity Effects on Crops and Chemical Communication Between Plants and Plant Growth-Promoting Microorganisms Under Stress," *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 5, no. June, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3389/fsufs.2021.618092.
- [19] A. K. M. M. Rahman, K. M. Ahmed, A. P. Butler, and M. A. Hoque, "Influence of surface geology and micro-scale land use on the shallow subsurface salinity in deltaic coastal areas: a case from southwest Bangladesh," *Environ. Earth Sci.*, vol. 77, no. 12, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1007/s12665-018-7594-0.
- [20] S. Eslamian and F. Eslamian, *Handbook of drought and water scarcity: Management of drought and water scarcity*. 2017.
- [21] D. Kour *et al.*, "Amelioration of drought stress in Foxtail millet (*Setaria italica* L.) by P-solubilizing drought-tolerant microbes with multifarious plant growth promoting attributes," *Environ. Sustain.*, vol. 3, no. 1, pp. 23–34, 2020, doi: 10.1007/s42398-020-00094-1.
- [22] A. Gupta, A. Rico-Medina, and A. I. Caño-Delgado, "The physiology of plant responses to drought," *Science (80)*, vol. 368, no. 6488, pp. 266–269, 2020, doi: 10.1126/science.aaz7614.
- [23] S. Curtis, "Means and Long-Term Trends of Global Coastal Zone Precipitation," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-41878-8.
- [24] M. M. Sousa Santos *et al.*, "Ecophysiology of the tall coconut growing under different coastal areas of northeastern Brazil," *Agric. Water Manag.*, vol. 232, no. June 2019, p. 106047, 2020, doi: 10.1016/j.agwat.2020.106047.
- [25] P. H. P. Ribeiro, H. R. Gheyi, C. A. Uyeda, M. B. Teixeira, F. A. L. Soares, and N. D. S. Dias, "Taxa de crescimento e produção de girassol irrigado com água salina sob doses de nitrogênio," *Irriga*, pp. 233–247, 2016.
- [26] G. Várallyay, "Climate Change, Soil Salinity and Alkalinity," *Soil Responses to Clim. Chang.*, pp. 39–54, 1994, doi: 10.1007/978-3-642-79218-2_4.
- [27] E. Pino *et al.*, *Factors affecting depletion and pollution by marine intrusion in the La Yarada's coastal aquifer, Tacna, Peru*, vol. 10, no. 5. 2019.
- [28] D. Chicoine, C. McNabb, and B. Clement, "Commensality, irrigation and agrarian entanglements in Early Horizon Nepeña, Coastal Peru," *Am. Eur. J. Am. Archaeology*, vol. 5, pp. 7–22, 2020.

- [29] F. A. O. & WWC, "Towards a water and food secure future: Critical Perspectives for Policy-makers. Rome and Marseille," 2015.
- [30] R. Setia *et al.*, "Simulation of salinity effects on past, present, and future soil organic carbon stocks," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 3, pp. 1624–1631, 2012, doi: 10.1021/es2027345.
- [31] M. D. Peña-Guerrero, A. Nauditt, C. Muñoz-Robles, L. Ribbe, and F. Meza, "Drought impacts on water quality and potential implications for agricultural production in the Maipo River Basin, Central Chile," *Hydrol. Sci. J.*, vol. 65, no. 6, pp. 1005–1021, 2020, doi: 10.1080/02626667.2020.1711911.
- [32] E. Loitzenbauer and C. A. Bulhões Mendes, "Salinity dynamics as a tool for water resources management in coastal zones: An application in the Tramandaí River basin, southern Brazil," *Ocean Coast. Manag.*, vol. 55, pp. 52–62, 2012, doi: 10.1016/j.ocecoaman.2011.10.011.
- [33] C. Gao, "Genome engineering for crop improvement and future agriculture," *Cell*, vol. 184, no. 6, pp. 1621–1635, 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.01.005.
- [34] K. B. Ruiz *et al.*, "Salares versus coastal ecotypes of quinoa: Salinity responses in Chilean landraces from contrasting habitats," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 101, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1016/j.plaphy.2016.01.010.
- [35] D. Paul and S. Nair, "Stress adaptations in a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils," *J. Basic Microbiol.*, vol. 48, no. 5, pp. 378–384, 2008, doi: 10.1002/jobm.200700365.
- [36] D. C. Rose and J. Chilvers, "Agriculture 4.0: Broadening Responsible Innovation in an Era of Smart Farming," *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 2, no. December, pp. 1–7, 2018, doi: 10.3389/fsufs.2018.00087.
- [37] M. B. de Moraes, R. A. Azevedo, T. R. Camara, C. Ulisses, C. C. de Albuquerque, and L. Willadino, "Antioxidative metabolism in sugarcane (*Poaceae*) varieties subjected to water and saline stress," *Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient.*, vol. 24, no. 11, pp. 776–782, 2020, doi: 10.1590/1807-1929/agriambi.v24n11p776-782.
- [38] M. A. Siddikee, P. S. Chauhan, R. Anandham, G. H. Han, and T. Sa, "Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20, no. 11, pp. 1577–1584, 2010, doi: 10.4014/jmb.1007.07011.
- [39] S. Mayak, T. Tirosh, and B. R. Glick, "Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 42, no. 6, pp. 565–572, 2004, doi: 10.1016/j.plaphy.2004.05.009.
- [40] G. F. De Paula, G. B. Demétrio, and L. S. Matsumoto, "Biotechnological potential of soybean plant growth-promoting rhizobacteria1," *Rev. Caatinga*, vol. 34, no. 2, pp. 328–338, 2021, doi: 10.1590/1983-21252021v34n209rc.
- [41] V. G. Ambrosini, S. M. V. Fontoura, R. P. de Moraes, S. Tamagno, I. A. Ciampitti, and C. Bayer, "Soybean yield response to *Bradyrhizobium* strains in fields with inoculation history in Southern Brazil," *J. Plant Nutr.*, vol. 42, no. 16, pp. 1941–1951, 2019, doi: 10.1080/01904167.2019.1648680.

- [42] B. Riviezzi *et al.*, "Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*," *Rhizosphere*, vol. 15, no. June, p. 100219, 2020, doi: 10.1016/j.rhisph.2020.100219.
- [43] D. S. Martins *et al.*, "Both the contribution of soil nitrogen and of biological N₂ fixation to sugarcane can increase with the inoculation of diazotrophic bacteria," *Plant Soil*, vol. 454, no. 1–2, pp. 155–169, 2020, doi: 10.1007/s11104-020-04621-1.
- [44] N. S. Ferreira *et al.*, "Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and their effect on plant development," *Plant Soil*, vol. 451, no. 1–2, pp. 221–238, 2020, doi: 10.1007/s11104-019-04388-0.
- [45] C. O. de C. Lima *et al.*, "Integrating microbial metagenomics and physicochemical parameters and a new perspective on starter culture for fine cocoa fermentation," *Food Microbiol.*, vol. 93, no. July 2020, 2021, doi: 10.1016/j.fm.2020.103608.
- [46] L. Wu, H. J. Wu, J. Qiao, X. Gao, and R. Borriss, "Novel routes for improving bio-control activity of *Bacillus* based bioinoculants," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. DEC, pp. 1–13, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.01395.
- [47] N. Singh, J. Singh, and K. Singh, "Small at size, big at impact: Microorganisms for sustainable development," *Microb. Bioprospecting Sustain. Dev.*, pp. 3–28, 2018, doi: 10.1007/978-981-13-0053-0_1.
- [48] E. L. Madsen, "Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 3, pp. 456–464, 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.008.
- [49] N. Kumawat, R. Kumar, S. Kumar, and V. S. Meena, "Nutrient Solubilizing Microbes (NSMs): Its Role in Sustainable Crop Production," in *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*, vol. 2, no. January, V. S. Meena, Ed. 2017, pp. 1–374.
- [50] A. Bargaz, K. Lyamlouli, M. Chtouki, Y. Zeroual, and D. Dhiba, "Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. July, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01606.
- [51] Z. A. Zahir, A. Munir, H. N. Asghar, B. Shaharoona, and M. Arshad, "Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, no. 5, pp. 958–963, 2008.
- [52] A. Rizvi, B. Ahmed, M. S. Khan, S. Umar, and J. Lee, "Psychrophilic bacterial phosphate-biofertilizers: A novel extremophile for sustainable crop production under cold environment," *Microorganisms*, vol. 9, no. 12, 2021, doi: 10.3390/microorganisms9122451.
- [53] S. Kumar, S. Nand, B. Pratap, D. Dubey, and V. Dutta, "Removal kinetics and treatment efficiency of heavy metals and other wastewater contaminants in a constructed wetland microcosm: Does mixed macrophytic combinations perform better?," *J. Clean. Prod.*, vol. 327, no. July, p. 129468, 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2021.129468.

- [54] K. Cornejo-Ríos *et al.*, "Impact of trichoderma asperellum on chilling and drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum*)," *Horticulturae*, vol. 7, no. 10, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3390/horticulturae7100385.
- [55] S. J. Parikh and B. R. James, *Soil: The Foundation of Agriculture. Nature Education Knowledge 3 (10): 2.* 2012.
- [56] G. S. Malhi, M. Kaur, and P. Kaushik, "Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A review," *Sustain.*, vol. 13, no. 3, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/su13031318.
- [57] R. L. B. Hooke, J. F. Martín-Duque, and J. Pedraza, "Land transformation by humans: A review," *GSA Today*, vol. 22, no. 12, pp. 4–10, 2012, doi: 10.1130/GSAT151A.1.
- [58] R. Kanianska, "Agriculture and Its Impact on Land-Use, Environment, and Ecosystem Services," in *Landscape Ecology - The Influences of Land Use and Anthropogenic Impacts of Landscape Creation land*, 2016, pp. 3–26.
- [59] J. Poore and T. Nemecek, "Reducing food's environmental impacts through producers and consumers," *Science (80-.)*, vol. 360, no. 6392, pp. 987–992, 2018, doi: 10.1126/science.aag0216.
- [60] A. F. S. Teixeira *et al.*, "Microbiological indicators of soil quality under native forests are influenced by topographic factors," *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 91, no. 4, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1590/0001-3765201920189696.
- [61] J. Dhaliwal, S. S. Kukal, and S. Sharma, "Soil organic carbon stock in relation to aggregate size and stability under tree-based cropping systems in Typic Ustochrepts," *Agrofor. Syst.*, vol. 92, no. 2, pp. 275–284, 2018, doi: 10.1007/s10457-017-0103-8.
- [62] Y. T. Cheng, L. Zhang, and S. Y. He, "Plant-Microbe Interactions Facing Environmental Challenge," *Cell Host Microbe*, vol. 26, no. 2, pp. 183–192, 2019, doi: 10.1016/j.chom.2019.07.009.
- [63] T. Alshaal *et al.*, "The Rhizosphere and Plant Nutrition Under Climate Change," in *Essential Plant Nutrients*, 2017, pp. 1–569.
- [64] A. De Zelicourt, M. Al-Yousif, and H. Hirt, "Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance," *Mol. Plant*, vol. 6, no. 2, pp. 242–245, 2013, doi: 10.1093/mp/sst028.
- [65] K. Timmis and J. L. Ramos, "The soil crisis: the need to treat as a global health problem and the pivotal role of microbes in prophylaxis and therapy," *Microb. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 769–797, 2021, doi: 10.1111/1751-7915.13771.
- [66] J. P. L. F. Brêda, R. C. D. de Paiva, W. Collischon, J. M. Bravo, V. A. Siqueira, and E. B. Steinke, "Climate change impacts on South American water balance from a continental-scale hydrological model driven by CMIP5 projections," *Clim. Change*, vol. 159, no. 4, pp. 503–522, 2020, doi: 10.1007/s10584-020-02667-9.
- [67] J. Yoon *et al.*, "A coupled human-natural system analysis of freshwater security under climate and population change," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, no. 14, 2021, doi: 10.1073/pnas.2020431118.

- [68] U. Seeliger and B. Kjerfve, *Coastal marine ecosystems of Latin America*. 2001.
- [69] A. Boit *et al.*, “Large-scale impact of climate change vs. land-use change on future biome shifts in Latin America,” *Glob. Chang. Biol.*, vol. 22, no. 11, pp. 3689–3701, 2016, doi: 10.1111/gcb.13355.
- [70] C. R. G. Reis *et al.*, “Biological nitrogen fixation across major biomes in Latin America: Patterns and global change effects,” *Sci. Total Environ.*, vol. 746, p. 140998, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140998.
- [71] F. and A. O. of T. U. N. FAO, “Major Farming Systems: Latin America and Caribbean.” 2001.
- [72] U. S. D. of A. USDA, “Global - Crop Production Maps.” 2021.
- [73] S. T. BECKETT, *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 1994.
- [74] H. B. Dias and P. C. Sentelhas, “Sugarcane yield gap analysis in Brazil – A multi-model approach for determining magnitudes and causes,” *Sci. Total Environ.*, vol. 637–638, pp. 1127–1136, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.017.
- [75] L.-F. Gutiérrez, L.-M. Rosada, and Á. Jiménez, “Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction,” *Grasas y aceites*, vol. 62, no. 1, pp. 76–83, 2011.
- [76] M. N. A. M. Yusoff *et al.*, “Sustainability of Palm Biodiesel in Transportation: a Review on Biofuel Standard, Policy and International Collaboration Between Malaysia and Colombia,” *BioEnergy Res.*, vol. 14, pp. 43–60, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10165-0>.
- [77] Z. Zhou, C. Wang, and Y. Luo, “Effects of forest degradation on microbial communities and soil carbon cycling: A global meta-analysis,” *Glob. Ecol. Biogeogr.*, vol. 27, no. 1, pp. 110–124, 2018, doi: 10.1111/geb.12663.
- [78] J. Ranger, “Forest Soils: Characteristics and Sustainability,” in *Soils as a Key Component of the Critical Zone 1: Functions and Services*, 2018, pp. 163–186.
- [79] M. S. Santos, M. A. Nogueira, and M. Hungria, “Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture,” *AMB Express*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s13568-019-0932-0.
- [80] G. Cunha-Zeri and J. Ometto, “Nitrogen emissions in Latin America: A conceptual framework of drivers, impacts, and policy responses,” *Environ. Dev.*, vol. 38, no. November 2020, p. 100605, 2021, doi: 10.1016/j.envdev.2020.100605.
- [81] D. Signor and C. E. P. Cerri, “Emissões de óxido nitroso em solos agrícolas: Uma revisão,” *Pesqui. Agropecu. Trop.*, vol. 43, no. 3, pp. 322–338, 2013, doi: 10.1590/S1983-40632013000300014.
- [82] C. Alewell, B. Ringeval, C. Ballabio, D. A. Robinson, P. Panagos, and P. Borrelli, “Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18326-7.
- [83] J. C. Corrêa, M. Mauad, and C. A. Rosolem, “Phosphorus in soil and soybean growth as affected by phosphate fertilization and cover crop residues,” *Pesqui. Agropecu. Bras.*, vol. 39, no. 12, pp. 1231–1237, 2004, doi: 10.1590/s0100-

- [84] M. N. Khan, M. Mobin, Z. K. Abbas, and S. A. Alamri, *Fertilizers and their contaminants in soils, surface and groundwater*, vol. 1–5. Elsevier Inc., 2017.
- [85] P. M. Glibert and J. M. Burkholder, “The Complex Relationships Between Increases in Fertilization of the Earth, Coastal Eutrophication and Proliferation of *Harmful algal blooms*,” *Ecol. Harmful Algae*, no. January, pp. 341–354, 2006, doi: 10.1007/978-3-540-32210-8_26.
- [86] D. Kour *et al.*, “Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 23, no. November 2019, p. 101487, 2020, doi: 10.1016/j.bcab.2019.101487.
- [87] M. Billah *et al.*, “Rock phosphate-enriched compost in combination with rhizobacteria; a cost-effective source for better soil health and wheat (*Triticum aestivum*) productivity,” *Agronomy*, vol. 10, no. 9, 2020, doi: 10.3390/agronomy10091390.
- [88] A. Ditta *et al.*, “Rock phosphate-enriched organic fertilizer with phosphate-solubilizing microorganisms improves nodulation, growth, and yield of legumes,” *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, vol. 49, no. 21, pp. 2715–2725, 2018, doi: 10.1080/00103624.2018.1538374.
- [89] M. F. Fernandes and R. P. M. Fernandes, “Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu,” *Rev. Bras. Ciência do Solo*, vol. 24, no. 2, pp. 321–327, 2000, doi: 10.1590/s0100-06832000000200009.
- [90] M. N. Islam, J. J. Germida, and F. L. Walley, “Survival of a commercial AM fungal inoculant and its impact on indigenous AM fungal communities in field soils,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 166, no. March, p. 103979, 2021, doi: 10.1016/j.apsoil.2021.103979.
- [91] B. A. Harris, E. M. Bauske, and S. V. Pennisi, “Cultural practices and microbial inoculants have variable impact on a bedding plant (*Lantana camara* L.) performance in the landscape,” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 282, no. February, p. 110059, 2021, doi: 10.1016/j.scienta.2021.110059.
- [92] M. J. Salomon *et al.*, “Global evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inoculants under greenhouse and field conditions,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 169, no. April 2021, p. 104225, 2022, doi: 10.1016/j.apsoil.2021.104225.
- [93] C. V. A. Lopes and G. S. C. de Albuquerque, “Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática,” *Saúde em Debate*, vol. 42, no. 117, pp. 518–534, 2018, doi: 10.1590/0103-1104201811714.
- [94] A. Hashem, E. F. Abd-Allah, A. A. Alqarawi, A. A. Al-Huqail, S. Wirth, and D. Egamberdieva, “The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of *Acacia gerrardii* under salt stress,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. JUL, pp. 1–15, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01089.
- [95] L. Fu *et al.*, “Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium wilt* disease,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 104, pp. 39–48, 2017, doi: 10.1016/j.soilbio.2016.10.008.
- [96] B. R. Glick, “Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications,”

Scientifica (Cairo)., vol. 2012, pp. 1–15, 2012.

- [97] G. M. Fipke *et al.*, “Osmoprotectant in soybean seeds can increase the inoculation and co-inoculation time in pre-sowing,” *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 14, no. 6, pp. 905–912, 2020, doi: 10.21475/ajcs.20.14.06.p1696.
- [98] M. Scagliola, F. Valentinuzzi, T. Mimmo, S. Cesco, C. Crecchio, and Y. Pii, “Bioinoculants as Promising Complement of Chemical Fertilizers for a More Sustainable Agricultural Practice,” *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 4, no. January, pp. 1–12, 2021, doi: 10.3389/fsufs.2020.622169.
- [99] S. K. Gosal and J. Kaur, “Microbial Inoculants: A Novel Approach for Better Plant Microbiome Interactions,” in *Probiotics in Agroecosystem*, 2017, pp. 1–537.
- [100] A. Basu *et al.*, “Plant growth promoting rhizobacteria (Pgpr) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects,” *Sustain.*, vol. 13, no. 3, pp. 1–20, 2021, doi: 10.3390/su13031140.
- [101] M. V. V. De Oliveira *et al.*, “Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5,” *Arch. Microbiol.*, vol. 198, no. 3, pp. 287–294, 2016, doi: 10.1007/s00203-015-1176-2.
- [102] A. C. Intorne, M. V. V. De Oliveira, M. L. Lima, J. F. Da Silva, F. L. Olivares, and G. A. De Souza Filho, “Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc,” *Arch. Microbiol.*, vol. 191, no. 5, pp. 477–483, 2009, doi: 10.1007/s00203-009-0472-0.
- [103] D. D. V. Pessoa *et al.*, “*Herbaspirillum seropedicae* strain HRC54 expression profile in response to sugarcane apoplastic fluid,” *3 Biotech*, vol. 11, no. 6, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1007/s13205-021-02848-y.
- [104] M. V. T. Cely *et al.*, “Inoculant of arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*) increase yield of soybean and cotton under field conditions,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. MAY, pp. 1–9, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00720.
- [105] A. R. Barazetti *et al.*, “Formulations of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum applied to soybean and corn plants under controlled and field conditions,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 142, no. January, pp. 25–33, 2019, doi: 10.1016/j.apsoil.2019.05.015.
- [106] M. Leggett *et al.*, “Soybean response to inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina,” *Agron. J.*, vol. 109, no. 3, pp. 1031–1038, 2017, doi: 10.2134/agronj2016.04.0214.
- [107] R. de C. Nascimento *et al.*, “Maize-associated bacteria from the Brazilian semi-arid region boost plant growth and grain yield,” *Symbiosis*, vol. 83, no. 3, pp. 347–359, 2021, doi: 10.1007/s13199-021-00755-7.
- [108] M. Hungria, R. J. Campo, E. M. Souza, and F. O. Pedrosa, “Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil,” *Plant Soil*, vol. 331, no. 1, pp. 413–425, 2010, doi: 10.1007/s11104-009-0262-0.
- [109] I. E. García de Salamone *et al.*, “Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 61, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1016/j.apsoil.2018.05.005.

no. 2012, pp. 196–204, 2012, doi: 10.1016/j.apsoil.2011.12.012.

