

BIOPROSPECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO
COM CEPAS DEGRADADORAS DO GLIFOSATO E PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL, ISOLADAS DE SOLOS DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

BIANCA DO CARMO SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2025

BIOPROSPECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO
COM CEPAS DEGRADADORAS DO GLIFOSATO E PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL, ISOLADAS DE SOLOS DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

BIANCA DO CARMO SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Alessandro Coutinho Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2025

BIOPROSPECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO
COM CEPAS DEGRADADORAS DO GLIFOSATO E PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL, ISOLADAS DE SOLOS DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

BIANCA DO CARMO SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal”

Aprovada em 21 de fevereiro de 2025

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALINE CHAVES INTORNE**
Data: 26/02/2025 09:55:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a Aline Chaves Intorne (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – IFRJ

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA SENNA FERREIRA COSTA**
Data: 27/02/2025 08:20:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fernanda Senna Ferreira Costa (D.Sc., Biotecnologia Vegetal) – FAESA

Documento assinado digitalmente
 **MARCO ANTONIO MARTINS**
Data: 26/02/2025 21:19:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Marco Antonio Martins (Ph.D., Microbiologia do Solo) – UENF

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRO COUTINHO RAMOS**
Data: 27/02/2025 10:13:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Orientador)

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586 Silva, Bianca do Carmo.

Bioprospecção e desenvolvimento de um consórcio bacteriano com cepas degradadoras do glifosato e promotoras do crescimento vegetal, isoladas de solos do Espírito Santo, Brasil / Bianca do Carmo Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

139 f. : il.

Bibliografia: 98 - 126.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2025. Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

1. enriquecimento. 2. biodesign. 3. biofertilizante. 4. sustentabilidade. 5. roundup. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

*Aos meus pais José Dias e
Maria Lúcia do Carmo. Vocês são
a razão de todas as minhas
conquistas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria e pela graça concedida ao longo desta jornada. Sem Sua presença, este trabalho não seria possível.

Aos meus pais, pelo amor e apoio constante, vocês são a base de tudo que conquistei até aqui. Aos meus irmãos e aos meus queridos sobrinhos, por serem fonte de alegria e inspiração.

À Brena Souza, que se tornou um dos melhores presentes que o doutorado me proporcionou. Breninha, querida e parceira de pesquisa, que esteve comigo durante todas as fases do doutorado, meu sincero agradecimento pela amizade, apoio e colaboração incondicional.

À Júnia Souza, por todo cuidado e carinho.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB), pela parceria, suporte técnico e científico, e por contribuírem para um ambiente de pesquisa estimulante e colaborativo. Em especial para Amanda Bertolazi e meu querido IC, Arthur Pêgos, pela dedicação e assistência imprescindíveis ao longo do trabalho.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Universidade Vila Velha (UVV) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo suporte e comprometimento durante todo o doutorado.

Ao meu orientador, professor Alessandro Coutinho Ramos, por todos os seus ensinamentos, não os esquecerei.

Aos membros da banca, Fernanda Senna e aos professores Aline Intorne e Marco Antonio, pela participação neste momento tão importante.

Obrigada a todos que contribuíram com a minha formação. Sintam-se abraçados, e que Deus proteja, ilumine e guie sempre os nossos caminhos.

Meu sincero agradecimento a todos.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Aspectos gerais do café arábica (<i>Coffea arábica</i>)	5
3.2. Aspectos gerais de leguminosas: feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) e soja (<i>Glycine max</i>).....	6
3.2.1. O feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	7
3.2.2. A soja (<i>Glycine max</i>).....	9
3.3. Herbicida glifosato: mecanismo de ação e fitotoxicidade.....	10
3.4. Alterações fisiológicas e morfológicas causadas pelo glifosato	14
3.5. Degradação microbiana do glifosato.....	16
3.6. Efeito dos microrganismos promotores do crescimento vegetal em cafeeiro e em leguminosas.....	18
3.7. Consórcios bacterianos: formulação e aplicação na agricultura	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Solo experimental	27
4.2. Produtos químicos e meios.....	28
4.3. Enriquecimento e isolamento de cepas tolerantes ao glifosato	28
4.4. Avaliação de bactérias tolerantes ao glifosato em meio sólido e líquido	29
4.5. Identificação das cepas bacterianas com base na amplificação do gene 16S rDNA	29

4.6. Caracterização morfológica e fisiológica das cepas	30
4.6.1. Solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido	30
4.6.2. Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	31
4.6.3. Fixação de nitrogênio atmosférico (N ₂) e coloração de Gram	32
4.7. Seleção de cepas bacterianas	32
4.8. Análise da degradação do glifosato (<i>in vitro</i>)	32
4.9. Testes de compatibilidade e formulação do consórcio bacteriano	33
4.10. Biodegradação de glifosato em grãos de <i>Coffea arabica</i> pelo consórcio bacteriano	34
4.11. Promoção do crescimento vegetal	35
4.11.1. Promoção do crescimento vegetal em sementes de tomate (<i>in vitro</i>)	35
4.11.2. Promoção do crescimento em plantas de feijão (<i>ex vitro</i>)	35
4.11.2.1. Localização, delineamento experimental e tratamentos	36
4.11.2.2. Condições de crescimento	36
4.11.2.3. Aplicação do consórcio bacteriano	36
4.11.2.4. Parâmetros de crescimento da cultura do feijão	36
4.11.2.5. Análise nutricional da parte aérea e das raízes	37
4.11.2.6. Componentes de produção	37
4.11.3. Promoção do crescimento em plantas de soja (<i>ex vitro</i>)	37
4.11.3.1. Localização, delineamento experimental e tratamentos	37
4.11.3.2. Condições de crescimento, aplicação do consórcio e glifosato	38
4.11.3.3. Parâmetros de crescimento da cultura da soja	38
4.12. Análise estatística dos dados	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Isolamento e contagem de bactérias totais	40
5.2. Tolerância bacteriana ao glifosato em meios sólido ou líquido	42
5.3. Identificação das cepas tolerantes ao glifosato	47
5.4. Curva padrão de crescimento bacteriano	49

5.5. Caracterização fisiológica das bactérias tolerantes ao glifosato isoladas do processo de enriquecimento.....	52
5.5.1. Solubilização de fosfato inorgânico em meios sólido e líquido	52
5.5.2. Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	54
5.5.3. Fixação de nitrogênio atmosférico (N ₂) e coloração de Gram	55
5.6. Seleção das bactérias promissoras para degradação do glifosato e promoção do crescimento vegetal	56
5.7. Análise da degradação do glifosato <i>in vitro</i>	59
5.8. Biodesign das bactérias isoladas com base em habilidade fisiológica	62
5.9. Teste de degradação do glifosato <i>in vivo</i>	64
5.10. Promoção do crescimento vegetal em sementes de tomate (<i>in vitro</i>).....	65
5.11. Promoção do crescimento vegetal em plantas de feijão (<i>ex vitro</i>).....	68
5.11.1. Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea e raiz.....	72
5.11.2. Impacto da inoculação bacteriana na produção do feijão TAA Dama	78
5.12. Promoção do crescimento vegetal em plantas de soja (<i>ex vitro</i>).....	79
6. DISCUSSÃO.....	84
6.1. Efeito do uso do consórcio bacteriano em feijoeiro.....	90
6.2. Interação entre consórcio bacteriano e glifosato em soja RR e convencional	93
7. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

RESUMO

SILVA, Bianca do Carmo; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2025; Bioprospecção e desenvolvimento de um consórcio bacteriano com cepas degradadoras do glifosato e promotoras do crescimento vegetal, isoladas de solos do Espírito Santo, Brasil. Orientador: Prof. D.Sc. Alessandro Coutinho Ramos.

