



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS NO PORTA-ENXERTO CITRUMELO
'SWINGLE' SOB SISTEMAS DE CULTIVOS ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

NATHÁLIA MANCINE

**Araras
2025**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS NO PORTA-ENXERTO CITRUMELO
'SWINGLE' SOB SISTEMAS DE CULTIVOS ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

NATHÁLIA MANCINE

ORIENTADOR: PROF. DR. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO
CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. HELENA SANTIAGO LIMA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal e Bioprocessos
Associados como requisito parcial à
obtenção do título de MESTRA EM
PRODUÇÃO VEGETAL E
BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2025

Mancine, Nathália

CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS NO PORTA-
ENXERTO CITRUMELO 'SWINGLE' SOB SISTEMAS DE
CULTIVOS ORGÂNICO E CONVENCIONAL / Nathália
Mancine -- 2025.
63f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Helvécio Della Coletta Filho
Banca Examinadora: Sara Adrián López de Andrade,
Sandra Regina Ceccato Antonini
Bibliografia

1. Microbioma rizosférico. 2. Bactérias promotoras de
crescimento em plantas (BPCPs). 3. Citricultura. I.
Mancine, Nathália. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Nathália Mancine, realizada em 22/05/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Helvécio Della Coletta Filho (IAC)

Profa. Dra. Sara Adrián López de Andrade (UNICAMP)

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao final desta etapa tão significativa e desafiadora de minha trajetória, é com gratidão que olho para todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Helvécio, pela orientação dedicada, paciência e incentivo, desde minha iniciação científica. Te considero um mentor nessa minha trajetória, sua experiência foi fundamental para meu crescimento pessoal e profissional. À minha coorientadora Prof. Dra. Helena agradeço por toda a troca e motivação nesse período.

Aos amigos do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC meu muito obrigada pelo companheirismo nos laboratórios, troca de conhecimento e boas conversas que tornaram meu dia a dia mais leve. Um agradecimento especial para minhas amigas de vida e de grupo de pesquisa, Giovana, Maria Fernanda, Alessia e Maria Julia, vocês são essenciais na minha vida e sempre me recordarei com alegria dos momentos vividos. A minha dupla de mestrado, Giovana Peruchi que enfrentou comigo todos os desafios do mestrado, sendo na universidade ou no laboratório, com certeza você tornou essa jornada mais leve.

Aos professores da PPGPVBA por todo carinho e experiência compartilhada e a secretaria pelo apoio durante esse processo.

Sou imensamente grata à minha família e ao meu marido, pelo amor e apoio nas horas difíceis e por sempre acreditarem no meu potencial, mesmo quando eu mesma duvidei.

Às instituições FAPESP (projetos 2023/01392-1 e 2020/14584-8) e CAPES (processo 88887.808946/2023-00), pelo apoio e financiamento que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa, de reconhecida relevância científica e social, expresso minha sincera gratidão.

A todos e todas que direta ou indiretamente, fizeram parte desta jornada: muito obrigada!!

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	06
2 OBJETIVOS	07
3 REVISÃO DA LITERATURA	08
3.1 Citrumelo 'Swingle' na agricultura.....	08
3.2 Interações solo, microrganismos e planta.....	09
3.3 Bactérias Promotoras de Crescimento (BPCPs).....	09
3.4 Bioinsumos como alternativa sustentável.....	10
3.5 O Papel da Metataxonômica na Validação de Ensaio In Vitro.....	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.2 Coleta de solo para análises químicas e metataxonômica.....	13
4.3 Análises Metataxonômicas.....	14
4.3.1 Determinação da composição da comunidade microbiana total do solo rizosférico.....	14
4.3.2 Processamento e análise dos dados brutos de sequenciamento....	14
4.3.3 Análises de bioinformática e estatísticas.....	14
4.4 Metodologia de isolamento para obtenção da biblioteca de rizobactérias..	14
4.4.1 Preparo das amostras.....	14
4.4.2 Isolamento e seleção das rizobactérias para biblioteca.....	15
4.5 Seleção de isolados para amostragem.....	16
4.6 Amplificação do fragmento do gene 16S rRNA.....	17
4.7 Demultiplexação e seleção de ASVs.....	18
4.8 Testes <i>in vitro</i>	18
4.8.1 Solubilização de fosfato.....	18
4.8.2 Determinação da produção de AIA (ácido indol acético)	19
4.8.3 Produção de sideróforos.....	19
4.8.4 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	20
4.9 Testes <i>in vivo</i>	21
4.9.1 Teste de Germinação.....	21
4.9.2 Ação de sinergismo entre microrganismos – ação indireta.....	21

4.9.3	Formação de <i>SynComs</i>	22
4.9.4	Experimento em casa de vegetação – inoculação das BPCPs.....	22
5	RESULTADOS	25
5.1	Análise química do solo.....	25
5.2	Metataxonômica.....	25
5.2.1	Similaridade entre isolamento e metagenômica.....	25
5.2.2	Identificação taxonômica para início da triagem <i>in vitro</i>	28
5.2.3	Mecanismos de promoção de crescimento de plantas – <i>Screening in vitro</i>	30
5.2.3.1	Fixação de Nitrogênio.....	30
5.2.3.2	Produção de Ácido indolacético.....	31
5.2.3.3	Produção de Sideróforos.....	31
5.2.3.4	Solubilização de Fosfato.....	32
5.2.4	Teste de Germinação de sementes.....	33
5.2.5	Promoção de crescimento em plântulas de citros – <i>Screening in vivo</i>	36
6	DISCUSSÃO	40
6.1	Metataxonômica.....	40
6.2	<i>Screening in vitro</i>	42
6.3	<i>Screening in vivo</i>	43
7	CONCLUSÃO	46
8	LITERATURA CITADA	47

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Média (n=5) dos parâmetros químicos do solo para os diferentes tipos de cultivos.	25
Tabela 2. Resultados do teste de germinação com inoculação de SynComs comparadas com controle.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática do processo de amostragem de isolados microbianos criopreservados do projeto, visando a otimização do sequenciamento.....	16
Figura 2. Representação esquemática da estratégia multiplex para amplificação da região V4-V5 do fragmento 16S rRNA da comunidade bacteriana amostrada da coleção estabelecida de rizobactérias.....	17
Figura 3. Esquema de condução dos testes in vivo em casa de vegetação e suas avaliações.	23
Figura 4. Gráfico de abundância relativa das ASVs nos diferentes cultivos (detecção maior que 0,05)	26
Figura 5. Análises de composição de comunidade bacteriana.....	27
Figura 6. Diagrama de Venn demonstrando a intersecção dos cultivos, microbioma core, além de demonstrar as ASVs exclusivas.....	27
Figura 7. Análise LEfSe comparando a composição microbiana entre os sistemas de cultivo orgânico (verde) e convencional (laranja).....	28
Figura 8. Comparação dos gêneros de bactérias obtidos dos sistemas de cultivo orgânico e convencional, identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das rizobactérias representativas das bibliotecas.....	29
Figura 9. Porcentagem de positivos para mecanismos de promoção de crescimento. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.....	30
Figura 10. Resultados do teste de produção de ácido indol-acético.. Gráfico com resultados positivos para o teste de produção deste fitohormônio. <i>A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.</i>	31
Figura 11. Capacidade de produção de sideróforos de acordo com o diâmetro dos halos formados em centímetros. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.....	32
Figura 12. Capacidade de solubilização de fosfato de acordo com o índice de solubilização medido através do diâmetro de razão halo/colônias. A cor verde demonstra os resultados do cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.....	32
Figura 13. Heatmap da correlação dos isolados bacterianos nos diferentes ensaios biológicos de promoção de crescimento. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.....	33
Figura 14. Resultados no teste de germinação com bactérias inoculadas em sementes comparados com controle não inoculado. A. Aumento de índice de velocidade de Germinação (IVG) para sementes de citrumelo ‘Swingle’ inoculadas com cepas de rizobactérias comparadas com controle não inoculado (Log ₂ Fold change). B. Aumento de massa (g) de volume de raiz comparada ao controle não inoculado (Log ₂ Fold change). * representa os resultados que tiveram valor significativo (p-valor >0,05) pelo teste t. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.....	34
Figura 15. Resultados do teste de sinergismo. A. Sinergismo para SynCom do cultivo convencional. B. Sinergismo para SynCom do cultivo orgânico. C. Fotos de bactérias plaqueadas isoladas como controle do teste.....	35

- Figura 16.** Valores de aumento de volume de raiz por Log₂ Fold Change comparados com o controle não inoculado. Todos os isolados plotados no gráfico apresentaram valor significativo (p-valor<0,05) pelo teste t. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional..... 36
- Figura 17.** Resultados do teste de sinergismo. **A.** Sinergismo para a SynCom “geral”. **B.** Sinergismo para SynCom do cultivo convencional. **C.** Sinergismo para SynCom do cultivo orgânico. **D.** Fotos de bactérias plaqueadas isoladas como controle do teste..... 37
- Figura 18.** Parâmetros fisiológicos de plântulas de citrumelo 'Swingle' sob diferentes tratamentos com SynComs em casa de vegetação. Comparações dos tratamentos Geral, Convencional e Orgânico com o Controle, ao longo de cinco repetições (semanas), para os parâmetros fisiológicos **ci** (concentração interna de CO₂), **E** (taxa de transpiração), **gs** (condutância estomática) e **A** (taxa de assimilação de carbono). Os pontos representam os valores obtidos na medição do IRGA e as barras verticais indicam o desvio padrão. As linhas pretas correspondem ao Controle, e as linhas cinza aos tratamentos comparados. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle na mesma repetição (p < 0,05)..... 38
- Figura 19.** Log₂ Fold Change de parâmetros morfológicos radiculares de plântulas de citrumelo 'Swingle' sob diferentes tratamentos com SynComs em casa de vegetação. Os valores representam a variação relativa ao controle não inoculado. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)..... 39

CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS NO PORTA-ENXERTO CITRUMELO ‘SWINGLE’ SOB SISTEMAS DE CULTIVOS ORGÂNICO E CONVENCIONAL

Autora: NATHÁLIA MANCINE

Orientador: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

Co-orientadora: Dra. HELENA SANTIAGO LIMA

RESUMO

A compreensão do impacto do microbioma vegetal tem impulsionado novas estratégias para aprimorar a produção agrícola, especialmente diante das mudanças climáticas, do aumento da prevalência de patógenos e das condições adversas de cultivo. O estudo dos microrganismos do solo é essencial para transformar a rizosfera em benefício das plantas, mas ainda há uma lacuna no conhecimento sobre a prospecção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCPs) em citros, particularmente comparando diferentes sistemas de cultivo. Este projeto investigou rizobactérias de citros sob cultivos orgânico e convencional, visando identificar microrganismos com potencial para a formulação de comunidades sintéticas (*SynComs*) e sua aplicação como bioinsumos. Foi coletado amostras de solo rizosférico para sequenciamento do DNA total do solo a fim de realizar análises metataxonômicas e amostras de raízes foram coletadas e a populações bacterianas foram isoladas da rizosfera e do rizoplaneo em quatro meios de cultura, buscando maximizar a diversidade bacteriana. Após seleção morfológica, os isolados foram armazenados criogenicamente e caracterizados taxonomicamente por meio do sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA na plataforma Illumina (250x250pb paired-end), permitindo a identificação a nível de gênero. Através de análises *in silico*, observou-se uma comunidade core de aproximadamente 76% entre os dois sistemas de cultivo, maior diversidade alfa e número de biomarcadores no cultivo orgânico e a beta diversidade indicou que o tipo de cultivo explicou 25% da variação na composição da comunidade microbiana. Foram conduzidos ensaios *in vitro* para caracterização funcional dos isolados como: testes de solubilização de fosfato, produção de ácido indol-acético (AIA) produção de sideróforos e de fixação de nitrogênio; e, *in vivo*, com testes de germinação de sementes e inoculação em sementes semeadas em tubetes em casa de vegetação, a fim de avaliar o potencial das bactérias como BPCPs. Ao total, 61 isolados foram testados *in vitro*, com até 70% dos isolados de plantas sob cultivo orgânico apresentando capacidade de solubilização de fosfato e aproximadamente 80% exibindo potencial de produção de sideróforos. Já no cultivo convencional, os isolados se destacaram na capacidade de fixação biológica de nitrogênio, com 55% deles apresentando esta capacidade. Nos testes de germinação de sementes, os isolados oriundos do cultivo orgânico aceleraram significativamente a velocidade e o vigor germinativo, enquanto a *SynCom* formado por bactérias do cultivo convencional, formadas a partir de suas capacidades de promoção de crescimento, apresentou um efeito positivo significativo ($p < 0,05$) no aumento de massa (g) de raiz. Nos ensaios *in vivo*, 16 isolados promoveram um aumento significativo ($p < 0,05$) no volume radicular das plantas. Os resultados deste estudo reforçam o potencial das bactérias isoladas, especialmente sob cultivo orgânico, na promoção do crescimento vegetal e no desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a citricultura. Além disso, a formação de *SynComs* representa uma abordagem inovadora para a formulação de bioinsumos, contribuindo para a resiliência das plantas em diferentes condições de cultivo.

Palavras-chave: *microbiologia do solo; bactérias promotoras de crescimento; citros; sequenciamento 16S rRNA*

CHARACTERIZATION OF RHIZOBACTERIA IN THE 'SWINGLE' CITRUMELO ROOTSTOCK UNDER ORGANIC AND CONVENTIONAL CULTIVATION SYSTEMS

Author: NATHÁLIA MANCINE

Adviser: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

Co-adviser: Dra. HELENA SANTIAGO LIMA

ABSTRACT

Understanding the impact of the plant microbiome has driven new strategies to enhance agricultural production, especially in the face of climate change, increased prevalence of pathogens, and adverse growing conditions. Studying soil microorganisms is essential for transforming the rhizosphere to benefit plants, but there is still a knowledge gap regarding the prospecting of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) in citrus, particularly when comparing different cultivation systems. This project investigated citrus rhizobacteria under organic and conventional cultivation systems, aiming to identify microorganisms with potential for the formulation of synthetic communities (SynComs) and their application as bioinputs. Rhizospheric soil samples were collected for total soil DNA sequencing to perform metataxonomic analyses, and root samples were collected to isolate bacterial populations from the rhizosphere and rhizoplane using four culture media to maximize bacterial diversity. After morphological selection, the isolates were cryopreserved and taxonomically characterized by sequencing the V4-V5 region of the 16S rRNA gene using the Illumina platform (250x250bp paired-end), allowing identification at the genus level. Through in silico analyses, a core community of approximately 76% was observed across both cultivation systems, along with higher alpha diversity and a greater number of biomarkers in organic cultivation. Beta diversity indicated that the cultivation type explained 25% of the variation in microbial community composition. In vitro assays were conducted to functionally characterize the isolates, including phosphate solubilization, indole-3-acetic acid (IAA) production, siderophore production, and nitrogen fixation tests. In vivo assays were also carried out, including seed germination tests and seed inoculation in seedling trays under greenhouse conditions to assess the potential of the bacteria as PGPB. A total of 61 isolates were tested in vitro, with up to 70% of isolates from organically grown plants exhibiting phosphate solubilization ability and approximately 80% demonstrating siderophore production potential. In contrast, isolates from conventional cultivation stood out for their biological nitrogen fixation capacity, with 55% showing this trait. In the seed germination tests, isolates from the organic system significantly accelerated germination speed and vigor, while the SynCom formed from conventionally derived bacteria—selected based on their growth-promotion abilities—showed a significant positive effect ($p < 0.05$) on root mass (g). In the in vivo assays, 16 isolates significantly increased ($p < 0.05$) root volume in plants. The results of this study reinforce the potential of the isolated bacteria, particularly from organic cultivation, in promoting plant growth and developing sustainable strategies for citrus farming. Furthermore, the formation of SynComs represents an innovative approach for the formulation of bioinputs, contributing to plant resilience under different cultivation conditions.

Key-words: *soil microbiology; growth-promoting bacteria; citrus; 16S rRNA sequencing*

1. INTRODUÇÃO

As plantas evoluíram estabelecendo interações complexas com os microrganismos ao seu redor. Esses microrganismos habitam diversos tecidos vegetais e, coletivamente, compõem o microbioma vegetal. Estudos mostram que comunidades bacterianas e fúngicas associadas às plantas podem trazer benefícios significativos aos seus hospedeiros, como o aumento do crescimento e da tolerância a estresses bióticos e abióticos (Wang & Haney, 2020).

Dentre esses microrganismos, destacam-se as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs), comumente encontradas na rizosfera. Elas atuam de diversas formas: melhorando a absorção de nutrientes, produzindo fitohormônios, promovendo resistência induzida e contribuindo para a tolerância ao estresse (Kusstascher *et al.*, 2020). Contudo, a composição e a funcionalidade das BPCPs são fortemente influenciadas pelas práticas agrícolas adotadas. O interesse em BPCPs tem aumentado, contudo, seus efeitos em distintos sistemas de cultivo ainda requerem maior investigação. Essa área oferece um campo promissor para estudos sobre o impacto das práticas agrícolas e a busca por otimizações que beneficiem diretamente a saúde do solo e o rendimento das culturas (Flaviano *et al.*, 2025).

De modo geral, sistemas de agricultura orgânica são associados a maior biodiversidade microbiana e resiliência, enquanto o cultivo convencional tende a promover maior perturbação do solo e redução da diversidade microbiana (Flaviano *et al.*, 2025). Essa perturbação inclui o uso intensivo de insumos químicos, que compromete a saúde e o equilíbrio dos agroecossistemas, reduzindo a fertilidade do solo (Flaviano *et al.*, 2025).

Diante dos efeitos negativos dos agroquímicos, cresce o interesse por bioinoculantes como alternativa sustentável, visando reduzir a dependência de insumos químicos e promover a fertilidade de forma biológica (Basu *et al.*, 2021). Além disso, o uso racional de consórcios microbianos pode potencializar o desenvolvimento das culturas, melhorar a supressão de doenças e reduzir o uso de fertilizantes sintéticos (Munir *et al.*, 2022; Wang & Haney, 2020).

Embora muitos estudos apontem impactos positivos do cultivo orgânico sobre a estrutura e função do microbioma do solo, ainda há controvérsias quanto a qual sistema é mais favorável à qualidade do solo de forma ampla (Poshvina *et al.*, 2024). Sendo assim, este estudo parte da hipótese de que a rizosfera e o rizoplane de citros cultivados organicamente abrigam uma comunidade bacteriana mais diversa e funcionalmente benéfica ao desenvolvimento das plantas em comparação ao cultivo convencional, o que permitirá a formulação de *SynComs* com potencial bioinsumos. Esta hipótese será investigada por meio de análises *in vitro* e dados metataxonômicos do solo.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Isolar e analisar isolados bacterianos do sistema radicular de plantas de citros, sob os agrossistemas de cultivos orgânicos e convencional, a fim de definir comunidades sintéticas compostas por bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs).