- [110] A. L. Ibarra-Villarreal *et al.*, “Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*),” *J. Arid Environ.*, vol. 186, 2021, doi: 10.1016/j.jaridenv.2020.104399.
- [111] T. Taurian *et al.*, “Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: Screening for plant growth-promoting activities,” *Plant Soil*, vol. 329, no. 1, pp. 421–431, 2010, doi: 10.1007/s11104-009-0168-x.
- [112] G. Forchetti, O. Masciarelli, M. J. Izaguirre, S. Alemanno, D. Alvarez, and G. Abdala, “Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi,” *Curr. Microbiol.*, vol. 61, no. 6, pp. 485–493, 2010, doi: 10.1007/s00284-010-9642-1.

5 **Capítulo 2 Isolation and characterization of plant growth-promoting bacteria associated with *Salvinia auriculata* Aublet**

5.1 **Abstract**

Salvinia auriculata Aublet is a floating aquatic plant, capable to absorb the excess of nutrients and water contaminants, and can be used in effluent treatment plants. The ability to survive in degraded areas may be related to the association with beneficial bacteria capable of promoting plant growth. However, little is known about the microbiota associated with this aquatic plant and its potential application to the aquatic environment. In this sense, this work aims to identify bacteria associated with *S. auriculata* that could be able to promote plant growth. Eighteen bacterial strains were identified by sequencing of the 16S rRNA gene, belonging to the genera *Rhizobium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Siccibacter*, and *Stenotrophomonas*. All isolates produced indole compounds, 12 fixed N₂, and 16 solubilized phosphate. A new strain of *Enterobacter* (sp 3.1.3.0.X.18) was selected for inoculation into *S. auriculata*. For this purpose, 500 mL of nutrient solution and 1 g of the plant were used in the control and inoculated conditions. *Enterobacter* inoculation promoted a significant increase ($p \leq 0.05$) in fresh plant biomass (17%) after 4 days of cultivation. In summary, the present study characterized 18 plant growth-promoting bacteria isolated from *S. auriculata* with potential for biotechnological application such as the production of bioinoculants or biomass resources to protect or improve plant growth under conditions of stress.

Keywords: Aquatic Plant, Plant Growth-Promoting Bacteria, Plant and Microorganism Association

5.2 Introduction

Salvinia auriculata Aublet is a free-floating macrophyte in the family Salviniaceae, which, under favorable conditions, quickly grows and spreads by vegetative propagation, colonizing large freshwater surfaces in a short time (Esteves 2011; Pott *et al.* 2011). Due to their small size and ease of cultivation, plants of the genus *Salvinia* have been used as a model for the study of aquatic macrophytes, including the molecular characterization of these plants at the genomic level (Leal-Alvarado *et al.* 2018; Machado *et al.* 2016).

Considering that the symbiotic interactions between plants and plant growth-promoting bacteria (PGPB) in the terrestrial environment are well-established, many studies have been carried out to isolate and characterize PGPB associated with important crops (Bevivino *et al.* 1998; Sajjad Mirza *et al.* 2001; Verma, Ladha, and Tripathi 2001). PGPB stimulate host plant growth through the production of phytohormones, such as indole-3-acetic acid, which directly promote plant growth (Gilbert *et al.* 2018; Glick 2012; Johnston-Monje and Raizada 2011). Likewise, PGPB can also improve plant growth through the biological fixation of atmospheric N₂ (BNF) (Van Der Heijden, Bardgett, and Van Straalen 2008; Jones *et al.* 2007) and the solubilization of mineral nutrients such as phosphate, which occurs through the production of organic acids and phosphatases (Chen *et al.* 2006; Rodríguez and Fraga 1999; Vazquez *et al.* 2000).

Even though microbial interactions with terrestrial plants are relatively well known, the study of PGPB associated with aquatic plants is quite recent. The experiments by Ishizawa *et al.* (2017), for example, showed that there was an increase in the production of plant biomass of the aquatic macrophyte *Lemna minor* when bacterial communities were co-cultivated with the plant. Saha *et al.* (2016) used *Typha angustifolia* as a study model, isolating endophytic microorganisms from this macrophyte. When inoculated in rice, these bacterial isolates also promoted plant growth in the new host. In the work by Ortega-Acosta *et al.* (2015) most of the isolates from *Lemna gibba* were shown to produce indole compounds. These studies show that microbial isolates from aquatic plants might present growth-promoting characteristics, and these PGPB exert positive effects on

growth when inoculated into a new host plant, similar to that observed in terrestrial cultures.

In this research, we explore the potential benefits that emerge in studying *Salvinia auriculata* and its associated bacteria as a model. As with most plants, it is hypothesized that *Salvinia auriculata* is colonized by PGPB which might positively shape plant growth. In the present study, we identify bacteria associated with *S. auriculata* capable of promoting plant growth and describe and discuss PGPB associated with this plant.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Cultivation of *Salvinia auriculata* Aublet

S. auriculata was cultivated in a greenhouse in a nutrient solution at 25% dilution, and pH 5.8 ± 0.1 (Hoagland and Arnon 1950) throughout all assays. According to the National Institute of Meteorology (INMET), with data from the Meteorological Station of Campos dos Goytacazes (RJ, Brazil), the mean photoperiod conditions ranged from 12h during the day and 12h at night, with average temperatures of 25 °C during the day and 18 °C at night. The relative humidity of the air was approximately 70%.

5.3.2 Bacterial strains isolation and cultivation

Adult plants with healthy, symptomless, green leaves, with approximately 0.5 cm in leaf diameter and 1 cm in root length, were brought from the greenhouse to the laboratory. Excess water from the plants was removed by placing them for 10 min on paper towels. 0.5 g of the drained plant tissue was washed in 10 mL of sterile distilled water for 1 min, twice. Then, the plants were transferred to 10 mL of sterile saline solution (0.85% NaCl) and incubated for 10 min in ultrasound. Subsequently, the plants were macerated in this same solution and the obtained extract was plated on DYGS medium (Rodrigues Neto, Malavolta Jr, and Victor 1986). The plates were incubated at 30 °C for up to 72h. After the colonies had grown, the bacteria were isolated based on morphological characteristics, including color, elevation (present or absent), edge (regular or irregular), surface (smooth or rough), and optical detail (bright, translucent, or opaque) (Perin 2007). The colonies presenting distinct characteristics were incubated in 5 mL liquid

DYGS medium at 175 rpm in an orbital shaker at 30 °C for 16h and the isolates were purified through crossed streaks. The cells were also analyzed under an optical microscope to observe their shape and to analyze their Gram stain pattern.

5.3.3 Molecular Identification of Isolates

Genomic DNA was extracted with Plant DNAzol (Invitrogen) according to the manufacturer's manual. Quantification of genomic DNA was performed using NanoDrop/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). For amplification of the 16S rRNA gene region primers for the Eubacteria domain fD1 (27F5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') and rD1 (1429R5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') were used (Weisburg *et al.* 1991). The amplification reaction contained 2.5 µL of 10x Taq buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 500 mM KCl, 1% Triton-X 100), 2 µL 25 mM MgCl₂, 0.5 µL of 10 mM dNTPs, 1 µL of each primer (10 pmol), 0.25 µL of Taq DNA polymerase (2.5 U), 100 ng DNA and sterile ultrapure water for a final volume of 25 µL. The cycle used was: 95 °C for 5 min; 3 pre-amplification cycles of 95 °C for 30 s; 55 °C for 30 s 72 °C for 2 min. Then, there were another 40 cycles of amplification of 95 °C for 30 s; 55 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, and 72 °C for 10 min. In the end, the samples were cooled to 4 °C still in the thermocycler. Sanger sequencing was performed by ACTGene Sequencing Service (Ludwig Biotechnologia Ltda, Rio Grande do Sul, Brazil). Sequence analysis and editing were performed in BioEdit v7.0 (Hall, Ibis Biosciences, and Carlsbad 2011). Consensus sequences were identified with BLASTN (Camacho *et al.* 2009). Sequence alignment was performed with Mafft Online (Kato, Rozewicki, and Yamada 2018) and a Maximum Likelihood tree was obtained in MEGA X with 500 bootstrap repetitions (Kumar *et al.* 2018).

5.3.4 Atmospheric N₂ fixation

Bacteria were cultivated in DYGS medium until reaching optical density (600 nm) equivalent to OD 1.0, then centrifuged and washed with saline solution (0.85% NaCl) to remove leftover culture medium and other possible nitrogen sources. 20 µl aliquots of the culture were inoculated into 10 mL flasks containing 5 mL of the semi-solid culture media NFb and JNFb (Döbereiner, Andrade, and Baldani 1999). Assays were carried out in triplicate and the flasks were kept for 10 days at 30 °C in a bacteriological incubator. After this period, we analyzed the ab-

sence or presence of the aerotaxic film formed by the isolates with active nitrogenase enzyme. Cultures were subcultured to new media three times and bacteria that remained forming films were considered positive for BNF.

5.3.5 Production of indole compounds

To assess the production of indole compounds, the Salkowsky method (Sarwar and Kremer 1995) was used. The isolates were cultivated until reaching OD (600 nm) = 1.0 and 100 μ L culture aliquots were inoculated in 2 mL of DYGS medium, with and without the addition of tryptophan (100 μ g.L⁻¹), being kept in the dark for 72 at 30 °C in an orbital shaker at 175 rpm. To evaluate the synthesis of indole compounds, 1 mL of the culture was centrifuged at 13,000 rpm for 5 min and 100 μ L of the supernatant was transferred to a microplate. Then, 100 μ L of Salkowsky's reagent was added and the plate was incubated in the dark for 30 min. The samples were analyzed in a spectrophotometer at 544 nm and the quantification of indole compounds produced was measured using a calibration curve with indole-3-acetic acid, relating absorbance and concentration of indoles. The assay was performed in triplicate for each isolate.

5.3.6 Phosphate solubilization

The isolates were cultivated until reaching OD (600 nm) = 1.0. Subsequently, an aliquot of 10 μ L of inoculum was placed on a Petri dish containing basal medium (Verma *et al.* 2001) plus 0.8 g.L⁻¹ of Ca₃(PO₄)₂. The plates were incubated in an incubator for 72h and after this period the formation of a solubilization halo was observed (Intorne *et al.* 2009). The assay was performed in triplicate for each isolate in three independent experiments.

5.3.7 Plant growth promotion test

Based on the studied plant growth-promoting characteristics, a bacterium was selected for inoculum in *S. auriculata*. In this sense, plants were acclimated for seven days in a greenhouse using a Hoagland nutrient solution at 25% (Bizzo *et al.* 2014; Hoagland and Arnon 1950). After this period, samples of plants without disease symptoms, with around 0.5 cm in leaf diameter and 1 cm in root length, were brought to the laboratory, where excess water was removed, and the plants were weighed. Then, 1 g of the plant was transferred to pots containing 500

mL of nutrient solution and 1 mL of selected bacteria inoculum at an OD = 1.0. No bacterial culture was added to the control condition. The plants were kept for four days in a greenhouse. Five replicates were analyzed for the treatments, and the experiments were carried out three times. At the end of each experiment, fresh and dry (after drying the samples at 60 °C for four days) biomass was evaluated. The photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, and carotenoids) were determined according to the method of Wellburn (1994). *S. auriculata* plants (50 mg of FB) were placed in plastic test tubes containing 5 mL dimethyl sulfoxide reagent (DMSO) as an organic solvent and kept in the dark. After 4 days, the extract was analyzed in a spectrophotometer at 480 nm, 649 nm, and 665 nm. All the laboratory procedures were carried out in a low-light environment.

5.3.8 Statistical Analysis

Data were tested for adequacy to a normal distribution and for homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. When necessary, data were log-transformed to ensure homogeneity of variance. A comparison of treatment means was performed using the Student's T-test at a 5% significance level using the R studio software. The data obtained show mean and standard error (SE). Three randomized repetitions were performed, totaling six experimental units.

5.4 Results

5.4.1 Bacteria associated with *Salvinia auriculata* Aublet

In total, 18 distinct cultivable bacteria were isolated from *Salvinia auriculata* Aublet based on morphological characteristics of the colony. Description of cell shape and Gram stain were also noted (Table 1). The 18 isolates were subjected to molecular analysis through partial sequencing of the 16S rRNA gene for taxonomic determination (Table 1, Figure. 1). The obtained sequences ranged from 481 to 1479 nucleotides, with identity coverage of 94 to 99% in BLASTN. Among these isolates, we could identify seven bacterial genera and at least nine distinct species. To analyze the genetic proximity of these isolates, the partial sequence of the 16S rRNA gene was also used to obtain a phylogenetic tree of the

strains obtained in the isolation, to verify the quality of the sequences obtained (Figure 1) through their clustering, which is adequate.

Table 1. Morphological characteristics of colonies and cells, and molecular identification of *Salvinia auriculata* isolates. Nt: nucleotides; Ident: identity.

Species	Isolate	GenBank Acc. Code	Length (nt)	Best Hit	Ident (%)	Color	Elevation	Shape	Surface	Optical Property	Gram	Form
<i>Priestia megaterium</i>	3.1.3.0. X.1	MK558237	1479	LC606532.1	97.92	Beige	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.1.3.0. X.2	MK558246	760	OK217196.1	99.17	Green	Absent	Uneven	Rough	Opaque	-	Bacilli
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	3.1.3.0. X.3	MK558253	818	MH341934.1	97.31	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3.1.3.0. X.4	MK558251	960	CP049956.1	98.09	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Siccibacter colletis</i>	3.1.3.0. X.5	MK558250	1459	NR_134807.1	98.57	White	Present	Uneven	Smooth	Translucent	+	Bacilli
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.1.3.0. X.6	MK558247	1499	OP677775.1	94.14	Green	Absent	Uneven	Rough	Opaque	-	Bacilli
<i>Curtobacterium</i> sp.	3.1.3.0. X.7	MK558240	1449	ON920698.1	94.05	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Pseudomonas fulva</i>	3.1.3.0. X.8	MK558248	1112	KT253977.1	96.82	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	-	Bacilli
<i>Curtobacterium</i> sp.	3.1.3.0. X.9	MK558241	691	MN511778.1	99.40	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	-	Bacilli
<i>Curtobacterium</i> sp.	3.1.3.0. X.10	MK558242	1453	KJ733897.1	96.97	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Pseudomonas mosselii</i>	3.1.3.0. X.11	MK558249	670	KF515676.1	95.17	Green	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Rhizobium radiobacter</i>	3.1.3.0. X.12	MK558236	1410	MH050420.1	97.69	White	Present	Regular	Smooth	Translucent	-	Bacilli
<i>Enterobacter</i> sp.	3.1.3.0. X.13	MK558244	979	KT260465.1	97.32	White	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Cocci
<i>Bacillus toyonensis</i>	3.1.3.0. X.14	MK558239	1461	MG561363.1	97.96	White	Absent	Uneven	Rough	Opaque	+	Bacilli
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3.1.3.0. X.15	MK558252	797	MN889390.1	96.60	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Bacillus</i> sp.	3.1.3.0. X.16	MK558238	481	MG461474.1	98.93	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Curtobacterium</i> sp.	3.1.3.0. X.17	MK558243	517	KX618332.1	97.71	Yellow	Present	Regular	Smooth	Bright	+	Bacilli
<i>Enterobacter</i> sp.	3.1.3.0. X.18	MK558245	1460	CP118552.1	97.79	White	Present	Regular	Smooth	Translucent	-	Bacilli

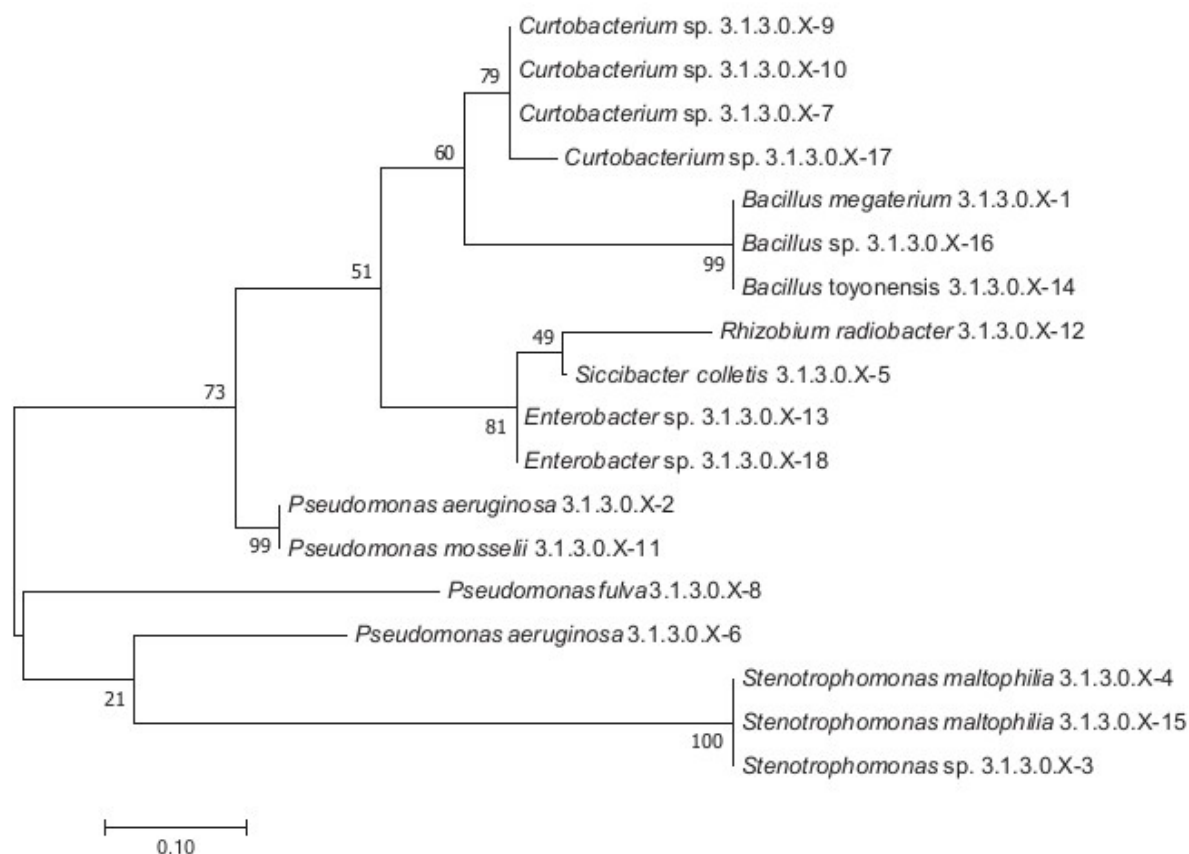


Figure 1: 16S rRNA gene Maximum Likelihood phylogenetic distribution of *S. auriculata* isolates.

5.4.2 Potential of bacteria to promote plant growth

In our BNF assay (Table 2), 12 bacterial isolates were able to fix atmospheric N_2 , meaning being positive for the formation of an aerotaxic film under the surface of at least one of the two culture media tested for biological N_2 fixation, which indicates the activity of nitrogenases. The analysis of indole compounds revealed that all isolates were positive for the production of indoles, ranging from 0.70 to 28.18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Table 2). The highest production was observed for *Enterobacter* sp 3.1.3.0.X.18 and the lowest recorded was for *Pseudomonas aeruginosa* 3.1.3.0.X.6. Only two bacteria were unable to solubilize phosphate; *Stenotrophomonas maltophilia* 3.1.3.0.X.15 and the *Curtobacterium* sp. 3.1.3.0.X.17.

Table 2. Plant growth-promoting characteristics in *S. auriculata* Aublet isolates. + Presence of the feature; - Absence of the feature.

Identification	NFb	JNFb	Indoles ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solubilization
<i>P. megaterium</i> 3.1.3.0. X.1	-	-	2.89	+
<i>P. aeruginosa</i> 3.1.3.0. X.2	-	+	24.00	+
<i>Stenotrophomonas</i> sp 3.1.3.0. X.3	+	-	4.70	+
<i>S. maltophilia</i> 3.1.3.0. X.4	-	+	6.97	+
<i>S. colletis</i> 3.1.3.0. X.5	+	+	7.90	+
<i>P. aeruginosa</i> 3.1.3.0. X.6	-	-	0.70	+
<i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.7	-	-	3.62	+
<i>P. fulva</i> 3.1.3.0. X.8	-	+	6.01	+
<i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.9	-	-	4.81	+
<i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.10	+	+	1.91	+
<i>P. mosselii</i> 3.1.3.0. X.11	+	+	1.44	+
<i>R. radiobacter</i> 3.1.3.0. X.12	+	-	19.63	+
<i>Enterobacter</i> sp 3.1.3.0. X.13	-	-	22.72	+
<i>B. toyonensis</i> 3.1.3.0. X.14	-	-	1.05	+
<i>S. maltophilia</i> 3.1.3.0. X.15	+	+	2.63	-
<i>Bacillus</i> sp. 3.1.3.0. X.16	+	+	6.45	+
<i>Curtobacterium</i> sp. 3.1.3.0. X.17	-	+	2.66	-
<i>Enterobacter</i> sp. 3.1.3.0. X.18	+	+	28.18	+

5.4.3 Growth promotion of *S. auriculata* by *Enterobacter* sp.

The interaction assay with the *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 during 4 days in *S. auriculata* shows a significant difference increase of 17,9% in fresh biomass of inoculated plants compared to the control condition (Figure 2 A). An increase of 11,9% in dry biomass, but no significant difference (Figure 2 B). And finally, our results show decreases of less than 1,0% in Chlorophyll a and Carotenoids, but, on the other hand, it shows a decrease of 12,1% in Chlorophyll b (Figure 2 C, D, E). These photosynthetic pigments of inoculated plants compared to the control condition, in summary, do not present statistically significant differences.