O uso excessivo de defensivos agrícolas, como o glifosato, tem causado danos à saúde e ao meio ambiente. Uma alternativa para melhorar a nutrição e o desenvolvimento do cafeeiro e diminuir a presença do herbicida é a biorremediação utilizando microrganismos. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo isolar bactérias tolerantes e degradadoras do glifosato de uma plantação de café no Espírito Santo, Brasil, caracterizar essas cepas por suas características fisiológicas benéficas às plantas e formular um inoculante bacteriano. Utilizando uma metodologia de bioprospecção (enriquecimento com glifosato), obtiveram-se 35 cepas bacterianas. As cepas foram avaliadas quanto à tolerância ao glifosato em meios sólidos e líquidos (0, 11, 22, 44 e 88 g L⁻¹ de glifosato). Dezesesseis cepas com alta tolerância ao glifosato (≥ 22 g L⁻¹) foram identificadas e caracterizadas por sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato inorgânico e produzir ácido indol-3-acético (AIA). Após análise de similaridade e testes de degradação do glifosato e compatibilidade entre as cepas, três bactérias (CaMP5 - *Priestia* sp.; CaRCA16 - *Achromobacter* sp.; e CaMP33 - *Pseudomonas* sp.) foram selecionadas para formar um consórcio e aplicadas em grãos de café arábica, sementes de tomate, e plantas de feijão e soja. Foi detectado glifosato residual nos grãos de café (0,16 mg kg⁻¹). No entanto, o consórcio bacteriano demonstrou capacidade de biodegradação, reduzindo em 31,25% o glifosato residual, aproximando-se do limite europeu (0,1 mg kg⁻¹) e facilitando a exportação. O consórcio promoveu o crescimento das sementes de tomate (109,8%). Em feijoeiro o consórcio proporcionou aumento no volume e comprimento de raiz (17,1%; 12,5%), massa seca da parte aérea (27,0%), acúmulo de N (20,1%), P (33,0%), K (30,8%), Mg (18,2%), Fe (37,2%), Zn (58,1%), Mn (54,8%), maior número e comprimento de vagens (50%; 43,1%). O consórcio estimulou o crescimento

radicular da soja resistente ao glifosato (SRR) e da soja convencional (SC) (31,6%; 66,7%) e protegeu a SRR dos efeitos do glifosato. A capacidade do consórcio de reduzir os níveis de glifosato nos grãos de café indica que essas bactérias desempenham um papel essencial na biorremediação de contaminantes. Além disso, as propriedades promotoras do crescimento vegetal das cepas (*Priestia* sp., *Achromobacter* sp. e *Pseudomonas* sp.), como fixação de N, produção de AIA e solubilização de fosfato, reforçam seu potencial como bioinoculante multifuncional. Este estudo demonstra que o consórcio bacteriano não só degrada a molécula do glifosato nos grãos de café, como também melhora o desenvolvimento das culturas de feijão e soja, contribuindo para uma agricultura mais sustentável ao minimizar os impactos negativos do glifosato. Dessa forma, o uso de consórcios bacterianos em integração com herbicidas como o glifosato representa uma estratégia inovadora para mitigar seus efeitos adversos e otimizar o potencial produtivo das culturas. Essa abordagem oferece uma alternativa eficaz para reduzir a dependência de insumos químicos, promovendo a sustentabilidade do solo e atendendo às demandas da agricultura moderna.

Palavras-chave: enriquecimento, biodesign, biofertilizante, sustentabilidade, roundup.

ABSTRACT

SILVA, Bianca do Carmo; D.Sc.; State University of Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2025; Bioprospecting and development of a bacterial consortium with glyphosate-degrading and plant growth-promoting strains isolated from soils in Espírito Santo, Brazil. Advisor: Prof. D.Sc. Alessandro Coutinho Ramos.

The excessive use of pesticides, such as glyphosate, has caused damage to health and the environment. An alternative to improve the nutrition and development of the coffee plant and reduce the presence of the herbicide is bioremediation using microorganisms. In this context, the present study aimed to isolate glyphosate-tolerant and glyphosate-degrading bacteria from a coffee plantation in Espírito Santo, Brazil, to characterize these strains by their physiological characteristics beneficial to plants, and to formulate a bacterial inoculant. Using a bioprospecting methodology (enrichment with glyphosate), 35 bacterial strains were obtained. The strains were evaluated for tolerance to glyphosate in solid and liquid media (0, 11, 22, 44 and 88 g L⁻¹ of glyphosate). Sixteen strains with high tolerance to glyphosate (≥ 22 g L⁻¹) were identified and characterized by their ability to fix atmospheric nitrogen, solubilize inorganic phosphate, and produce indole-3-acetic acid (IAA). After similarity analysis and tests of glyphosate degradation and compatibility between the strains, three bacteria (CaMP5 - *Priestia* sp.; CaRCA16 - *Achromobacter* sp.; and CaMP33 - *Pseudomonas* sp.) were selected to form an intercropping and applied to Arabica coffee beans, tomato seeds, and bean and soybean plants. Residual glyphosate was detected in coffee beans (0,16 mg kg⁻¹). However, the bacterial intercropping demonstrated biodegradation capacity, reducing residual glyphosate by 31,25%, approaching the European limit (0,1 mg kg⁻¹) and facilitating export. The intercropping promoted the growth of tomato seeds (109,8%). In common bean, the intercropping provided an increase in root volume and length (17,1%; 12,5%), shoot dry mass (27,0%), accumulation of N (20,1%), P (33,0%), K (30,8%), Mg (18,2%), Fe (37,2%), Zn (58,1%), Mn (54,8%), greater number and length of pods (50%; 43,1%). The intercropping stimulated root growth of glyphosate-resistant soybean (SRR) and conventional soybean (SC) (31,6%; 66,7%) and protected SRR from the effects of glyphosate. The consortium's ability to reduce glyphosate levels in coffee beans indicates that these bacteria play an

essential role in the bioremediation of contaminants. In addition, the plant growth-promoting properties of the strains (*Priestia* sp., *Achromobacter* sp. and *Pseudomonas* sp.), such as N fixation, IAA production and phosphate solubilization, reinforce its potential as a multifunctional bioinoculant. This study demonstrates that bacterial intercropping not only degrades the glyphosate molecule in coffee beans, but also improves the development of bean and soybean crops, contributing to a more sustainable agriculture by minimizing the negative impacts of glyphosate. Thus, the use of bacterial intercropping in integration with herbicides such as glyphosate represents an innovative strategy to mitigate their adverse effects and optimize the productive potential of crops. This approach offers an effective alternative to reduce reliance on chemical inputs, promoting soil sustainability, and meeting the demands of modern agriculture.

Keywords: enrichment, biodesign, biofertilizer, sustainability, roundup.

1. INTRODUÇÃO

O café arábica (*Coffea arabica* L.) é a espécie de café mais amplamente cultivada e consumida no mundo, com o Brasil como principal produtor desse grão, representando 53,5% das exportações globais na safra de 2023/2024 (ICO, 2024a). Adicionalmente, mesmo com uma maior produção total de grãos comparada à safra 2022/2023 (25,2%), essa liderança enfrenta desafios crescentes devido ao custo de produção, instabilidades econômicas e volatilidade nos preços do grão, combinada ao aumento do consumo, o que intensificou as pressões no mercado global de café (ICO, 2024a). Esse cenário destaca a necessidade de inovação contínua para se adaptar às mudanças nos padrões de produção e consumo, além de atender às crescentes demandas dos consumidores por práticas agrícolas mais sustentáveis (Busby et al., 2017).