Objetivos específicos

1. Sequenciar o DNA do solo rizosférico para análises metataxonômicas e caracterização da microbiota;
2. Realizar análises metataxonômicas para quantificar a diversidade microbiana (alfa e beta) e identificar biomarcadores taxonômicos (LEfSe) que diferenciem as comunidades bacterianas no solo rizosférico dos diferentes cultivos;
3. Isolar rizobactérias associadas a plantas cultivadas em diferentes sistemas de manejo;
4. Correlacionar os perfis microbianos obtidos por metataxonômica com os dados de sequenciamento das bactérias isoladas;
5. Avaliar, *in vitro*, os isolados selecionados quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal (solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos e auxinas);
6. Testar o impacto das BPCPs na germinação de sementes de citros e no desenvolvimento do sistema radicular, parte aérea e aspectos nutricionais das plântulas;
7. Desenvolver comunidades microbianas sintéticas (*SynComs*) a partir das BPCPs promissoras identificadas nos testes *in vitro*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Citrumelo 'Swingle' na agricultura

O porta-enxerto influencia o vigor e a produtividade das copas, além da qualidade dos frutos. Também afeta a tolerância a diferentes condições de estresse abiótico, como excesso ou déficit hídrico, e pode conferir resistência ou tolerância a pragas e doenças, especialmente as que afetam o sistema radicular. No Brasil, a citricultura tem sido amplamente baseada no limoeiro 'Cravo' e no citrumelo 'Swingle' [*C. paradisi* Macfad x *Poncirus trifoliata*], devido à baixa diversidade de porta-enxertos nas últimas décadas (Vitória, 2022).

O citrumelo 'Swingle' destaca-se por sua tolerância a diversas doenças, como o vírus da tristeza dos citros (CTV), exocortis, xiloporose e requeima dos citros. Além disso, apresenta resistência à gomose de *Phytophthora* e aos nematoides dos citros (POMPEU JR., 2005). A disseminação do vírus da tristeza dos citros (CTV), que causou a substituição da laranja azeda por sua alta sensibilidade à doença, impulsionou o uso de porta-enxertos como citranges e híbridos de *Poncirus trifoliata*, como o citrumelo 'Swingle'. Embora esses porta-enxertos possam ser suscetíveis a estresses abióticos, o citrumelo 'Swingle' e o limão Cravo exibem mecanismos adaptativos que os tornam moderadamente tolerantes à seca, permitindo que a planta mantenha o potencial hídrico dos tecidos (Modica *et al.*, 2025).

A resiliência ao estresse hídrico é avaliada por indicadores morfológicos e fisiológicos, como o fechamento estomático. No entanto, estudos indicam que genótipos como o citrumelo Swingle podem não ativar todos os mecanismos de mitigação da seca, como a redução da área foliar, levantando questões sobre sua adaptabilidade em condições de estresse hídrico prolongado (Modica *et al.*, 2025). Este trabalho revelou que a tangerina Sunki e o citrumelo Swingle, ambos porta-enxertos alternativos proeminentes ao limão Cravo, exibiram desempenho positivo em ambiente de sequeiro na localidade de Bebedouro, São Paulo, Brasil. Tal resultado foi notável especialmente na combinação com variedades de laranja de maturação tardia (Girardi *et al.*, 2017).

De acordo com Pompeu Junior e Blumer (2011) citrumelo 'Swingle' e W-2 como porta-enxerto para 'Valência' foram os mais produtivos no total de três colheitas superando o limão 'Cravo' EEL. Apesar do amplo uso comercial deste porta-enxerto, seu impacto no microbioma da rizosfera e endosfera ainda não é compreendido. Como o microbioma pode influenciar a saúde e o desempenho da planta, entender como esse porta-enxerto modula as comunidades microbianas na rizosfera e endosfera de laranjeiras, principalmente a laranja doce que representa 57% da produção total de frutas (Lima *et al.*, 2024), sendo assim, é essencial para otimizar estratégias sustentáveis de manejo na citricultura.

3.2 Interações solo, microrganismos e planta

As plantas possuem a endosfera que tem predisposição à colonização por microrganismos rizosféricos. Sendo assim, o recrutamento do microbioma ocorre em três zonas principais: rizosfera, filosfera e endosfera. A atividade das raízes modifica a atividade microbiana e as propriedades físico-químicas do solo da rizosfera (Santoyo, 2022). Uma vez estabelecida a microbiota, esses microrganismos auxiliam na aquisição de nutrientes e em troca, os microrganismos secretam compostos ácidos, íons hidroxila, compostos fenólicos, fosfatase que podem promover o crescimento geral da planta e resistência contra estresses bióticos e abióticos (Das *et al.*, 2022).

Os microrganismos associados às plantas têm um efeito positivo na saúde das plantas, influenciando a fisiologia e seu desenvolvimento, além de trazer benefícios na saúde do solo. Plantas e microrganismos começaram a se estabelecer através de comunicações químicas e físicas, onde plantas multicelulares permitiram que microrganismos selecionados se estabelecessem e colonizassem seus compartimentos internos (Santoyo, 2022). Um fator crucial na interação entre plantas e microrganismos é a liberação de compostos de carbono pelas raízes por meio de mucilagens e exsudatos que servem como fontes de energia para grupos microbianos específicos (Gonçalves *et al.*, 2023).

Vários fatores bióticos e abióticos afetam a associação a curto e a longo prazo entre plantas e seu microbioma. Os fatores abióticos incluem o pH do solo, disponibilidade de recursos como nutrientes, oxigênio, temperatura, água, presença de metais, salinidade e tipo de solo (Santoyo, 2022). O *trade-off* entre esses organismos, pode desenvolver parcerias distintas dependendo do impacto causado na planta. As práticas agrícolas, um fator antropogênico, incluindo dosagens de fertilizantes, pesticidas, poluição de práticas de cultivo perturbam a qualidade do solo e conseqüentemente, também influenciam a estrutura da composição microbiana ali presente (Shelake *et al.*, 2019).

Fatores associados às plantas promovem o crescimento de um conjunto de microrganismos preferível e a inibição de outros. A rizosfera não se distingue apenas do solo de forma química e física, mas também de forma biológica e ecológica, incluindo atividade de enzimas e microrganismos (Kuppe *et al.*, 2022). Dentre esses fatores o genótipo de hospedeiro, sistema imunológico, compartimento da planta, metabólitos, idade da planta, morfologia da raiz e seus exsudatos. Sendo assim, diferentes espécies de plantas variam em relação às suas comunidades da rizosfera (Shelake *et al.*, 2019).

3.3 Bactérias Promotoras de Crescimento (BPCPs)

As bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) são encontradas na rizosfera e auxiliam o crescimento das plantas de forma direta e indireta, colonizando as raízes

das plantas (Das *et al.*, 2022). Os mecanismos diretos incluem a produção de hormônios vegetais, solubilização de fosfatos e aumento da absorção de ferro. Já os efeitos indiretos, incluem a produção de antibióticos, competição nutricional, parasitismo, inibição de toxinas patogênicas e resistência induzida (El-Saadony *et al.*, 2022). De acordo com Abbas *et al.*, (2019), as BPCPs podem alterar a morfologia de raízes, aumentando sua área superficial e seu melhor desempenho, além de poder competir com outras bactérias colonizando rapidamente e acumulando um maior suprimento de nutrientes, impedindo o crescimento de outros organismos.

As bactérias produzem metabólitos e substâncias intra e extracelulares que facilitam sua funcionalidade e de seus vizinhos. As bactérias promotoras de crescimento em plantas podem produzir sideróforos, exopolissacarídeos (EPS), 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase) e ácido indolacético (AIA). Essas atividades, permite que as bactérias interajam com a rizosfera de forma mutuamente benéfica para a bactéria e para a planta (Kamath *et al.*, 2023). Sua capacidade biocontrole, ocorrem através da produção de bacteriocinas, proteínas antibacterianas e enzimas como peptídeos antimicrobianos (El-Saadony *et al.*, 2022).

Buscando alternativas mais sustentáveis para mitigar efeitos de insumos químicos, aumentou-se a procura por biofertilizantes ou bioinoculantes que são produtos de base microbiana que atuam como ferramentas para potencial promoção de crescimento e ação biocontrole (Basu *et al.*, 2021).

3.4 Bioinsumos como alternativa sustentável

Há uma necessidade urgente de agrossistemas mais sustentáveis que não comprometam a saúde do ecossistema, mas restaurem os solos já degradados, ao mesmo tempo que fornecem rendimentos suficientes para atender à crescente demanda global por alimentos (Lori *et al.*, 2023). Para o aumento da produção de culturas, fertilizantes químicos e pesticidas são usados excessivamente, com o objetivo de erradicar ou diminuir fitopatologias. Porém, ao longo dos anos evidenciou-se que o uso de insumos químicos a longo prazo apresenta vários efeitos adversos ao meio ambiente e a saúde humana. Além disso, o uso de pesticidas químicos pode causar danos generalizados ao ecossistema, afetando microrganismos não-alvo, reduzindo a diversidade microbiana benéfica no solo eleva riscos de invasão e colonização de patógenos em tecidos vegetais (Afridi *et al.*, 2022).

A inoculação microbiana destaca-se como uma vantagem essencial, promovendo relações simbióticas entre microrganismos benéficos e plantas, aumentando assim a absorção de nutrientes, reforçando a resiliência contra estresses ambientais e promovendo crescimento vegetal mais saudável e produtivo, atraindo um interesse significativo na

pesquisa pois leva a melhoria da aptidão física e da produtividade agrícola (da Cunha *et al.*, 2024).

Os bioinoculantes podem disponibilizar nutrientes através de processos naturais de fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fósforo e estimulação do crescimento de plantas (Ortiz & Sansinenea, 2022). Como bioprodutos eficientes, essas bactérias devem ser capazes de primeiramente sobreviver no solo, ser compatíveis com a cultura na qual estão sendo inoculadas e interagir com a microbiota nativa do solo (Ortiz & Sansinenea, 2022), além de colonizar suficientemente as raízes das plantas hospedeiras, adequar a rizosfera para o crescimento de plantas e aumentar a biodisponibilidade de nitrogênio, fósforo e potássio (Basu *et al.*, 2021).

O uso de BPCPs em forma de consórcio têm recebido interesse nos últimos anos. A projeção de comunidades sintéticas (SynComs) é dado pelo consórcio de bactérias promotoras de crescimento a fim de imitar o papel de um microbioma específico (Marín, González & Poupin, 2021). A pesquisa com SynCom vem crescendo e combina biologia sintética com conhecimentos obtidos por estudos de microbiomas, metagenômica e bioinformática, que se tornaram mais acessíveis com as novas tecnologias de sequenciamento. Compreender como os microrganismos interagem dentro desses ecossistemas ajuda a criar consórcios microbianos mais estáveis, previsíveis e eficientes (Shayanthan, Ordoñez & Oresnik, 2022). Essa abordagem promete otimizar a interação entre microrganismos e plantas, possibilitando aplicações mais eficazes na promoção do crescimento vegetal e na adaptação a diferentes condições agrícolas.

3.5 O Papel da Metataxonômica na Validação de Ensaios *In Vitro*

Métodos independentes de cultivo para comunidades microbianas demonstram que a maioria dos microrganismos ambientais são recalcitrantes ao cultivo e constituem a chamada “matéria escura microbiana”. Métodos dependentes de cultivo selecionam apenas táxons facilmente cultiváveis e de rápido crescimento, que podem representar apenas 1% de toda a diversidade (Riva *et al.*, 2022).

A análise de dados metataxonômicos contribui significativamente para estudos de agroecossistemas e facilita a compreensão dos microrganismos presentes no solo, o que é importante para alcançar avanços tecnológicos e auxiliar a agricultura. Recentemente, muitas pesquisas têm se concentrado nas características biológicas de microrganismos cultiváveis, o que é uma abordagem promissora, mas limitada se considerada isoladamente (Nwachukwu & Babalola, 2022). Sendo assim, fornece informações características sobre os microrganismos presentes, incluindo a composição microbiana, identidade e abundância relativa de todos os táxons na comunidade, independente de cultivo (Philippot *et al.*, 2013). Portanto, o cruzamento de informações do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) de

bactérias cultivadas da rizosfera/rizoplano/endosfera com informações do sequenciamento metataxonômico de amostras de DNA total do solo/raiz é uma ótima maneira de entender melhor a capacidade dos microrganismos que podem ser bioprospectados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

As coletas para a realização da amostragem, ocorreram na fazenda São José, localizada em Rio Claro – São Paulo (22°18'18.524"S / 47°31'35.525"W). Na fazenda foram diferenciados dois talhões de citros de acordo com o cultivo agrícola: um talhão sob cultivo orgânico, segundo as diretrizes do Instituto Biodinâmico (<https://www.ibd.com.br/>) e outro talhão sob cultivo convencional. Em ambos os sistemas de manejo são cultivados limoeiros da variedade Siciliano (*Citrus lemon*) enxertados no porta-enxerto de citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* MACF x *Poncirus trifoliata* (L) RAF). O solo predominante é classificado como Neossolo Quartzarêrino. Portanto, ambos os talhões possuem as mesmas características de solo, e variedades de citros (copa e porta-enxerto), portanto eliminando qualquer variável de estudo que não seja o tipo de manejo da cultura.

Em ambas as condições foram coletadas amostras de solo e raízes de cinco plantas aleatórias, porém preferenciando aquelas que visualmente apresentavam-se sadias. De cada planta, raízes jovens foram coletadas entre 5 e 15 cm de profundidade, sendo agitadas manualmente para retirar excesso de solo e armazenadas em sacos plásticos sobre as quais aspergiu-se tampão fosfato salino (PBS) autoclavado com objetivo de manter a hidratação do material coletado. Raízes com até 3 mm de diâmetro e distantes aproximadamente 25 cm da base do tronco foram preferenciadas.

4.2 Coleta de solo para análises químicas e metataxonômica

Foi determinado a caracterização química do solo pela metodologia por Raji *et al.* (2001), no Instituto Agronômico de Campinas (IAC). O pH foi analisado em solução de CaCl₂ 0,01 M, e a acidez trocável foi determinada após a diluição das amostras em solução tampão SMP; a matéria orgânica (MO) foi quantificada por colorimetria após oxidação com dicromato; o fósforo (P) foi extraído utilizando resinas de troca iônica e determinado por colorimetria; o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg) foram extraídos pelo mesmo método e quantificados por espectrofotometria de absorção atômica; potássio (K) foi extraído com resinas de troca iônica e quantificado por fotometria de chama; micronutrientes cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) foram extraídos com ácido dietilenotriamina pentaacético (DTPA) e analisados por espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; o boro (B) foi extraído por meio do método de água quente e quantificado por colorimetria. (Lima *et al.*, 2024).

4.3 Análises Metataxonômicas

4.3.1 Determinação da composição da comunidade microbiana total do solo rizosférico.

O DNA total do solo rizosférico amostrado dos solos coletados foram extraídos usando o kit FastDNA spim kit for Soil (MPbio), seguindo as recomendações do fabricante para detalhes e enviados para sequenciamento NGS usando a plataforma Illumina NovaSeq x 250pb PE. Um total de 40 amostras foi sequenciado para a região V4-V5 do gene 16S rRNA (515F 5'GTGCCAGCMGCCGCGGTAA3' e 907R 5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT3') para sequenciamento de bactérias e 1-5F do gene ITS (ITS5-1737F 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' e ITS2-2043R 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3') para sequenciamento de fungos, na empresa Novogene (<http://www.novogene.com/>).

4.3.2 Processamento e análise dos dados brutos de sequenciamento

O resultado do sequenciamento foi processado utilizando o ambiente R (version 4.0) utilizando o pacote DADA2 (version 1.18.). O parâmetro erro esperado (maxEE = 2) foi usado para remover *reads* de baixa qualidade. Um modelo de erro foi utilizado para realizar a inferência das Amplicon Sequence Variant (ASV) (Callahan *et al.*, 2017). As *reads* forward e reverse foram alinhados e as quimeras removidas. O banco de dados Silva versão 138 (<http://www.arb-silva.de>) foi utilizado para afiliar taxonomia.

4.3.3 Análises de bioinformática e estatísticas

Para visualizar a dissimilaridade entre as amostras foi realizado o Principal Coordinates Analysis (PCoA), baseado na matriz de dissimilaridade Bray-Curtis, a nível de ASV. Para verificar a separação dos grupos no PCoA, a Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) foi realizada. Para a mensuração da diversidade foram avaliados 3 diferentes índices, sendo eles o Shannon, Richness e Simpson. As diferenças da abundância das ASV entre as amostras foram testadas usando Kruskal-Wallis e o p-valor ajustado por FDR. Todas as análises estatísticas foram realizadas no R (version 4.0) (R core team, 2021) com o suporte dos pacotes Vegan (Oksanen *et al.*, 2013), McToolsR e Phyloseq (McMurdie *et al.*, 2013).

4.4 Metodologia de isolamento para obtenção da biblioteca de rizobactérias

No laboratório, as raízes coletadas foram manipuladas o mais assepticamente possível dentro de possibilidade de cada uma das etapas de preparo das amostras.

4.4.1 Preparo das amostras

Para iniciar o preparo das amostras, foi removido qualquer material que não fosse raiz fresca de citros. A lavagem das amostras foi adaptada pela metodologia de Barillot *et al.*, (2013). Com as raízes dentro dos sacos plásticos com tampão fosfato salino (PBS), seguiu-

se com agitação manual de forma vigorosa para desvencilhar o solo aderido às raízes. Em seguida, as raízes foram fragmentadas em pedaços menores e pesadas padronizando-se 200 gramas de raízes por planta. Cada amostra foi então transferida para “beckeres” previamente autoclavados (um por amostra), aos quais foram adicionados 200 mL de tampão PBS autoclavado, de modo que as raízes ficassem completamente imergidas, adicionando-se então 100 µL Tween 20 por litro. Os beckeres contendo as amostras foram fechados com papel alumínio e mantidos a 150 rpm por 90 min para homogeneizar o conteúdo

4.4.2 Isolamento e seleção das rizobactérias para biblioteca

Após a agitação, foi retirado 40 mL de sobrenadante da solução e transferidos para tubos Falcom de 50 mL, centrifugados à 150 g por 20 min. Desta alíquota de 40 mL de solução sobrenadante, retirou-se 1 mL do sobrenadante o qual foi diluído serialmente em 9 mL de tampão PBS até a terceira diluição.

O isolamento foi realizado utilizando-se a metodologia mencionada de Lima *et al.*, (2024), utilizando quatro tipos de meio de cultura, sendo dois seletivos e dois indeterminadas (ricos), visando abranger a maior riqueza de microrganismos possível. Os meios utilizados foram o R2A (Reasoner’s 2ª agar) para bactérias de crescimento lento, TWYE (Tap Water Yeast Extract) e TSA 10% (Tryptic Soy agar) são ricos e não seletivos, para crescimento de ampla gama de espécies bacterianas e PSM (*Pseudomonas syringae* Medium) é específico para espécies de *Pseudomonas*, gênero com alto potencial de promoção de crescimento em plantas (Lima *et al.*, 2024).