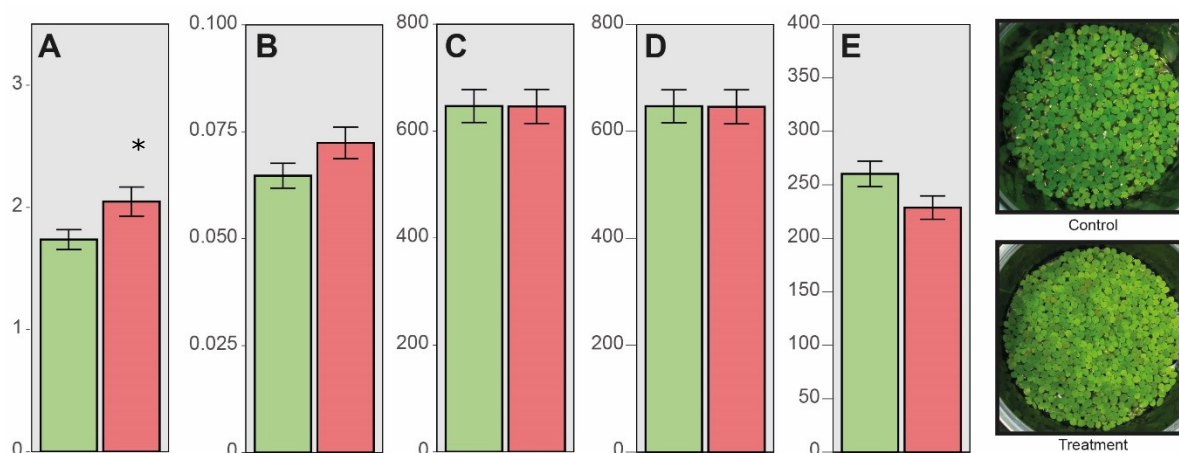


Figure 2: Effect of *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 in *Salvinia auriculata* in plant biomass and photosynthetic pigments. The bacteria promoted an increase in fresh plant biomass (A), with no significant difference in dry biomass after 4 days of inoculation (B) and in photosynthetic pigments (chlorophyll a represented by bar C, chlorophyll b represented by bar D, and carotenoids represented by bar E) according to the T Test ($p \leq 0.05$). Control (only *S. auriculata* plants), represented by green bars. Treatment (plants inoculated with *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 + *S. auriculata*) represented by red bars. The asterisk symbol represents a significant difference between treatments.

5.5 Discussion

The current literature on *Salvinia auriculata* Aublet has described species distribution (Bini *et al.* 1999; Forno 1983), and applications for phytoremediation (Palácio *et al.* 2020; Panfili *et al.* 2017; Bizzo *et al.* 2014; Wolff *et al.* 2012; Espinoza-Quiñones *et al.* 2009) that are essential to describe relevant environmental information. Nonetheless, there is still a gap in the knowledge of the association between bacteria and aquatic plants, especially plant growth-promoting bacteria (Ishizawa *et al.* 2019; Suzuki *et al.* 2014). The present work and some other recent research have brought the isolation of bacteria from aquatic plants and a characterization of growth promoters among the isolated strains. Gilbert *et al.*, (2018) isolated 47 endophytic bacteria from *Lemna minor* tissues and evaluated their production of indole compounds. Ishizawa *et al.*, (2017) isolated and characterized 22 bacteria from the rhizosphere of *Lemna gibba*. Shehzadi *et al.*, (2016) obtained 41 endophytic bacteria isolated from three aquatic plants, finding eight isolates associated with *Eichhornia crassipes*, 24 with *Typha domingensis*, and nine with *Pistia stratiotis*. Analysis of the DNA sequences of the 18 isolates revealed that most strains belong to different species and genera. Over the next few

paragraphs, we go over the species and traits evaluated in this work, and whether they correspond to a novelty in that species/genus.

Some clades among the species and genera isolated from *S. auriculata* are already known for their growth-promotion traits, like *Curtobacterium* strains, for instance. Díez-Méndez and Rivas (2017) showed an improvement in saffron production using *Curtobacterium herbarum* Cs10 isolated from the plant as a bioinoculant. Research by Vimal *et al.*, (2019) on abiotic stress examined the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria under different salinity conditions. According to the authors, *Curtobacterium albidum* SRV4 is described as a diazotrophic and indole compounds producer. Rice plants inoculated with this strain showed significant gains in plant biomass. It was also found that *C. albidum* SRV4 is an effective microbial agent to improve the development of tolerance and relief of salt stress in rice plants. These data corroborate our results; *Curtobacterium* strains isolated from *S. auriculata* are also diazotrophic and produce indole compounds (Table 2), which may also have the potential to protect plants against environmental stresses.

Chinnaswamy *et al.* (2018) tested growth-promotion traits in *Bacillus megaterium*, including a positive indole compound production, but no phosphate solubilization activity or growth in an N-free medium was possible for that strain. In our work, *B. megaterium* 3.1.3.0.X.1 also produced indole compounds and did not fix N₂, but solubilized phosphate (Table 2). This can be explained by the different cultivation conditions that were used. Meanwhile, Zhao *et al.* (2015) observed the production of indole compounds and phosphate solubilization in this species. Although some *Bacillus* species are recognized as PGPB, the association between *Bacillus toyonensis* and plants is, to the best of our knowledge, a novelty of our research despite the genomic analyzes of the species suggesting antimicrobial potential against phytopathogens (Lopes *et al.* 2017). Growth promotion traits in *Rhizobium radiobacter* (syn. *Agrobacterium tumefaciens*) (Young *et al.* 2001) found in the microbiota of *S. auriculata* (strain 3.1.3.0.X.12 strain was diazotrophic, producing indole compounds and solubilizing phosphate) is also observed elsewhere (Banach *et al.* 2019; Khangahi *et al.* 2018; Lee *et al.* 2015). Banach *et al.*, (2019) isolated bacteria from the rhizosphere of the aquatic plant *Azolla filiculoides* and identified some genera common to those found in *S. auric-*

ulata, such as *Bacillus* and *Rhizobium radiobacter*. Ishizawa *et al.*, (2019) examined the colonization and competition dynamics of PGPB and two plant growth inhibitory bacteria inoculated into the aquatic plant *Lemna minor* for seven days. The results showed that PGPB consistently excluded plant growth inhibitors, even though it coexisted almost in the same proportion with another inhibitor strain.

Another species found in the microbiota of *S. auriculata*, *Stenotrophomonas maltophilia*, was able to promote an increase in shoot and root length, chlorophyll content, and total fresh plant biomass when inoculated in tomato plants (Rojas-Solís *et al.* 2018). The bacterium was identified as an indole producer (Naz and Bano 2012), in the same way as isolates 3.1.3.0.X.4 and 3.1.3.0.X.15. *Siccibacter colletis* was identified in poppy seed isolation. Jackson *et al.*, (2015) did not observe the production of indole compounds in their strains. In the present work, strain 3.1.3.0.X.5 is an indole compounds producer, diazotrophic, and phosphate solubilizer. As prementioned, such differences can also result from different growing conditions. *Pseudomonas* is a broad clade, found in various water, soil, and plant environments. These bacteria have high adhesion and biofilm-forming capacities, being used in the production of biosurfactants, in biological control, and as a promoter of plant growth (Ma *et al.* 2018; Uzair *et al.* 2018; Zhao *et al.* 2018). In *Pseudomonas aeruginosa*, the production of indole-3-acetic acid and phosphate solubilization have already been verified (Ndeddy Aka and Babalola 2016). Such results agree with the data obtained for the isolates of the genus *Pseudomonas* in the present work (Table 2).

Even though it is largely studied for its clinical aspects, the genus *Enterobacter* is also associated with different plants and soil environments. Some research works describe different species of *Enterobacter* in plants, such as sunflower Shahid *et al.*, (2012), wheat (Borham *et al.* 2017), and corn (Ogbo and Okonkwo 2012). These works highlight plant growth promotion traits that we also evaluated in our research, especially phosphate solubilization and phytohormone production. N₂-fixating *Enterobacter* strains are also described (Lin *et al.* 2012). Even though these findings corroborate our results (Table 2, Fig. 2).

Photosynthesis is the process by which plants use the energy of sunlight to assimilate CO₂ from the atmosphere and convert it into soluble carbohydrates, which are then used for plant growth (Biel and Fomina 2015). Makino *et al.*, (2022) and Suzuki *et al.*, (2014) suggest that an increase in photosynthetic activity associated with increased chlorophyll content is one of the reasons for the growth-promoting effect on aquatic plants. Our results comparing chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids production were not statistically significant between *Enterobacter* inoculated plants and the control.

The interaction between aquatic plants and bacteria, although little studied, occurs in water bodies and must have a relevant ecological role in the maintenance of the ecosystem. Plant exudates attract microorganisms, forming true microbial communities with characteristics that can help plant growth, through specific mechanisms and the organic compounds produced, bacteria help to protect the developing plant tissue (Srivastava *et al.* 2017). Thus, it is possible to envision the application of these PGPB in contaminated areas together with aquatic plants, seeking an efficient, low-cost, and less costly treatment for the environment.

5.6 Conclusion

Taken together, these results demonstrate that each isolate obtained from *S. auriculata* has the potential to be explored as a biotechnological product in pure cultures or even in microbial consortia, which is more similar to what is found in nature. In the present study, we isolated 18 cultivable bacteria associated with *S. auriculata*. All isolates have shown growth-promotion traits, and plant inoculation with *Enterobacter* sp. 3.1.3.0.X.18 significantly increased the fresh biomass of *S. auriculata* in just four days after inoculation, which reveals the viability of using endogenous PGPB for bioaugmentation, which can be used in processes of remediation.

5.7 References

- Banach, Artur, Agnieszka Kuźniar, Radosław Mencfel, and Agnieszka Wolińska. 2019. "The Study on the Cultivable Microbiome of the Aquatic Fern *Azolla filiculoides* L. as New Source of Beneficial Microorganisms." *Applied Sciences (Switzerland)* 9(10):1–20. doi: 10.3390/app9102143.
- Bevivino, Annamaria, Sabrina Sarrocco, Claudia Dalmastri, Silvia Tabacchioni, Cristina Cantale, and Luigi Chiarini. 1998. "Characterization of a Free-Living Maize-Rhizosphere Population of *Burkholderia cepacia*: Effect of Seed Treatment on Disease Suppression and Growth Promotion of Maize." *FEMS Microbiology Ecology* 27(3):225–37. doi: 10.1016/S0168-6496(98)00069-5.
- Biel, K., and I. Fomina. 2015. "Benson-Bassham-Calvin Cycle Contribution to the Organic Life on Our Planet." *Photosynthetica* 53(2):161–67. doi: 10.1007/s11099-015-0112-7.
- Bini, L. Mauricio, Sidinei M. Thomaz, Kevin J. Murphy, and Antonio F. M. Camargo. 1999. "Aquatic Macrophyte Distribution in Relation to Water and Sediment Conditions in the Itaipu Reservoir, Brazil." *Hydrobiologia* 415:147–54. doi: 10.1023/A.
- Bizzo, Andresa Lana Thomé, Aline Chaves Intorne, Pollyana Honório Gomes, Marina Satika Suzuki, and Bruno dos Santos Esteves. 2014. "Short-Term Physiological Responses to Copper Stress in *Salvinia auriculata* Aubl." *Acta Limnologica Brasiliensia* 26(3):268–77. doi: 10.1590/s2179-975x2014000300006.
- Borham, Ali, Elsayed Belal, Metwaly Metwaly, and shokry El-gremy. 2017. "Phosphate Solubilization by *Enterobacter cloacae* and Its Impact on Growth and Yield of Wheat Plants." *Journal of Sustainable Agricultural Sciences* 43(2):89–103. doi: 10.21608/jsas.2017.1035.1004.
- Camacho, Christiam, George Coulouris, Vahram Avagyan, Ning Ma, Jason Papadopoulos, Kevin Bealer, and Thomas L. Madden. 2009. "BLAST+: Architecture and Applications." *BMC Bioinformatics* 10:1–9. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- Chen, Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W. A. Lai, and C. C. Young. 2006. "Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities." *Applied Soil Ecology* 34(1):33–41. doi: 10.1016/j.apsoil.2005.12.002.
- Chinnaswamy, A., T. Coba de la Peña, A. Stoll, D. de la Peña Rojo, J. Bravo, A. Rincón, M. M. Lucas, and J. J. Pueyo. 2018. "A Nodule Endophytic *Bacillus megaterium* Strain Isolated from Medicago Polymorpha Enhances Growth, Promotes Nodulation by Ensifer Medicae and Alleviates Salt Stress in Alfalfa Plants." *Annals of Applied Biology* 172(3):295–308. doi: 10.1111/aab.12420.
- Díez-Méndez, Alexandra, and Raul Rivas. 2017. "Improvement of Saffron Production Using *Curtobacterium herbarum* as a Bioinoculant under Greenhouse Conditions." *AIMS Microbiology* 3(3):354–64. doi: 10.3934/microbiol.2017.3.354.
- Döbereiner, Johanna, Vanderlei de Oliveira Andrade, and Vera Lúcia Divan Baldani. 1999. *Protocolos Para Preparo de Meios de Cultura Da Embrapa Agrobiologia*. Seropédica, Brazil.
- Espinoza-Quiñones, F. R., A. N. Módenes, L. P. Thomé, S. M. Palácio, D. E. G. Trigue-

- ros, A. P. Oliveira, and N. Szymanski. 2009. "Study of the Bioaccumulation Kinetic of Lead by Living Aquatic Macrophyte *Salvinia auriculata*." *Chemical Engineering Journal* 150(2–3):316–22. doi: 10.1016/j.cej.2009.01.004.
- Esteves, F. A. 2011. *Fundamentos de Limnologia*. 3rd ed. edited by Interciência. Rio de Janeiro.
- Forno, I. W. 1983. "Native Distribution of the *Salvinia auriculata* Complex and Keys to Species Identification." *Aquatic Botany* 17(1):71–83. doi: 10.1016/0304-3770(83)90019-0.
- Gilbert, Sarah, Jenny Xu, Kenneth Acosta, Alexander Poulev, Sarah Lebeis, and Eric Lam. 2018. "Bacterial Production of Indole Related Compounds Reveals Their Role in Association between Duckweeds and Endophytes." *Frontiers in Chemistry* 6(JUL):1–14. doi: 10.3389/fchem.2018.00265.
- Glick, Bernard R. 2012. "Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications." *Scientifica* 2012:1–15.
- Hall, Tom, Ibis Biosciences, and Ca Carlsbad. 2011. "BioEdit: An Important Software for Molecular Biology." *GERF Bulletin of Biosciences* 2(1):60–61. doi: 10.1017/S0317167100012865.
- Van Der Heijden, Marcel G. A., Richard D. Bardgett, and Nico M. Van Straalen. 2008. "The Unseen Majority: Soil Microbes as Drivers of Plant Diversity and Productivity in Terrestrial Ecosystems." *Ecology Letters* 11(3):296–310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.
- Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1950. "The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil." *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347(2):1–32.
- Intorne, Aline C., Marcos Vinicius V. De Oliveira, Mariana L. Lima, Juliana F. Da Silva, Fábio L. Olivares, and Gonçalo Apolinário De Souza Filho. 2009. "Identification and Characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Mutants Defective in the Solubilization of Phosphorus and Zinc." *Archives of Microbiology* 191(5):477–83. doi: 10.1007/s00203-009-0472-0.
- Ishizawa, Hidehiro, Masashi Kuroda, Kanako Inoue, Daisuke Inoue, Masaaki Morikawa, and Michihiko Ike. 2019. "Colonization and Competition Dynamics of Plant Growth-Promoting/Inhibiting Bacteria in the Phytosphere of the Duckweed *Lemna minor*." *Microbial Ecology* 77(2):440–50. doi: 10.1007/s00248-018-1306.
- Ishizawa, Hidehiro, Masashi Kuroda, Masaaki Morikawa, and Michihiko Ike. 2017. "Evaluation of Environmental Bacterial Communities as a Factor Affecting the Growth of Duckweed *Lemna minor*." *Biotechnology for Biofuels* 10(1):1–10. doi: 10.1186/s13068-017-0746-8.
- Jackson, Emily E., Naqash Masood, Khaled Ibrahim, Noémie Urvoy, Sumyya Hariri, and Stephen J. Forsythe. 2015. "Description of *Siccibacter Colletis* Sp. Nov., a Novel Species Isolated from Plant Material, and Emended Description of *Siccibacter Turicensis*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:1335–41. doi: 10.1099/ijs.0.000108.
- Johnston-Monje, David, and Manish N. Raizada. 2011. "Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnogra-

- phy and Ecology." *PLoS ONE* 6(6). doi: 10.1371/journal.pone.0020396.
- Jones, Kathryn M., Hajime Kobayashi, Bryan W. Davies, Michiko E. Taga, and Graham C. Walker. 2007. "How Rhizobial Symbionts Invade Plants: The Sinorhizobium–Medicago Model." *Nature Reviews Microbiology* 5(8):619–33. doi: 10.1038/nrmicro1705.
- Katoh, Kazutaka, John Rozewicki, and Kazunori D. Yamada. 2018. "MAFFT Online Service: Multiple Sequence Alignment, Interactive Sequence Choice and Visualization." *Briefings in Bioinformatics* 20(4):1160–66. doi: 10.1093/bib/bbx108.
- Khanghahi, Mohammad Yaghoubi, Patrizia Ricciuti, Ignazio Allegretta, Roberto Terzano, and Carmine Crecchio. 2018. "Solubilization of Insoluble Zinc Compounds by Zinc Solubilizing Bacteria (ZSB) and Optimization of Their Growth Conditions." *Environmental Science and Pollution Research* 25(26):25862–68. doi: 10.1007/s11356-018-2638-2.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, and Koichiro Tamura. 2018. "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms." *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547–49. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Leal-Alvarado, D. A., H. Estrella-Maldonado, L. Sáenz-Carbonell, J. H. Ramírez-Prado, Omar Zapata-Pérez, and J. M. Santamaría. 2018. "Genes Coding for Transporters Showed a Rapid and Sharp Increase in Their Expression in Response to Lead, in the Aquatic Fern (*Salvinia minima baker*)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147(November):1056–64. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.046.
- Lee, Jin Hyung, Yong Guy Kim, Kwang Hyun Baek, Moo Hwan Cho, and Jintae Lee. 2015. "The Multifaceted Roles of the Interspecies Signalling Molecule Indole in *Agrobacterium Tumefaciens*." *Environmental Microbiology* 17(4):1234–44. doi: 10.1111/1462-2920.12560.
- Lin, Li, Zhengyi Li, Chunjin Hu, Xincheng Zhang, Siping Chang, Litao Yang, Yangrui Li, and Qianli An. 2012. "Plant Growth-Promoting Nitrogen-Fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China." *Microbes and Environments* 27(4):391–98. doi: 10.1264/jsme2.ME11275.
- Lopes, Ralf, Louise Cerdeira, Grace S. Tavares, Jeronimo C. Ruiz, Jochen Blom, Elvira C. A. Horácio, Hilário C. Mantovani, and Marisa Vieira de Queiroz. 2017. "Genome Analysis Reveals Insights of the Endophytic *Bacillus Toyonensis* BAC3151 as a Potentially Novel Agent for Biocontrol of Plant Pathogens." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33(10):1–15. doi: 10.1007/s11274-017-2347.
- Ma, Li, Hao Yu Zhang, Xing Kui Zhou, Cheng Gang Yang, Shuai Chao Zheng, Jin Ling Duo, and Ming He Mo. 2018. "Biological Control Tobacco Bacterial Wilt and Black Shank and Root Colonization by Bio-Organic Fertilizer Containing Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NXHG29." *Applied Soil Ecology* 129(2):136–44. doi: 10.1016/j.apsoil.2018.05.011.
- Machado, S. A., A. V. Oliveira, T. M. C. Fabrin, S. M. A. P. Prioli, and A. J. Prioli. 2016. "Molecular Characterization of the Species *Salvinia* (Salviniaceae) from the Upper Paraná River Floodplain." *Genetics and Molecular Research* 15(3). doi:

10.4238/gmr.15038575.