Para atender a essa demanda crescente, as práticas agrícolas intensivas nas plantações de café brasileiras têm se tornado cada vez mais dependentes de defensivos agrícolas, especialmente o glifosato. Esse herbicida, o mais amplamente utilizado nas plantações de café, pode levar à contaminação do solo, comprometendo sua qualidade e biodiversidade, além de representar riscos à saúde humana devido à sua persistência no ambiente e potencial exposição por meio da cadeia alimentar (van Bruggen et al., 2021). O glifosato [N-(fosfometil) glicina] é um herbicida não seletivo, de ação sistêmica e amplo espectro, amplamente adotado devido à sua eficácia em baixas concentrações e sua suposta baixa toxicidade para mamíferos (Baer et al., 2014). Embora seja considerado de curta meia-vida e com atividade e mobilidade limitadas no solo, o glifosato pode se adsorver às partículas do solo, impactando a microbiota local e afetando o crescimento de culturas subsequentes ou de plantas não alvo por deriva, exsudatos radiculares ou contato com as raízes (Staub et al., 2012; Pinho et al., 2021). Além disso, esse herbicida pode causar distúrbios estruturais nas comunidades microbianas do solo, potencialmente promovendo o crescimento de fungos fitopatogênicos (Johal e Huber, 2009; van Bruggen et al., 2021).

O uso intensivo de glifosato também tem levantado preocupações regulatórias sobre os níveis de resíduos nos alimentos e no solo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil estabelece os Limites Máximos de Resíduos (LMR) para agroquímicos registrados, fixando o LMR do glifosato em alimentos em $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$

(ANVISA, 2024). No entanto, os principais importadores de café, particularmente na Europa — o segundo maior comprador de café do Brasil (USDA, 2024a) —, impõem limites mais rigorosos para o glifosato, com LMR de apenas $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (EFSA, 2024), dez vezes inferior ao limite brasileiro. Essa discrepância destaca a necessidade de estratégias que não apenas melhorem o crescimento das plantas em ambientes tratados com glifosato, mas também mitiguem seu impacto residual no solo e nos grãos de café, garantindo exportações seguras e minimizando os riscos à saúde.

Uma abordagem promissora para minimizar os efeitos residuais do glifosato que envolve o uso de microrganismos capazes de degradar esse herbicida, integrando-os ao manejo agrícola sustentável. A biorremediação assistida por microrganismos apresenta uma estratégia eficaz para a remoção e degradação do glifosato em solos e corpos d'água, prevenindo sua disseminação para áreas não alvo (Massot et al., 2021). Diversas cepas de bactérias e fungos demonstraram a capacidade de metabolizar o glifosato, utilizando-o como fonte de fósforo, nitrogênio e carbono, o que lhes permite prosperar em solos contaminados enquanto simultaneamente melhoram a saúde e a fertilidade do solo (Zhan et al., 2018). Embora algumas cepas microbianas com tolerância e capacidade de degradação do glifosato tenham sido estudadas (Wijekoon e Yapa, 2018, Noguera et al., 2021), a seleção de cepas que também promovam o crescimento das plantas é crucial para o desenvolvimento de bioinoculantes eficazes para o cultivo de café (Massot et al., 2021).

Microrganismos do solo, especialmente bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), podem melhorar significativamente a saúde e o desenvolvimento das plantas (Busby et al., 2017). As principais características das BPCV incluem fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de ácido indol-3-acético (AIA) e aumento do crescimento radicular e da eficiência na aquisição de nutrientes (Wang et al., 2021). Esse grupo de bactérias representa uma tecnologia promissora para a formulação de produtos biológicos, como bioinoculantes, que podem ser aplicados no cultivo de café arábica ao incorporar microrganismos com propriedades de biorremediação e biofertilizantes (Martis et al., 2021; Urgiles-Gómez et al., 2021). Além dos benefícios sob a produtividade do cafeeiro, as BPCV também proporcionam maior produtividade e qualidade dos grãos nas lavouras de leguminosas como feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*), ao auxiliar na fixação biológica de nitrogênio, melhorar a eficiência no uso de nutrientes e

proporcionar tolerância a condições adversas, como baixa disponibilidade hídrica e temperaturas extremas (Filipini et al., 2020; Meert et al., 2020; Ai et al., 2022; Pádua e Florentino, 2022; Serafin-Andrzejewska et al., 2024).

Portanto, o desenvolvimento de bioinoculantes com BPCV está alinhado às práticas agrícolas sustentáveis, oferecendo uma alternativa para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, enquanto mitiga os efeitos residuais do glifosato. Essa abordagem apoia um manejo personalizado e sustentável dentro das propriedades agrícolas (Owen et al., 2015; Di Benedetto et al., 2017; Veja et al., 2020; Mohy-Ud-Din et al., 2023).

Reforçando ainda mais essa estratégia, o uso de microrganismos nativos oferece várias vantagens em relação à introdução de espécies exóticas, incluindo maior adaptabilidade, sustentabilidade e preservação dos ecossistemas locais (Iqbal et al., 2023). Microrganismos nativos são inerentemente adaptados às condições de solo e clima locais, o que aumenta sua eficácia e resiliência, reduzindo o risco de desequilíbrios ecológicos que podem surgir da introdução de espécies não nativas (Iqbal et al., 2023). Portanto, o emprego de cepas nativas como bioinoculantes e agentes de biorremediação não apenas promove a saúde do solo e a disponibilidade de nutrientes para as plantas, mas também fomenta práticas agrícolas mais equilibradas e ecológicas (Babalola e Akindolire, 2011; Aloo et al., 2022).

No entanto, no caso do cultivo de café, nenhum estudo descreveu bioinoculantes nativos compostos por BPCV com capacidade de degradação de glifosato. Espera-se que plantações de café submetidas a aplicações repetidas desse herbicida abriguem microrganismos com potencial de resistência e capacidade de degradação no solo. Da mesma forma, plantas daninhas resistentes a herbicidas, provavelmente hospedam espécies microbianas em sua microbiota capazes de resistir e degradar o glifosato (Veja et al., 2020; Mohy-Ud-Din et al., 2023). Assim, o desenvolvimento de um bioinoculante nativo representa uma abordagem sustentável que, além de favorecer o crescimento das plantas, pode contribuir para a redução dos resíduos de glifosato no ambiente e para o aumento da produtividade do café de forma ecologicamente equilibrada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo isolar bactérias tolerantes e degradadoras do glifosato de uma plantação de café no Espírito Santo, Brasil, caracterizar essas cepas por suas características fisiológicas benéficas às plantas e formular um inoculante bacteriano.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar bactérias tolerantes ao glifosato a partir de solo de uma plantação de café no Espírito Santo, Brasil, utilizando metodologia de bioprospecção baseada em enriquecimento com glifosato;
- Avaliar a tolerância das cepas isoladas ao glifosato em meios de cultura sólidos e líquidos contendo diferentes concentrações do herbicida (0, 11, 22, 44 e 88 g L⁻¹);
- Identificar e caracterizar as cepas bacterianas tolerantes ao glifosato quanto à sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol-3-acético (AIA);
- Selecionar bactérias para a formulação de um consórcio bacteriano, com base em: tolerância e degradação do glifosato, análise de similaridade e compatibilidade entre as cepas;
- Aplicar o consórcio bacteriano selecionado em grãos de café arábica, sementes de tomate e plantas de feijão e soja, visando avaliar seu potencial como biorremediador da molécula do glifosato e bioinoculante.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais do café arábica (*Coffea arábica*)

O cafeeiro pertence à família botânica Rubiaceae, gênero *Coffea*, e desenvolve-se em regiões tropicais e subtropicais. O gênero *Coffea* é representado por mais de 6 mil espécies, com destaque para café arábica (*C. arabica* L.) e café conilon (*C. canephora* P.), que são as espécies responsáveis pela alta produção no comércio global de café (ICO, 2024b).