O meio de cultura R2A (0,5 g de proteose peptona, 0,5 de ácido casamínico, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 de glicose, 0,5 de amido solúvel, 0,3 g de K₂HPO₄, 0,024 g de MgSO₄, 0,3 g de piruvato de sódio e 15 g de ágar / L) e o PSM (15 g de sacarose, 3,75 g de peptona, 0,38 g de K₂HPO₄, 0,1 g de MgSO₄ e 15 g de ágar / L), seletivos para bactérias de crescimento lento e específico para espécies do gênero *Pseudomonas*, respectivamente. Os meios indeterminados utilizados foram o TSA 10 % (1,5 g de triptona, 0,5 g de peptona de soja, 0,5 g de NaCl e 15 g de ágar / L) e o TWYE (0,25 g de extrato de levedura, 0,50 g de K₂HPO₄ e 15 g de ágar / L), os meios ricos suportam o crescimento de uma alta riqueza de crescimento bacteriano (Lima *et al.*, 2024).

Um total de quatro placas para cada tipo de meio foi utilizado, totalizando 16 placas de Petri de 15 cm de diâmetro por amostra. As placas foram incubadas em BOD à 24 °C por 48 h.

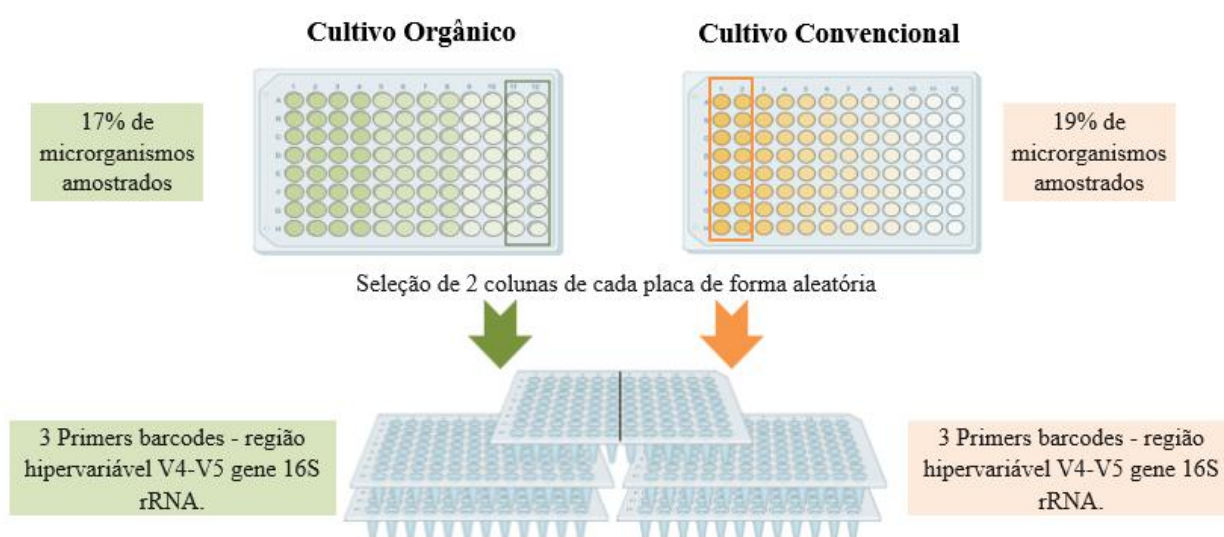
Após a incubação, as colônias crescidas foram selecionadas com o auxílio de palitos de dente autoclavados e transferidas para placas de cultura permanente de 96 poços contendo 200 µL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) previamente autoclavado. A seleção das colônias foi baseada em diferenças morfológicas, incluindo réplicas de colônias com morfologia

semelhante. As placas de cultura permanente de 96 poços, foram incubadas em agitador a 200 rpm por 48 h à 28 °C. Uma alíquota de 50 µL do meio com crescimento bacteriano foi usada para inocular em uma placa réplica. Em ambas as placas foi adicionado 90 µL de glicerol a 50%. Uma das placas foi armazenada em condições criogênicas (-80 °C) e a outra a -20 °C para trabalhos de tipificação através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.

4.5 Seleção de isolados para amostragem

Após o isolamento de todos os microrganismos cultiváveis, obteve-se um total de 1344 amostras de microrganismos do cultivo orgânico e 1056 do cultivo convencional, criopreservados em ultrafreezer -80°C em placas de 96 poços. Devido ao alto número de microrganismos presentes na biblioteca e a possível redundância de resultados no sequenciamento, foi feita uma amostragem da biblioteca para otimizar o processo de PCR e sequenciamento. Essa seleção foi feita de forma aleatória, selecionando colunas em placas de 96 poços de cultura permanente que fossem de plantas e coletas diferentes a fim de amostrar a maior diversidade de bactérias possível. Sendo assim, o cultivo orgânico contava com 14 placas de 96 poços e o cultivo convencional de 11 placas. De cada uma das placas e de forma aleatória, foram selecionadas duas colunas (16 amostras) para amostragem. Ao final, obteve-se 17% (224 isolados microbianos) do cultivo orgânico e 19% (176 isolados microbianos) do cultivo convencional foram selecionados, prosseguindo com a etapa de PCR com 3 primers barcodes para cada cultivo (**Figura 1**).

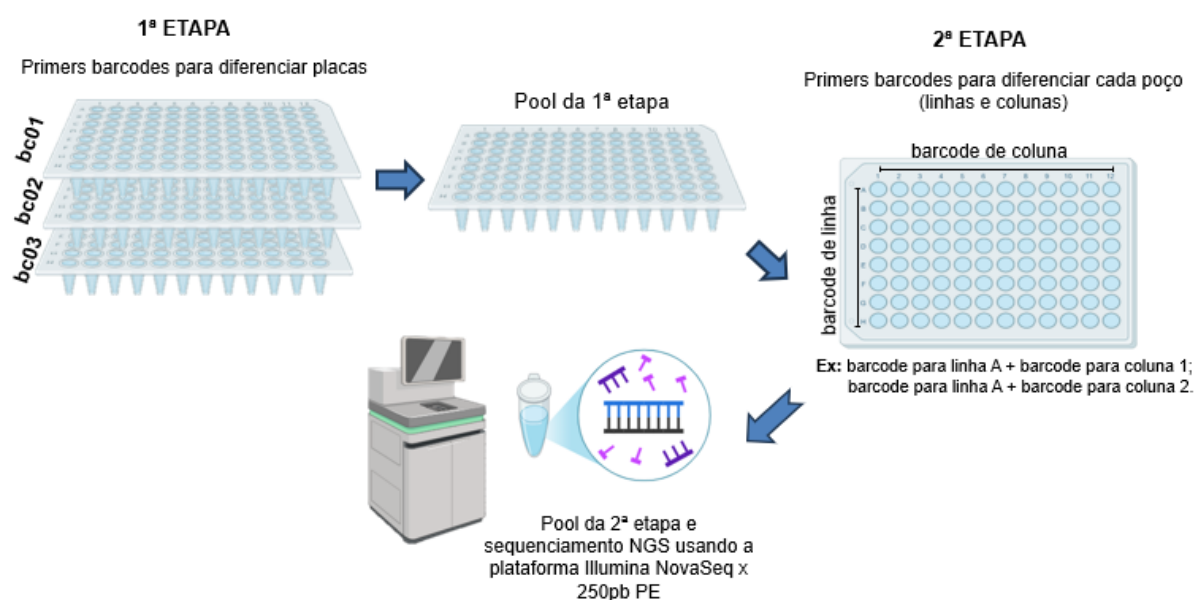
Figura 1. Representação esquemática do processo de amostragem de isolados microbianos criopreservados do projeto, visando a otimização do sequenciamento.



4.6 Amplificação do fragmento do gene 16S rRNA

A metodologia de amplificação da região V4–V5 do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos foi estabelecida utilizando-se duas etapas de amplificação. Na primeira etapa os iniciadores 515Y –GTGYCAGCMGCCGCGGTAA e 926r – CCGYCAATTYMTTTRAGTTT foram usados onde nos iniciadores reverso (926r) estão os códigos (barcodes) para identificação de placas (**Figura 2**) adaptando a metodologia de Armanhi *et al.*, (2016).

Figura 2. Representação esquemática da estratégia multiplex para amplificação da região V4-V5 do fragmento 16S rRNA da comunidade bacteriana amostrada da coleção estabelecida de rizobactérias.



As amplificações foram estabelecidas utilizando-se a enzima GoTaq G2 DNA Polymerase (Promega Corp.) para um volume final de 20 µL contendo 10 µM dos iniciadores, 10 mM de cada dNTP e 4 µL do DNA. As amplificações foram realizadas numa ciclagem de 20X (95 °C, 55 °C e 72 °C - 30 s em cada etapa) precedida por desnaturação inicial a 95 °C (5 min). Previamente a segunda etapa de amplificação os produtos da PCR da primeira etapa foram agrupados e purificados usando-se o sistema ExoSap PCR Cleanup (Thermo Fischer Scientific). Na segunda etapa de amplificação utilizou-se iniciadores forward e reverse Nextera XT DNA Library Prep Kit (FC-120-1012; Illumina, San Diego, CA, USA), os iniciadores forward (i5 - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA) possuem 8 diferentes barcodes, compostos por 8 pares de bases, para identificação das linhas e os iniciadores reverso (i7 - CAAGCAGAAGACGGCATACTGAGA) possuem 12 barcodes, compostos por 8 pares de base, para as colunas, completando a identificação para uma placa de 96 poços (Armanhi *et al.*, 2016).

As amplificações foram padronizadas usando-se a enzima VeriFi Hot Start Polimerase (PCR Biosystems, UK) para um volume final de 20 µL contendo 10 µM dos iniciadores, 10mM

de cada dNTP e 3 µL do DNA purificado. Utilizou-se ciclagens com 30X (95 °C - 15 s, 58 °C - 30 s e 72 °C - 45 s) precedida por denaturação inicial a 95 °C (12 min) e extensão final a 72 °C - 45 s. Ao final do todo o processo de amplificação os produtos da PCR serão agrupados, purificados e enviados para preparo das bibliotecas e sequenciamento.

4.7 Demultiplexação e seleção de ASVs

Os dados de sequenciamento da coleção biológica de rizobactérias foram processados no ambiente R (versão 4.0) utilizando o pacote DADA2 (versão 1.18). Utilizou-se o parâmetro $\text{maxEE} = 2$ para remover reads de baixa qualidade e um modelo de erro para inferir as Amplicon Sequence Variants (ASVs), conforme descrito por Callahan *et al.* (2017). As reads forward e reverse foram alinhadas e quimeras removidas. A afiliação taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados Silva versão 138 (<http://www.arb-silva.de>).

Primeiramente, as amostras foram demultiplexadas no software QIIME 2, separando-as com base em barcodes específicos do segundo round de PCR, resultando em 96 amostras individualizadas. Posteriormente, no software Fgbio, as amostras foram demultiplexadas por placas utilizando barcodes específicos do primeiro round de PCR, o que resultou em 424 amostras individualizadas. Devido à limitação do tamanho dos fragmentos gerados pela tecnologia Illumina na região V4-V5 do 16S rRNA, a identificação das ASVs foi possível até o nível de gênero. Foram priorizadas as sequências que apresentaram similaridade significativa com gêneros bacterianos conhecidos por suas capacidades de promover o crescimento de plantas ou de mostrar antagonismo a estresses bióticos e abióticos, desde que apresentassem cobertura mínima de 100 *reads*. Essas etapas são cruciais para assegurar a qualidade e a precisão na análise das comunidades bacterianas associadas às raízes das plantas estudadas.

4.8 Testes *in vitro*

No total, 60 isolados foram selecionados para triagem *in vitro*, sendo 29 do cultivo orgânico e 31 do cultivo convencional priorizando microrganismos já descritos na literatura como promotores de crescimento. Para a realização dos ensaios *in vitro*, 200 µL da cultura permanente de cada isolado foi recuperada em 2 mL de meio LB e incubada a 30 °C e 160 rpm por aproximadamente 24 h. Após este período, a densidade óptica foi padronizada para $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$.

4.8.1 Solubilização de fosfato

Para a seleção de linhagens solubilizadoras de fosfato a metodologia de Freitas *et al.* (1997) foi utilizada, utilizando caldo BD (Caldo de Batata-Dextrose, Kasvi®) suplementado

com 5 g/L de extrato de levedura. Após a autoclavagem, o meio BD deve ser resfriado e as soluções de K_2HPO_4 10% (50 mL/L) e $CaCl_2$ 10% (10 mL/L) são adicionadas. As soluções não podem ser autoclavadas e devem ser esterilizadas separadamente por filtração em membrana de 0,22 μm . Quando K_2HPO_4 e $CaCl_2$ entram em contato ocorre a formação de $Ca_3(PO_4)_2$ (fonte de fósforo insolúvel) tornando o meio turvo.

4.8.1.1 Ensaio e quantificação

Em cada placa de Petri de 6 cm de diâmetro foram pipetados 3 spots de 10 μL cada e mantidas em câmara de fluxo laminar para secar. Após as placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C. Se após o crescimento das colônias houver formação de halo translúcido considera-se o isolado como capaz de solubilizar a fonte de fosfato presente no meio. A capacidade de solubilização é quantificada através da razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Para cada isolado foi utilizada a média dos 3 spots. A medição de halos foi feita através do software ImageJ.

4.8.2 Determinação da produção de AIA (ácido indol acético)

Inicialmente uma solução estoque de triptofano a 50 mM (10,2 g/L) foi preparada e 100 mL dessa solução foi adicionada em 900 mL de meio BD (Caldo de Batata-Dextrose, Kasvi®) para obter concentração final de 5 mM. Em tubos tipo Falcom de 15 mL foi adicionado 2 mL de BD com 5 mM de triptofano e 200 μL do inóculo previamente preparado. Os tubos foram incubados a 30 °C em agitação a 160 rpm por 48 horas. Passado esse período, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos.

Seguindo a metodologia adaptada de Bric *et al.* (1991) 150 μL do sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato. O mesmo volume do reagente de Salkowski (3,5 mL de HCL; 1,35 g de $FeCl_6 \cdot H_2O$ para 10 mL com água destilada) é adicionado e a placa mantida por 30 min em temperatura ambiente sob proteção da luz. Após esse período foi feita leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Para quantificação da produção de AIA uma curva padrão foi realizada e através da equação de regressão linear obtida das concentrações de AIA sintético (Sigma) iguais a 0, 50, 150, 250, 350, 450 $\mu g/mL$ e interpolados com as respectivas absorbâncias a 540 nm. O reagente apresenta coloração amarelada e em contato com a AIA sofre alteração de cor para rosa/vermelho.

4.8.3 Produção de sideróforos

Inicialmente, 20 g de LB broth (Sigma) e 30,24 g de PIPES foram adicionados em 890 mL de água e o pH ajustado para 6,8 com pastilhas de NaOH. Após autoclavagem do meio as seguintes soluções, após filtragem em 0,45 μm , foram adicionadas; **1**) Solução férrica (adicionou-se 0,027 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e 30 μL de HCl em 10 mL de água destilada); **2**) Solução

CAS (adicionou-se 60,5 mg de azul de cromoazurol em 50 mL de água destilada) e **3) Solução CTAB** (dissolveu-se 72,88 mg de CTAB em 40 mL de água destilada). Após o preparo das três soluções, junta-se a solução de CTAB lentamente a solução CAS para não fazer muita espuma, e por fim adiciona-se 10 mL da solução férrica. Quando a solução férrica é adicionada, a solução CAS sofre alteração da cor laranja para azul. Os 110 mL totais devem ser filtrados no fluxo laminar em membrana de 0,45 μm e adicionados ao meio LB + PIPES previamente autoclavado e resfriado. A medição de halos foi feita através do software ImageJ.

4.8.3.1 Quantificação de sideróforos

Para quantificar o sideróforo produzido 10 μL do inóculo previamente preparado foi plaqueado em triplicata em placas Petri com 6 cm de diâmetro, mantendo-as em fluxo laminar para secarem. Após serem incubadas por 72 horas a 30°C, as colônias que apresentaram um halo cor de laranja ao seu redor foram consideradas produtoras de sideróforos. A capacidade de produção de sideróforos foi quantificada através da razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Para cada isolado foi utilizada a média dos 3 spots.

4.8.4 Fixação Biológica de Nitrogênio

Para este teste foi utilizada a metodologia de Cordova-Rodriguez *et al.* (2022). Inicialmente o meio de cultura NFb foi preparado adicionando 5 g/L de ácido málico; 0,5 g/L de K_2HPO_4 ; 0,2 g/L de MgSO_4 ; 0,1 g/L de NaCl; 0,02 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 mL/L de solução de micronutrientes (0,04 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,40 g/L de H_3BO_3 , 1,0 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1,175 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e 4,5 g/L de KOH. Devido ao alto valor de pH, os componentes foram adicionados na ordem acima para evitar a precipitação de Fe e outros sais e o pH foi ajustado para 6,5. Após o preparo adicionou-se 1,8 g de ágar a fim de obter o meio de forma semissólida e posteriormente foi autoclavado.

Depois de autoclavado, adicionou-se ao meio de cultura, 2 mL/L de solução de azul de bromotimol (5 g/L de azul de bromotimol em KOH 0,2 N); 4 mL/L de solução de ácido Fe-etilendiaminotetracético (EDTA) (16,4 g/L Fe-EDTA); 1 mL/L de solução vitamínica (10 mg de biotina e 20 mg de piridoxal-HCl em 100 mL de água destilada), que foram filtrados no fluxo laminar em membrana de 0,45 μm . O meio de cultura foi então transferido para tubos de ensaio de 50 mL previamente autoclavados.

As bactérias foram inoculadas no interior do meio de cultura, pipetadas em um volume de 10 μL , e foram realizadas em triplicata. Os tubos de ensaio foram incubados a 28°C por 48 horas em BOD. O meio de cultura contém azul de bromotimol em sua composição, sendo este um indicador de pH, a alteração da cor do meio verde turquesa para azul escuro foi considerada positivo para a fixação de nitrogênio. A avaliação do experimento foi feita através do software ImageJ, através da medição de cores por número de pixels na imagem.

4.9 Testes in vivo

4.9.1 Teste de Germinação

Esse teste foi feito em duas etapas, sendo primeiramente realizado apenas com isolados da primeira seleção (**Figura 13**) buscando testar uma maior diversidade de representantes de gêneros e otimizando a quantidade de isolados inoculados; e posteriormente, testado com *SynComs* das bactérias que tiveram os melhores resultados.

Seguindo a metodologia de Carvalho *et al.*, (2021), para este teste, são utilizadas 30 sementes para cada tratamento. Neste experimento, foram utilizadas sementes de citrumelo *Swingle*, Primeiro as sementes foram desinfestadas utilizando solução de 5 % (v/v) de hipoclorito de sódio e 0,01 % (v/v) de Tween 20, após isso, lavadas três vezes em água destilada autoclavada. Posteriormente, as sementes foram padronizadas em relação a umidade em condições de 10 °C com 100 % de umidade relativa, no escuro. No dia seguinte, com os inóculos previamente prontos e com $D.O_{600nm} = 1$, as sementes foram embebidas nos inóculos por 40 min e após esse processo, secas naturalmente em temperatura ambiente.