- Makino, Ayaka, Ryosuke Nakai, Yasuko Yoneda, Tadashi Toyama, Yasuhiro Tanaka, Xian Ying Meng, Kazuhiro Mori, Michihiko Ike, Masaaki Morikawa, Yoichi Kamagata, and Hideyuki Tamaki. 2022. "Isolation of Aquatic Plant Growth-Promoting Bacteria for the Floating Plant Duckweed (*Lemna minor*).” *Microorganisms* 10(8). doi: 10.3390/microorganisms10081564.
- Naz, Irum, and Asghari Bano. 2012. "Assessment of Phytohormones Producing Capacity of *Stenotrophomonas maltophilia* SSA and Its Interaction with Zea Mays L.” *Pakistan Journal of Botany* 44(1):465–69.
- Ndeddy Aka, Robinson Junior, and Olubukola Oluranti Babalola. 2016. "Effect of Bacterial Inoculation of Strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes feacalis* and *Bacillus subtilis* on Germination, Growth and Heavy Metal (Cd, Cr, and Ni) Uptake of Brassica Juncea.” *International Journal of Phytoremediation* 18(2):200–209. doi: 10.1080/15226514.2015.1073671.
- Ogbo, Frank, and Julius Okonkwo. 2012. "Some Characteristics of a Plant Growth Promoting <I>Enterobacter</I> Sp. Isolated from the Roots of Maize.” *Advances in Microbiology* 02(03):368–74. doi: 10.4236/aim.2012.23046.
- Ortega-Acosta, Orlando, Aida Verónica Rodríguez-Tovar, Eugenia López-López, and Angélica Rodríguez-Dorantes. 2015. "Characterization of Indole Acetic Acid Endophyte Producers in Authoctonus *Lemna gibba* Plants from Xochimilco Lake.” *African Journal of Biotechnology* 14(7):604–11. doi: 10.5897/ajb2014.14309.
- Palácio, Soraya Moreno, Daniele Alves Nogueira, Fernando Rodolfo Espinoza-Quíñones, Élvio Antônio de Campos, and Márcia Teresinha Veit. 2020. "Silver Nanoparticles Bioaccumulation by Aquatic Macrophyte *Salvinia auriculata*.” *Water, Air, and Soil Pollution* 231(2). doi: 10.1007/s11270-020-4435-z.
- Panfili, Ivan, Maria Luce Bartucca, Eleonora Ballerini, and Daniele Del Buono. 2017. "Combination of Aquatic Species and Safeners Improves the Remediation of Copper Polluted Water.” *Science of the Total Environment* 601–602:1263–70. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.003.
- Perin, Liamara. 2007. "Estudo Da Comunidade de Bactérias Diazotróficas Do Gênero *Burkholderia* Em Associação Com Cana-de-Açúcar e Descrição de *Burkholderia* Silvatlantica.”
- Pott, V. J., A. Pott, L. C. P. Lima, S. N. Moreira, and A. K. M. Oliveira. 2011. "Aquatic Macrophyte Diversity of the Pantanal Wetland and Upper Basin.” *Brazilian Journal of Biology* 71(1 SUPPL.):255–63. doi: 10.1590/s1519-69842011000200004.
- Rodrigues Neto, J., V. A. Malavolta Jr, and O. Victor. 1986. "Meio Simples Para o Isolamento e Cultivo de *Xanthomonas campestris* Pv. Citri Tipo B.” *Summa Phytopathologica* 12(16).
- Rodríguez, Hilda, and Reynaldo Fraga. 1999. "Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion.” *Biotechnology Advances* 17(4–5):319–39. doi: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2.
- Rojas-Solís, Daniel, Elizabeth Zetter-Salmón, Miguel Contreras-Pérez, Ma del Carmen Rocha-Granados, Lourdes Macías-Rodríguez, and Gustavo Santoyo. 2018.

- "*Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 Endophytes Produce Antifungal Volatile Organic Compounds and Exhibit Additive Plant Growth-Promoting Effects." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13(December):46–52. doi: 10.1016/j.bcab.2017.11.007.
- Saha, C., G. Mukherjee, P. Agarwal-Banka, and A. Seal. 2016. "A Consortium of Non-Rhizobial Endophytic Microbes from *Typha angustifolia* Functions as Probiotic in Rice and Improves Nitrogen Metabolism." *Plant Biology* 18(6):938–46. doi: 10.1111/plb.12485.
- Sajjad Mirza, M., Waseem Ahmad, Farooq Latif, Jacqueline Haurat, Rene Bally, Philippe Normand, and Kauser A. Malik. 2001. "Isolation, Partial Characterization, and the Effect of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) on Micro-Propagated Sugarcane in Vitro." *Plant and Soil* 237(1):47–54. doi: 10.1023/A:1013388619231.
- Sarwar, Muhammad, and Robert J. Kremer. 1995. "Enhanced Suppression of Plant Growth through Production of L-Tryptophan-Derived Compounds by Deleterious Rhizobacteria." *Plant and Soil* 172(2):261–69. doi: 10.1007/BF00011328.
- Shahid, Muhammad, Sohail Hameed, Asma Imran, Saira Ali, and Jan Dirk van Elsas. 2012. "Root Colonization and Growth Promotion of Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) by Phosphate Solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(8):2749–58. doi: 10.1007/s11274-012-1086-2.
- Shehzadi, M., K. Fatima, A. Imran, M. S. Mirza, Q. M. Khan, and M. Afzal. 2016. "Ecology of Bacterial Endophytes Associated with Wetland Plants Growing in Textile Effluent for Pollutant-Degradation and Plant Growth-Promotion Potentials." *Plant Biosystems* 150(6):1261–70. doi: 10.1080/11263504.2015.1022238.
- Srivastava, Jatin K., Harish Chandra, Swinder J. S. Kalra, Pratibha Mishra, Hena Khan, and Poonam Yadav. 2017. "Plant–Microbe Interaction in Aquatic System and Their Role in the Management of Water Quality: A Review." *Applied Water Science* 7(3):1079–90. doi: 10.1007/s13201-016-0415-2.
- Suzuki, Wakako, Masayuki Sugawara, Kyoko Miwa, and Masaaki Morikawa. 2014. "Plant Growth-Promoting Bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 Increases the Chlorophyll Content of the Monocot *Lemna minor* (Duckweed) and the Dicot *Lactuca Sativa* (Lettuce)." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118(1):41–44. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.007.
- Uzair, Bushra, Rehana Kausar, Syeda Asma Bano, Sammer Fatima, Malik Badshah, Ume Habiba, and Fehmida Fasim. 2018. "Isolation and Molecular Characterization of a Model Antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* Divulging in Vitro Plant Growth Promoting Characteristics." *BioMed Research International* 2018. doi: 10.1155/2018/6147380.
- Vazquez, P., G. Holguin, M. E. Puente, A. Lopez-Cortes, and Y. Bashan. 2000. "Phosphate-Solubilizing Microorganisms Associated with the Rhizosphere of Mangroves in a Semiarid Coastal Lagoon." *Biology and Fertility of Soils* 30(5–6):460–68. doi: 10.1007/s003740050024.
- Verma, Subhash C., Jagdish K. Ladha, and Anil K. Tripathi. 2001. "Evaluation of Plant Growth Promoting and Colonization Ability of Endophytic Diazotrophs from Deep

- Water Rice.” *Journal of Biotechnology* 91:127–41. doi: 10.2495/ICCT131512.
- Vimal, Shobhit Raj, Vikas Kumar Patel, and Jay Shankar Singh. 2019. “Plant Growth Promoting *Curtobacterium albidum* Strain SRV4: An Agriculturally Important Microbe to Alleviate Salinity Stress in Paddy Plants.” *Ecological Indicators* 105(July 2019):553–62. doi: 10.1016/j.ecolind.2018.05.014.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. “16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study.” *Journal of Bacteriology* 173(2):697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Wellburn, Alan R. 1994. “The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution.” *Journal of Plant Physiology* 144(3):307–13. doi: 10.1016/S0176-1617(11) 81192-2.
- Wolff, G., GC Pereira, EM Castro, J. Louzada, and FF Coelho. 2012. “The Use of *Salvinia auriculata* as a Bioindicator in Aquatic Ecosystems: Biomass and Structure Dependent on the Cadmium Concentration.” *Brazilian Journal of Biology* 72(1):71–77. doi: 10.1590/s1519-69842012000100009.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada. 2001. “A Revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an Emended Description of the Genus, and the Inclusion of All Species of *Agrobacterium conn* 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as New Combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. Rhizogenes*, *R. Rubi*, *R. Undicola* and *R. Vitis*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(1):89–103. doi: 10.1099/00207713-51-1-89.
- Zhao, Feng, Ping Li, Chao Guo, Rong Jiu Shi, and Ying Zhang. 2018. “Bioaugmentation of Oil Reservoir Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to Enhance Oil Recovery through In-Situ Biosurfactant Production without Air Injection.” *Bioresource Technology* 251(2013):295–302. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.057.
- Zhao, Longfei, Yajun Xu, Xin He Lai, Changjuan Shan, Zhenshan Deng, and Yuliang Ji. 2015. “Screening and Characterization of Endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* Strains from Medicinal Plant *Lonicera Japonica* for Use as Potential Plant Growth Promoters.” *Brazilian Journal of Microbiology* 46(4):977–89. doi: 10.1590/S1517-838246420140024.

6 Capítulo 3 A bactéria do gênero *Enterobacter* sp. protege *Salvinia auriculata* Aublet. do estresse causado pelo cobre

6.1 Resumo

A poluição por metais na água é uma das principais preocupações, causando diferentes problemas ambientais. O acúmulo excessivo desses metais na água, diminui o crescimento e o rendimento das plantas além de entrar na cadeia trófica. A tolerância das plantas ao estresse por metais pesados pode ser melhorada pela presença de bactérias promotoras do crescimento vegetal, que permite o crescimento dessas plantas com acúmulo mínimo ou nenhum acúmulo de metais. Neste estudo, investigamos a remoção de cobre pela cepa *Enterobacter* sp, uma bactéria tolerante a cobre, recentemente isolada da planta aquática *Salvinia auriculata* Aublet. Essa bactéria mostrou tolerância a cobre na concentração de 158 mgL^{-1} . Foi visto que a cepa sobreviveu em um ambiente estressante. A cepa removeu maiores quantidades de cobre no tempo de 4 horas quando comparada com tempo de 8 horas. Além disso, quando *Enterobacter* sp foi inoculada na planta aquática *Salvinia*, foi capaz de proteger a planta do estresse causado pelo cobre e a remoção de cobre foi maior na condição inoculada quando comparada com a condição apenas com a adição do cobre. Em conclusão, essas análises fornecem uma compreensão mais abrangente da associação de *Enterobacter* sp com a planta *S. auriculata* sob estresse causado por cobre.

Palavras-Chave: ambiente aquático, contaminação, biorremediação, interação planta - bactéria

6.2 Abstract

Metal pollution in water is a major concern, causing different environmental problems. The excessive accumulation of these metals in water reduces plant growth and yield, in addition to entering the trophic chain. Plant tolerance to heavy metal stress can be improved by the presence of plant growth-promoting bacteria, which allows these plants to grow with minimal or no accumulation of metals. In this study, we investigated copper removal by the *Enterobacter* sp strain, a copper tolerant bacterium recently isolated from the aquatic plant *Salvinia auriculata* Aublet. This bacterium showed tolerance to copper at a concentration of 158 mg L⁻¹. The strain was seen to survive in a stressful environment. The strain removed greater amounts of copper in 4 hours compared to 8 hours. Furthermore, when *Enterobacter* sp was inoculated into the aquatic plant *Salvinia*, it was able to protect the plant from stress caused by copper and copper removal was greater in the inoculated condition when compared to the condition with only the addition of copper. In conclusion, these analyzes provide a more comprehensive understanding of the association of *Enterobacter* sp with the *S. auriculata* plant under copper stress.

Keywords: aquatic environment, contamination, bioremediation, plant-microbe interaction

6.3 Introdução

A água doce é um recurso essencial para o desenvolvimento e sobrevivência dos organismos vivos (MORAES *et al.*, 2002). A água encontrada na natureza contém vários tipos de impurezas que, devido a ação antrópica, causam a poluição do ambiente aquático, gerando diversos danos ao ambiente e a saúde humana (SONONE *et al.*, 2020). Um dos principais poluentes que afetam o ambiente aquático são os metais tóxicos, esses elementos não são biodegradáveis e se acumulam ao longo da cadeia trófica (ALI *et al.*, 2019). Entre esses metais, destaca-se o cobre que inicialmente possui importância biológica, atua como micronutriente essencial, porém em altas concentrações torna-se tóxico para os seres vivos (REHMAN *et al.*, 2019; ALTARELLI, *et al.*, 2019; WEI *et al.*, 2015; ZATTA *et al.*, 2007).

A toxicidade do cobre está relacionada com suas características químicas, e com as ações antrópicas, que incluem atividades de mineração, aplicação de pesticidas, fungicidas e algicidas intensificam a toxicidade. Esses resíduos liberados no ambiente são lixiviados para o ambiente aquáticos que, por apresentarem um formato de depressão, são os locais para onde esses elementos são destinados. (HUANG *et al.*, 2023; PSCHIEDT *et al.*, 2022; IZYDORCZYK *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A complexidade desse problema exige a implementação de sistemas eficazes e ecologicamente sustentáveis para reduzir a contaminação causada pelo cobre (GHAZARYAN *et al.*, 2019; KARAMI *et al.*, 2011). A utilização de espécies de plantas aquáticas como *Salvinia* torna-se uma estratégia promissora, uma vez, que possuem crescimento rápido e têm a capacidade de acumular metais em seus tecidos. (DONATUS *et al.*, 2016; DHI *et al.*, 2011; ESTEVES., 2011; ABBASI.,1986). Algumas espécies do gênero *Salvinia* têm sido testadas para diferentes tipos de metais que incluem: cobre, cádmio, chumbo e mercúrio (SITARSKA *et al.*, 2023, PANFILI *et al.*, 2017; DHIR *et al.*, 2011; PHETSOMBAT *et al.*, 2006).

Associadas com as macrófitas são encontradas bactérias promotoras do crescimento vegetal, que atuam através de mecanismos diretos e indiretos, promovendo o desenvolvimento das plantas (BORAH *et al.*, 2023; ETESAMI *et al.*,

2023). Os mecanismos diretos ocorrem quando as bactérias estimulam o seu crescimento, através da obtenção de nutrientes e os mecanismos indiretos as bactérias protegem as plantas dos efeitos abióticos como os metais tóxicos (GLICK *et al.*, 2012). Estudos identificaram bactérias promotoras associadas com plantas aquáticas (ISHIZAWA *et al.*, 2017; SAHA *et al.*, 2016; ISHIZAWA *et al.*, 2019; PRIYA *et al.*, 2022; JHA *et al.*, 2007; UNDERWOOD *et al.*, 1991). Algumas espécies de bactérias apresentam, mecanismos de resistência aos metais, incluindo sistemas de efluxo, transformação de compostos tóxicos em forma menos danosas e a imobilização ou mobilização de metais reduzindo danos que os metais podem causar (SOLIOZ *et al.*, 2018; SOLIOZ *et al.*, 2003; COOKSEY *et al.*, 1994).

A interação entre plantas aquáticas e bactérias promotoras do crescimento vegetal dentro desse contexto representa uma associação simbiótica positiva. Enquanto as plantas obtêm benefícios para o seu crescimento e desenvolvimento, as bactérias encontram um ambiente favorável para sobreviver. Nesse sentido, investigamos os efeitos de diferentes concentrações do cobre na bactéria *Enterobacter* sp, descrita como promotora do crescimento vegetal, e na planta aquática *Salvinia auriculata* em meio contendo cobre inoculada com a cepa *Enterobacter* sp. Com isso, buscamos compreender os principais fatores que condicionam ou incidem sobre essa interação.

6.4 Materiais e Métodos

6.4.1 Meio e condições de cultivo

A bactéria *Enterobacter* sp usada nesse trabalho foi isolada da planta de *S. auriculata* (capítulo 2) onde foram identificadas 18 bactérias promotoras do crescimento vegetal - BPCV. Para o cultivo das bactérias, o preparo de culturas estoques e inóculos foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB). Os componentes são: Triptona 10 g, NaCl 10 g, Extrato de Levedura 5 g, para o meio sólido e 15 g de ágar (meio sólido), valores para 1 litro (MACWILLIAMS e LIÃO 2006). Uma modificação foi realizada ao ser adicionado 10 g/L⁻¹ de glicose. A solução de glicose foi preparada separadamente do meio de cultivo e adicionada ao meio de cultivo quando esse foi usado. Todos os componentes foram pesados, dissolvidos em água destilada e, após homogeneização, o pH foi ajustado com NaOH, para 7,0 e acondicionado em frasco de vidro. Depois do preparo, o meio foi esterilizado em autoclave vertical à 121 °C e 1 atm por 15 min.

6.4.2 Preparo do inóculo bacteriano e da solução estoque de Cobre

Enterobacter sp. foi cultivada em meio LB líquido, nas seguintes condições: uma alçada da bactéria cultivada em meio sólido foi adicionada a um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB líquido sob agitação de 120 rpm, a 30 °C, por 24 h. Posteriormente foram realizadas estrias em uma placa de petri contendo meio LB sólido, as placas foram incubadas em estufa microbológica a 30° C por 24 h. Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio LB foram inoculados com uma alçada da bactéria, cobertos com manta feita de algodão e gaze e incubados a 30 °C, com 120 rpm, em agitador pendular até atingir a fase exponencial do crescimento. Após realizar esse procedimento, foi realizada a curva do inóculo para conhecer o seu perfil de crescimento.

A concentração da solução estoque (1M), foi preparada com CuCl₂ 2H₂O em água ultrapura. A solução foi esterilizada por filtração com membrana filtro 0,22 µm e armazenada. A partir dessa solução foram preparados os meios de cultura suplementados com o metal.

6.4.3 Curva de crescimento da bactéria

Nesse experimento foi avaliado o crescimento celular da bactéria na ausência e presença de diferentes concentrações de CuCl_2 . A avaliação foi realizada em função do tempo de cultivo sob agitação (BARANYI e PIN., 1999).

Para tanto, o cultivo foi feito em triplicata em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 95 mL de meio LB com glicose e suplementado com concentrações crescentes de CuCl_2 (63 e 158 mg L^{-1}) e o controle (sem adição do metal), foram adicionados 5 mL do inóculo crescido até atingir D.O = 4,0. Os frascos foram cobertos com manta feita de algodão e gaze e incubados em agitador pendular a 30 °C com 120 rpm. Durante todo o processo, os valores de D.O foram medidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, com intervalos de tempo regulares 2 em 2 horas, até atingir a fase estacionária. Amostras do meio fermentado foram coletadas e armazenadas para análise de determinação de cobre. Todos os ensaios de cultivo foram realizados em triplicata como experimentos independentes.

6.4.4 Cultivo da planta

Plantas de *S. auriculata* foram obtidas da Lagoa do Jacú, na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil em 2012. Desde então, as plantas são cultivadas em casa de vegetação em solução de Hoagland pH $6,0 \pm 0,1$ (HOAGLAND; ARNON, 1950). Para os ensaios, as plantas foram aclimatadas por 7 dias em solução nutritiva, selecionando-se indivíduos saudáveis para a experimentação (BIZZO *et al.*, 2014).

6.4.5 Inoculação da bactéria na planta

Para o ensaio, 1 g da planta *S. auriculata* foi transferido para potes contendo 500 mL de solução Hoagland, que foram expostos a 4 tratamentos: T1. Planta (controle); T2. Planta + *Enterobacter* sp; T3. Planta + 0,635 mgL^{-1} CuCl_2 e T4. Planta + *Enterobacter* sp + 0,635 mgL^{-1} CuCl_2 . Foram utilizadas seis réplicas por tratamento, por um período de 8 dias. Os quatro primeiros dias foram para estabelecer a interação da bactéria com a planta, após esses quatro dias foi realizada a troca da solução nutritiva adicionando-se o CuCl_2 . Então, o ensaio foi mantido

em casa de vegetação por mais quatro dias, totalizando oito dias de experimentação. O experimento foi repetido três vezes.

6.4.6 Desenvolvimento da planta

Encerrado os dias de exposição ao metal, as plantas foram recolhidas e secas em papel toalha por 10 min, em seguida, o material vegetal foi colocado em estufa a 60 °C por 4 dias para determinação de biomassa seca (BS) material foi pesado em uma balança analítica (BIZZO *et al.*, 2014).

6.4.7 Preparo das amostras para determinação do Cobre

Após os tempos pré-estabelecidos de crescimento da bactéria que foram 4 e 8 horas, nas condições, controle e concentrações de 1 e 2, 5 mmol⁻¹ de Cu-Cl₂ foi realizado o seguinte procedimento: em tubos de 15 mL Rnase/Dnase free foi adicionado uma alíquota de 5 mL e o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 5.000 rpm. Após esse tempo o sobrenadante foi retirado e reservado e foi adicionada água ultrapura nesse mesmo tubo para realização de uma lavagem das células, esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes e descartou-se o sobrenadante. O sobrenadante reservado foi novamente pesado até atingir um peso final de aproximadamente 0,100 mg L⁻¹. O tubo devidamente identificado foi acondicionado a -18 °C. O sobrenadante do cultivo também foi separado nessas mesmas condições para ser analisado. Esse procedimento foi realizado em triplicata para todas as concentrações e nos diferentes tempos.