C. arabica é nativo das terras altas da Etiópia, as árvores atingem até 6 m de altura, crescem bem em altitudes elevadas e temperaturas amenas (Aerts et al., 2013; Farah e dos Santos, 2015). Apresenta bebida de qualidade superior e menor teor de cafeína, em comparação com as árvores de café conilon, possui aroma marcante e sabor adocicado, sendo largamente difundida no mundo, consumida de forma pura ou em misturas com outras espécies de cafés (EMBRAPA, 2004; Farah e Dos Santos, 2015).

No Brasil, o cultivo de café arábica é recomendado para regiões de temperaturas mais amenas, com médias anuais entre 18 °C e 22 °C, geralmente situadas em altitudes superiores a 500 m, diferindo do café conilon que é recomendado para regiões com temperatura média entre 22 °C e 26 °C, com menor altitude, normalmente abaixo de 500 m (Ferrão et al., 2012; Ferrão et al., 2021).

As árvores de *C. arabica* apresentam crescimento arbustivo, porte grande com folhas ovaladas verde-escuras, sistema radicular profundo e os frutos são ovais, maiores quando comparados ao café conilon e amadurecem em sete a nove meses. Esta espécie é geneticamente diferente de outras espécies de café, pois tem quatro conjuntos de cromossomas em vez de dois (ICO, 2024b).

As fases de florescimento e maturação do café arábica, ocorrendo em épocas que variam em função das condições da região de cultivo, tendo o fator térmico como influenciador na duração da frutificação e na época de maturação, em que, quanto mais baixa a altitude e mais quente for a região, mais precoce será a maturação (Bardin-Camparotto et al., 2012).

C. arabica é a espécie do gênero *Coffea* mais cultivada no mundo, tendo o Brasil como principal produtor e exportador, onde Minas Gerais, São Paulo e Espírito

Santo, se destacam como maiores produtores nacionais, representando um percentual superior a 85% da produção nacional (CONAB, 2024a).

O Brasil, até junho de 2021, possuía 176 cultivares de café cadastradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), das quais 135 são de *C. arabica* e 42 de *C. canephora*. Essas cultivares possuem várias características importantes, tais como: alto potencial produtivo, ampla adaptabilidade a condições edafoclimáticas, época de maturação bem definida, resistência a pragas, doenças e nematoides, boa resposta à poda, tolerância a estresses abióticos, grãos mais graúdos, bebida com qualidade diferenciada, entre outros atributos positivos (Carvalho et al., 2022). No Brasil, as cultivares de café arábica mais difundidas pertencem aos grupos Catuaí, Catucaí, Icatu, Mundo Novo, Sarchimor e Catimor (Carvalho et al., 2022). Estes grupos são formados por cultivares que possuem a mesma origem genética.

3.2. Aspectos gerais de leguminosas: feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*)

Leguminosas são um grande grupo de plantas angiospermas encontradas em todos os continentes, capazes de crescer em ambientes aquáticos e terrestres, sob diferentes condições edáficas e climáticas. Elas formam uma ampla família chamada Fabaceae, que inclui cerca de 20.000 espécies e 750 gêneros, abrange uma variedade de plantas, desde árvores, arbustos, ervas e plantas rasteiras. Esse grupo de plantas é fundamental para a alimentação humana e animal por serem ricas em proteínas, óleos e carboidratos, além de atuar como adubo verde e melhorar a fertilidade do solo (Mesquita et al., 2007; Toledo e Canniatti-Brazaca, 2008; Velázquez et al., 2010; Peix et al., 2014; Ribeiro-Barros et al., 2018).

A maioria das plantas da família Fabaceae tem a capacidade de estabelecer simbioses com bactérias diazotróficas, como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que formam nódulos radiculares onde ocorre a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este processo reduz a necessidade de fertilizantes nitrogenados, tornando as leguminosas impulsionadoras para uma agricultura sustentável (Velázquez et al., 2010).

Portanto, o uso de simbioses capazes de fixar N tem conquistado cada vez mais espaço na agricultura, em especial, os produtos biológicos. Produtos como inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio e a tecnologia de

coinoculação, que combina bactérias do gênero *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, têm demonstrado eficiência em aumentar a produtividade de culturas como a soja e o feijão (Filipini et al., 2020; Meert et al., 2020). Esses insumos biológicos fazem parte de estratégias de manejo integrado que visam equilibrar o solo, proporcionando às plantas uma nutrição adequada e maior resistência a pragas e doenças.

Adicionalmente, as leguminosas também formam associações com outros grupos de microrganismos que podem atuar com biofertilizantes ou bioestimulantes, ao reduzir o uso de fertilizantes minerais e contribuir para maior produtividade e estabilidade na produção das culturas, como através da produção de fitormônios, sideróforos, solubilização de P e K e capacidade antifúngica. *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Priestia* sp., *Burkholderia* sp., *Brevibacillus* sp. são alguns exemplos de cepas que possuem tais características (Ferreira et al., 2018; Pádua e Florentino, 2022; Rocha et al., 2022).

Logo, as leguminosas têm um papel crucial no agronegócio global, tanto pela produção de grãos e forragem quanto pelo impacto positivo no solo e nas práticas de rotação de culturas, tendo como exemplos: a soja, feijão comum, fava, lentilha e ervilha, que podem ser rotacionadas com cereais tais como arroz e milho (Peix et al., 2014). Portanto, essas plantas oferecem uma alternativa sustentável, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos. Além disso, sua capacidade de melhorar a estrutura e fertilidade do solo contribui para sistemas agrícolas mais resilientes e produtivos em longo prazo.

3.2.1. O feijão (*Phaseolus vulgaris*)

O feijão comum (*P. vulgaris* L.) é originário da América do Sul, México e Guatemala, caracterizado por ser uma espécie de ciclo anual, pertencente à família Fabaceae e gênero *Phaseolus* (Freitas, 2006; Santos and Gavilanes, 2006). Este gênero possui 55 espécies, das quais *P. vulgaris* é o mais cultivado e consumido no mundo. Esta espécie possui ciclo de cultivo curto, de 80 a 100 dias, o que o torna ideal para sistemas de rotação de culturas. Os requisitos de fertilizantes para alta produção são de 20 a 40 kg ha⁻¹ de N, 40 a 60 kg ha⁻¹ de P e 50 a 120 kg ha⁻¹ de K. O feijão é capaz de fixar N, o que pode atender aos seus requisitos para altos rendimentos. No

entanto, uma dose inicial de N é benéfica para um bom crescimento inicial (FAO, 2024).