Para cada tratamento, foram utilizadas três folhas de papel de germinação (Germitest ®) previamente autoclavadas (duas folhas embaixo e uma folha em cima). Ajustou-se a umidade do papel, pesando por vez, quinze folhas e multiplicando x 2,4 o peso em mL de água destilada autoclavada. As folhas foram colocadas em uma bandeja e molhadas com a água destilada autoclavada. Foi semeado nos papéis as trinta sementes, depois disso, o papel foi enrolado e incubado em B.O.D à 27 °C por 40 dias. As avaliações foram feitas uma vez na semana, contando o número de sementes germinadas e após a finalização do experimento, foi feita a pesagem de massa fresca da raiz, após 3 dias incubadas em uma estufa a 40°C foi feita a pesagem de massa seca. Através dos valores obtidos de massa seca e massa fresca foi calculado o índice de biomassa seca (massa seca – massa fresca).

4.9.2 Ação de sinergismo entre microrganismos – ação indireta

Após os testes para avaliar possíveis BPCPs (itens 4.1 a 4.6), as três bactérias de cada cultivo que apresentaram melhores resultados e que foram positivas em mais de um teste foram testadas para ações de sinergismo segundo adaptação à metodologia descrita por Berendsen *et al.*, 2018. Estes isolados foram recuperados da cultura permanente em placas de 96 poços de meio de cultura, 200 µL foram inoculadas em 2 mL de meio de cultura LB e incubadas a 28 °C overnight sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento, a densidade óptica foi ajustada para OD_{600nm} : 0,5. O volume de 5 µL dessas diluições serão inoculados em placa de Petri contendo meio LB com uma pipeta multicanal, criando um V com 8 spots de cada bactéria. Para validação dos resultados, foi feita uma placa de cada BPCPs isoladamente em 8 spots como controle. As placas foram seladas e incubadas a 28 °C pelo período de 2 dias.

Passado este período foram observadas a formação sinérgica entre os isolados. Isolados que mostraram sinergismo, serão inoculados na segunda etapa do *screening in vivo* testando microrganismos em consórcio. Este é importante para avaliar se não há inibição entre os microrganismos.

Além da metodologia mencionada acima, foi feita a metodologia adaptada de Tyc *et al.*, (2015) para avaliar o efeito dos voláteis bacterianos emitidos no crescimento mútuo das bactérias de forma indireta. Para isso, os ensaios foram realizados em placas de Petri contendo áreas de crescimento superior e inferior, seladas as bactérias em pares.

4.9.3 Formação de *SynComs*

Com base nos resultados preliminares do potencial de cada isolado em acelerar a germinação, foram selecionados, em ambos os cultivos, aqueles que apresentaram melhor desempenho (**Figura 14**) para a formação de comunidades sintéticas (*SynComs*) e posterior avaliação de seus efeitos na germinação das sementes. Para o cultivo orgânico, foram selecionadas as bactérias *Microvirga*-IAC86, *Siccibacter*-IAC111 e *Sphingomonas*-IAC115 e para o cultivo convencional, as bactérias *Chryseobacterium*-IAC42, *Pseudomonas*-IAC97 e *Yokenella*-IAC135.

A seleção dos *SynComs* para inoculação em plântulas de citrumelo 'Swingle' em casa de vegetação foi baseada nos resultados obtidos nos testes *in vitro*, priorizando diferentes ASVs dentro de um mesmo *SynCom* e bactérias que apresentaram resultados positivos em pelo menos três testes *in vitro*. No *screening in vivo*, foram estabelecidos três tipos de *SynComs*: um específico para o cultivo convencional, um para o cultivo orgânico e um "geral", composto pelas cepas mais promissoras, independentemente do cultivo de origem. As bactérias selecionadas para o *SynCom* "geral", *Chryseobacterium*-IAC42, *Siccibacter*-IAC110 e *Acinetobacter*-IAC167; para o cultivo convencional foram *Chryseobacterium*-IAC42, *Pseudomonas*-IAC103 e *Siccibacter*-IAC110; e, para o cultivo orgânico, *Bacillus*-IAC26, *Sphingomonas*-IAC115 e *Acinetobacter*-IAC167.

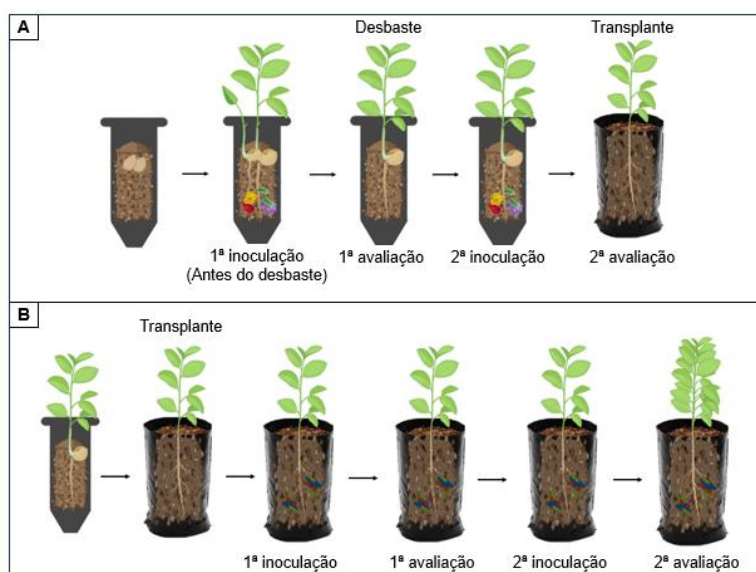
Para preparo das *Syncoms*, foi feito um inóculo individual de cada bactéria, ajustada a $D.O_{600nm} = 1$ e após ajuste, as bactérias foram misturadas em Erlenmeyer. No teste de germinação, seguiu o protocolo de imergir as sementes no inóculo e no teste em casa de vegetação, foi inoculado 3 mL do inóculo próximo as raízes das plântulas.

4.9.4 Experimento em casa de vegetação – inoculação das BPCPs

Este experimento foi dividido em duas partes, sendo primeiro os testes com microrganismos isolados (**Figura 3**) e posteriormente, após os resultados anteriores, foram selecionados os melhores microrganismos isolados e usamos para o segundo experimento, testados em consórcio.

Para este teste, os tubetes foram desinfestados utilizando solução de 5 % (v/v) de hipoclorito de sódio e 0,01 % (v/v) e lavadas três vezes em água corrente e secos naturalmente. No primeiro experimento, foram utilizados 15 tubetes por tratamento, já no segundo experimento, 40 tubetes. Para esse experimento optou-se por utilizar substrato buscando mimetizar condições de campo, sem esterilizá-lo previamente. Sendo assim, todos os tubetes foram previamente preenchidos com substrato no dia anterior ao experimento e com abertura de “covas” para sementeira de 3 cm de profundidade. No dia seguinte, duas sementes foram semeadas por cova aguardando a germinação.

Figura 3. Esquema de condução dos testes in vivo em casa de vegetação e suas avaliações. **A.** inoculação de bactérias de forma isolada. **B.** inoculação de bactérias como consórcio.



As inoculações foram feitas antes de um período de estresse pelas plântulas. Sendo, antes do desbaste das plântulas e antes do transplante. Para as inoculações são pipetados 1 mL dos inóculos previamente prontos e com $D.O_{600nm} = 1$ em cada um dos tubetes. O *screening in vivo* foi feito apenas com os isolados da primeira seleção (**Figura 13**), buscando avaliar a maior diversidade de representantes gêneros e otimizando a quantidade de isolados inoculados e de plântulas de citrumelo *Swingle* em casa de vegetação.

O *screening in vivo* foi avaliado pelo LA2400 Scanner for WhinRHIZO™ (Regent Instruments Canada Inc.) que padroniza os resultados em sete parâmetros de raiz impactados pela aplicação dos microrganismos no crescimento das plântulas de citrumelo 'Swingle'. Os parâmetros obtidos, são: **1) Lenght**, comprimento de raízes; **2) ProjArea**, área projetada de raiz; **3) SurfArea**, área de superfície de raízes; **4) AvgDiamMeasured**, diâmetro médio medido; **5) RootVolumeMeasured**, volume de raiz medido; **6) RootVolumeEstimated**, volume de raiz estimado; **7) Tips**, pontas radiculares; **8) Forks**, bifurcações radiculares; **9)**

Crossings, densidade de raízes medidas através dos cruzamentos entre elas na análise; **10) LenPerVol**, comprimento por volume de raiz.

Além das análises morfológicas de raiz realizadas com o scanner WinRHIZO, foram conduzidas avaliações fisiológicas utilizando um equipamento IRGA (analisador de infravermelho multicanal). Este instrumento quantifica a variação de CO₂ e H₂O no fluxo de ar, permitindo o cálculo simultâneo da fotossíntese, transpiração e condutância estomática (Carvalho, 1997). Através do IRGA é possível a aferição (A), taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (gs), condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); (Ci), concentração interna subestomática de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e (E), taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Cavalcanti, 2014).

5. RESULTADOS

5.1 Análise química do solo

A análise química do solo foi realizada a fim de verificar a homogeneidade dos parâmetros químicos do solo onde as plantas foram coletadas e sob os diferentes tipos de cultivo. Na Tabela 1, estão apresentadas as médias das cinco amostras coletadas para cada cultivo.

Tabela 1. Média (n=5) dos parâmetros químicos do solo para os cultivos orgânico e convencional. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey. Nível de significância $\alpha=0,05$.

Componentes químicos	Orgânico	Convencional
M.O. (g/dm ³)	15,20 a	16,20 a
pH	6,46 a	6,02 b
P (mg/dm ³)	33,62 a	34,80 a
K (mmolc/dm ³)	4,20 a	1,80 b
Ca (mmolc/dm ³)	129,80 a	138,60 a
Mg (mmolc/dm ³)	16,40 a	26,20 a
H + Al (mmolc/dm ³)	9,00 b	11,20 a
S.B. (mmolc/dm ³)	150,40 a	166,60 a
C.T.C. (mmolc/dm ³)	159,40 a	177,80 a
V%	94,00 a	93,40 a
B (mg/dm ³)	0,45 a	0,57 a
Cu (DTPA pH 7,3)	22,48 a	48,50 a
Fe (DTPA pH 7,3)	20,20 b	29,40 a
Mn (DTPA pH 7,3)	6,68 a	3,72 b
Zn (DTPA pH 7,3)	10,06 a	10,36 a

Nota: M.O: matéria orgânica; P: fósforo; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; H +Al: acidez potencial do solo; S.B.: soma de bases trocáveis; C.T.C: capacidade de troca de cátions; V%: saturação por bases; B: boro; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Zn: zinco.

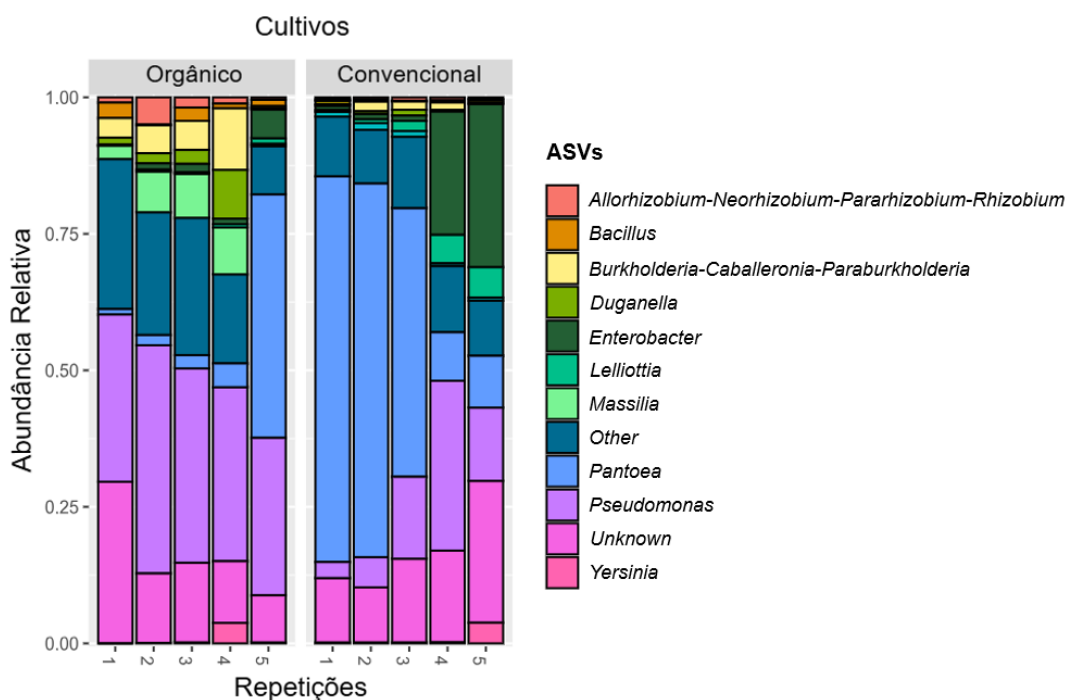
Os dados químicos do solo demonstram que o pH do cultivo convencional é mais ácido quando comparado ao cultivo orgânico e maior quantidade de Fe ($p < 0.05$), comparado ao cultivo orgânico. Já o solo coletado do cultivo orgânico, apresenta maiores concentrações de K e Mn do que solo do sistema convencional.

5.2 Metataxonômica

5.2.1. Similaridade entre isolamento e metagenômica

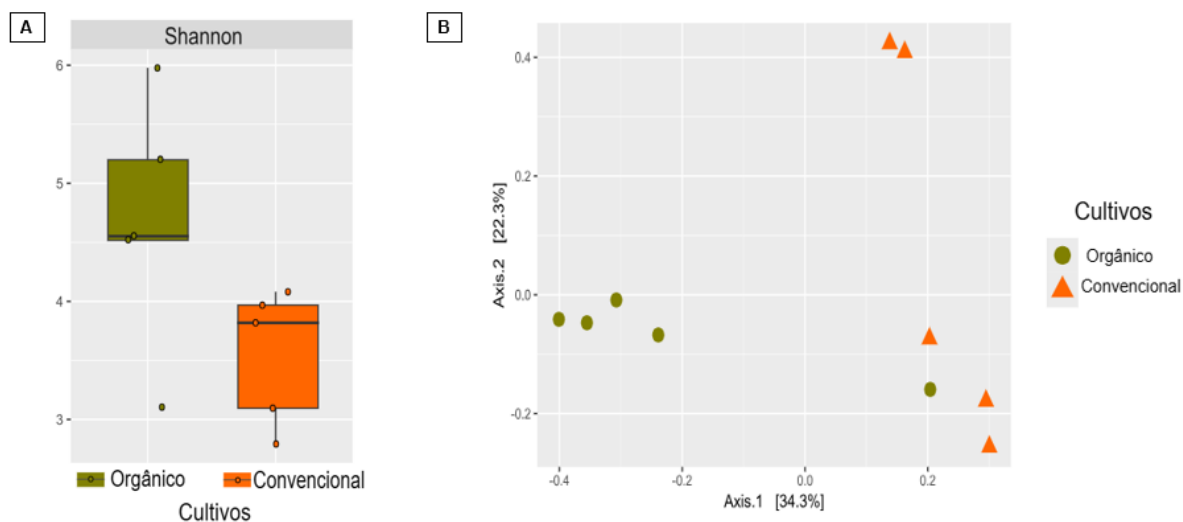
A abundância relativa dos gêneros foi calculada, demonstrando diferentes abundâncias de ASVs nos diferentes tipos de cultivo (**Figura 4**).

Figura 4. Abundância relativa das ASVs nos diferentes cultivos (detecção maior que 0,05). “Other” representa o agrupamento de todos os gêneros com detecção $p < 0,05$. “Unknown” representa os ASVs que não possuíam afiliação taxonômica conhecida no banco de dados.



A alfa diversidade também se mostrou diferente significativamente (p -valor $< 0,01$) entre os cultivos (**Figura 5 A**). Para a análise de diversidade, são levados em conta os fatores de riqueza e equitabilidade dos ambientes (Kim *et al.*, 2017) e vários índices são utilizados para quantificar a diversidade, o utilizado neste estudo foi o índice de Shannon. A composição da comunidade bacteriana mostrou-se diferente significativamente, pela análise de dissimilaridade permutacional multivariada (PERMANOVA), entre os cultivos ($R^2 = 0.25646$ / p -valor: 0,017) (**Figura 5 B**). A análise da diversidade indicou que o cultivo orgânico apresentou uma maior diversidade microbiana pelo índice de Shannon, com valores mais altos, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. No entanto, a ordenação das comunidades microbianas revelou uma separação clara entre os microbiomas dos dois cultivos, destacando que as comunidades se diferenciam em composição conforme o sistema de cultivo.

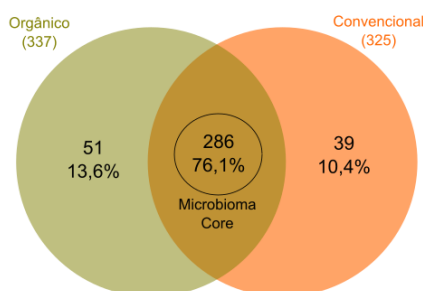
Figura 5. Análises de composição de comunidade bacteriana da rizosfera. **A.** Comparação de alfa diversidade dos cultivos orgânico e convencional de citros através do índice de Shannon. **B.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis para comparar a estrutura da comunidade bacteriana, a nível de ASV entre os cultivos de estudo, essa diferença é significativa entre os cultivos por PERMANOVA ($p < 0,05$). A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.



Seguindo a metodologia de Xu *et al.*, (2018), os gêneros foram filtrados para prevalência de 75% por amostras de cada cultivo. Sendo assim, os gêneros compartilhados entre os cultivos são chamados de comunidade *core* da rizosfera de citros. A comunidade *core* é composta por 286 gêneros, além de notar que os cultivos compartilham quase 80% de sua comunidade uma com a outra (**Figura 6**).