As amostras das plantas após os dias de exposição ao metal, foram armazenadas nas seguintes condições: tubos 15 ml Rnase/Dnase free foram pesados e os valores foram anotados. Posteriormente foi adicionado a esse tubo 0,250 mg de planta seca, para encontrar esse valor realizou-se o cálculo peso do tubo vazio antes (PD), peso do tubo com material depois (PD) (PD -PA). Esse procedimento foi realizado em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado para coleta das amostras da solução que se encontrava as plantas, no entanto, o volume de solução usado foi de aproximadamente 0,100 mg L⁻¹, realizado em triplicata.

6.4.8 Análise do Cobre na bactéria e na planta aquática

As amostras pesadas receberam a adição de ácido nítrico 2,5 mL subdestilado e deixado por um período de pelo menos 12 horas para uma etapa de pré decomposição. Após este período as amostras foram levadas ao bloco digestor (SL-25/40, Solab, Brasil), por 4 horas, a uma temperatura de 100°C. Restando 15 minutos para o final da decomposição ácida, foi adicionado 1 mL de H₂O₂ (30%). Terminada a decomposição das amostras, foram resfriadas a temperatura ambiente e transferidas de forma quantitativa para tubos falcon de 15 mL de capacidade e avolumadas para 10 mL com água ultrapura tipo I (purificada por um sistema Milli-Q). O equipamento usado para a análise foi ICP OES - ICPE – 9000 SHIMADZU - Espectrômetro de emissão atômica de plasma indutivamente acoplado.

6.4.9 Análise estatística

Os dados da curva do crescimento foram realizados três experimentos independentes realizados em momentos distintos e são apresentados como valores de médias $\pm$ EP provenientes de uma estimativa de 95% de confiança em 1.000 reamostragens (bootstrap). A análise dos dados de remoção do cobre foi calculada como média $\pm$ erro-padrão da média.

6.5 Resultados e Discussão

Foi realizada uma curva de crescimento para obtenção do inóculo de *Enterobacter* sp. A produção desta cultura foi utilizada como inóculo nos diferentes experimentos realizados nesse estudo. Como pode ser observado na (figura 1 a), a mid log ocorreu em torno 4 horas de cultivo. Este momento da curva, no meio da fase logarítmica, corresponde ao crescimento ótimo das células. Por isso, foi adotado como tempo de cultivo do inóculo.

Enterobacter sp foi capaz de crescer em meio LB contendo até a concentração de 158 mg L^{-1} de cobre demonstrando tolerância sob condições de estresse causado pelo metal (Figura 1b). A curva de crescimento para *Enterobacter* sp representa um crescimento contínuo em um método polinomial (Figura 1). O isolado tolerante ao cobre exibiu maiores valores de D.O no tratamento com 63 mg L^{-1} de CuCl_2 , essa concentração parece não ter efeito negativo no crescimento dessa bactéria, enquanto a concentração de 158 mg L^{-1} revelou uma redução no valor da D.O da bactéria. A concentração de 63 mg L^{-1} de CuCl_2 apresentou um perfil de crescimento similar ao controle durante os intervalos de tempo analisados até o tempo de 10 horas.

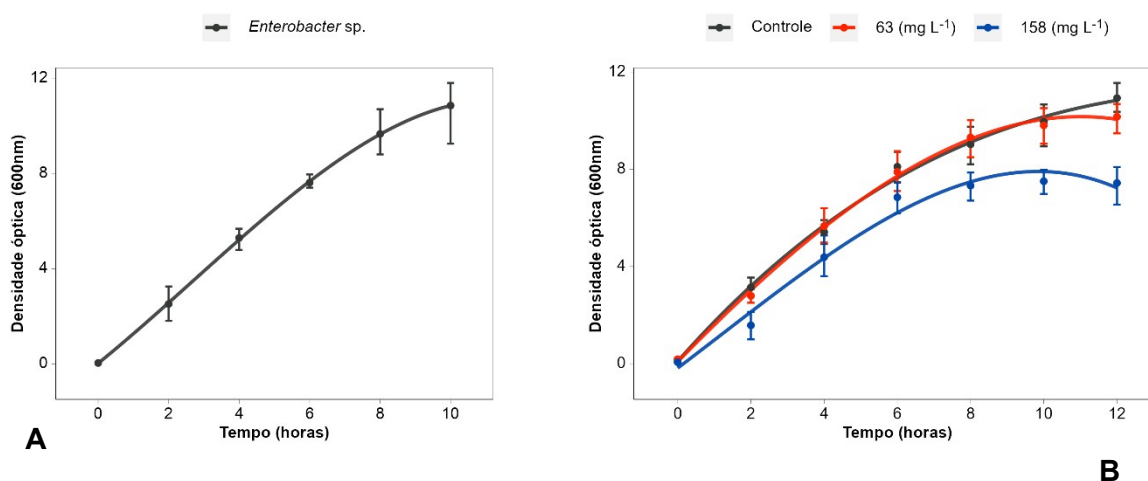


Figure 1 a: Curva de crescimento (inóculo) da bactéria *Enterobacter* sp. Figura 1b Curva de crescimento nas diferentes concentrações de CuCl_2 . Cultivo realizado em meio LB sob agitação durante 12 h. As barras representam o desvio padrão da média. Esses dados representam três experimentos realizados em momentos distintos e são apresentados como valores de médias $\pm$ EP provenientes de uma estimativa de 95% de confiança em 1.000 reamostragens (bootstrap).

A capacidade de remoção do cobre do meio de cultivo nas concentrações testadas é apresentada na tabela 1. A eficiência da remoção do cobre aumentou gradativamente com o tempo de incubação como observado no tempo de 4 horas e na concentração de 63 mgL⁻¹, houve uma remoção de 18,27%, conforme ilustrado na (figura 2 b). Na mesma concentração no tempo de 8 horas, a remoção foi de 49,41%. Com o aumento da concentração de cobre para 158 mgL⁻¹ a eficiência de remoção foi de 39,13% para o tempo de 4 horas e de 27,41% e para o tempo de 8 horas, notou-se que a remoção diminuiu com o aumento do tempo nessa concentração de cobre. Esse resultado foi consistente com um estudo de IRAWATI *et al.* (2021) no qual a eficiência de remoção do cobre diminuiu com o aumento das concentrações. Estudos com maior tempo de incubação das bactérias do mesmo gênero mostraram que em 24 h *Enterobacter* sp J1 foi capaz de remover 10 mg de cobre $\cong$ 127 mg . LU *et al.* (2006) em uma concentração próxima a usada no presente estudo, que foi de 158 mgL⁻¹ de Cu com uma remoção de 48,073 mg. É provável que o crescimento *Enterobacter* sp tenha sido estimulado até certo ponto na presença de baixas concentrações de Cu. A toxicidade para as células bacterianas na superfície celular levaria a uma diminuição contínua na taxa de remoção da adição de cobre (Peng *et al.*, 2020).

Tabela 1: *Enterobacter* sp sob diferentes concentrações de cobre 63 e 158 mgL⁻¹ e diferentes tempos de tratamento (4 e 8 horas).

Situações <i>Enterobacter</i> sp	Aplicações (mg L ⁻¹)	Tempo (h)	Valores	%
Célula	Controle	4	5,56 $\pm$ 0,66	
Célula	63	4	17,17 $\pm$ 3,04	18,27
Célula	158	4	67,72 $\pm$ 16,67	39,13
Célula	Controle	8	4,54 $\pm$ 0,16	
Célula	63	8	35,93 $\pm$ 17,86	49,41
Célula	158	8	48,07 $\pm$ 4,01	27,41
Sobrenadante	Controle	4	0,00 $\pm$ 0,00	
Sobrenadante	63	4	37,65 $\pm$ 0,77	59,25
Sobrenadante	158	4	85,40 $\pm$ 2,31	53,75
Sobrenadante	Controle	8	0,00 $\pm$ 0,00	
Sobrenadante	63	8	37,55 $\pm$ 0,63	59,10
Sobrenadante	158	8	87,48 $\pm$ 3,62	55,06

A análise do efeito do cobre nos tratamentos com a planta *aquática Salvinia auriculata* e a inoculação da bactéria *Enterobacter* sp pode ser observada na tabela 2. A análise foi realizada calculando-se a variação percentual das mé-

dias. Primeiro foi comparado controle com inoculado que apresentou um incremento de 30,36% de cobre do inoculado (*Salvinia auriculata* + *Enterobacter* sp). O grupo inoculado + cobre apresentou um incremento médio de 64,84% em relação ao grupo de tratamento que continha apenas cobre. No que se refere aos grupos inoculado e cobre eles não foram comparados com as condições descritas anteriormente, mas podem ser comparados entre si.

Por outro lado, observa-se na solução de Hoagland que o tratamento inoculado comparado com o controle apresentou uma redução média de -42,15% de cobre (Tabela 2). Por fim, o grupo de inoculado com cobre apresentou uma variação negativa da média que foi de -10,16%. Com isso, é possível constatar que nos tratamentos que envolveram a inoculação da bactéria na planta foi obtido reduções relevantes de cobre.

Tabela 2: *Salvinia auriculata* sob diferentes condições de tratamento: Controle, Tratamento *Enterobacter* sp (Inoculado) Tratamento com 0,63 mgL⁻¹ de CuCl₂. 2 H₂O (Cobre) Tratamento contendo (*Enterocater* sp + 0,63 mgL⁻¹ CuCl₂. 2 H₂O) (Inoculado + Cobre). Ensaio realizado durante 8 dias em casa de vegetação.

Situações	Aplicações (0,63 mgL ⁻¹ CuCl ₂)	Valores	%
<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	Controle	7,47 ± 1,62	
<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	Inoculado	9,73 ± 1,51	30,36
<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	Cobre	170,67 ± 14,9	
<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	Inoculado + Cobre	281,33 ± 6,7	64,84
Solução (Hoagland)	Controle	2,97 ± 1,02	
Solução (Hoagland)	Inoculado	1,72 ± 0,14	- 42,15
Solução (Hoagland)	Cobre	1,71 ± 0,31	
Solução (Hoagland)	Inoculado + Cobre	1,53 ± 0,09	-10,16

Plantas não expostas ao cobre apresentaram valores muito baixos de Cu em sua biomassa durante o tempo de experimentação. A concentração de cobre na biomassa da planta aquática *Salvinia auriculata* cultivada na concentração de 0,635 mgL⁻¹ CuCl₂ com a adição de *Enterobacter* sp foi maior do que a concentração de cobre na biomassa das plantas na situação contendo apenas o cobre (Tabela 2). Como foi demonstrado em estudos relacionados (CARRILLO-NIQUETE *et al.*, 2022) e observado aqui, a biomassa de *S. auriculata* pode acumular metais como Cu da solução por meio de uma combinação de mecanismos de adsorção e absorção.

As plantas absorvem metais tóxicos geralmente por meio de suas raízes. A captação do metal ocorre por duas vias: em um estágio rápido de modo extracelular seguido por um estágio lento intracelular. No estágio rápido, os metais tóxicos são absorvidos por adsorção, bem como por processos de troca iônica. O estágio mais lento envolve a absorção intracelular e o transporte de metais para as dentro das células (RASKIN *et al.*, 1994).

Em um estudo realizado por ZAYED *et al.* (1998) foi visto que, a planta aquática *Lemna minor* foi usada para o tratamento de água contaminada com cobre em diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 10 mg L⁻¹) o metal fornecido foi sulfato de cobre por 8 dias. As concentrações de cobre nas plantas foram de aproximadamente 100, 150, 250, 500, 375, 1000 e 3400 mg. Os valores encontrados para a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de cobre e a concentração encontrada na planta é próxima da concentração do presente estudo, que em aproximadamente 0,6 mg L⁻¹ foi verificado uma concentração de 170,67 mg L⁻¹ de cobre na planta.

As concentrações usadas nesse estudo foram aplicadas baseadas em (BIZZO *et al.*, 2014) e são maiores do que as concentrações estabelecidas conforme legislação brasileira pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, (CONAMA nº 357) que estabelece que não se deva exceder o limite de 0,009 mg L⁻¹ de cobre dissolvido na água doce de Classe 1, que seja destinada: a) ao abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) à recreação de contato primário; d) à irrigação de hortaliças; e) e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas. Nesse estudo todas as concentrações usadas estão acima do valor máximo permitido de cobre para simular um ambiente contaminado por cobre.

As plantas aquáticas do gênero *salvinia* tem sido reconhecidas como um grupo promissor de plantas hiperacumuladoras de metais (DHIR 2013). Várias proteínas de transporte possibilitam o movimento do cobre através da membrana celular: como as ATPases do tipo P (ATPases 7A e 7B) e os transportadores de cobre (COPT1) (KUMAR *et al.*, 2021; COLANGELO e GUERINOT 2006). Seria interessante realizar estudos futuros para determinar se transportadores equivalentes podem estar envolvidos na hiper acumulação de cobre em *S. auriculata*.

Informações específicas sobre os possíveis efeitos estimuladores do crescimento, absorção, remoção de cobre pela interação de bactéria e plantas aquáticas não estão prontamente disponíveis. Esse estudo forneceu evidências de que a *Enterobacter* sp estimulou o crescimento de *Salvinia auriculata* na condição contendo cobre.

6.6 Conclusão

A capacidade de remoção do cobre pela bactéria é reduzida com o tempo. A bactéria mostrou tolerância ao cobre na concentração de 158 mgL^{-1} . Foi visto que a cepa sobreviveu em um ambiente estressante. A cepa removeu maiores quantidades de cobre no tempo de 8 horas. Quando *Enterobacter* sp foi inoculada na planta aquática *S. auriculata*, protegeu a planta do estresse causado pelo cobre. A remoção de cobre foi maior quando comparada com a condição contendo apenas cobre.

6.7 Referências

- ABBASI, S. A.; NIPANEY, P. C. Infestation by aquatic weeds of the fern genus *Salvinia*: its status and control. **Environmental conservation**, v. 13, n. 3, p. 235-241, 1986.
- ALI, Hazrat; KHAN, Ezzat. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs Concepts and implications for wildlife and human health. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 25, n. 6, p. 1353-1376, 2019.
- ALTARELLI, Marco *et al.* Copper deficiency: causes, manifestations, and treatment. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 34, n. 4, p. 504-513, 2019.
- BARANYI, József; PIN, Carmem. Estimativa de parâmetros de crescimento bacteriano por meio de tempos de detecção. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, v. 65, n.2, pág.732-736, 1999.
- BIZZO, Andresa Lana Thomé *et al.* Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, p. 268-277, 2014.
- CARRILLO-NIQUETE, Gerardo *et al.* Copper accumulation in the aquatic fern *Salvinia minima* causes more severe physiological stress than zinc. **BioMetals**, v. 35, n. 5, p. 1043-1057, 2022.
- COLANGELO, Elizabeth P.; GUERINOT, Mary Lou. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 322-330, 2006.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE CONAMA. Resolução nº 357/05. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Diário Oficial da União, (53) .2005.
- COOKSEY, Donald A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. **FEMS Microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 381-386, 1994.
- DE OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino; LOPES, Renato Matos; PAUMGARTTEN, Francisco José Roma. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, v. 56, n. 4, p. 369-374, 2004.
- DHIR, Bhupinder; SRIVASTAVA, Sheela. Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 6, p. 893-896, 2011
- DONATUS, Michael. Removal of heavy metals from industrial effluent using *Salvinia molesta*. **Int. J. Chemtech. Res**, v. 9, p. 608-613, 2016.
- Esteves. F. A. Fundamentos de Limnologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- ETESAMI, Hassan; JEONG, Byoung Ryong; GLICK, Bernard R. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p. 102048, 2023.
- GHAZARYAN, Karen *et al.* Copper phytoremediation potential of wild plant species growing in the mine polluted areas of Armenia. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 491-501, 2019.

- GLICK, Bernard R. *et al.* Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.
- HOAGLAND, Dennis Robert *et al.* The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.
- HUANG, Xiangbin; SHI, Xiaonan; ZENG, Huabin. How Far Does the Copper/Nickle Recovery from the Practical Application in the Electroplating Wastewater?. **Resources, Conservation & Recycling Advances**, p. 200170, 2023.
- IRAWATI, Wahyu; TAHYA, Candra Yulius. Copper removal by *Enterobacter cloacae* strain IrSuk1, *Enterobacter cloacae* strain IrSuk4a, and *Serratia nematodiphila* strain IrSuk13 isolated from Sukolilo River-Indonesia. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2021. p. 012038.
- ISHIZAWA, Hidehiro *et al.* Colonization and competition dynamics of plant growth-promoting/inhibiting bacteria in the phytosphere of the duckweed *Lemna minor*. **Microbial Ecology**, v. 77, p. 440-450, 2019.
- ISHIZAWA, Hidehiro *et al.* Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.
- IZYDORCZYK, Grzegorz *et al.* Potential environmental pollution from copper metallurgy and methods of management. **Environmental Research**, v. 197, p. 111050, 2021.
- JHA, Prabhat N.; KUMAR, A. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1311-1320, 2007.
- KARAMI, Nadia *et al.* Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass. **Journal of Hazardous Materials**, v. 191, n. 1-3, p. 41-48, 2011.
- KUMAR, Vinod *et al.* Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, p. 127810, 2021.
- LU, Wei-Bin *et al.* Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous *isolate Enterobacter sp.* J1 possessing high heavy-metal resistance. **Journal of Hazardous materials**, v. 134, n. 1-3, p. 80-86, 2006.
- MACWILLIAMS, Maria P.; LIAO, Min K. Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. **ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology**, v. 2006, 2006.
- MISHRA, Sandhya *et al.* Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. **Environmental Biotechnology: for Sustainable Future**, p. 103-125, 2019.
- MORAES, Danielle Serra de Lima; Jordão, Berenice Quinzani. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 370-374, 2002.

- PANFILI, Ivan *et al.* Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. **Science of the Total Environment**, v. 601, p. 1263-1270, 2017.
- PENG, Dinghua *et al.* Performance of microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Cd in water and soil. **Journal of Hazardous materials**, v. 400, p. 123116, 2020.
- PHETSOMBAT, Siriwan *et al.* Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in *Salvinia cucullata*. **Journal of Environmental Biology**, v. 27, n. 4, p. 645-652, 2006.
- PRIYA, P. *et al.* Comparative proteomic analysis of saline tolerant, phosphate solubilizing endophytic *Pantoea* sp., and *Pseudomonas* sp. Isolated from *Eichhornia* rhizosphere. **Microbiological Research**, v. 265, p. 127217, 2022.
- PSCHEIDT, Jay W.; OCAMB, C. M. Copper-based bactericides and fungicides. **Pacific Northwest pest management handbooks. Oregon State University, Corvallis**, 2022.
- RASKIN, Ilya *et al.* Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 285-290, 1994.
- REHMAN, Muzammal *et al.* Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. **Environmental science and pollution research**, v. 26, p. 18003-18016, 2019.
- SAHA, C. *et al.* A consortium of non-rhizobial endophytic microbes from *Typha angustifolia* functions as probiotic in rice and improves nitrogen metabolism. **Plant Biology**, v. 18, n. 6, p. 938-946, 2016.
- SITARSKA, Magdalena *et al.* Removal of mercury from water by phytoremediation process with *Salvinia natans* (L.) All. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-14, 2023.
- SOLIOZ, Marc; SOLIOZ, Marc. Copper homeostasis in gram-negative bacteria. **Copper and Bacteria: Evolution, Homeostasis and Toxicity**, p. 49-80, 2018.
- SOLIOZ, Marc; STOYANOV, Jivko V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 183-195, 2003.
- SONONE, Swaroop S. *et al.* Water contamination by heavy metals and their toxic effect on aquaculture and human health through food Chain. **Lett. Appl. NanoBioScience**, v. 10, n. 2, p. 2148-2166, 2020.
- UNDERWOOD, G. J. C.; BAKER, J. H. The effect of various aquatic bacteria on the growth and senescence of duckweed (*Lemna minor*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 192-196, 1991.
- WEI, Keqiang; YANG, Junxian. Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 113, p. 446-453, 2015.
- WU, Ping *et al.* Integrative chemical and omics analyses reveal copper biosorption and tolerance mechanisms of *Bacillus cereus* strain T6. **Journal of Hazardous Materials**, v. 435, p. 129002, 2022.

ZATTA, Paolo; FRANK, Adrian. Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 1, p. 19-33, 2007.

ZAYED, Adel; GOWTHAMAN, Suvarnalatha; TERRY, Norman. **Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1998.