O Brasil é o segundo maior produtor de feijão do mundo, não superando apenas a Índia. Na safra 2023/2024, o Brasil obteve um total de 2.856,3 mil hectares de área plantada e uma produção total de 3.249,3 mil toneladas, tendo o Estado do Paraná como o maior produtor de feijão do país (CONAB, 2024b; FAO, 2024). Tamanha produção está associada à grande importância socioeconômica deste grão, uma vez que representa uma importante fonte de emprego e renda no campo, além de fazer parte da alimentação diária dos brasileiros, seguido por carne e arroz. Adicionalmente, essa leguminosa é rica em proteínas (20 a 35%), fibra alimentar, conteúdo de carboidratos e a presença de vitaminas do complexo B, bem como é uma excelente fonte de nutrientes essenciais como Fe, Ca, Mg e Zn (Mesquita et al., 2007; Toledo e Canniatti-Brazaca, 2008; Porch et al., 2017).

No Brasil, o feijão é cultivado por grande parcela de pequenos produtores, empregando milhares de pessoas, além de também existir médios e grandes produtores. O plantio desta espécie é feito ao longo do ano, concentrando-se em três safras. Devido às características do feijoeiro, às variadas práticas de cultivo nas diversas regiões do Brasil e à diversidade climática do país, é possível encontrar produção de feijão em algum lugar ao longo de todos os meses do ano. Isso ajuda a manter o abastecimento interno constante e a diminuir a oscilação nos preços (Posse et al., 2010).

No entanto, dos fatores de produção do feijoeiro, a disponibilidade de água e a de fertilizantes são aqueles que, com maior frequência, limitam a produtividade desta cultura. Por essa razão, o controle da irrigação e da fertilidade do solo constituem critérios preponderantes para o êxito da agricultura (Tagliaferre et al., 2013).

Dentre os nutrientes essenciais, o N é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura do feijão, sendo que as principais fontes do mesmo são a adubação nitrogenada e a FBN. A adoção da inoculação de bactérias fixadoras de N reduz a necessidade de fertilizantes nitrogenados e contribui para uma agricultura mais sustentável, ao passo que incrementa em biomassa, vagens por planta, grãos por vagens e produtividade (Tocheto e Boiago, 2020). Segundo Das et al. (2018), a FBN é um processo natural e mutualista, entre a planta e os microrganismos, em que estes convertem N atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas.

Além disso, o feijoeiro pode possuir sinergismo com outros microrganismos, a fim de promover o crescimento vegetal, tal qual reportado por Pádua e Florentino (2022), que observaram aumento do desenvolvimento vegetal, solubilização de P e K, bem como produção de fitormônio. Segundo estes autores, o uso de microrganismos é uma alternativa para a redução de impactos ambientais e diminuição de custos de produção da cultura do feijoeiro e, nesse sentido, é necessário conhecer como estes se desempenham associados às culturas em diferentes situações de manejo.

3.2.2. A soja (*Glycine max*)

A soja é classificada como uma planta herbácea, pertence à família Fabaceae cujo gênero é o *Glycine* com destaque para a espécie *G. max* L. Esta espécie que teve origem no continente asiático (China antiga) apresenta ciclo anual (90-150 dias) e uma produção de grãos com elevado teor de proteína e composição oleaginosa, com teores de proteína e óleo nos grãos que podem superar 37% e 22%, respectivamente (Câmara, 2015; Balbinot Júnior et al., 2015; Oliveira et al., 2018). A soja é uma leguminosa, autógama e caracterizada por apresentar um caule herbáceo, pouco ramificado, com altura média de 0,5 a 1,5 metros, raízes pivotante e folhas alternadas, tendo a quantidade de vagens influenciadas pelo ambiente e condições de cultivo (Sedyama et al., 1999).

O Brasil é o maior produtor de soja do mundo, correspondendo a 39%, seguido por Estados Unidos (29%) e Argentina (12%) (USDA, 2024b). Na safra 2023/2024, o Brasil obteve um total de 46.029,8 mil hectares de área plantada e uma produção total de 147.382,0 mil toneladas, tendo o Estado do Mato Grosso como o maior produtor de soja do país, responsável por 27% da produção nacional (CONAB, 2024b).

Segundo Pipolo et al. (2015), a principal utilização da soja, tanto no Brasil como nos demais países, é como matéria-prima para a indústria de esmagamento, que produz óleo e farelo. No Brasil, a soja é a principal commodity do agronegócio, correspondendo a 51,2% de toda a produção de grãos no país (CONAB, 2024b). Um dos principais fatores por trás desse cenário é o desenvolvimento de tecnologias inovadoras, que tem impulsionado um aumento significativo na produção, com destaque para a FBN. Estima-se que o Brasil economizaria cerca de R\$15 bilhões/ano ao dispensar completamente o uso do N mineral na adubação,

considerando os custos do fertilizante, os custos operacionais para aplicá-lo na semeadura e/ou em cobertura. Além disso, não usar N mineral traz benefícios ao ambiente, pois reduz a contaminação das águas subterrâneas com nitrato e reduz a contaminação atmosférica com óxido nitroso (um dos gases de efeito estufa) (Dall' Agnol, 2016).

No entanto, devido as exigências de mercado, o aumento da produção da soja demanda, cada vez mais, o aprimoramento nas práticas fitotécnicas e biotecnológicas, incluindo intervenções estratégicas no processo produtivo, desde a implantação da lavoura, aumento da eficiência da adubação, determinação de melhor época de semeadura, escolha de melhores cultivares e utilização de estirpes de *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* mais eficientes (Rezende et al., 2004; Dall' Agnol, 2016; Bazzo e Marinho, 2021).

Nessa perspectiva, a adoção conjunta de práticas adequadas de manejo e o uso de cultivares com alto potencial produtivo são decisivos para manter o status do Brasil como uma potência internacional na produção e produtividade de soja. No entanto, devido ao aumento dos custos de produção da cultura nos últimos anos, tornou-se comum a busca por cultivares com alto potencial produtivo e adaptadas às macros e microrregiões, a fim de otimizar o sistema de produção da cultura e aumentar a lucratividade por unidade de área (Paraginski et al., 2024).

Além disso, o uso de biotecnologias que se estendem ao uso de microrganismos como *Bradyrhizobium* tem se mostrado promissor, como o uso a microrganismos capazes de melhorar a aquisição de nutrientes e proporcionar maior resistência a estresses bióticos e abióticos (Dall' Agnol, 2016).

3.3. Herbicida glifosato: mecanismo de ação e fitotoxicidade

O glifosato (glyphosate) [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida não seletivo, de ação sistêmica, pós-emergente, com rápida absorção e translocação através do xilema ou floema (Rodrigues e Almeida, 2018; Kanissery et al., 2019). Este composto de fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e massa molecular de $169,01 \text{ g mol}^{-1}$ é um sólido branco, muito solúvel em água (12 g L^{-1} a 25 °C) e corresponde ao herbicida mais comercializado no mundo, largamente usado em áreas agrícolas (Amarante Junior et al., 2002; Baer e Marcel, 2014). Seu amplo espectro de ação permite que seja utilizado no controle de plantas infestantes anuais, perenes, de folha estreita e folha larga, além

do uso em lavouras transgênicas e controle de plantas aquáticas em reservatórios de água, com destaque para as culturas de arroz, cana-de-açúcar, café, milho e soja (Galli e Montezuma, 2005; Kanissery et al., 2019).