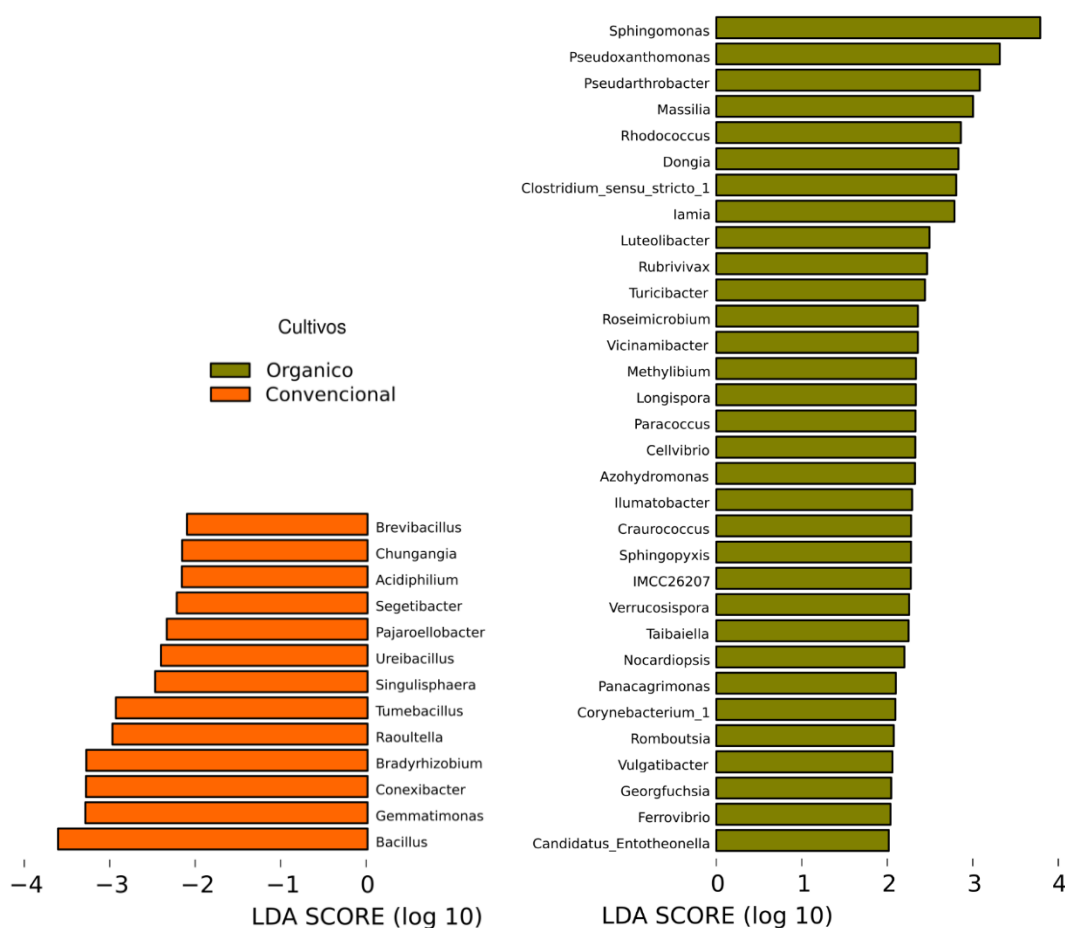
O diagrama de Venn (**Figura 6**) mostra que o cultivo orgânico tem maior riqueza de gêneros (337 gêneros) quando comparado ao cultivo convencional (325 gêneros). Porém os dois tipos de cultivo possuem um *microbioma core* comum, representado pela intersecção deste diagrama, de 286 gêneros, compartilhando aproximadamente 76% dos gêneros bacterianos.

Figura 6. Diagrama de Venn mostrando a intersecção dos cultivos, microbioma core, além de demonstrar os gêneros exclusivos.



A análise LEfSe (**Figura 7**) foi realizada para identificar os gêneros bacterianos diferencialmente abundantes entre os sistemas de cultivo Orgânico e Convencional. Essa análise complementa os resultados das métricas de diversidade alfa e da PCoA, permitindo a identificação de táxons específicos que contribuem para as diferenças observadas entre os grupos. Entre os gêneros mais associados ao cultivo orgânico destacam-se *Sphingomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Pseudarthrobacter*, *Massilia* e *Rhodococcus*, enquanto no cultivo convencional, os gêneros *Bacillus*, *Gemmatimonas*, *Conexibacter*, *Bradyrhizobium* e *Raoutella* foram mais abundantes.

Figura 7. Análise LEfSe comparando a composição microbiana entre os sistemas de cultivo orgânico (verde) e convencional (laranja).



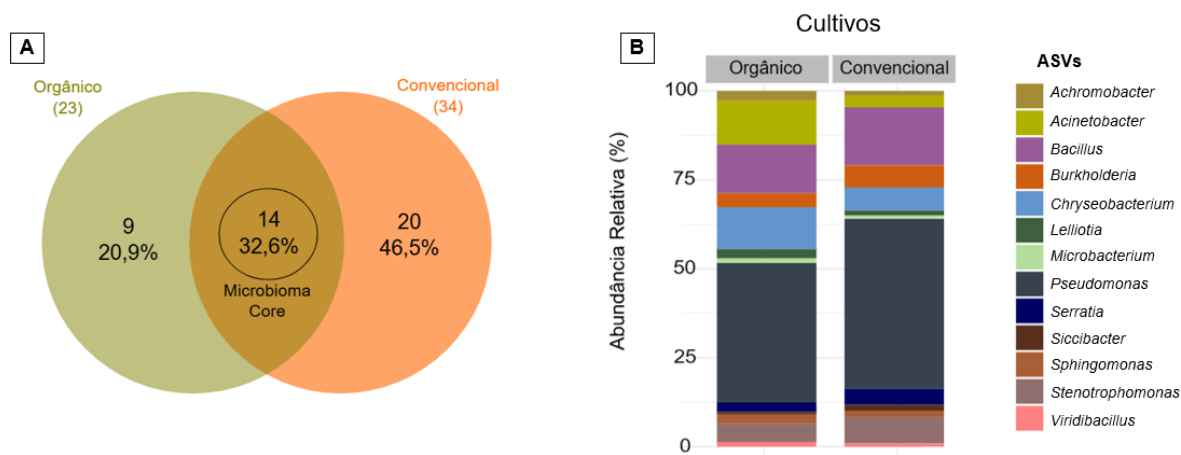
5.2.2 Identificação taxonômica para início da triagem *in vitro*

Na submissão do projeto, foi proposto que a construção dos *SynComs* seria realizada através de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais), que agrupam sequências com menos de 3% de dissimilaridade (Callahan *et al.*, 2017). No entanto, novos métodos para resolução através de ASVs (Variantes de Sequência de Amplicon) tem sido utilizado e se

mostraram mais sensíveis para identificar sequências com 100% de identidade (Callahan *et al.*, 2017).

Com os resultados da amostragem dos microrganismos sequenciados, foram feitas análises para determinação dos gêneros de bactéria adotando-se os parâmetros estabelecidos pela metodologia ASVs que se mostram mais sensíveis a variações de nucleotídeos (Callahan *et al.*, 2017). Correlacionado os dados de isolamento, os dois cultivos têm um microbioma cultivável de 32,6% de ASVs compartilhadas (**Figura 8 A**). Através dessas ASVs compartilhadas foi feita abundância relativa para observar qual ASV prevalece entre os cultivos (**Figura 8 B**).

Figura 8. Comparação dos gêneros de bactérias obtidos dos sistemas de cultivo orgânico e convencional, identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das rizobactérias representativas das bibliotecas. **(A)** Diagrama de Venn mostrando o número de gêneros bacterianos exclusivos cultivo orgânico (23 gêneros) e convencional (34 gêneros) e compartilhados entre cultivos (16 gêneros). **(B)** Gráfico de barras empilhadas representando a abundância relativa dos gêneros bacterianos compartilhados por ambos os sistemas de cultivo convencional e orgânico. Cada cor representa um gênero diferente, com destaque para os gêneros mais abundantes em cada sistema de cultivo.



A recuperação de gêneros por isolamento em laboratório, em comparação com os dados metataxonômicos do microbioma core, foi de 4,5% para o cultivo orgânico e de 8,2% para o cultivo convencional. Após a filiação taxonômica, microrganismos que demonstraram estar isolados pelos resultados do sequenciamento, e não em consórcio, foram priorizados para início dos ensaios biológicos em caracterização de potenciais promotoras de crescimento. Todos os gêneros de ambos os cultivos utilizados para os ensaios biológicos estão na **Figura 13**. A Figura 13 apresenta todos os gêneros utilizados nos ensaios biológicos, provenientes de ambos os cultivos. No cultivo convencional, foram identificados 9 gêneros representados de forma isolada, enquanto no cultivo orgânico foram 10 gêneros.

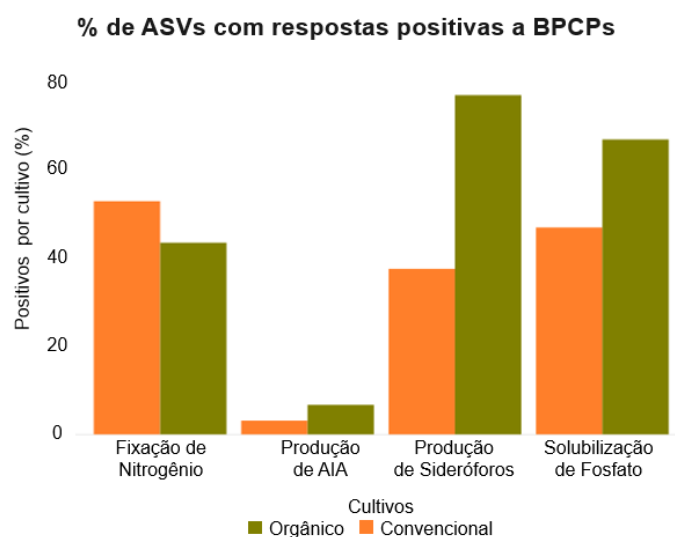
Aproximadamente 8% do *microbioma core* foi representado pelos isolados cultiváveis, incluindo gêneros como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Spingomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium* e *Stenotrophomonas*.

5.2.3 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas – *Screening in vitro*

Os dados do sequenciamento demonstraram que muitas rizobactérias isoladas estavam criopreservadas em consórcio. Para garantir uma maior representatividade dos cultivos foi feita uma primeira seleção de microrganismos isolados, escolhendo até três representantes de cada gênero em cada tipo de cultivo. No total, foram selecionados 25 gêneros distintos, sendo 13 do cultivo orgânico e 12 do convencional. Esses microrganismos passaram por testes de promoção de crescimento *in vitro*, germinação de sementes e inoculação em casa de vegetação para avaliação *in vivo*.

Com base nos resultados dessa primeira seleção, foram escolhidos novos representantes de gêneros para ampliar a representatividade nos testes. Nessa segunda seleção, foram incluídos 20 microrganismos do cultivo convencional e 16 do orgânico, priorizando aqueles que tiveram bons resultados na primeira etapa. O cultivo orgânico obteve predominantemente resultados positivos na produção de sideróforos e solubilização de fosfato (**Figura 9**).

Figura 9. Porcentagem de positivos para mecanismos de promoção de crescimento. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.



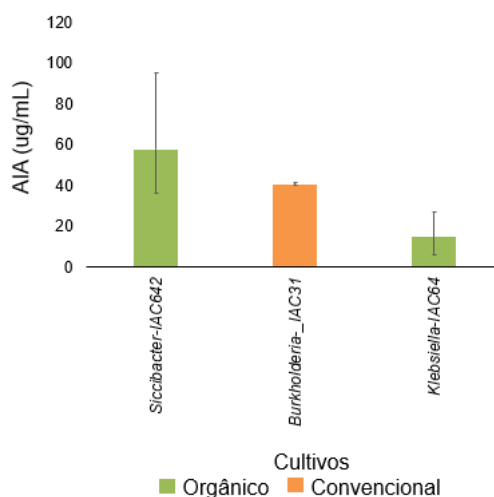
5.2.3.1 Fixação de Nitrogênio

Esse teste resultou em apenas dados qualitativos para validação dos microrganismos capazes de fixar nitrogênio. Os gêneros positivos para este teste, são *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Siccibacter* com mais de um isolado testado. Um total de 26 bactérias foram positivas para esse teste, sendo 16 do cultivo convencional e 10 do cultivo orgânico.

5.2.3.2 Produção de Ácido indolacético

Neste teste, os isolados *Siccibacter_IAC642*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia_IAC31* e *Klebsiella_IAC64* demonstraram produção de ácido indol-3-acético (AIA), com valores médios de $57,73 \pm 37,51 \mu\text{g/mL}$, $40,6 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ e $14,96 \pm 8,55 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Figura 10**).

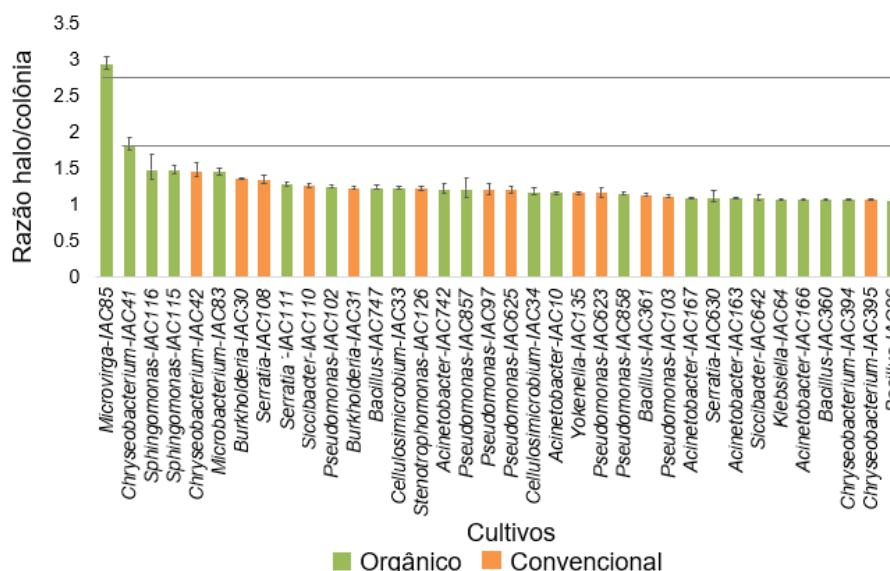
Figura 10. Resultados do teste de produção de ácido indol-acético.. Gráfico com resultados positivos para o teste de produção deste fitohormônio. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.



5.2.3.3 Produção de Sideróforos

O teste de produção de sideróforos representou o ensaio biológico com maior número de resultados positivos, no geral, o cultivo convencional apresentou ~38% de resultados positivos e o cultivo orgânico, teve destaque com ~79%. Apenas um isolado apresentou índice de solubilização alta, sendo o *Microvirga_IAC85* (**Figura 11**).

Figura 11. Capacidade de produção de sideróforos de acordo com o diâmetro dos halos formados em centímetros. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.

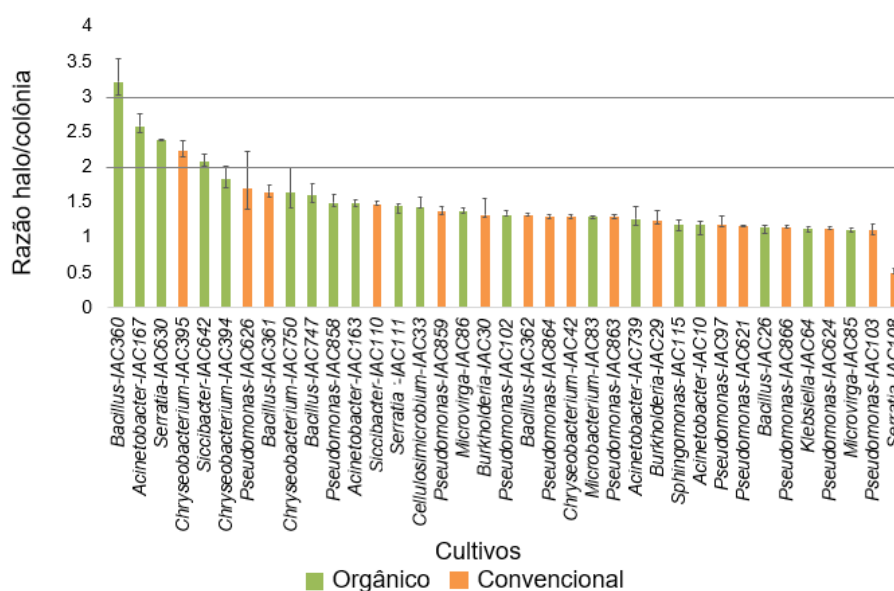


5.2.3.4 Solubilização de Fosfato

No teste de solubilização de fosfato tricálcico, ~69% dos isolados do cultivo orgânico e ~48% do cultivo convencional demonstraram, média e baixa capacidade de solubilização.

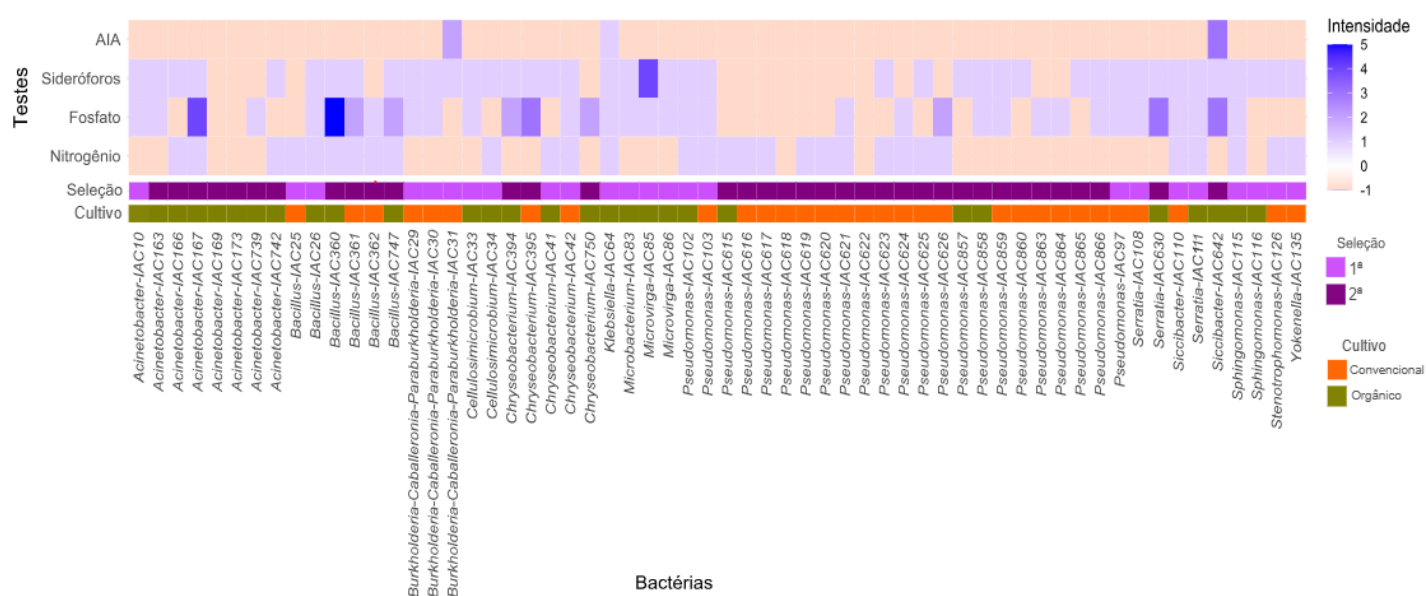
Dentre os microrganismos positivos para este teste *Bacillus_IAC360* teve índice de solubilização alto ($IS > 3$) com valor de média de $3,21 \pm 0,32$, três bactérias do gênero *Chryseobacterium* tiveram índice de solubilização médio. *Acinetobacter_IAC167* e *Serratia_IAC630* do cultivo orgânico e *Chryseobacterium_IAC395*, do cultivo convencional, se destacaram nesse teste e tiveram médio índice de solubilização ($IS > 2$) (Figura 12).