7 Capítulo 4 Mitigação do estresse salino por bactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas da serapilheira da restinga

7.1 Resumo

Neste estudo, o objetivo foi isolar bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) tolerantes à salinidade da serapilheira da espécie vegetal *Clusia hiliariana*, encontrada em restingas. A salinidade é um fator limitante para o crescimento das plantas, e as BPCV podem ajudar a aliviar esse estresse. A coleta do material foi realizada na restinga do Parque Estadual Paulo Cesar Vinha, no Espírito Santo. As amostras foram isoladas em meio LB suplementado com NaCl e avaliadas quanto à produção de indóis, solubilização de fosfato e degradação de celulose. Entre as dez bactérias avaliadas, três produziram indóis, seis solubilizaram fosfato e uma apresentou halo alaranjado para degradação de celulose. O isolado S3103, que apresentou mais características de promoção do crescimento, foi selecionado para os experimentos seguintes. Em seguida, o isolado S3103 foi inoculado na planta aquática *Salvinia auriculata* em diferentes tratamentos: planta (controle), planta + bactéria, planta + bactéria + 100 mmol⁻¹ NaCl e planta + 100 mmol⁻¹ NaCl. Após oito dias, foram avaliados parâmetros como biomassa fresca, biomassa seca, teor de prolina. Os resultados mostraram que os tratamentos com a bactéria (T2 e T3) tiveram aumento significativo na biomassa fresca e biomassa seca em comparação com o controle (T1) e o tratamento com salinidade (T4). Além disso, houve uma redução significativa nos teores de prolina nos tratamentos com a bactéria em comparação com os tratamentos sem bactéria. Conclui-se que foi encontrada uma BPCV de restinga tolerante à salinidade e que a aplicação do inoculante em *S. auriculata* representa uma estratégia interessante para mitigar os efeitos da salinidade em plantas.

Palavras- Chave: Microrganismo, ecossistema costeiro, ambiente aquático, planta aquática, salinidade

7.2 Abstract

In this study, the objective was to isolate plant growth-promoting bacteria (PGPB) tolerant to salinity from the litter of the plant species *Clusia hilariana*, found in coastal sand dunes (sandy coast). Salinity is a limiting factor for plant growth, and PGPB can help alleviate this stress. The material collection was carried out in the coastal sand dunes of the Paulo Cesar Vinha State Park in Espírito Santo, Brazil. The samples were isolated in LB medium supplemented with NaCl and evaluated for indole production, phosphate solubilization, and cellulose degradation. Among the ten evaluated bacteria, three produced indoles, six solubilized phosphate, and one showed an orange halo for cellulose degradation. Isolate S3103, which exhibited more growth-promoting characteristics, was selected for further experiments. Next, isolate S3103 was inoculated into the aquatic plant *Salvinia auriculata* in different treatments: plant (control), plant + bacteria, plant + bacteria + 100 mmol⁻¹ NaCl, and plant + 100 mmol⁻¹ NaCl. After eight days, parameters such as fresh biomass, dry biomass, and proline content were evaluated. The results showed that treatments with the bacterium (T2 and T3) had a significant increase in fresh and dry biomass compared to the control (T1) and the salinity treatment (T4). Additionally, there was a significant reduction in proline levels in treatments with the bacterium compared to treatments without the bacterium. In conclusion, a salinity-tolerant PGPB from the coastal sand dunes was found, and the application of this inoculant in *S. auriculata* represents an interesting strategy to mitigate the effects of salinity on plants.

Keywords: Microorganism, coastal ecosystem, aquatic environment, aquatic plant, salinity

7.3 Introdução

A salinização é um grave problema ambiental que restringe o funcionamento do ecossistema aquático (CAÑEDO-ARGÜELLES *et al.*, 2013). É um dos fatores que afetam negativamente os ambientes dulcícolas e os organismos que habitam esses locais, causando estresse, dificultando a absorção de água e levando a toxicidade por meio do acúmulo de altas concentrações de sais (DOBRY, *et al.*, 2021; SAFDAR *et al.*, 2019; HART *et al.*, 2003).

No ambiente aquático são encontradas plantas que melhoram a qualidade da água e fornecem habitat e alimentos para os organismos (JEPPESEN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2020). Essas plantas têm sido estudadas para a tolerância a determinadas concentrações de sais na água (ARÁMBURO-MIRANDA *et al.*, 2017; AKHTAR, *et al.*, 2017; MUFARREGE *et al.*, 2011; UPADHYAY *et al.*, 2005).

Salvinia auriculata é uma planta aquática flutuante, que aumenta sua biomassa em um curto período de tempo, em torno de três a quatro dias. Desta forma, é usada como uma planta modelo neste estudo. Alguns trabalhos anteriores estudaram o gênero *Salvinia* sob condição salina (GOMES *et al.*, 2017; OWENS *et al.*, 2014; GOMES, *et al.* 2011; JAMPEETONG *et al.*, 2009). Esses achados demonstram a necessidade de estudos sobre a salinidade, que atualmente é uma preocupação global. (MUSTAFA *et al.*, 2019; PITMAN & LÄUCHLI., 2002).

Diante desse cenário o ecossistema costeiro é muito influenciado pela salinidade devido a sua proximidade com o mar (HOBOMH *et al.*, 2021). Portanto, é um local com potencial biotecnológico para ser explorado, visando aos estudos para mitigar os efeitos prejudiciais da salinidade (SANTOS *et al.*, 2014). Um dos habitats costeiros é a restinga, que é parte do Bioma Mata Atlântica, localizada na costa leste brasileira (CERQUEIRA, 2000). Este ecossistema abriga comunidades bióticas sobre depósitos arenosos com alta irradiância solar, elevada temperatura, baixa disponibilidade de nutrientes e baixa capacidade de retenção de água.

Uma das plantas mais encontradas em restinga é *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae), um arbusto nativo que ocorre entre o sudeste e o nordeste do Brasil (ALENCAR *et al.*, 2023; BITTRICH *et al.*, 2015). É uma espécie que favorece o

desenvolvimento de outras plantas, de modo que ao seu redor há uma grande diversidade de plantas estabelecidas (Dias & Scarano 2007). Isso ocorre porque *C. hilariana* desempenha um papel fundamental como facilitadora da ciclagem de nutrientes no ecossistema costeiro, através da decomposição da sua serapilheira (VILLELA *et al.*, 2020; BRITO *et al.*, 2018). Esses nutrientes são disponibilizados para as plantas ao serem lixiviados da serapilheira ou pela ação dos microrganismos (KRISHNA & MOHAN., 2017).

Além de poderem atuar como decompositoras fornecendo nutrientes para o vegetal, as bactérias também dispõem de outras funções na natureza. Elas podem promover o crescimento das plantas por mecanismos diretos e ou indiretos (BORAH *et al.*, 2023). Os mecanismos diretos referem-se as características que resultam no crescimento direto da planta como a solubilização de fosfato, produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio e produção de sideróforos. Já os mecanismos indiretos referem-se as características que resultam no crescimento indireto, quando as bactérias promotoras do crescimento da planta impedem que patógenos ou fatores abióticos, como salinidade, temperatura, seca, metais tóxicos causem danos à planta (AHMAD *et al.*, 2014).

[Espécies de plantas que](#) vivem naturalmente em ambientes com influência salina são uma fonte valiosa de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Alguns trabalhos já relataram isolamentos bacterianos e aplicação de inoculantes oriundos desses ambientes salinos, inclusive com resultados promissores de ganho de biomassa vegetal (GUO *et al.*, 2021; Magalhães *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2014; CLACINO *et al.*, 2006). Nesse cenário, é oportuno introduzir medidas sustentáveis como o uso de BPCV para mitigar o efeito do estresse salino (ARORA, *et al.*, 2018).

7.4 Materiais e Métodos

7.4.1 Local da coleta

Amostras da serapilheira da planta *Clusia hilariana* foram coletadas no Parque Estadual Paulo César Vinha – PEPCV, localizado na Rodovia ES-060, Km 37,5, s/n - Praia de Setiba, Guarapari – Espírito Santo. A coleta foi feita no mês de abril do ano de 2021. Para orientar a coleta das amostras da serapilheira foi realizado um transecto linear (reto). As amostras foram coletadas em triplicata, em uma formação arbustiva aberta da planta *Clusia hilariana*. O mapa abaixo (Figura 1), mostra a localização e vias de acesso ao PEPCV.

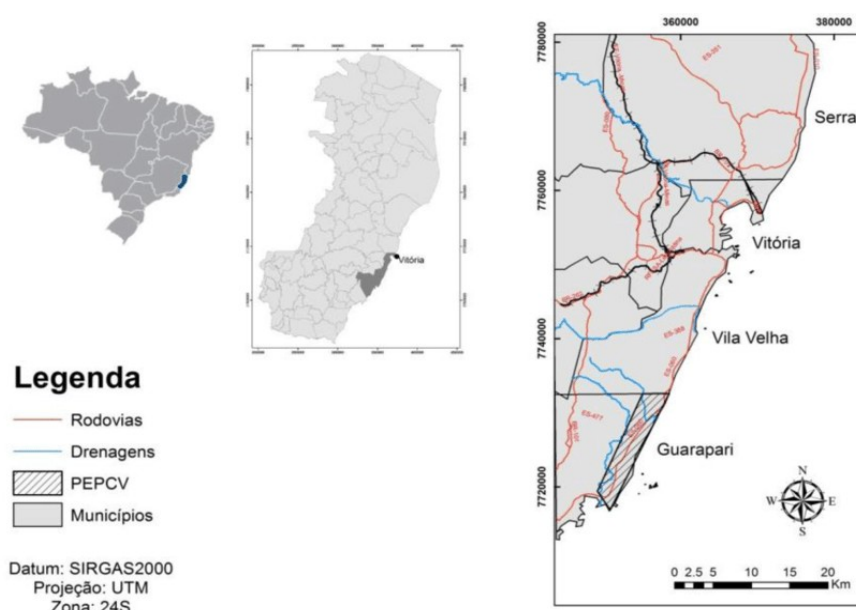


Figura 1: Mapa de localização e vias de acesso do Parque Estadual Paulo César Vinha (Fonte: DE OLIVEIRA., 2008).

7.4.2 Isolamento de bactérias

Após a coleta, as amostras da serapilheira foram levadas para o laboratório em um isopor com gelo gel reutilizável. Para realizar o isolamento, as amostras foram pesadas, para isso usou-se um tubo de 50 mL e uma balança analítica. Primeiramente, o tubo foi pesado e o valor foi anotado, posteriormente foi adicionado a este tubo uma quantidade de serapilheira e o tubo foi novamente pesado, para obtenção de 1 g de serapilheira o cálculo realizado foi peso antes – peso depois (PD-PA). A esse tubo, contendo (1 g) da serapilheira, foi adicionado 10

mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e, em seguida, foi colocado sob agitação em um vórtex por cinco minutos. Posteriormente, em três tubos de 1,5 mL foi adicionado 900 µL de água destilada estéril e 100 µL da amostra, os tubos foram homogeneizados e 100 µL foram adicionados a outro tubo, contendo 900 µL de água, que novamente foi homogeneizado e outros 100 µL foram adicionados a outro tubo para obtenção das seguintes diluições: 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , um volume de 100 µL de cada diluição foi pipetado em meio sólido LB - Luria Bertani (MACWILLIAMS & LIÃO 2006), suplementado com 600 mmol^{-1} de NaCl (KUMAR et al., 2021). O ensaio foi realizado em duplicata, o espalhamento da amostra foi feito com uma alça de Drigalski de vidro. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C, por até 72 horas.

Após o crescimento das colônias, as bactérias foram isoladas com base nas diferenças morfológicas, avaliando: cor, elevação (presente ou ausente), borda (regular ou irregular), superfície (lisa ou rugosa) (PERÍN, 2003). Dessa forma, as colônias que apresentaram características distintas foram incubadas em 5 mL de meio LB líquido, a 175 rpm, em agitador orbital a 30 °C, por 24 horas e os isolados foram purificados através de estrias cruzadas.

7.4.3 Meio e condições de cultivo

Para o cultivo das bactérias, o preparo de culturas estoques e inóculos foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB). Os componentes são: Triptona 10 g, NaCl 10 g, Extrato de Levedura 5 g. Para solidificar o meio, foram adicionados 15 g de ágar por litro (MACWILLIAMS & LIÃO 2006). Uma modificação foi realizada ao serem adicionados 10 g L^{-1} de glicose. A solução de glicose foi preparada separadamente e adicionada ao meio de cultivo quando esse foi usado. Todos os componentes foram pesados, dissolvidos em água destilada e, após homogeneização, o pH foi ajustado com NaOH, para 7,0 e acondicionado em frasco de vidro. Depois do preparo, o meio foi esterilizado em autoclave vertical à 121 °C e 1 atm, por 15 min. No cultivo em meio líquido, as culturas foram incubadas a 30 °C em agitador pendular a 120 rpm. As placas de Petri foram incubadas em estufa microbiológica a 30 °C. O mesmo meio de cultivo foi utilizado para os ensaios de tolerância a salinidade, curva de crescimento e inoculação bacteriana.

Para o preparo dos inóculos, frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio LB foram inoculados com uma alçada, cobertos com manta feita de algodão e gaze e incubados a 30 °C com 120 rpm em agitador pendular até atingir a fase exponencial do crescimento.

7.4.4 Produção de compostos indólicos

Para avaliar a produção de compostos indólicos, foi utilizado o método de Salkowsky (SARWAR & KREMER, 1995). Os isolados foram cultivados por quatro horas e alíquotas do cultivo de 100 µL foram adicionadas em 2 mL de meio de cultivo DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986), com e sem adição de triptofano (100 µg L⁻¹), suplementado com concentrações de 300 e 600 mmol⁻¹ de Na Cl, sendo mantidos no escuro por 72 h a 30 °C sob agitação de 120 rpm. Para avaliação de síntese de compostos indólicos, 1 mL da cultura foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 min e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca. Em seguida, foram adicionados 100 µL do reagente de Salkowsky e a placa foi incubada no escuro por 30 min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 530 nm e a quantificação de compostos indólicos produzidos foi dosada por meio de curva de calibração com ácido indol-3-acético, relacionando absorbância e concentração de indóis. O ensaio foi realizado em triplicata para cada isolado com três experimentos independentes.

7.4.5 Solubilização de fosfato

Os isolados foram cultivados em meio líquido por quatro horas sob agitação de 120 rpm. Posteriormente, uma alíquota de 10 µL de inóculo foi adicionada sobre a placa de Petri contendo meio basal (VERMA *et al.*, 2001) acrescido de 0,8 g L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂ e suplementado com concentrações de 300 e 600 mmol⁻¹ de Na Cl. As placas foram incubadas em estufa por 72 h e após esse período foi observada a formação do halo de solubilização IS: halo/colônia (INTORNE *et al.*, 2009). O ensaio foi realizado em triplicata para cada isolado em três experimentos independentes.

7.4.6 Triagem dos isolados para enzima celulase

Para a seleção do isolado para enzima celulase, foi realizado o teste de Vermelho Congo para observar a capacidade de hidrólise de Carboximetilcelulo-

se (CMC) pelas cepas isoladas da serapilheira de *Clusia hilariana*. Placas frescas dos isolados foram usadas para iniciar o cultivo dos isolados. Para isso, uma alçada de cada isolado foi adicionada em 25 mL de meio LB líquido incubados em agitador pendular com 120 rpm por 24 h. Posteriormente foram adicionados em meio de cultura sólido Luria Bertani (LB) contendo Carboximetilcelulose - CMC na concentração de 1% a 30°C por 72h. Após o tempo de incubação as placas foram inundadas com uma solução aquosa de 0,1% de Vermelho Congo, deixando atuar por 20 minutos. Em seguida, as placas foram cobertas com NaCl (1 mol L⁻¹) por 20 minutos. A atividade celulolítica foi revelada pelo tamanho da zona clara ao redor das colônias dos isolados. A avaliação foi realizada observando a presença ou ausência do halo amarelado. (HARSHVARDHAN *et al.*, 2013; APUN *et al.*, 2000).

7.4.7 Ensaio de estresse salino

O meio LB sólido foi suplementado com 300, 600 e 800 mmol⁻¹ de NaCl. O preparo do meio foi feito em concentração dupla para permitir a adição das diferentes concentrações. Dessa forma as soluções do NaCl também foram feitas em dobro da concentração testada. O meio e as soluções de NaCl foram esterilizados em autoclave por 15 minutos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). O meio sólido foi vertido em placas de Petri (esterilizadas) no fluxo laminar que posteriormente, foram mantidas em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas, como forma de controle da esterilidade.

Uma alíquota de 10 µL do inóculo cultivado durante 24 h foi transferida para as placas de Petri contendo meio LB suplementado com as concentrações crescentes de NaCl e uma condição sem adição de NaCl (controle). As placas inoculadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por um tempo de exposição de cinco dias e os resultados foram registrados.

7.4.8 Perfil de crescimento dos três isolados bacterianos selecionados

Foi realizado o perfil de crescimento das bactérias selecionadas a partir das características apresentadas nos ensaios anteriores. Uma alçada de cada um dos isolados foi adicionada a um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB

líquido por 24 h sob agitação de 120 rpm a 30 °C. Posteriormente foram realizadas estrias em uma placa de petri contendo meio LB sólido, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 30° C por 24 h. Após 24 h uma alçada da placa fresca de cada isolado foi adicionada a frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio LB cobertos com manta feita de algodão e gaze e incubados a 30 °C com 120 rpm em agitador pendular. Durante todo o processo, os valores de D.O foram medidos em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm com intervalos de tempo regulares, a cada 2 horas, para confirmação do isolado com maior crescimento em menor tempo.

7.4.9 Curva de crescimento da bactéria

O perfil de crescimento da bactéria em meio contendo NaCl e as concentrações utilizadas foram baseadas no resultado obtido no ensaio anterior. Esse experimento avaliou o crescimento celular da bactéria na ausência e presença de diferentes concentrações de NaCl. Foi avaliado em função do tempo de cultivo sob agitação.

Para tanto, o cultivo foi feito em triplicata em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 95 mL de meio LB com glicose e suplementado com concentrações crescentes de NaCl (300 e 600 mmol⁻¹) e controle (sem adição de NaCl), foram adicionados 5 mL do inóculo crescido D.O = 4,0 Os frascos foram cobertos com manta feita de algodão e gaze e incubados em agitador pendular a 30 °C com 120 rpm. Durante todo o processo, os valores de D.O foram medidos em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm com intervalos de tempo regulares, até atingir a fase estacionária. Amostras do meio fermentado foram coletadas e armazenadas para análise de microscopia óptica. Todos os ensaios de cultivo foram realizados em triplicata como experimentos independentes.

7.4.10 Microscopia Óptica

As amostras retiradas dos ensaios de curva de crescimento foram previamente fixadas antes de serem analisadas no microscópio óptico. Para tanto, 100 uL do meio fermentado foram retirados em tempos previamente estabelecidos e centrifugados a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeí-

do 4,0% e tampão cacodilato 0,1 mol⁻¹. Então, as amostras foram mantidas em geladeira a 4 °C até ser observada no MO (BEVERIDGE *et al.*, 2007).

As análises de Microscopia Óptica (MO) foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) pertencente ao Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da UENF. As análises microscópicas das células coletadas em diferentes tempos de crescimento foram realizadas nas amostras da bactéria nos tratamentos controle e com as concentrações de NaCl utilizadas neste experimento (BEVERIDGE *et al.*, 2007).

7.4.11 Ensaio de promoção do crescimento vegetal

Com base nas características de promoção do crescimento vegetal estudadas, a bactéria foi selecionada para inóculo na planta modelo de estudo *Salvinia auriculata*. Neste sentido, as plantas foram aclimatadas por 7 dias em casa de vegetação usando solução nutritiva de Hoagland (BIZZO *et al.*, 2014; HOAGLAND & ARNOLD, 1950). Após esse período, as plantas foram trazidas para o laboratório, onde foi retirado o excesso de água e as plantas foram pesadas. Para retirar o excesso de água das plantas foram usadas duas folhas de papel toalha por um tempo de cinco minutos, após cinco minutos as plantas foram viradas em outras duas folhas de papel toalha por mais cinco minutos. Então, 1 g de planta foi transferido para potes contendo 500 mL de solução nutritiva. As plantas foram mantidas por 8 dias em casa de vegetação. Foram realizados quatro tratamentos: Tratamento 1 (controle), Tratamento 2 (planta + bactéria), Tratamento 3 (planta + 100 mmol⁻¹ NaCl) e Tratamento 4 (planta + bactéria + 100 mmol⁻¹ NaCl). Os tratamentos foram distribuídos em seis réplicas inteiramente causalizados, sendo os experimentos repetidos duas vezes no tempo.

Ao final do experimento, foram avaliadas biomassa fresca e biomassa seca após secagem das amostras a 60 °C por 4 dias. O conteúdo de água da planta (CA mL g⁻¹) foi estimado usando a equação: $CA = (BF - BS)/BS$.

A prolina foi determinada de acordo com BATES *et al.* (1973). Amostras de plantas (100 mg de FW) foram misturadas em 5 mL de ácido sulfosalicílico a 3% (p/v) e o homogeneizado foi centrifugado a 15.700 g para 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL da mistura foi aquecido a 96 °C por 1 h em

banho-maria juntamente com 1 mL de ninidrina ácida (2,5% ninidrina e 50% de ácido fosfórico) e 1 mL de ácido acético glacial ácido. Após o resfriamento, a reação foi medida a 518 nm.