A absorção do glifosato é um processo bifásico que envolve uma rápida penetração nas cutículas das folhas da planta, onde é translocado de forma simplástica através do floema para os meristemas apicais e, também, através da rota apoplástica (Monquero et al., 2004; Shaner, 2009). A duração desse processo depende de vários fatores, como espécie e idade da planta, condições ambientais, surfactantes e concentração do pesticida na calda (Satchivi et al., 2000).

O mecanismo de ação do glifosato ocorre por meio de inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), impedindo a biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, que são necessários para a síntese de proteínas, provocando o aumento do ácido chiquímico (Duke e Powles, 2008). Dessa forma, com a aplicação do glifosato, a EPSPS, alvo molecular do glifosato, catalisa a transferência do grupamento enolpiruvil do PEP (fosfoenol-piruvato) para o S3P (chiquimato-3-fosfato), formando o produto EPSP (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato) e um fosfato inorgânico (Pi) (Figura 1) (Martinez et al., 2018).

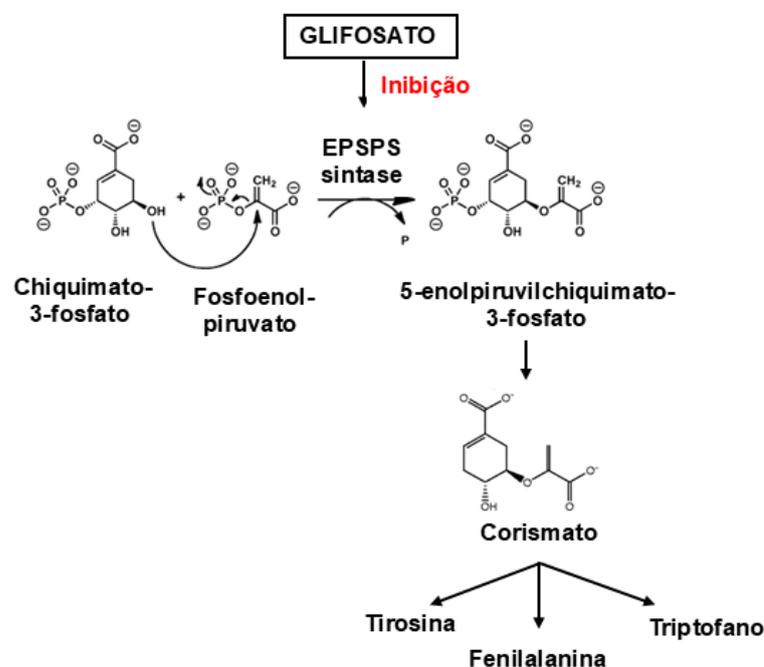


Figura 1: Modo de ação do glifosato em plantas, adaptado de Martinez et al. (2018) e Zhan et al. (2018).

Esta rota está relacionada com o declínio de produtos intermediários da fixação de carbono, redução da fotossíntese, inibição da síntese de clorofila, estimulação da produção de etileno, redução da síntese de proteínas e elevação da concentração de AIA (Cañal et al., 1987; Zobiolo et al., 2010; Martinez et al., 2018; Kanissery et al., 2019). Logo, a ação do glifosato é sistêmica, uma vez que inicia com a absorção do composto pelo tecido vivo das plantas seguindo por sua translocação, via xilema ou floema, através da planta para os tecidos meristemáticos ativos.

Por ser um herbicida sistêmico de aplicação foliar, possui dependência da translocação através do floema (preferencialmente) para uma atividade ideal. Esse herbicida deve atravessar a barreira da cutícula e entrar nas células das folhas maduras (simplasto). Este transporte pode envolver processos de difusão ativos (mediados por proteínas) e/ou passivos. Uma vez dentro do simplasto, transloca-se das folhas de origem para as folhas mais jovens do dreno através do floema, além de translocar-se para regiões meristemáticas, muitas vezes junto com o movimento de açúcares fotossintéticos (Gaines et al., 2020).

Portanto, a eficácia do glifosato é dependente de processos como a retenção da molécula na superfície foliar, a absorção foliar, a translocação na planta até o sítio de ação e inibição da enzima alvo, a EPSPS, onde o produto vai exercer sua atividade herbicida (Satchivi et al., 2000; Ferreira et al., 2006). Segundo Galli e Montezuma (2005), o herbicida se degrada através de fotodegradação e transformações químicas naturais, ou bióticas, com processos extras e intracelulares, por intermédio de enzimas de microrganismos.

Embora seja eficiente no controle de plantas daninhas, existem relatos por parte de alguns pesquisadores dos diferentes efeitos fisiológicos induzidos por esse herbicida, como o trabalho desenvolvido por Basso et al. (2011), que relata que a soja tolerante ao glifosato pode sofrer injúrias ocasionadas pelo herbicida, sob determinadas condições e formulações do sal do produto.

Segundo Velini et al. (2008), todas as espécies de plantas são sensíveis ao glifosato quando não sofreram nenhuma transformação transgênica. A inibição da enzima se procede em maior ou menor grau nas diversas espécies de plantas, o que indica uma variabilidade funcional da enzima EPSPS em seu complexo de ligação. Como verificado por Carvalho (2011), estudando plantas jovens das cultivares de café Catucaí Amarelo e Acaíá, foi observado um menor crescimento das cultivares quando submetidas ao tratamento com glifosato.

Para Serra et al. (2011), a frequência de aplicações de glifosato exerce influência na eficiência nutricional do N, Mn, Fe, Cu e Zn. Em trabalho de Eker et al. (2006), foi observado que o uso contínuo do glifosato pode influenciar a imobilização de nutrientes no solo e nas plantas; fator este ocasionado também por deriva. A deriva consiste no deslocamento das gotas aspergidas na pulverização em plantas não alvo. Para Nuyttens et al. (2011), a deriva de produtos fitossanitários é considerada um dos maiores problemas da agricultura moderna. Em avaliações do efeito da deriva de glifosato em plantas, além da porcentagem de intoxicação, alterações no crescimento, sensibilidade entre os órgãos da planta e desenvolvimento das plantas podem ser observados (Borges et al., 2021).

A eficiência da aplicação dos herbicidas depende de vários fatores, como a relação entre as gotas e o alvo, a qual determinam a retenção ou a perda do herbicida; os tipos de bicos a serem utilizados, que irão produzir tamanho de gotas que permita eficácia de aplicação, penetração e deposição de gotas nas folhas, com uniformidade; a forma do alvo; a natureza física da superfície e o ângulo de incidência das gotas em relação à superfície; a pressão com que se realiza a pulverização; bem como das condições micrometeorológicas durante a aplicação (Debortoli et al., 2012; Contiero et al., 2018). Estes cuidados são tomados a fim de se evitar o contato das gotas aspergidas com as folhas das plantas não alvo. No entanto, apesar de todos os cuidados tomados, pode haver casos de fitotoxidez causada por herbicidas na cultura de interesse. Alguns dos principais sintomas visuais verificados após intoxicação das plantas pelo glifosato são: murcha, clorose, necrose, malformações (especialmente nas áreas de rebrotamento) e produção de novos ramos devido à morte das gemas apicais, redução do crescimento e no número de folhas (Tuffi Santos et al., 2006; Gravena et al., 2012).

Pinho et al. (2021) relatam que, mesmo com a aplicação de glifosato com equipamentos avançados, há deriva da pulverização para a planta não alvo, o que prejudica a cultura de interesse. Estes autores ainda relatam que este herbicida é de grande importância para a cafeicultura e que há dificuldades em evitar contato indesejado do glifosato durante as aplicações. Assim, pode ocorrer intoxicação das plantas não alvo promovida pela deriva de produtos não seletivos.