Figura 12. Capacidade de solubilização de fosfato de acordo com o índice de solubilização medido através do diâmetro de razão halo/colônias. A cor verde demonstra os resultados do cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.



O heatmap (**Figura 13**) foi utilizado para representar a intensidade dos resultados positivos obtidos nos ensaios de atividade promotora de crescimento. O teste de fixação biológica de nitrogênio foi avaliado de forma qualitativa, considerando-se como positivo qualquer indicativo de atividade, sem distinção entre diferentes intensidades de resposta. Para os demais testes, a coloração azul no heatmap foi graduada conforme os valores obtidos, intensificando-se progressivamente a cada incremento de 0,5 unidade. Essa representação gráfica permitiu uma visualização mais clara da magnitude dos resultados, destacando com tonalidades mais intensas os isolados que apresentaram maior desempenho nos ensaios.

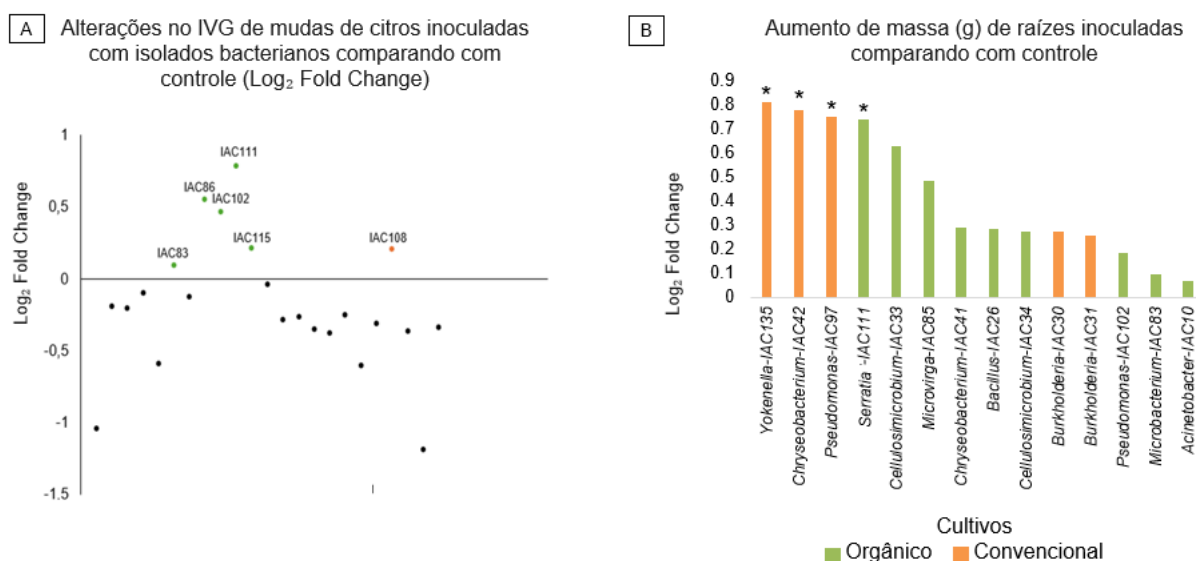
Figura 13. Heatmap da correlação dos isolados bacterianos nos diferentes ensaios biológicos de promoção de crescimento. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.



5.2.4 Teste de Germinação de sementes

Em complementariedade aos testes *in vitro*, incluiu-se o teste de germinação de sementes para avaliar se os microrganismos afetam a germinação e crescimento inicial das plântulas, além de avaliar a viabilidade das sementes, plântulas e uniformidade do crescimento e agregando nos resultados com potenciais microrganismos bioestimulantes.

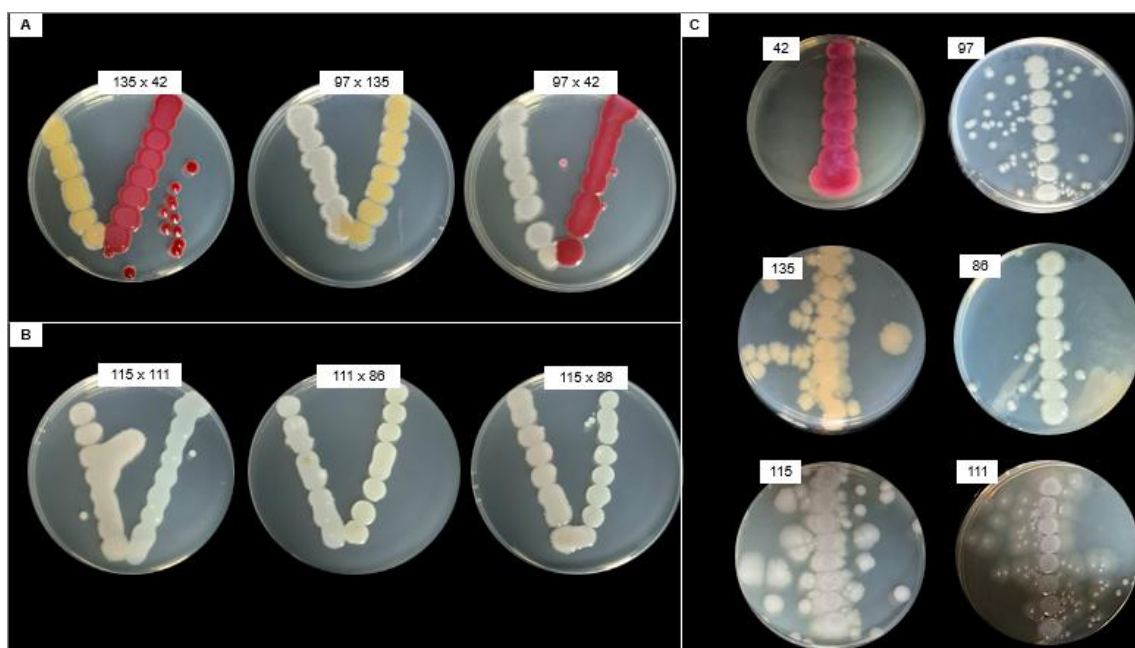
Figura 14. Resultados no teste de germinação com bactérias inoculadas em sementes comparados com controle não inoculado. **A.** Aumento de índice de velocidade de Germinação (IVG) para sementes de citrumelo 'Swingle' inoculadas com cepas de rizobactérias comparadas com controle não inoculado (Log_2 Fold change). **B.** Aumento de massa (g) de volume de raiz comparada ao controle não inoculado (Log_2 Fold change). * representa os resultados que tiveram valor significativo (p -valor $>0,05$) pelo teste t. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.



Com base nos resultados preliminares do potencial de cada isolado em acelerar a germinação, foram selecionados, em ambos os cultivos, aqueles que apresentaram melhor desempenho (Figura 14) para a formação de consórcios microbianos (*SynComs*) e posterior avaliação de seus efeitos na germinação das sementes. Para o cultivo orgânico, foram selecionadas as bactérias *Microvirga*-IAC86, *Serratia*-IAC111 e *Sphingomonas*-IAC115 e para o cultivo convencional, as bactérias *Chryseobacterium*-IAC42, *Pseudomonas*-IAC97 e *Yokenella*-IAC135.

Após a seleção dos isolados para a formação de *SynComs* as bactérias foram submetidas a teste de sinergismo em pares (**Figura 15**).

Figura 15. Resultados do teste de sinergismo. **A.** Sinergismo para SynCom do cultivo convencional. **B.** Sinergismo para SynCom do cultivo orgânico. **C.** Fotos de bactérias plaqueadas isoladas como controle do teste.



No teste de sinergismo observa-se se não há inibição de crescimento entre os microrganismos pareados, sem antagonismo entre eles há um pré-requisito dos microrganismos cooperarem e formarem um consórcio. Na Figura 15, observa-se que não há antagonismo entre os microrganismos. Após o teste de sinergismo, foi feito o teste das *SynComs* em sementes de citrumelo 'Swingle' (**Tabela 2**).

Tabela 2. Resultados do teste de germinação com inoculação de *SynComs* comparadas com controle.

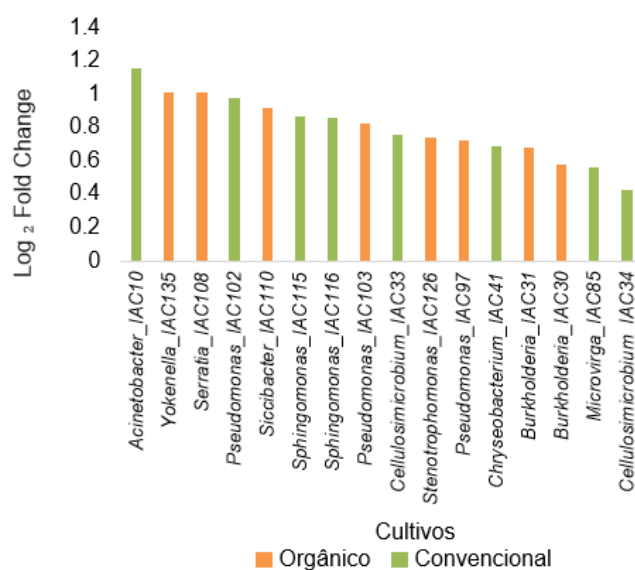
	ID	Log 2 Fold Change		Teste t
		Índice de Biomassa Seca	de Massa (g)	p-valor
SynCom (orgânico)	<i>Microvirga</i> -IAC86			
	<i>Serratia</i> -IAC111	0,71	0,75	0,064
	<i>Sphingomonas</i> -IAC115			
	<i>Chryseobacterium</i> -IAC42			
SynComs (convencional)	<i>Pseudomonas</i> -IAC97	1,34	1,56	0,045*
	<i>Yokenella</i> -IAC135			

Nota: *p-valor<0,05.

5.2.5 Promoção de crescimento em plântulas de citros – *Screening in vivo*

Além do aumento do crescimento radicular, algumas bactérias demonstraram a capacidade de ampliar a área projetada da raiz (ProjArea) e a área de superfície radicular (SurfArea) em comparação ao controle sem inoculação bacteriana, conforme análise de Log₂ Fold Change. No cultivo convencional, destacaram-se *Pseudomonas*-IAC103, *Serratia*-IAC108, *Siccibacter*-IAC110, *Stenotrophomonas*-IAC126 e *Yokenella*-IAC135. Já no cultivo orgânico, *Pseudomonas*-IAC102, *Sphingomonas*-IAC115 e *Sphingomonas*-IAC116 apresentaram esse efeito positivo.

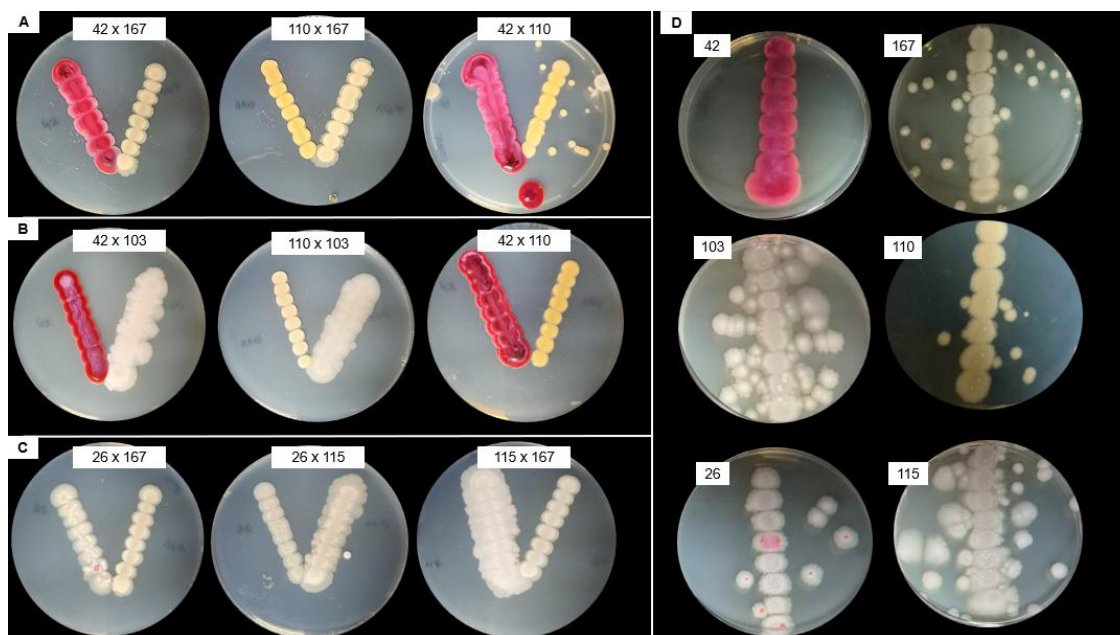
Figura 16. Valores de aumento de volume de raiz por Log₂ Fold Change comparados com o controle não inoculado. Todos os isolados plotados no gráfico apresentaram valor significativo (p-valor<0,05) pelo teste t. A cor verde demonstra o cultivo orgânico e a cor laranja, para o cultivo convencional.



Dezesseis isolados demonstraram aumento de volume de raiz (RootVolumeMeasured) por Log₂ Fold Change comparados com controle sem inoculação.

Após o teste em casa de vegetação com bactérias isoladas, foi feito teste com *SynComs*. As bactérias selecionadas para o *SynCom* "geral", *Chryseobacterium*-IAC42, *Siccibacter*-IAC110 e *Acinetobacter*-IAC167; para o cultivo convencional foram *Chryseobacterium*-IAC42, *Pseudomonas*-IAC103 e *Siccibacter*-IAC110; e, para o cultivo orgânico, *Bacillus*-IAC26, *Sphingomonas*-IAC115 e *Acinetobacter*-IAC167.

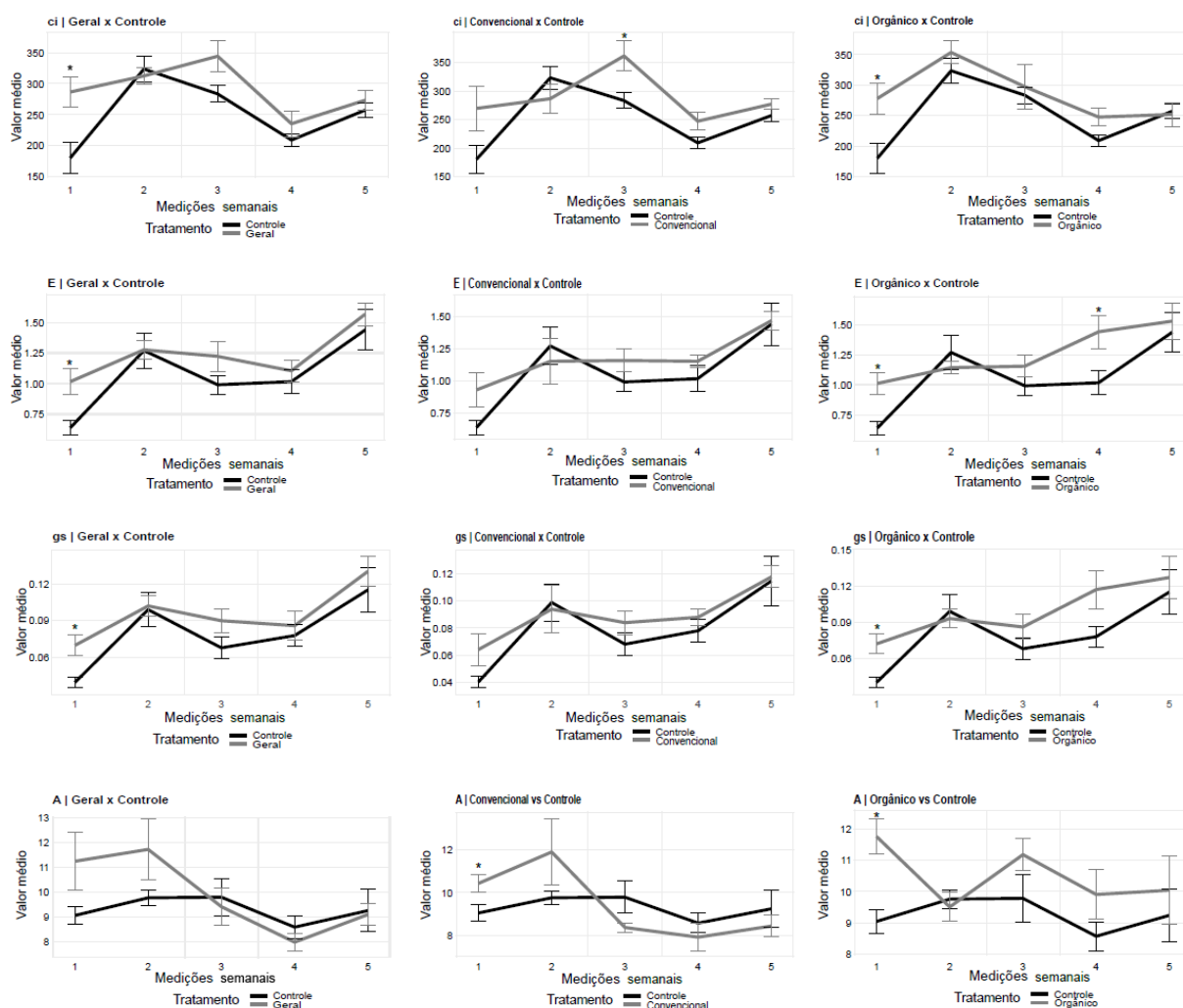
Figura 17. Resultados do teste de sinergismo. **A.** Sinergismo para a SynCom “geral”. **B.** Sinergismo para SynCom do cultivo convencional. **C.** Sinergismo para SynCom do cultivo orgânico. **D.** Fotos de bactérias plaqueadas isoladas como controle do teste.



Os testes de sinergismo demonstraram que não houve inibição entre as bactérias utilizadas para formação das *SynComs*.

A inoculação com *SynComs* em plântulas de citrumele ‘Swingle’ resultou em respostas fisiológicas distintas entre os tratamentos. O *SynCom* geral promoveu aumento significativo na concentração interna de CO_2 (ci), condutância estomática (gs) e taxa de transpiração (E) na primeira semana, indicando maior abertura estomática. O *SynCom* convencional apresentou aumento significativo em ci e, principalmente, na assimilação de carbono (A) na segunda semana, sugerindo melhora na eficiência fotossintética. Já o *SynCom* orgânico apresentou os efeitos mais consistentes, com aumento significativo de ci, gs, E e A, principalmente nas primeiras semanas, demonstrando uma resposta fisiológica coordenada. Em geral, os resultados indicam que todos os *SynComs* influenciaram positivamente parâmetros fisiológicos em diferentes intensidades e tempos, com destaque para o tratamento orgânico.