7.4.12 Análises Estatísticas

Os dados foram testados para adequação quanto a distribuição normal e a homogeneidade de variância usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Foram realizadas uma regressão linear múltipla e a comparação de médias dos tratamentos foi realizada usando análise de variância Two Way ANOVA a um nível de significância de 5%. Posteriormente foi realizada análise Post hoc para comparação entre tratamentos. Para analisar as curvas de crescimento foi realizada uma análise de regressão polinomial de terceira ordem ($k=3$). Todas as análises foram realizadas usando o software R Studio. Os resultados são apresentados como média e erro padrão (EP).

7.5 Resultados

7.5.1 3.1. Isolados da serapilheira de *Clusia hilariana*

No presente estudo, dez isolados foram obtidos da serapilheira de *Clusia hilariana* sob condição de alta salinidade em placa LB sólido, suplementado com 600 mmol^{-1} de NaCl. Todas as colônias foram selecionadas com base na caracterização que incluiu produção de pigmento, elevação borda e superfície como observado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características morfológicas das colônias dos isolados da serapilheira de *Clusia hilariana* na restinga PEPCV*.

Isolados	Cor	Elevação	Borda	Superfície
S3101	Branca	Presente	Irregular	Lisa
S3102	Amarela	Presente	Regular	Lisa
S3103	Bege	Presente	Regular	Lisa
S3104	Branca	Presente	Regular	Lisa
S3105	Branca	Presente	Regular	Lisa
S3106	Bege	Presente	Regular	Lisa
S3107	Bege	Presente	Regular	Lisa
S3108	Branca	Presente	Regular	Lisa
S3109	Bege	Presente	Regular	Lisa
*S3110	Bege	Presente	Regular	Lisa

*S31 representa um código usado nas rotinas do laboratório: S tipo de amostra (serapilheira), 3 meio de cultura, 1 local de coleta, os demais números identificam a ordem na tabela. * PEPCV Parque Estadual Paulo César Vinha.

7.5.2 Produção de compostos indólicos

Todos os experimentos foram conduzidos para avaliar a capacidade dos isolados em realizar atividades de promoção do crescimento vegetal em diferentes concentrações de NaCl. Entre os isolados, sete foram analisados para produção de indóis, desses apenas três foram positivos para produzir indóis, os valores variaram de 16,82 a 105,09 $\mu\text{g mL}$ na condição controle, na ausência e presença do triptofano. Na concentração de 300 mmol^{-1} de NaCl os isolados mostraram redução na produção de indóis variando de 12,69 a 67,48 $\mu\text{g mL}$ e na concentração de 600 mmol^{-1} de NaCl a concentração de indóis produzida foi ainda

menor quando comparado a condição controle e com a concentração de 300 mmol⁻¹ de NaCl variando de 7,85 a 42,81 µg mL. Os demais isolados em estudo não produziram, não apresentaram a coloração rosada. Na tabela 2 foram identificados como negativo ou não foram analisados para essa característica identificado como nd (não determinado). Os três isolados que exibiram produção de compostos indólicos mesmo em uma alta concentração de NaCl é um indicativo da sua tolerância ao estresse salino. Comparando os três isolados, o isolado S3103 foi o que exibiu maior quantidade de indóis em todas as concentrações testadas, seguido do isolado S3102 e o isolado S3101 foi o que apresentou a menor produção de indóis em todas as condições testadas.

7.5.3 Solubilização de fosfato

A maior parte dos isolados foram solubilizadores de fosfato e apresentaram uma zona clara ao redor da gota, para quantificar a solubilização de fosfato pelos diferentes isolados após 72 h, o halo de solubilização foi medido (Tabela 2). Os resultados revelaram que S3110 foi o que apresentou maior índice de solubilização 1,64 (mm) na condição sem NaCl, um outro isolado que também apresentou halo considerável foi o isolado S3109 que solubilizou 1,33 (mm), seguido pelos isolados restantes que apresentaram halo de solubilização variando de 1,13 a 0,8 (mm), na condição sem NaCl. Na concentração de 300 mmol⁻¹ houve uma redução do tamanho do halo para todos os isolados variando de 1,07 a 0,7 (mm) novamente o isolado S3110 foi o que apresentou o maior halo nessa concentração e na concentração. Em 600 mmol⁻¹ o tamanho do halo foi ainda menor para todos os isolados comparando a com as condições anteriores e o isolado S3110 foi o que apresentou maior halo 0,80 (mm) e o menor halo foi verificado para o isolado S3103 0,4 (mm). Vale ressaltar que dois isolados não apresentaram halo de solubilização S3101 e S3102 (Tabela 2) porém foram capazes de crescer nas condições testadas, mas não apresentaram halo em torno da gota, desta forma, foram descritos como não solubilizadores de fosfato. À medida que a concentração de sal aumentou houve uma redução na eficiência de solubilização. Todos os isolados foram melhores solubilizadores de fosfato na condição sem adição de NaCl.

7.5.4 Ensaio de estresse salino

Os isolados foram desafiados para crescimento em meio sólido sob condições crescentes de NaCl. Os resultados demonstraram que mesmo na maior concentração testada os isolados cresceram sem aparentemente serem inibidos pela condição estressante como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Características promotoras do crescimento vegetal em isolados da serapilheira de *Clusia hilariana* + Presença da característica; - Ausência da característica (nd) não determinado

Isolados	Concentrações NaCl mmol ⁻¹	Solubilização Fosfato* IS	Indóis µg/L sem triptofano	Indóis µg/L com triptofano	Concentrações 300, 600 e 800 NaCl mmol ⁻¹	CMC*
S3101	0	-	9,02	16,82	+	-
S3101	300	-	10,28	12,69		
S3101	600	-	7,83	7,85		
S3102	0	-	12,91	67,04		+
S3102	300	-	9,71	57,30	+	-
S3102	600	-	11,76	34,33		
S3103	0	0,8	10,68	105,09	+	-
S3103	300	0,6	12,38	67,48		
S3103	600	0,4	11,10	42,81		
S3104	0	1,2	-	-	+	-
S3104	300	0,9	-	-		
S3104	600	0,57	-	-		
S3105	0	0,73	-	-	+	-
S3105	300	0,67	-	-		
S3105	600	0,53	-	-		
S3106	0	1,13	-	-	+	-
S3106	300	0,60	-	-		
S3106	600	0,50	-	-		
S3107	0	1,10	nd	nd	+	-
S3107	300	0,73	nd	nd		
S3107	600	0,53	nd	nd		
S3108	0	1,0	nd	nd	+	-
S3108	300	1,04	nd	nd		
S3108	600	0,66	nd	nd		
S3109	0	1,33	-	-	+	-
S3109	300	0,70	-	-		
S3109	600	0,50	-	-		
S3110	0	1,64	-	-	+	-
S3110	300	1,07	-	-		
S3110	600	0,80	-	-		

*Índice de solubilização IS:

*CMC - Carboximetilcelulase

7.5.5 Triagem de bactérias degradadoras de celulose

Os isolados foram testados com o CMC para produção de enzima. O isolado S3102 apresentou essa característica como observado na (Tabela 2). Os demais isolados não foram capazes de apresentar o halo amarelado em torno da gota.

7.5.6 Curva de crescimento dos isolados selecionados

Após a triagem primária os isolados foram selecionados para avaliação em uma curva de crescimento para obtenção de um isolado que apresentasse maior crescimento em menor tempo. O isolado S3103 que apresentou maior crescimento em menor tempo como apresentado na (**Figura 3**). Posteriormente o isolado S3103 foi testado quanto ao seu potencial de crescimento sob diferentes concentrações de NaCl (300 e 600 mmol⁻¹) em meio líquido LB.

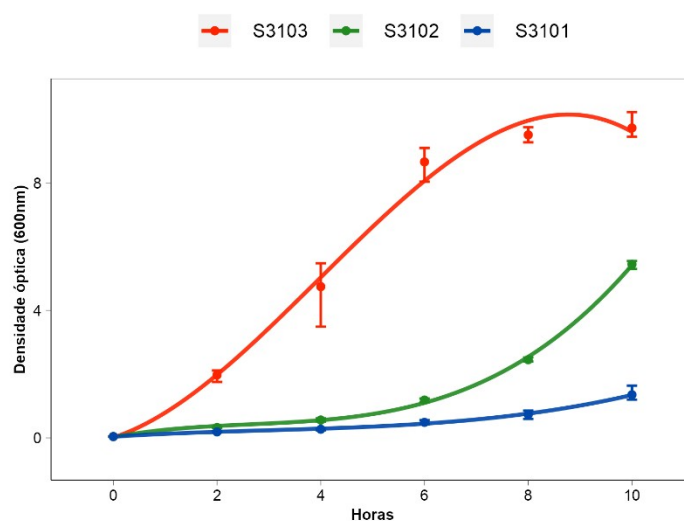


Figura 3: Curva de crescimento dos isolados: S3101 S3102 S3103. Cultivo realizado em meio LB durante 10 h, sob agitação constante dos frascos. As barras representam o desvio padrão da média.

7.5.7 Curva de crescimento bacteriana

O isolado foi capaz de crescer em meio LB contendo até a concentração de 600 mmol⁻¹ de sal demonstrando tolerância sob condições de estresse salino (Figura 4). A curva de crescimento para o isolado representa um crescimento contínuo em um método polinomial. O isolado tolerante ao sal exibiu maiores valores de D.O no tratamento com 300 mmol⁻¹ de NaCl, com isso a concentração de 300 mmol⁻¹ de NaCl não teve efeito negativo no crescimento do isolado S3103, enquanto a adição de 600 mmol⁻¹ de NaCl representou uma redução no valor da D.O do isolado S3103. A concentração de 300 mmol⁻¹ apresentou um perfil de crescimento similar ao controle durante os intervalos de tempo analisados até 12 h.

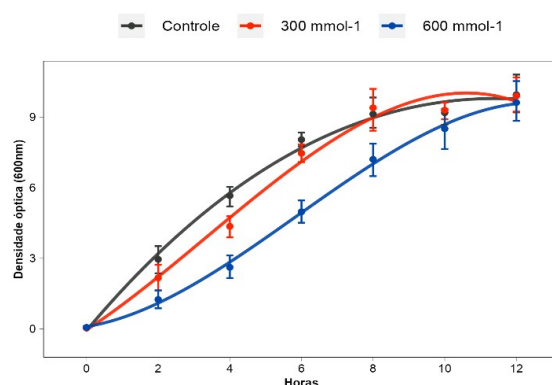


Figura 4: Curvas de crescimento do isolado S3103. Cultivo realizado em meio LB durante 12 h, sob agitação constante dos frascos. As barras representam o desvio padrão da média. Esses dados representam quatro experimentos realizados em momentos distintos e são apresentados como valores de médias $\pm$ EP provenientes de uma estimativa de 95% de confiança em 1.000 reamostragens (bootstrap).

7.5.8 Microscopia Óptica

Considerando o efeito das diferentes concentrações de NaCl no crescimento do isolado S3103, também foi avaliada a morfologia bacteriana dessa cultura submetida ao agente estressor. A figura 5 mostra alterações morfológicas nas células promovidas pela concentração de 600 mmol⁻¹ de NaCl. Nessa condição a célula encontra-se alongada, muda de um bacilo curto como observado nas condições de 300 mmol⁻¹ e condição sem do NaCl para um bacilo alongado principalmente nos tempos iniciais entre 2, 4 e 6 horas do seu crescimento. Esse efeito não ocorreu nas células expostas as outras condições.

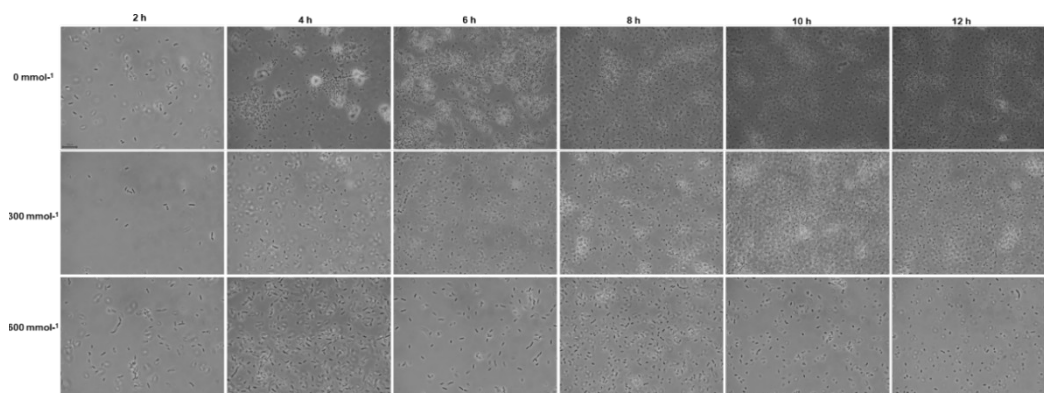


Figura 5: Efeito do estresse salino na morfologia do isolado S3103. Nas concentrações 0, 300 e 600 mmol⁻¹ de NaCl observada a cada duas horas. Amplificação da imagem em 100% com óleo de imersão. A barra é de 10µm.

7.5.9 Ensaio de promoção do crescimento vegetal

As características de crescimento da planta aquática *Salvinia auriculata* foram melhoradas pela inoculação com o isolado S3103. A inoculação foi realizada uma única vez e após oito dias de cultivo a biomassa fresca de *S. auriculata* aumentou significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle (Figura 5 a). O tratamento com o isolado S3103 em relação a biomassa seca da planta, não foi significativo (Figura 5 b). A biomassa fresca e a biomassa seca plantas inoculadas com S3103 aumentaram em 50,51% e 27,53% em comparação com o controle. E a biomassa fresca e biomassa seca das plantas na presença de 100 mmol^{-1} de NaCl e inoculadas com S3103 aumentaram em 24,20% e 11 % respectivamente comparada com a concentração de 100 mmol^{-1} de NaCl. Em relação à quantificação de prolina (Figura 5 c) foi observado que na presença do NaCl e inoculado com o isolado S3103, observou-se uma redução de 10% na quantidade de prolina em comparação com a concentração de 100 mmol^{-1} de NaCl. Em relação ao conteúdo de água houve um aumento de 18% em relação as plantas inoculadas comparando com as plantas do grupo controle, e um aumento de 20% nas plantas inoculadas na presença do NaCl comparadas com as plantas cultivadas apenas na condição de NaCl.

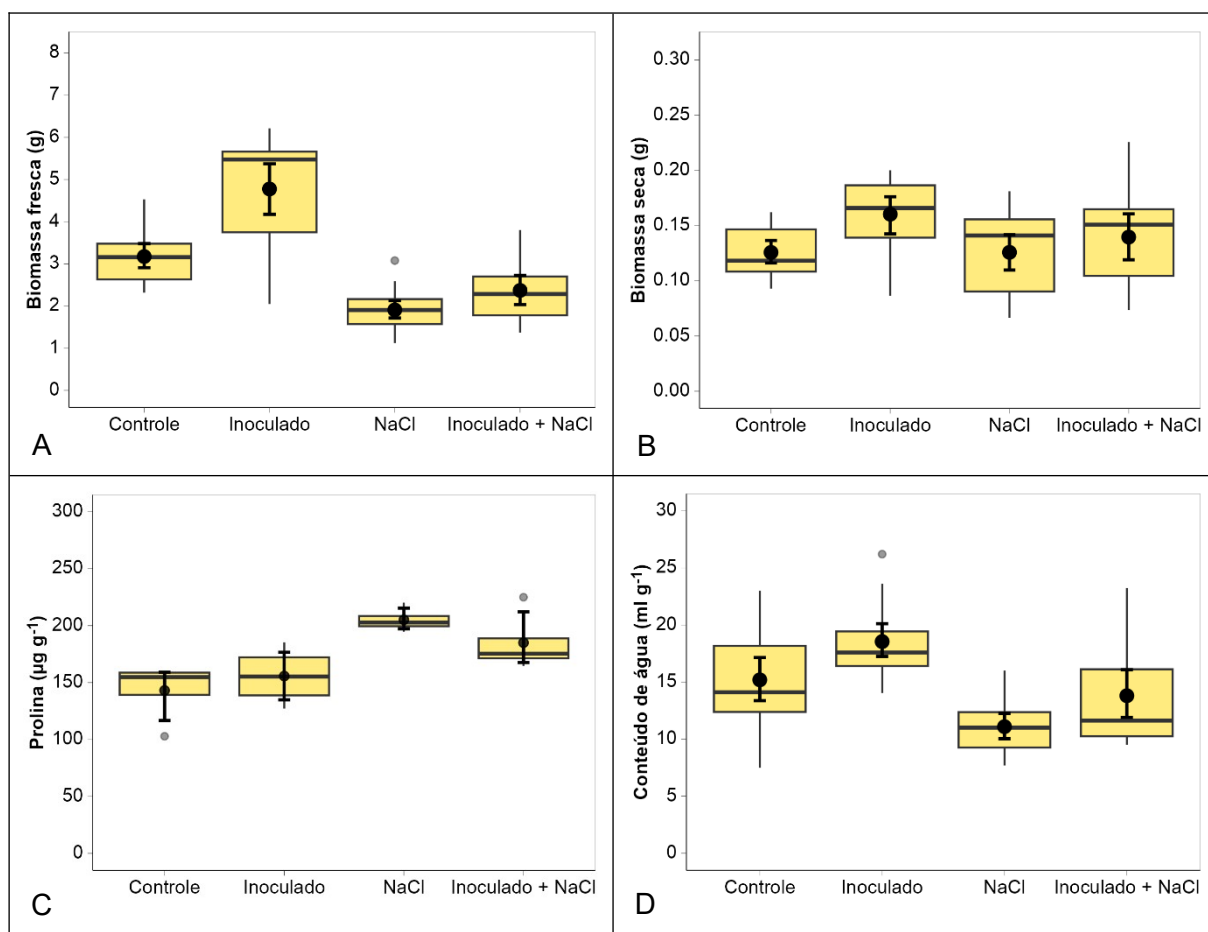


Figura 5: Efeito mitigador da inoculação do isolado (S3103) em *S. auriculata* sob estresse por NaCl na presença do agente estressante. Os pontos acompanhados das barras de erro indicam média e erro padrão provenientes de uma estimativa de 95% de confiança em 1.000 reamostragens (bootstrap). Os boxplots resumem a amostra obtida durante os ensaios através da mediana linha preta e seus quartis.

7.6 Discussão

Na presente pesquisa, objetivamos isolar bactérias da serapilheira de uma planta de ambiente com influência salina e avaliar sua capacidade de promover o crescimento de plantas aquáticas cultivadas sob estresse salino.

O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal é uma abordagem que tem sido amplamente estudada em várias culturas agrícolas para mitigar o impacto da salinidade nas plantas (LATIF *et al.*, 2023; AZEEM, 2023; NESHAT *et al.*, 2022; PRITTESH *et al.*, 2020; BHISE *et al.*, 2017). Nesse caso, bactérias tolerantes a salinidade são capazes de suportar altas concentrações de sal devido à sua capacidade de acumular osmólito para manter o equilíbrio osmótico intracelular (NIU *et al.*, 2022; PARK *et al.*, 2020; SLEATOR, *et al.*, 2002).

Bactérias quando apresentam características positivas relacionadas ao estresse salino facilitam a sobrevivência das plantas nessa condição (SGROY *et al.*, 2009; ETESAMI *et al.*, 2018). No presente estudo, isolamos dez bactérias da serapilheira sob alta concentração de salinidade 600mmol^{-1} . MAGALHÃES *et al.*, (2017) isolou bactérias da serapilheira do Parque Estadual Paulo Cesar Vinhaes e encontraram um total de 16 isolados, associados à serapilheira. A quantidade de bactérias isoladas pode estar relacionada a composição do meio de cultivo usado para o isolamento, que difere do meio de cultivo que foi usado nesse estudo e a concentração de NaCl que nesse estudo foi de 600mmol^{-1} . MAGALHÃES *et al.*, (2017) identificaram os isolados como pertencentes a diferentes espécies de *Burkholderia*. No entanto, os isolados do presente estudo não foram sequenciados e, por isso, não temos informações específicas sobre cada um deles.

O potencial de promoção do crescimento vegetal dessas bactérias foi determinado sob controle e concentrações crescentes de NaCl. Sabe-se que BPCV são produtoras de compostos indólicos, entre os indóis mais bem estudados está o Ácido Indol Acético - AIA. Nossas observações sobre essa característica são consistentes com artigos anteriores onde diversas bactérias halotolerantes exibiram a produção de indóis. KHAN *et al.*, (2021) observaram que as bactérias produziram AIA em diferentes concentrações que variaram de 70 a 280mmol^{-1} de NaCl. Concentrações menores do que as utilizadas na presente análise. RAVAL *et al.*, (2020) encontraram bactérias que produziram AIA na condição

de 670 mmol^{-1} de NaCl. Onde a concentração de AIA produzida pelas bactérias foi de 250 ug/mL . Concentração que por outro lado, é maior do que a empregada no presente estudo e a concentração de AIA produzida também foi maior do que a dos nossos achados. A síntese do fitohormônio AIA é um mecanismo usado por BPCV para aumentar o crescimento da planta (PATTEN e GLICK 1996). O AIA controla vários processos biológicos que estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas, como a iniciação lateral da raiz, divisão celular e promove o aumento da área de superfície da raiz, que ajuda na absorção de nutrientes do solo (OLANREWAJU *et al.*, 2017). Os três isolados bacterianos produziram uma quantidade relativa de compostos indólicos mesmo sob a condição de estresse salino.