3.4. Alterações fisiológicas e morfológicas causadas pelo glifosato

O glifosato afeta vários processos fisiológicos das plantas, uma vez que o efeito do herbicida não se restringe somente à inibição da biossíntese de aminoácidos aromáticos. Na literatura, há estudos que evidenciam que o glifosato exerce inúmeros efeitos secundários ou indiretos na fisiologia vegetal, como a limitação de macro e micronutrientes importantes devido à sua ação quelante, inibição enzimática, indução de estresse oxidativo através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas plantas, redução da taxa fotossintética ao inibir a biossíntese de clorofilas e, ainda, reduzindo a produção de fitoalexinas, o que pode causar um aumento na incidência de patógenos, resultando no desenvolvimento de doenças (Johal e Huber, 2009; Gomes et al., 2014; Gomes et al., 2017; Hammerschmidt, 2018; Van Bruggen et al., 2021).

A síntese de clorofila pode ser interrompida pelo glifosato, através da diminuição da concentração de Mg nas folhas, provocando a redução do conteúdo de clorofila e da fotossíntese (Cakmak et al., 2009). Da mesma forma, acontece com a deficiência de Fe induzida por glifosato, que compromete a catalase e a peroxidase – enzimas altamente sensíveis à privação de Fe. Segundo Gomes et al. (2014), a redução da disponibilidade de metais e aminoácidos associados ao fotossistema II, pode reduzir sua capacidade de transferir energia luminosa para a cadeia de transporte de elétrons, o que pode explicar a redução da atividade fotossintética quando as plantas são expostas ao glifosato.

O glifosato pode ser tóxico para todas as plantas não alvo (culturas de interesse), especialmente aquelas que não são organismos geneticamente modificados, uma vez que apresentam os mesmos efeitos das plantas alvo (daninhas) quando expostas à aplicação acidental ou deriva. Essa exposição pode afetar os meristemas, os níveis de chiquimato, os aminoácidos livres totais e os compostos fenólicos totais, podendo causar sintomas transitórios ou permanentes (Gravena et al., 2012).

Em trabalho realizado por Zobiolo et al. (2011), o fornecimento de doses crescentes de glifosato (4, 5 e 12 g L⁻¹) pode causar uma diminuição dos parâmetros fotossintéticos e pigmentos clorofilados ao reduzir o acúmulo de macro (N, P, K Ca, Mg e S) e micronutrientes (Zn, Mn, Fe, Cu e B) das plantas. Já o aparecimento de sintomas visuais nas folhas e/ou morte das plantas não está associado somente ao

acúmulo de ácido chiquímico, mas também é atribuído a desregulação da produção de compostos secundários, comprometimento do fluxo de carbono, biossíntese de proteínas e acúmulo de nutrientes (Zobiole et al., 2010).

O glifosato também pode causar anormalidades nas características morfológicas das plantas, tais como: limitação no desenvolvimento da parte aérea e de raiz primária, redução da emissão de raízes secundárias e engrossamento e amarelecimento gradativo do hipocótilo, sendo esses sintomas aumentados conforme o aumento da concentração de equivalente ácido de glifosato (0, 0,432, 0,864, 1,296 e 1,728 g L⁻¹) (Bertagnolli et al., 2006). A redução da emissão de raízes secundárias e o menor desenvolvimento das plantas causadas pelo glifosato é atribuído ao impedimento da biossíntese de aminoácidos o que, concomitantemente, tem efeitos inibitórios na organogênese, impedindo a diferenciação das raízes (Nagata et al., 2000; Bervalde et al., 2010).

Através da morfologia foliar é possível avaliar os efeitos da deriva causados por diferentes formulações de glifosato, e compreender os mecanismos de intoxicação e o diagnóstico de injúrias. Tuffi Santos et al. (2008) caracterizaram anatomicamente os efeitos provocados pelas formulações comerciais de glifosato (Scout®, Roundup NA®, Roundup transorb® e Zapp QI®) registraram que tais formulações causaram o colapso do parênquima lacunoso adjacente à região dos estômatos, o rompimento da parede periclinal externa da epiderme e, consecutivamente, o colapso de tecidos mais internos, como o colênquima subepidérmico e a plasmólise dos tecidos.

Em trabalho desenvolvido por Reis et al. (2018), foi observado em plantas de café que o glifosato reduz a espessura da epiderme adaxial e abaxial e do parênquima paliádico, e aumenta a espessura do parênquima esponjoso. Portanto, o estudo do diagnóstico da análise visual e prognóstico da anatomia vegetal são parâmetros fundamentais para avaliar a sensibilidade entre as plantas e o potencial fitotóxico de herbicidas (Tuffi Santos et al., 2008).

O uso do herbicida glifosato pode permitir o controle de plantas daninhas, no entanto, modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas provocadas pela aplicação ineficiente e/ou irracional podem afetar as características da planta não alvo, aumentando a sensibilidade da molécula do glifosato. Portanto, as estratégias para melhorar os efeitos predisponentes do glifosato sobre o status da planta incluem a seleção criteriosa das taxas de aplicação de herbicidas, correção de micronutrientes, desintoxicação do glifosato em tecidos meristemáticos e solo, mudanças nas práticas

culturais para aumentar a disponibilidade de micronutrientes para absorção pelas plantas e correção biológica com microrganismos resistentes ao glifosato para fixação de nitrogênio e disponibilidade de nutrientes (Johal e Huber, 2009).

3.5. Degradação microbiana do glifosato

Além de afetar as funções fisiológicas da planta, o glifosato pode afetar negativamente muitos microrganismos benéficos do solo, porém, há microrganismos que têm mostrado interação positiva com a degradação do glifosato, como as BPCV e os fungos endofíticos que habitam a zona radicular ou rizosfera (Kremer et al., 2005; Helander et al., 2018; Wijekoon e Yapa, 2018) contudo, as respostas microbianas ao glifosato variam consideravelmente entre as espécies (Martinez et al., 2018).

A velocidade de degradação do glifosato no solo está associada à quantidade elevada de microrganismos existentes nestes solos, onde estes microrganismos utilizam o herbicida como fonte de energia, P, N e C, por meio de três principais metabólitos intermediários do metabolismo do glifosato - ácido aminometilfosfônico (AMPA), sarcosina e acetilglifosato - sendo AMPA, o metabólito mais frequentemente detectado na biodegradação do glifosato (Figura 2) (Zhan et al., 2018). Ao contrário da via AMPA, os microrganismos que metabolizam o glifosato em sarcosina desintoxicam completamente o glifosato utilizando a sarcosina como nutriente de crescimento, enquanto os microrganismos que convertem o glifosato em acetilglifosato não podem utilizar o acetilglifosato como fonte de P (Zhan et al., 2018).