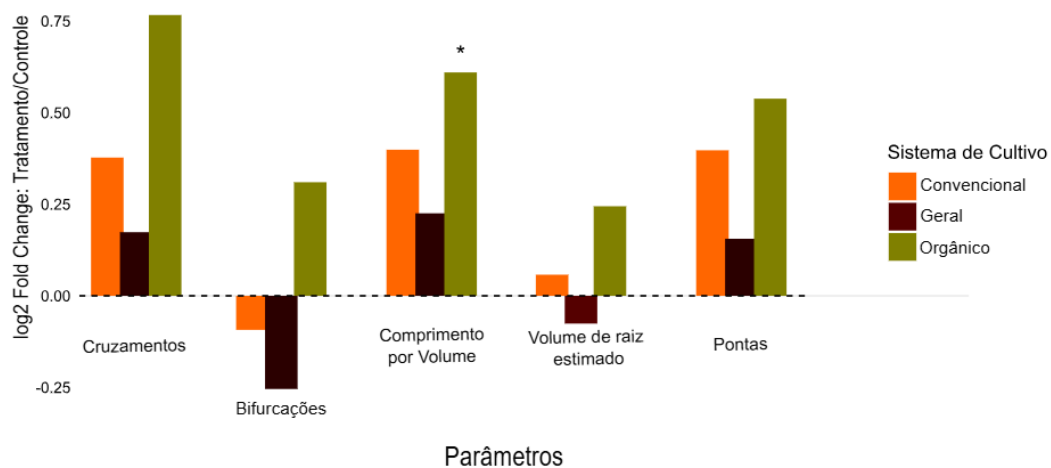
Figura 18. Parâmetros fisiológicos de plântulas de citrumele 'Swingle' sob diferentes tratamentos com *SynComs* em casa de vegetação. Comparações dos tratamentos Geral, Convencional e Orgânico com o Controle, ao longo de cinco repetições (semanas), para os parâmetros fisiológicos **ci** (concentração interna de CO₂), **E** (taxa de transpiração), **gs** (condutância estomática) e **A** (taxa de assimilação de carbono). Os pontos representam os valores obtidos na medição do IRGA e as barras verticais indicam o desvio padrão. As linhas pretas correspondem ao Controle, e as linhas cinza aos tratamentos comparados. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle na mesma repetição ($p < 0,05$) pelo teste t.



Na avaliação quanto aos efeitos das *SynComs* em parâmetros morfológicos radiculares medidos pelo scanner WinRhizo (**Figura 19**), a *SynCom* do cultivo orgânico demonstrou um aumento positivo estatisticamente significativo no parâmetro Comprimento por Volume de raiz por Log₂ Fold Change em relação ao controle não inoculado. Para os parâmetros "Cruzamentos" e "Pontas", todas as *SynComs* exibiram valores de Log₂ Fold Change positivos, com a *SynCom* do cultivo orgânico apresentando os maiores aumentos, embora não significativos. Em contraste, o efeito nas "Bifurcações" foi misto e não significativo, com o tratamento do cultivo orgânico mostrando aumento, enquanto convencional e geral

apresentaram pequenas diminuições. Similarmente, as mudanças no "Volume de raiz estimado" foram pequenas e não significativas para todos os tratamentos.

Figura 19. Log2 Fold Change de parâmetros morfológicos radiculares de plântulas de citrumelo 'Swingle' sob diferentes tratamentos com SynComs em casa de vegetação. Os valores representam a variação relativa ao controle não inoculado. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



6. Discussão

6.1 Metataxonômica

A análise química do solo destaca que o solo do cultivo orgânico tem valores elevados de K (potássio) e Mn (Manganês) e o cultivo convencional, tem elevada acidez potencial (H+Al), Fe (Ferro) e, valores de pH menores que o cultivo orgânico, que pode estar relacionado com a aplicação de fertilizantes químicos (Naz *et al.*, 2022). Dentre todos os parâmetros químicos do solo, o pH é uma das principais características que influenciam diretamente na diversidade, biomassa e composição microbiana no solo. Solos com pH abaixo de 6,2 tendem a limitar a atividade de microrganismos decompositores, enquanto pH mais alto favorece sua atuação (Naz *et al.*, 2022).

Comparando os sistemas de cultivo, é esperado que o sistema orgânico apresente maiores teores de matéria orgânica (MO) no solo, uma vez que práticas como a manutenção da cobertura vegetal, adubação verde e uso de compostos orgânicos favorecem o acúmulo de carbono e a atividade biológica do solo. No entanto, esse padrão pode ser influenciado pelo manejo conservacionista em ambos os sistemas. A menor perturbação do solo nos manejos retarda a mineralização e constante adição de biomassa e preservação da estrutura do solo, promovendo o acúmulo e a estabilização da matéria orgânica nas camadas superficiais. Dessa forma, ao longo do tempo, os solos podem ao longo do tempo atingirem um equilíbrio de matéria orgânica independente do cultivo (Embrapa, 2004)

As características químicas do solo sob cultivo orgânico, em especial o pH, explicar a presença de determinados biomarcadores microbianos associados à decomposição da matéria orgânica e ao ciclo do carbono. O gênero *Sphingomonas*, reconhecido por sua capacidade de degradar compostos orgânicos complexos e frequentemente relacionado a sistemas agrícolas sustentáveis, apresentou maior abundância em solos orgânicos (Kumar *et al.*, 2024; Pan *et al.*, 2025). Além disso, a adição de matéria orgânica também tem sido correlacionada ao aumento de *Pseudoxanthomonas* (Maffia *et al.*, 2024) e ao enriquecimento de *Massilia* (Yang *et al.*, 2021), reforçando o papel do manejo orgânico na promoção de comunidades microbianas funcionalmente relevantes para a manutenção da saúde e fertilidade do solo.

O cultivo orgânico apresentou maior número de biomarcadores em comparação ao cultivo convencional, indicando que as condições de cultivo podem afetar o padrão de recrutamento dos microrganismos que irão compor a comunidade rizosférica associada a planta. Esse padrão também foi observado por Mishra *et al.*, (2025), que relataram diferenças na estrutura da comunidade microbiana entre solos tratados com fertilizantes orgânicos e químicos por meio do sequenciamento de amplicon 16S rRNA e ITS (internal transcribed spacer), sendo observado uma maior diversidade de bactérias e fungos observada no solo de cultivo orgânico. De forma semelhante, Wang *et al.* (2016) também identificaram um número mais

elevado de biomarcadores em solos sob manejo orgânico. Essa maior diversidade funcional, refletida pela redundância funcional proveniente do maior número de espécies biomarcadoras, pode estar associada a um ambiente que apresenta maior resiliência ecológica para manter a multifuncionalidade ecossistêmica promovida pelos microrganismos, favorecida pela redundância funcional, pois, nesse contexto, diferentes microrganismos com funções ecológicas semelhantes coexistem, assegurando a continuidade dos processos do solo mesmo sob perturbações (Azarbad *et al.*, 2022; Ramond, Galand & Logares, 2025). Nesse sentido, diante dos desafios impostos pelas mudanças climáticas, como as variações de umidade e temperatura, comunidades microbianas mais diversas tendem a oferecer maior estabilidade ecológica e capacidade de adaptação frente a cenários de estresse ambiental.

O solo do sistema de cultivo convencional apresentou maiores teores de ferro disponível, entretanto, estudos em pomares de citros demonstram que as concentrações de ferro são baixas na fração solúvel do solo, sendo que grande parte desse ferro se encontra na matriz do solo (Souza *et al.*, 2015). Sendo assim, apesar da elevada concentração solo quando comparado ao cultivo orgânico, ainda assim, o ferro pode ser encontrado de maneira indisponível para a planta. Assim, é possível que presença dos gêneros *Bacillus*, *Raoutella*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacillus*, notoriamente conhecidos por sua produção de sideróforos, são biomarcadores do cultivo convencional, exercendo a função de quelar o ferro e torná-lo biodisponível para as plantas (Ghazanfar *et al.*, 2024; Xu *et al.*, 2019; Ong *et al.*, 2023; Sheng *et al.*, 2020). Os microrganismos com capacidade de produção de sideróforos podem suprimir patógenos de plantas pois indisponibilizam ferro para estes microrganismos (Abo-Zaid *et al.*, 2023).

6.2 Screening *in vitro*

Apesar do cultivo convencional demonstrar sideróforos em seus biomarcadores, o cultivo orgânico demonstrou um maior número de bactérias com essa capacidade nos testes funcionais *in vitro*. Ambos os agrossistemas de cultivos indicam que diferentes BPCPs, apresentam características benéficas no desenvolvimento das plantas. No geral, o cultivo orgânico teve predominância de resultados positivos nas capacidades de promoção de crescimento, com maioria dos isolados nos testes de sideróforos, fosfato e AIA. O cultivo convencional apenas teve destaque na capacidade de fixação de nitrogênio.

O isolado *Microvirga*-IAC85, proveniente do sistema orgânico, destacou-se pela elevada capacidade de produção de sideróforos, expressa por um dos maiores índices halo/colônia (cm) o que indica um potencial superior de quelar ferro e favorecer a absorção desse micronutriente por plantas em ambientes com baixa disponibilidade na forma biodisponível (Jiménez-Gómez *et al.*, 2019). De acordo com Ahmed *et al.* (2014), a produção de sideróforos

é uma adaptação microbiana à limitação de ferro no ambiente, mecanismo que pode ser particularmente relevante em solos orgânicos. Assim, a elevada produção de *Microvirga*-IAC85 pode estar relacionada às condições do cultivo orgânico, onde apesar de ter menor teor total de ferro, há escassez na forma biodisponível e esse fator pode estimular essa característica funcional.

Isolados como *Acinetobacter*-IAC167, *Serratia*-IAC630, *Siccibacter*-IAC642, *Chryseobacterium*-IAC394, *Chryseobacterium*-IAC750, também provenientes do cultivo orgânico e *Chryseobacterium*-IAC395 e *Pseudomonas*-IAC626 do cultivo convencional, apresentaram resultados promissores quanto a solubilização de fosfato. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Serratia*, *Siccibacter* e *Pseudomonas* são gêneros descritos como solubilizadores de fosfato (Mujumdar *et al.*, 2023; Jung *et al.*, 2023; Sutio *et al.*, 2023; Goulart *et al.*, 2024; Dasila *et al.*, 2023).

Observou-se que os melhores desempenhos na solubilização de fosfato foram majoritariamente associados a isolados provenientes do cultivo orgânico, com cinco cepas apresentando índices de solubilização superiores a 2 e um isolado com índice acima de 3. Esses resultados indicam uma tendência de maior potencial de solubilização de fosfato em sistemas orgânicos em comparação aos convencionais. Melo *et al.*, (2016) demonstraram que os sistemas de manejo agrícola influenciam em características associadas à promoção de crescimento vegetal, como a solubilização de fosfato, sendo esta significativamente superior em solos sob cultivo orgânico.

A bactéria *Klebsiella*-IAC64 demonstrou resultados positivos em quatro dos testes de promoção de crescimento. Estudos demonstram que bactérias do gênero *Klebsiella* são versáteis, com diversas capacidades de promoção de crescimento, como, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato; produção de sideróforos, produção de ACC deaminase, tolerância a estresse salino (Kumar *et al.*, 2024; Girma *et al.*, 2022; Ganesh *et al.*, 2024).

O cultivo convencional destacou-se no número de microrganismos com capacidade de fixação de nitrogênio. Estudos demonstram que o uso intensivo de fertilizantes nitrogenados pode reduzir esse processo na rizosfera. No entanto, a adição de fertilizantes fosfatados pode dobrar a taxa de fixação de nitrogênio, uma vez que o fósforo é essencial para suprir a alta demanda energética envolvida nesse mecanismo (Orr *et al.*, 2011). Gao *et al.* (2024) demonstra que a fixação assimbiótica de nitrogênio é significativamente correlacionada com teores de molibdênio, fósforo, potássio, nitrogênio e carbono orgânico. De acordo com Weisany *et al.*, (2013) o ferro é necessário em diversas enzimas-chave no complexo da nitrogenase, o que pode estar associado a predominância dos microrganismos diazotróficos encontrados nesse cultivo devido a um maior valor desse elemento.

6.3 Screening in vivo

Após a caracterização *in vitro* dos isolados quanto aos principais mecanismos relacionados à promoção de crescimento vegetal, os microrganismos foram avaliados *in vivo* quanto ao seu desempenho em duas etapas: estímulo à germinação de sementes de citros e promoção de crescimento em condições controladas de casa de vegetação.

O aumento de crescimento e germinação de sementes foi observado por Sarvepalli, Velidandi & Korrapati (2023) em bactérias produtoras de sideróforos e Dasila *et al.*, (2023) em bactérias solubilizadoras de fosfato. Esse efeito é atribuído à maior disponibilidade de ferro promovida pelos sideróforos e à solubilização de fósforo, dois nutrientes-chave para processos bioquímicos essenciais ao metabolismo vegetal e à promoção do crescimento.

No teste de germinação de sementes, alguns isolados foram particularmente eficazes em aumentar o volume de raiz, como *Yokenella*-IAC135, *Chryseobacterium*-IAC42, *Pseudomonas*-IAC97 do cultivo convencional e *Serratia*-IAC111, do cultivo orgânico, sugerindo um impacto positivo no desenvolvimento radicular, aumentando em até duas vezes quando comparado com o controle. Jasrotia *et al.*, (2021) descreve bactérias do gênero *Chryseobacterium* com capacidade de promover aumento significativo de peso fresco e seco da raiz e parte aérea de arroz. Dasila *et al.*, (2023) testaram cepas de *Pseudomonas* e demonstraram aumento de comprimento e peso fresco de raiz e vigor da planta maior que o controle não inoculado em trigo. Koo & Cho (2009) citam que o gênero *Serratia* demonstrou crescimento de parte aérea e biomassa em capim-arroz e Zhang *et al.*, (2022) demonstraram que esse gênero promove formação de raiz lateral em *Arabidopsis*. O gênero *Yokenella* é descrito por seu potencial de biorremediação (Xu *et al.*, 2024), mas não há estudos o relacionando como potencial BPCPs.

A SynCom do cultivo convencional apresentou resultados significativos no teste de germinação de sementes, destacando-se em relação à inoculação individual das bactérias. Esse desempenho superior pode ser explicado pelo fato de que as SynComs buscam mimetizar o microbioma nativo em condições controladas, potencializando os efeitos sinérgicos entre cepas promotoras de crescimento (Rigerte *et al.*, 2025).

Dentre todos os microrganismos testados *in vivo* em casa de vegetação, os isolados *Acinetobacter*-IAC10, *Yokenella*-IAC135, *Serratia*-IAC108, *Pseudomonas*-IAC102, *Siccibacter*-IAC110, *Sphingomonas*-IAC115, *Pseudomonas*-IAC103, *Cellulosimicrobium*-IAC33, *Stenotrophomonas*-IAC126, *Chryseobacterium*-IAC41, *Burkholderia*-IAC31, *Burkholderia*-IAC30, *Microvirga*-IAC85 e *Cellulosimicrobium*-IAC34 foram os que apresentaram melhor desempenho.

Todos os gêneros que apresentaram bom desempenho no ensaio de germinação, também foram promissores na promoção de crescimento vegetal em casa de vegetação. Os gêneros *Acinetobacter* e *Sphingomonas* são descritos com cepas capazes de aumentar biomassa vegetal (Abbas *et al.*, 2023; Mazoyon *et al.*, 2023). Estudos com *Siccibacter* como

bactéria inclusa em um consórcio bioinoculante, demonstrou que o consórcio melhorou parâmetros de crescimento de raízes (Chamkhi *et al.*, 2023). Estudos com *Pseudomonas* e *Cellulosimicrobium* demonstram que as estirpes foram mais eficazes no aumento do peso seco de folhas e raízes e diâmetro do caule (Lobato-Ureche *et al.*, 2023). Uma cepa de *Stenotrophomonas* inoculada mesmo que *in vitro*, estimulou o enraizamento de estacas de álamo e aumentou o peso de raízes (Ulrich *et al.*, 2021). A inoculação de uma cepa de *Burkholderia* em raízes de arroz demonstram aumento de crescimento de mudas (Basak *et al.*, 2024).

A inoculação de *SynComs* em plântulas em casa de vegetação demonstrou efeitos fisiológicos distintos entre os tratamentos, teve destaque para o *SynCom* do cultivo orgânico, que apresentou os melhores desempenhos. Esse consórcio promoveu aumento significativo da concentração interna de CO₂ (ci), condutância estomática (gs) e taxa de assimilação de carbono (A). Ao longo das duas primeiras semanas, indicando estímulo direto à fotossíntese. O aumento da transpiração induzido pela inoculação favorece a abertura estomática, permitindo maior entrada de CO₂ atmosférico, o que eleva a concentração intercelular de CO₂ e, conseqüentemente, a taxa fotossintética (Xu *et al.*, 2025). Esse processo resulta em maior produção de fotoassimilados, como açúcares, que são fundamentais para o crescimento vegetal, acúmulo de biomassa e maior resiliência ao estresse abiótico.

A composição do *SynCom* orgânico, inclui cepas de *Bacillus*, *Sphingomonas* e *Acinetobacter*, pode explicar os efeitos fisiológicos observados. Cepas de *Bacillus* já foram amplamente associadas ao aumento do conteúdo de clorofila, taxa de transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂ e taxa fotossintética líquida, inclusive sob condições adversas como salinidade e déficit hídrico (Sayahi *et al.*, 2022; Fonseca *et al.*, 2022). Complementarmente, *Acinetobacter* tem demonstrado efeitos similares, com aumento da fotossíntese e eficiência nas trocas gasosas em espécies como *Sambucus williamsii* (Liu *et al.*, 2019).

No *SynCom* associado ao cultivo convencional, os aumentos pontuais de ci e A observados na segunda semana podem estar relacionados à presença de *Pseudomonas*, gênero amplamente documentado como promotor de crescimento vegetal. Diversas cepas de *Pseudomonas* têm sido associadas ao aumento da taxa fotossintética líquida, condutância estomática e eficiência no uso da água em culturas como tomateiro e trigo (Costa-Santos *et al.*, 2021; Sayahi *et al.*, 2022).