Bactérias solubilizadoras de fosfato contribuem para o crescimento das plantas, essas bactérias têm a capacidade de converter o fósforo insolúvel em forma de fósforo solúvel através de processos como a acidificação e a quelação. (RODRÍGUEZ e FRAGA. 1999). Quando sob estresse salino a absorção de nutrientes se torna deficiente, algumas bactérias possuem mecanismos para sobreviver nessa condição, reduzindo a captação de íons salinos na membrana e parede celular regulando a concentração intracelular de íons bombeando íons para fora da célula (RUPPEL *et al.*, 2013). Os isolados apresentaram resposta positiva para solubilização de fosfato tanto na condição sem estresse salino quanto em condição de salinidade. MAGALHÃES *et al.* (2017) observou solubilização de fosfato para todos os isolados o que corrobora com os nossos achados. Existem muitas bactérias que são capazes de solubilizar fósforo insolúvel sob condição de salinidade (FLORES CLAVO *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2023; SRINIVASAN *et al.*, 2012).

A celulose é um dos componentes dos tecidos vegetais (BARHOUM *et al.*, 2020). Bactérias degradadoras de celulose realizam esse processo devido a presença de enzimas extracelulares. A atuação dessas enzimas torna possível a degradação da celulose em glicose (KHADKA *et al.*, 2022; POTPROMMANEE *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2012). Muitas aplicações industriais podem ser desenvolvidas com o uso das celulasas produzidas pelas bactérias (KUHAD *et al.*, 2011). Nesse trabalho apenas o isolado S3102 apresentou halo amarelado, um possível candidato para aplicações futuras.

As curvas de crescimento para produção de inóculo dos três isolados selecionados foi realizada para encontrar um isolado com maior crescimento em menor tempo. Observamos que existe uma diferença no tempo de crescimento dos três isolados. PENFOLD, (1914) e HAMILL *et al.* (2020) explicam que as medidas de crescimento microbiano são representações de diferentes elementos compostos de taxa de crescimento exponencial, fase estacionária e declínio. Essas avaliações específicas das curvas do crescimento bacteriano considera os vários processos de crescimento que incluem a divisão celular dentro de populações, aumento na massa de células, alongamento ou crescimento celular. O crescimento tardio dos isolados pode estar relacionado com esses fatores descritos anteriormente. Células de uma determinada bactéria com diferentes fenótipos respondem de maneira diferente umas das outras durante as fases de crescimento (HAMILL *et al.*, 2020).

Estudos realizados com bactérias sob estresse salino em função do tempo indicam que determinadas concentrações de NaCl inibem o crescimento das células bacterianas (GUPTA *et al.*, 2021, HE *et al.*, 2019). Neste sentido analisamos a influência do NaCl sob o crescimento do isolado S3103 e identificamos que quanto maior a concentração de NaCl maior o impacto negativo sobre o crescimento da população bacteriana, que retardou o seu crescimento.

O presente estudo revelou que o isolado S3103 amenizou o impacto da salinidade na planta aquática. O isolado S3103 aumentou significativamente a biomassa fresca da planta aquática sem estresse e, quando sob o impacto causado pelo NaCl mitigou o estresse salino. Foi verificado que a quantidade de prolina produzida pela planta aumentou na presença de 100 mmol^{-1} de NaCl e na planta inoculada a quantidade de prolina produzida reduziu em 10%. O que corrobora com alguns trabalhos que mostraram que a prolina é um dos osmólitos produzidos na presença do estresse salino (GOMES, *et al.*, 2011; JAMPEETONG *et al.*, 2009). Na literatura, até o presente momento, não foram encontrados trabalhos que examinaram bactérias inoculadas em plantas de *Salvinia auriculata* Aublet sob estresse salino. Além disso, nossos resultados evidenciam a importância da exploração bacteriana em restingas, uma vez que uma melhor compreensão da diversidade e funcionamento microbianos do ecossistema é de suma importância na busca de práticas sustentáveis.

7.7 Conclusão

O presente estudo revelou a existência de bactérias em um ecossistema de restinga a partir do isolamento dessas associadas a serapilheira da planta *Clusia hilariana*. Esses isolados exibiram diversas características de adaptação que podem ser úteis para aplicações biotecnológicas como atividade de produção de fitormônios, solubilização de fosfato, tolerância a salinidade, atividade enzimática e mitigou o estresse salino em plantas de *Salvinia auriculata*.

8 Considerações finais e perspectivas futuras

Nessa tese investigamos o potencial biotecnológico da aplicação de bactérias em quatro capítulos. O primeiro capítulo revisou, as principais características biotecnológicas existentes e empregadas no mercado agrícola em larga escala. O segundo e terceiro capítulos foram dedicados ao isolamento e análises bacterianos sob estresse por cobre. O último capítulo explorou, em uma abordagem de bioprospecção, com resultados que inovam a aplicação de inoculantes na mitigação de estresse salino.

No primeiro capítulo, buscamos identificar as principais interfaces de aplicação da pesquisa com as tecnologias vigentes no mercado agrícola latino-americano. A agricultura é uma das atividades humanas mais antigas e está sempre inovando para atender às necessidades alimentares da população. Vivemos tempos de mudanças, principalmente no que diz respeito às mudanças climáticas, que intensificam os estresses abióticos como a salinidade e o déficit hídrico, trazendo desafios para a agricultura. Exploramos uma perspectiva para contornar os efeitos negativos do uso de fertilizantes químicos não renováveis e pesticidas, com inoculantes microbianos. Dessa forma, será possível melhorar a qualidade dos solos, evitar a perda da diversidade e conservar os corpos hídricos, promovendo uma agricultura sustentável e segura. O interesse pelo uso de inoculantes microbianos contendo bactérias e fungos, que promovam o crescimento das plantas, deve aumentar nos próximos anos, devido aos custos mais altos dos fertilizantes e principalmente com preocupações com a poluição e ênfase na agricultura sustentável. Uma das principais constatações da revisão é a de que para garantir a segurança alimentar da população, é necessário explorar novos caminhos e os inoculantes microbianos são uma prática bem-sucedida, que pode trazer uma solução para os problemas da agricultura do século XXI.

No segundo capítulo e no terceiro capítulo, plantas aquáticas são descritas como fitoremediadoras de diferentes metais. Com isso, a hipótese investigada buscava fornecer indícios de respostas de que associadas a espécie de planta aquática *Salvinia auriculata* Aublet são encontradas bactérias com características de promoção do crescimento vegetal e que na presença do cobre seja uma colaboradora na remoção do metal presente na água. Os resultados demonstram que associadas às plantas aquáticas são encontradas bactérias com

características de promoção do crescimento vegetal e quando sob estresse causado pela alta concentração de cobre foram capazes de sobreviver e de promover o crescimento da planta.

No quarto e último capítulo, nosso estudo revelou a existência de bactérias em um ecossistema de restinga a partir do isolamento dessas associadas a serapilheira da planta *Clusia hilariana*. Nossos resultados evidenciam a importância da exploração bacteriana em restingas, uma vez que uma melhor compreensão da diversidade e funcionamento microbianos do ecossistema é de suma importância na busca de práticas sustentáveis.

As principais perspectivas futuras abertas com esse estudo são duas: a primeira é a necessidade de ampliação das amostras e replicação dos testes em outras condições, plantas e fatores experimentais visando a melhorar a precisão e o poder explicativo das principais associações investigadas ao longo da tese. A segunda é realizar o sequenciamento para investigar os possíveis mecanismos de resistência das bactérias às diferentes fontes de estresse investigadas.

8.1 Referências Bibliográficas

- AHEMAD, Munees; KIBRET, Mulugeta. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- AKHTAR, Noreen *et al.* Leaf anatomical and biochemical adaptations in *Typha domin-gensis* Pers. ecotypes for salinity tolerance. **Botanical Sciences**, v. 95, n. 4, p. 807-821, 2017.
- ALENCAR, Ana Cláudia; NASCIMENTO-JÚNIOR, José Elvino do; MARINHO, Lucas Cardoso. Flora of Espírito Santo: Clusiaceae. **Rodriguésia**, v. 74, p. e00552022, 2023.
- 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.
- ARÁMBURO-MIRANDA, Isela Victoria; RUELAS-RAMÍREZ, Emmanuel Hammurabi. Desalination of sea water with aquatic lily (*Eichhornia crassipes*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 33, p. 25676-25681, 2017.
- ARORA, Naveen Kumar *et al.* Environmental sustainability: challenges and viable solutions. **Environmental Sustainability**, v. 1, p. 309-340, 2018.
- AZEEM, Muhammad Atif *et al.* Exploration of plant growth promoting traits and regula-tory mechanisms of *Bacillus anthracis* PM21 in enhancing salt stress tolerance in maize. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-18, 2023.
- BARHOUM, Ahmed *et al.* Plant celluloses, hemicelluloses, lignins, and volatile oils for the synthesis of nanoparticles and nanostructured materials. **Nanoscale**, v. 12, n. 45, p. 22845-22890, 2020.
- BEVERIDGE, Terry J.; LAWRENCE, John R.; MURRAY, Robert GE. Sampling and staining for light microscopy. **Methods for General and Molecular Microbiol-ogy**, p. 19-33, 2007.
- BHISE, Komal K.; BHAGWAT, Prashant K.; DANDGE, Padma B. Plant growth-pro-moting characteristics of salt tolerant *Enterobacter cloacae* strain KBPD and its efficacy in amelioration of salt stress in *Vigna radiata* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 215-226, 2017.
- BITTRICH, V., Trad, J., Cabral, F., & Nascimento-Jr, J. E. Clusiaceae in Lista de es-pécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000089> [accessed August 2010], 2020.
- BIZZO, Andresa Lana Thomé *et al.* Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, p. 268-277, 2014.
- BORAH, Palakshi *et al.* An insight into plant growth-promoting rhizobacteria-mediated mitigation of stresses in plant. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 5, p. 3229-3256, 2023.

- BRITO, L. D. S., Irmiler, U., Forte, B. V. G., Xavier, T. P., & Martins, R. L. Matter turnover in the oligotrophic restinga ecosystem and the importance of the key species *Clusia hilariana*. *Biota Neotropica*, v. 18, n. 4, 2018.
- CAÑEDO-ARGÜELLES, Miguel *et al.* Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 157-167, 2013.
- CERQUEIRA, Rui. Biogeografia das restingas. *Ecologia de restingas e lagoas costeiras*, v. 1, p. 65 -75, 2000.
- CLACINO, Deyvison *et al.* Halotolerant spore-forming Gram-positive bacterial diversity associated with *Blutaparon portulacoides* (St. Hill.) Mears, a pioneer species in Brazilian coastal dunes. 2006.
- DE OLIVEIRA, Fabricia Benda; DA SILVA CANDOTTI, Calvin; DE ABREU MARQUES, Rodson. *Geologia Aplicada. Análise sedimentar da região costeira do Parque Estadual Paulo Cesar Vinha, Guarapari – Espírito Santo* 2008.
- DE OLIVEIRA, Marcos Vinicius V. *et al.* Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Archives of Microbiology**, v. 198, p. 287-294, 2016.
- DIAS, A. T., de Mattos, E. A., Vieira, S. A., Azeredo, J. V., & Scarano, F. R. Above-ground biomass stock of native woodland on a Brazilian sandy coastal plain: estimates based on the dominant tree species. *Forest Ecology and Management*, v. 226, n. 1-3, p. 364-367, 2006.
- DOBRY, E., Schoeniger, G. and Natile, S.A., The effect of salinity fluctuation in freshwater streams on the fecundity of post-diapause *Chironomus dilutus*. **Ecotoxicology**, 30, pp.224-230, 2021
- ETESAMI, Hassan; MAHESHWARI, Dinesh K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 225-246, 2018.
- FLORES CLAVO, Rene *et al.* Rhizobacterial Isolates from *Prosopis limensis* Promote the Growth of *Raphanus sativus* L. Under Salt Stress. **Current Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 269, 2023.
- GOMES, Maria Angélica da Conceição *et al.* Effect of salt stress on nutrient concentration, photosynthetic pigments, proline and foliar morphology of *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, p. 164-176, 2011.
- GOMES, Maria Angélica da Conceição *et al.* Salinity effects on photosynthetic pigments, proline, biomass and nitric oxide in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 29, 2017.
- GUO, Jiameng *et al.* Roles of endophytic bacteria in *Suaeda salsa* grown in coastal wetlands: Plant growth characteristics and salt tolerance mechanisms. **Environmental Pollution**, v. 287, p. 117641, 2021.
- GUPTA, Anmol *et al.* Comparative evaluation of different salt-tolerant plant growth-promoting bacterial isolates in mitigating the induced adverse effect of salinity in *pisum sativum*. **Biointerface Res. Appl. Chem**, v. 11, n. 5, p. 13141-13154, 2021.

- GUPTA, Pratima; SAMANT, Kalpana; SAHU, Avinash. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.
- HAMILL, Philip G. et al. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5948, 2020.
- HARSHVARDHAN, Kumar; MISHRA, Avinash; JHA, Bhavanath. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: a potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 51-56, 2013.
- HART, B.T., Lake, P.S., Webb, J. A. and Grace, M.R., Ecological risk to aquatic systems from salinity increases. **Australian Journal of Botany**, 51(6), pp.689-702, 2003.
- HE, Yanhui *et al.* Different responses of *Capsicum annuum* L. root and shoot to salt stress with *Pseudomonas putida* Rs-198 inoculation. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, p. 799-811, 2019.
- HOAGLAND, Dennis Robert *et al.* The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.
- HOBOHM, Carsten; SCHAMINÉE, Joop; VAN ROOIJEN, Nils. Coastal habitats, shallow seas and inland saline steppes: ecology, distribution, threats and challenges. **Perspectives for Biodiversity and Ecosystems**, p. 279-310, 2021.
- HOQUE, Md Najmol *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria-mediated adaptive responses of plants under salinity stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 1307-1326, 2023.
- INTORNE, A. C., de Oliveira, M. V. V., Lima, M. L., da Silva, J. F., Olivares, F. L., & de Souza Filho, G. A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology*, v. 191, n. 5, p. 477-483, 2009.
- JAMPEETONG, Arunothai; BRIX, Hans. Effects of NaCl salinity on growth, morphology, photosynthesis and proline accumulation of *Salvinia natans*. **Aquatic Botany**, v. 91, n. 3, p. 181-186, 2009.
- JHA, Prabhat N.; KUMAR, A. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1311-1320, 2007.
- KARTIK, Vinodbhai Patel; JINAL, Hardik Naik; AMARESAN, Natarajan. Inoculation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings with salt-tolerant plant growth promoting bacteria improves nutrient uptake, plant attributes and physiological profiles. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 1728-1740, 2021.
- KHADKA, Subash *et al.* Production Optimization and Biochemical Characterization of Cellulase from *Geobacillus* sp. KP43 Isolated from Hot Spring Water of Nepal. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.

- KHAN, Muhammad Aaqil *et al.* Halotolerant bacteria mitigate the effects of salinity stress on soybean growth by regulating secondary metabolites and molecular responses. **BMC Plant Biology**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021.
- KRISHNA, M. P.; MOHAN, Mahesh. Litter decomposition in forest ecosystems: a review. **Energy, Ecology and Environment**, v. 2, p. 236-249, 2017.
- KUHAD, Ramesh Chander; GUPTA, Rishi; SINGH, Ajay. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.
- KUMAR, Akhilesh *et al.* Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPVS11 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126616, 2021.
- LATIF, Aasia *et al.* Novel halotolerant rhizobacterial strains mitigated the salt stress in-vitro and in-vivo and improved the growth of tomato plants. **Scientia Horticulturae**, v. 319, p. 112115, 2023.
- LI, Zhe *et al.* Integrated application of phosphorus-accumulating bacteria and phosphorus-solubilizing bacteria to achieve sustainable phosphorus management in saline soils. **Science of The Total Environment**, v. 885, p. 163971, 2023.
- MACWILLIAMS, Maria P.; LIAO, Min K. Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. **ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology**, v. 2006, 2006.
- MAGALHÃES, Valter Cruz *et al.* *Burkholderia* isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, v. 112, p. 41-48, 2017.
- MUFARREGE, M. M. *et al.* Adaptability of *Typha domingensis* to high pH and salinity. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 457-465, 2011.
- MUSTAFA, Ghulam; AKHTAR, Mohd Sayeed; ABDULLAH, Rabia. Global concern for salinity on various agro-ecosystems. **Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Causes and Solution: Volume 1**, p. 1-19, 2019.
- NESHAT, Mohammadreza *et al.* Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 28, n. 2, p. 347-361, 2022.
- NIU, Shuqi *et al.* The osmolyte-producing endophyte *Streptomyces albidoflavus* Os*iL1-2* induces drought and salt tolerance in rice via a multi-level mechanism. **The Crop Journal**, v. 10, n. 2, p. 375-386, 2022.
- OLANREWAJU, Oluwaseyi Samuel; GLICK, Bernard R.; BABALOLA, Olubukola Olu-ranti. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-16, 2017.
- OWENS, CHETTA S.; SMART, R. MICHAEL; DICK, GARY O. Effects of salinity and pH on growth of giant salvinia (*Salvinia molesta* Mitchell). **J. Aquat. Plant Manage**, v. 52, p. 93-96, 2014.

- PARK, Ye-Lim *et al.* Effects of osmolytes on salt resistance of *Halomonas soci* CKY01 and identification of osmolytes-related genes by genome sequencing. **Journal of Biotechnology**, v. 322, p. 21-28, 2020.
- PATTEN, Cheryl L.; GLICK, Bernard R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.
- PENFOLD, William Jas. On the nature of bacterial lag. **Epidemiology & Infection**, v. 14, n. 2, p. 215-241, 1914.
- PERIN, Liamara. Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Burkholderia* em Associação com Cana-de-açúcar e Descrição de *Burkholderia silvatic*. 2007.
- PITMAN, Michael G.; LÄUCHLI, André. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. **Salinity: Environment-Pants-Molecules**, v. 3, p. 20, 2002.
- POTPROMMANEE, Laddawan *et al.* Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175004, 2017.
- PRITTESH, Patel *et al.* Amelioration effect of salt-tolerant plant growth-promoting bacteria on growth and physiological properties of rice (*Oryza sativa*) under salt-stressed conditions. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 2419-2428, 2020.
- PRIYA, P. *et al.* Comparative proteomic analysis of saline tolerant, phosphate solubilizing endophytic *Pantoea* sp., and *Pseudomonas* sp. Isolated from *Eichhornia* rhizosphere. **Microbiological Research**, v. 265, p. 127217, 2022.
- RAVAL, Vikram H. *et al.* Biosynthesis and purification of indole-3-acetic acid by halotolerant rhizobacteria isolated from Little Runn of Kachchh. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101435, 2020.
- RODRIGUES NETO, J. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathol**, v. 12, p. 16, 1986.
- RODRÍGUEZ, Hilda; FRAGA, Reynaldo. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.
- RUPPEL, Silke; FRANKEN, Philipp; WITZEL, Katja. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 9, p. 940-951, 2013.
- SAFDAR, Hamna *et al.* Uma revisão: Impacto da salinidade no crescimento das plantas. **Nat. Sci**, v. 17, n. 1, pág. 34-40, 2019.
- Sarwar, M.; Kremer, R.J. (1995). Enhanced Suppression of Plant Growth Through Production Of L-Tryptophan-Derived Compounds by Deleterious Rhizobacteria. *Plant and Soil*, V.172, N.2, P.261–269
- SGROY, Verónica *et al.* Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 371-381, 2009.

- SILVA, Jussara Tamires De Souza. Promoção do crescimento de *Salvinia auriculata* Aublet mediada por *Enterobacter* sp. Sob Estresse Por Cobre. **Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, 2019.
- SLEATOR, Roy D.; HILL, Colin. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 49-71, 2002.
- SRINIVASAN, Ramakrishnan *et al.* Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 4, p. 427-434, 2012.
- UNDERWOOD, G. J. C.; BAKER, J. H. The effect of various aquatic bacteria on the growth and senescence of duckweed (*Lemna minor*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 192-196, 1991.
- UPADHYAY, R. K.; PANDA, S. K. Salt tolerance of two aquatic macrophytes, *Pistia stratiotes* and *Salvinia molesta*. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 157-159, 2005.
- VERMA, Subhash C.; Ladha, Jagdish K.; Tripathi, Anil K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.
- VILLELA, Dora Maria *et al.* *Clusia hilariana*, a key species on nutrient cycling in sand dune vegetation thickets. **Oecologia Australis**, v. 24, n. 2, p. 420-437, 2020.