Apesar das *SynComs* utilizadas no experimento em casa de vegetação não terem sido formuladas com base nos resultados individuais prévios, a análise comparativa revela que alguns isolados presentes nessas combinações já haviam demonstrado potencial promotor de crescimento vegetal em experimentos anteriores. É o caso de *Siccibacter_IAC110* e *Pseudomonas_IAC103*, que compõem a *SynCom* do cultivo convencional, ambos com

desempenho positivo tanto na promoção do crescimento inicial das raízes quanto na massa radicular. Da mesma forma, *Sphingomonas_IAC115*, presente na *SynCom* do cultivo orgânico, também já havia se destacado em testes individualizados. Esses resultados sugerem que a inclusão de bactérias previamente eficientes pode ter contribuído para os efeitos observados das *SynComs*, mesmo sem uma formulação baseada diretamente nesses dados. Além disso, isolados como *Chryseobacterium_IAC42* (cultivo convencional) e *Bacillus_IAC26* (cultivo orgânico) apresentaram resultados promissores nos testes de germinação em papel germitest. Esses resultados podem ser explicados considerando estudos que destacam a importância da diversidade funcional em consórcios microbianos. Estudos demonstram que a riqueza de pode resultar em consórcios sinérgicos com desempenho superior ao de inoculações individuais (Wang *et al.*, 2022).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que o cultivo orgânico abriga uma microbiota mais diversa, o que pode contribuir para maior resiliência ecológica e estabilidade do sistema agrícola a longo prazo. No entanto, microrganismos com potencial promotor de crescimento no cultivo convencional, especialmente em testes funcionais *in vivo*, revelam que ambos os sistemas de cultivo apresentam comunidades microbianas com elevada capacidade funcional. Esses achados reforçam a importância de explorar a diversidade microbiana em diferentes contextos agrícolas, visando estratégias sustentáveis para a promoção do crescimento vegetal.

Com os resultados obtidos, conclui-se que seja de forma individualizada ou em consórcio, as BPCPs testadas demonstram sua eficácia no uso como bioinoculantes futuramente. Os testes com *SynComs* ainda são iniciais, mas trazem novas perspectivas no entendimento das interações entre microrganismos e planta e contribui para o avanço do uso de bactérias promotoras de crescimento em trabalhos com citros.

8. LITERATURA CITADA

- ABBAS, R. et al. **Halotolerant PGPR: A hope for cultivation of saline soils.** *Journal of King Saud University - Science* Elsevier B.V., 1 out. 2019.
- ABBAS, S. et al. Deciphering the Impact of *Acinetobacter* sp. SG-5 Strain on Two Contrasting Zea mays L. Cultivars for Root Exudations and Distinct Physio-Biochemical Attributes Under Cadmium Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 42, n. 11, p. 6951–6968, 1 nov. 2023.
- ABO-ZAID, G. A. et al. Evaluation of Bio-Friendly Formulations from Siderophore-Producing Fluorescent *Pseudomonas* as Biocontrol Agents for the Management of Soil-Borne Fungi, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *Agriculture* **2023, Vol. 13, Page 1418**, v. 13, n. 7, p. 1418, 18 jul. 2023.
- AFRIDI, M. S. et al. **New opportunities in plant microbiome engineering for increasing agricultural sustainability under stressful conditions.** *Frontiers in Plant Science* Frontiers Media S.A., , 15 set. 2022.
- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.
- ARMANHI, J. S. L. et al. Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. *Scientific Reports*, v. 6, 12 jul. 2016.
- ASAF, Sajjad et al. *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 40, n. 2, p. 138-152, 2020.
- AULER, P. A. M. et al. Fruit yields of “Pêra” orange under different soil tillage and interrow management systems. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, v. 32, n. 1, p. 363–374, 2008.
- AZARBAD, Hamed. Conventional vs. organic agriculture—which one promotes better yields and microbial resilience in rapidly changing climates?. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 903500, 2022.
- BACAR, Elídio Liliano Carlos. Desempenho da laranja 'Jaffa' enxertada sobre cinco porta-enxertos em Londrina-PR. 2024.
- BALASJIN, Nasim Maghbolli et al. Plant growth promoting activity of bacteria isolated from Asian rice (*Oryza sativa* L.) are plant subspecies dependent. *bioRxiv*, p. 2021.12. 21.473765, 2021.

- BARILLOT, C. D. C. et al. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplane soil bacteria associated to a herbaceous root system. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 471–476, 21 jun. 2013.
- BASAK, Nilendu et al. Evaluation of root plaque associated plant growth promoting Burkholderia sp. EIKU24 in metal (loid) s removal, minerals solubilization and arsenic uptake inhibition in rice seedlings. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 103236, 2024.
- BASU, Anirban et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1140, 2021.
- BERENDSEN, Roeland L. et al. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. **The ISME journal**, v. 12, n. 6, p. 1496-1507, 2018.
- BERRAQUERO, F. Ruiz; BAYA, Ana M^a; CORMENZANA, A. Ramos. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.
- BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 535–538, 1991.
- BROWN, R. F.; MAYER, D. G. A critical analysis of Maguire's germination rate index. **Journal of seed technology**, p. 101-110, 1986.
- DE CARVALHO, Deived Uilian et al. Determining seed viability during fruit maturation to improve seed production and availability of new citrus rootstocks. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 777078, 2021.
- DA CUNHA, Izadora de Cássia Mesquita et al. The interplay between the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria and the rhizosphere microbiome and their impact on plant phenotype. **Microbiological Research**, v. 283, p. 127706, 2024.
- CALLAHAN, Benjamin J.; MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME journal**, v. 11, n. 12, p. 2639-2643, 2017.
- CARVALHO, C. J. R. Instrumentação Básica para Análise das Trocas Gasosas (CO₂ e H₂O) entre as Plantas e o Meio Ambiente. Embrapa Amazônia Oriental, 1997.

- CAVALCANTI, F. R. **Thermal Pest Control (TPC) III: percepção do fluxo de ar quente no tecido foliar da videira e impactos sobre o metabolismo antioxidativo, membrana celular e fotossíntese**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. 16 p.
- CHAMKHI, Imane et al. *Siccibacter colletis* as a member of the plant growth-promoting rhizobacteria consortium to improve faba-bean growth and alleviate phosphorus deficiency stress. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1134809, 2023.
- CORDOVA-RODRIGUEZ, A. et al. Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures. **MethodsX**, v. 9, p. 101917, 2022.
- COSTA-SANTOS, M. et al. Effect of *Bacillus* spp. and *Brevibacillus* sp. on the Photosynthesis and Redox Status of *Solanum lycopersicum*. **Horticulturae** **2021, Vol. 7, Page 24**, v. 7, n. 2, p. 24, 3 fev. 2021.
- DAHAL, Ram Hari et al. *Azohydromonas caseinilytica* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio isolada do solo florestal por meio de método de cultura otimizado. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 647-132, 2021.
- DAS, Prajna Priyadarshini et al. Plant-soil-microbes: A tripartite interaction for nutrient acquisition and better plant growth for sustainable agricultural practices. **Environmental Research**, v. 214, p. 113821, 2022.
- DASILA, Hemant et al. Cold-tolerant phosphate-solubilizing *Pseudomonas* strains promote wheat growth and yield by improving soil phosphorous (P) nutrition status. **Frontiers in microbiology**, v. 14, p. 1135693, 2023.
- DE FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of soils**, v. 24, p. 358-364, 1997.
- EL-SAADONY, Mohamed T. et al. Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. **Frontiers in plant science**, v. 13, p. 923880, 2022.
- EMBRAPA. **Sistema Plantio Direto: Bases para o Manejo da Fertilidade do Solo**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 64 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

- FLAVIANO, Trasmundi et al. Impact of organic and conventional cropping systems on plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 64, p. 103527, 2025.
- DA FONSECA, M. DE C. et al. *Bacillus subtilis* Inoculation Improves Nutrient Uptake and Physiological Activity in Sugarcane under Drought Stress. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 809, 1 abr. 2022.
- GANESH, Jyothsna et al. IAA-producing plant growth promoting rhizobacteria from *Ceanothus velutinus* enhance cutting propagation efficiency and Arabidopsis biomass. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1374877, 2024.
- GHAZANFAR, S. et al. Prospects of iron solubilizing *Bacillus* species for improving growth and iron in maize (*Zea mays* L.) under axenic conditions. **Scientific reports**, v. 14, n. 1, p. 26342, 1 dez. 2024.
- GIRARDI, E. A. et al. Sunki mandarin and Swingle citrumelo as rootstocks for rain-fed cultivation of late-season sweet orange selections in northern São Paulo state, Brazil. **Bragantia**, v. 76, n. 4, p. 501–511, 14 ago. 2017.
- GIRMA, Berhanu et al. Molecular, biochemical, and comparative genome analysis of a rhizobacterial strain *Klebsiella* Sp. KBG6. 2 imparting salt stress tolerance to *Oryza sativa* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 203, p. 105066, 2022.
- GITONGA, Nicholas Mawira et al. Bradyrhizobium inoculation has a greater effect on soybean growth, production and yield quality in organic than conventional farming systems. **Cogent Food & Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 1935529, 2021.
- GOMEZ, M. Y. et al. *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 promotes salt tolerance through jasmonic acid priming in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, p. 1–19, 1 dez. 2023.
- GONÇALVES, Osiel S.; CREEVEY, Christopher J.; SANTANA, Mateus F. Designing a synthetic microbial community through genome metabolic modeling to enhance plant–microbe interaction. **Environmental microbiome**, v. 18, n. 1, p. 81, 2023.
- GOULART, Jussara Tamires de Souza Silva et al. Isolation and Characterization of Plant-Growth-Promoting Bacteria Associated with *Salvinia auriculata* Aublet. **Microorganisms**, v. 12, n. 9, p. 1842, 2024.

- HOU, Jinyu et al. PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response. **Chemosphere**, v. 138, p. 592-598, 2015.
- JUNG, Hyejung et al. Análise genômica comparativa de espécies de *Chryseobacterium*: insights aprofundados sobre as capacidades de promoção do crescimento de plantas e de halotolerantes. **Microbial Genomics**, v. 9, n. 10, p. 001108, 2023.
- KAMATH, Anushree; PATEL, Dhara; SHUKLA, Arpit. Traversing through the intricate interplay of plant microbiome front runners. **European Journal of Plant Pathology**, v. 165, n. 3, p. 407-419, 2023.
- KOO, So-Yeon; CHO, Kyung-Suk. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 11, p. 1431-1438, 2009.
- KUMAR, SP Lalid et al. Sustainable farming practices enhance bacterial diversity and nutrient levels in sorghum rhizosphere soil. **Rhizosphere**, v. 32, p. 100967, 2024.
- KUMAR, Ashish et al. Siderophore-mediated iron acquisition by *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 206, n. 5, p. e00024-24, 2024.
- KUPPE, C. W. et al. Rhizosphere models: their concepts and application to plant-soil ecosystems. **Plant and Soil** 2022 474:1, v. 474, n. 1, p. 17–55, 19 abr. 2022.
- KUSSTATSCHER, Peter et al. Microbiome management by biological and chemical treatments in maize is linked to plant health. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1506, 2020.
- LAKSHMANAN, Venkatachalam; SELVARAJ, Gopinath; BAIS, Harsh P. Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. **Plant physiology**, v. 166, n. 2, p. 689-700, 2014.
- LIMA, Helena Santiago et al. Microbial community of cultivated and uncultivated citrus rhizosphere microbiota in Brazil. **Scientific Data**, v. 11, n. 1, p. 1294, 2024.
- LIU, F. et al. Effect of the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on the photosynthetic characteristics of *Sambucus williamsii* Hance container seedlings under drought stress. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2019.

- LOBATO-URECHE, Miguel Andrés et al. Pseudomonas 42P4 and Cellulosimicrobium 60I1 as a sustainable approach to increase growth, development, and productivity in pepper plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, p. 1111573, 2023.
- LORI, Martina et al. Soil microbial communities are sensitive to differences in fertilization intensity in organic and conventional farming systems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 99, n. 6, p. fiad046, 2023.
- MAFFIA, Angela et al. Transforming Agricultural and Sulfur Waste into Fertilizer: Assessing the Short-Term Effects on Microbial Biodiversity via a Metagenomic Approach. **Life**, v. 14, n. 12, p. 1633, 2024.
- MARÍN, Olga; GONZÁLEZ, Bernardo; POUPIN, María Josefina. From microbial dynamics to functionality in the rhizosphere: a systematic review of the opportunities with synthetic microbial communities. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 650609, 2021.
- MAZOYON, Candice et al. Sphingomonas sediminicola is an endosymbiotic bacterium able to induce the formation of root nodules in pea (Pisum sativum L.) and to enhance plant biomass production. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 199, 2023.
- MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.
- MELO, Juliana et al. Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. **Springerplus**, v. 5, p. 1-16, 2016.
- MISHRA, Ajay Kumar et al. Comparison of microbial diversity and community structure in soils managed with organic and chemical fertilization strategies using amplicon sequencing of 16 s and ITS regions. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1444903, 2025.
- MODICA, G. et al. Response to Water Stress of Eight Novel and Widely Spread Citrus Rootstocks. **Plants**, v. 14, n. 5, p. 773, 1 mar. 2025.
- MUJUMDAR, Shilpa et al. Acinetobacter: A versatile plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: **Plant-microbe interaction-recent advances in molecular and biochemical approaches**. Academic Press, 2023. p. 327-362.
- MUNIR, Neelma et al. Mechanisms and strategies of plant microbiome interactions to mitigate abiotic stresses. **Agronomy**, v. 12, n. 9, p. 2069, 2022.

- NAZ, Misbah et al. The soil pH and heavy metals revealed their impact on soil microbial community. **Journal of Environmental Management**, v. 321, p. 115770, 2022.
- NWACHUKWU, Blessing Chidinma; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Metagenomics: a tool for exploring key microbiome with the potentials for improving sustainable agriculture. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, p. 886987, 2022.
- OKSANEN, Jari et al. Community ecology package. **R package version**, v. 2, n. 0, p. 321-326, 2013.
- ONG, Alasteir; O'BRIAN, Mark R. The Bradyrhizobium japonicum fsrB gene is essential for utilization of structurally diverse ferric siderophores to fulfill its nutritional iron requirement. **Molecular microbiology**, v. 119, n. 3, p. 340-349, 2023.
- ORTIZ, Aurelio; SANSINENEA, Estibaliz. The role of beneficial microorganisms in soil quality and plant health. **Sustainability**, v. 14, n. 9, p. 5358, 2022.
- OUBOHSSAINE, Malika; SBABOU, Laila; AURAG, Jamal. Potential of the plant growth-promoting rhizobacterium Rhodococcus qingshengii LMR356 in mitigating lead stress impact on Sulla spinosissima L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 33, p. 46002-46022, 2024.
- PAN, Xue et al. Effects of organic fertilizer replacement on the microbial community structure in the rhizosphere soil of soybeans in albic soil. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 12271, 2025.
- PHILIPPOT, Laurent et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature reviews microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.
- POMPEU JR., J. Porta enxertos. In: MATTOS JR., D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. p. 61-104.
- POMPEU JUNIOR, Jorgino; BLUMER, Silvia. Citrumelos como porta-enxertos para a laranja'Valência'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 105-107, 2011.
- POSHVINA, Darya V. et al. Structural and Functional Differences in the Bacterial Community of Chernozem Soil Under Conventional and Organic Farming Conditions. **Agriculture**, v. 14, n. 12, p. 2127, 2024.
- RAMOND, Pierre; GALAND, Pierre E.; LOGARES, Ramiro. Microbial functional diversity and redundancy: moving forward. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 49, p. fuae031, 2025.

- RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Campinas, Instituto Agronômico, 285p. 2001
- RIGERTE, Linda et al. Assembly and application of a synthetic bacterial community for enhancing barley tolerance to drought. **Frontiers in Bacteriology**, v. 4, p. 1572294, 2025.
- RIVA, Valentina et al. A meta-analysis approach to defining the culturable core of plant endophytic bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 6, p. e02537-21, 2022.
- SANTOYO, Gustavo. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. **Journal of advanced research**, v. 40, p. 45-58, 2022.
- SARVEPALLI, Mounika; VELIDANDI, Aditya; KORRAPATI, Narasimhulu. Optimization of siderophore production in three marine bacterial isolates along with their heavy-metal chelation and seed germination potential determination. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2873, 2023.
- SAYAHI, N. et al. Characterization of *Siccibacter* sp. Strain C2 a Novel Rhizobacterium that Enhances Tolerance of Barley to Salt Stress. **Current Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 1–13, 1 ago. 2022.
- SHELAKE, Rahul Mahadev; PRAMANIK, Dibyajyoti; KIM, Jae-Yean. Exploration of plant-microbe interactions for sustainable agriculture in CRISPR era. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 269, 2019.
- SHENG, Miaomiao et al. Siderophore production by rhizosphere biological control bacteria *Brevibacillus brevis* GZDF3 of *Pinellia ternata* and its antifungal effects on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 689, 2020.
- SHAYANTHAN, Ambihai; ORDOÑEZ, Patricia Ann C.; ORESNIK, Ivan John. The role of synthetic microbial communities (SynCom) in sustainable agriculture. **Frontiers in Agronomy**, v. 4, p. 896307, 2022.
- SOUZA, Thais R. de et al. Nutrientes no solo e na solução do solo na citricultura fertirrigada por gotejamento. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 3, p. 484-493, 2015.
- SUTIO, G. et al. *Serratia marcescens* strain NPKC3_2_21 as endophytic phosphate solubilizing bacteria and entomopathogen: Promising combination approach as rice biofertilizer and biopesticide. **Biodiversitas**, v. 24, n. 2, p. 901–909, 2023.
- SUYAL, Deep Chandra et al. Microbiome change of agricultural soil under organic farming practices. **Biologia**, v. 76, n. 4, p. 1315-1325, 2021.

TENG, Y. et al. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil.

Bioresource Technology, v. 101, n. 10, p. 3437–3443, maio 2010.

TYC, O. et al. Volatiles in inter-specific bacterial interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, 2015.

ULRICH, K. et al. Genomic Analysis of the Endophytic *Stenotrophomonas* Strain 169 Reveals Features Related to Plant-Growth Promotion and Stress Tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 16 jun. 2021.

VITÓRIA, Marina Ferreira da. *Seleção de combinações de copa e portaenxerto de citros na presença de HLB*. 2022. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2022.

XU, J. et al. The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

XU, S. et al. Role of novel bacterial *Raoultella* sp. strain X13 in plant growth promotion and cadmium bioremediation in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 9, p. 3887–3897, 2 maio 2019.

XU, Y. et al. A *Yokenella* regensburgi strain effectively removes Cu(II), Pb(II), and Cd(II) through a combination of absorption and mineralization modes. **Journal of Water Process Engineering**, v. 58, 1 fev. 2024.

XU, Q. et al. Effects of maturity stage and mancozeb on phyllosphere microbial communities and the plant health potential of silage maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, p. 1581401, 4 jun. 2025.

WANG, W. et al. Consistent responses of the microbial community structure to organic farming along the middle and lower reaches of the Yangtze River. **Scientific Reports**, v. 6, 11 out. 2016.

WANG, Nicole R.; HANEY, Cara H. Harnessing the genetic potential of the plant microbiome. **The Biochemist**, v. 42, n. 4, p. 20-25, 2020.

WANG, Y. et al. Richness and antagonistic effects co-affect plant growth promotion by synthetic microbial consortia. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104300, 1 fev. 2022.

YANG, Yazhen et al. Differences in the soil bacterial communities under organic farming and conventional farming modes revealed by 16S rDNA sequencing. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 15, n. 1, p. 10-19, 2021.

ZHANG, C. et al. *Serratia marcescens* PLR enhances lateral root formation through supplying PLR-derived auxin and enhancing auxin biosynthesis in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 11, p. 3711–3725, 2 jun. 2022.