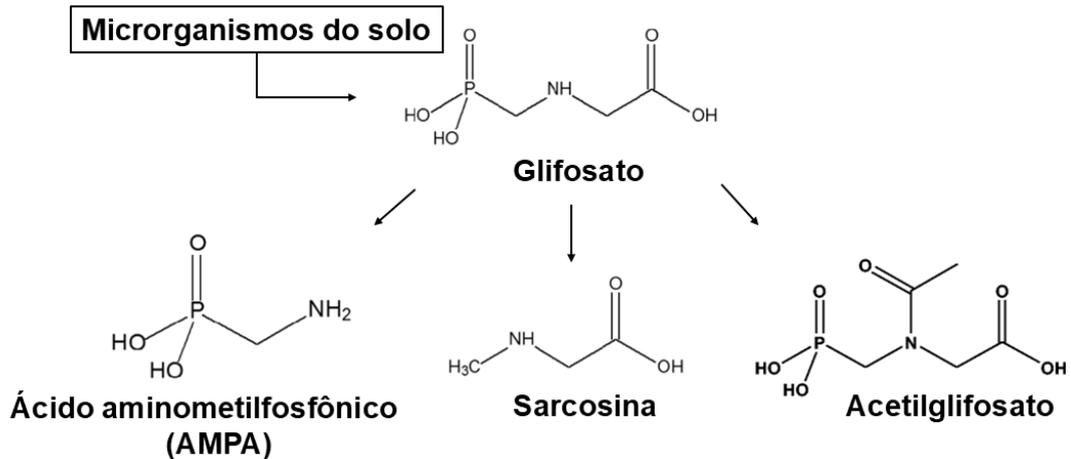


Figura 2: Degradação microbiana do glifosato: Metabólitos Intermediários (AMPA, sarcosina e acetilglifosato). Adaptado de Zhan et al. (2018).

Os efeitos positivos ou negativos do herbicida na microbiota do solo podem ser resultados das dosagens de aplicação, formulação do glifosato e resistência microbiana (Helander et al., 2018). Ademais, a adaptação e resistência da população microbiana ao glifosato é produto de uma forte condição de pressão seletiva que envolve sensibilidade ou insensibilidade ao herbicida, considerando que uma quantidade significativa do produto pode ficar na superfície do solo durante as aplicações pós-emergência (Peng et al., 2012; Avanzi et al., 2019). Nesse sentido, a utilização de células microbianas isoladas de solos contaminados com o herbicida glifosato pode ser considerada uma ferramenta promissora na biorremediação deste poluente, visto que estas células podem estar adaptadas à presença do composto (Noguera et al., 2021).

Desse modo, os efeitos do glifosato em microrganismos no solo têm sido extensivamente investigados usando a biomassa microbiana e a respiração em nível de comunidade, em que o efeito estimulador de altas concentrações de glifosato na respiração do solo é parcialmente atribuído ao metabolismo microbiano do glifosato, mas efeitos secundários devido à mineralização de N e P, também, podem estimular a respiração (Duke et al., 2012).

Em estudos de Massot et al. (2021), buscando estratégia de fitorremediação para remediar glifosato de solos agrônomicos contaminados, observaram que as cepas *Ochrobactrum haematophilum* e *Rhizobium* sp. foram capazes de metabolizar

o glifosato através da via da CP liase ativa, ambos registrando uma degradação de aproximadamente 50% da concentração original de glifosato de 0,05 g L⁻¹. Malfatti et al. (2021) observaram que *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora albida* possuem mecanismos de resposta distintos quando expostos ao glifosato, já que observaram que o glifosato não alterou a germinação de *G. albida*, mas a inibição da germinação de esporos de *R. clarus* em 30,8% a 1 g L⁻¹, sendo, portanto, *Rhizophagus* mais sensível que *Gigaspora*.

Para Rodríguez et al. (2019), microrganismos com o gene da sarcosina oxidase, como *Lysinibacillus sphaericus*, podem degradar o glifosato através da via Carbono-Fósforo (C-P) sem levar à produção de AMPA. Neste trabalho, estes autores observaram uma redução de 79% na concentração de glifosato no solo, propondo que a adição de *L. sphaericus* é uma boa estratégia de biorremediação para solos pulverizados com herbicidas à base de glifosato.

Já em estudos desenvolvidos por Hindersah et al. (2021), foi observado que um consórcio composto por *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Stenotrophomona* ssp. foi capaz de utilizar o glifosato como única fonte de C, N e P, degradando efetivamente até 93%. O experimento comprovou que os consórcios catabolizaram efetivamente o glifosato, principalmente na ausência de N inorgânico. Afirmaram, também, que a utilização do consórcio bacteriano cobriu todo processo bioquímico de degradação do herbicida glifosato, ao passo que inicialmente o glifosato foi convertido em AMPA e glicosilatos através da quebra da ligação C-P liases e, por fim, liberam ortofosfato (Pi), amônia e formaldeído, dependendo da via metabólica.

Portanto, microrganismos promotores do crescimento vegetal podem ter comportamentos diferentes quando submetidos a diferentes concentrações de glifosato, podendo apresentar efeito inibitório de sua atividade, resistência/tolerância e/ou mostrar respostas positivas ao degradar a molécula deste herbicida.

3.6. Efeito dos microrganismos promotores do crescimento vegetal em cafeeiro e em leguminosas

A produção intensiva de café e leguminosas é acompanhada por vários desafios e problemas ambientais, abrangendo perda de biodiversidade, degradação do solo e contaminação devido ao uso contínuo de insumos agrícolas (Peix et al.,

2014; Duong et al., 2020). Dessa forma, o uso de microrganismos promotores do crescimento vegetal em culturas de grande impacto econômico como o cafeeiro e leguminosas como a soja (*G. max* L.) e o feijão (*P. vulgaris* L.) tem ganhado destaque, principalmente rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Paula et al., 2021; Urgiles-Gómez et al., 2021; Rocha et al., 2022). As micorrizas são simbioses mutualistas estabelecidas entre raízes de plantas e fungos do solo, onde nesta interação, os simbiontes transferem água e nutrientes para a planta hospedeira em troca de fotoassimilados e, dessa forma, oferecendo diversos serviços ecossistêmicos em ambientes naturais e agrícolas (Genre et al., 2020).

Na microbiota rizosférica de cafeeiro e de leguminosas é possível encontrar microrganismos que beneficiam o crescimento vegetal. As plantas empregam uma gama de mecanismos para modular seu microbioma, incluindo modificações estruturais e exsudação de metabólitos secundários, que influenciam os microrganismos em sua rizosfera (Pascale et al., 2020). Desse modo, a rizosfera é fortemente influenciada pelo metabolismo vegetal através da liberação de CO₂ e secreção de fotossintatos (Ahkami et al., 2017), com destaque para as RPCV. As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) na rizosfera podem aumentar a produção das culturas agindo como promotoras do crescimento ou fornecendo nutrientes às plantas, como demonstrado com bactérias fixadoras de N e solubilizadoras de fosfato (Muleta et al., 2013; Caldwell et al., 2015).

Já a microbiota endosférica do café é caracterizada pela presença de microrganismos endofíticos, tendo os FMA como os principais endofíticos do cafeeiro (Duong et al., 2020), e algumas bactérias endofíticas (Duong et al., 2021). Os endófitos passam todo ou parte de seu ciclo de vida dentro de seus hospedeiros e são conhecidos por aumentar o crescimento do hospedeiro, ganho de nutrientes e por proporcionar melhorias na capacidade da planta de tolerar estresses abióticos e bióticos (Gouda et al., 2016).

O uso de fungos micorrízicos e RPCV está ganhando importância e aceitação em todo o mundo. Para Muleta (2007), esses microrganismos são biorrecursos que podem se tornar ferramentas potenciais para proporcionar benefícios substanciais ao mercado de grãos, pois são elementos-chave para o estabelecimento de plantas em condições de desequilíbrio de nutrientes. Este autor detectou uma densidade de esporos de FMA (*Glomus* e *Acaulospora* spp.) e rizobactérias (*Pseudomonas* e

Bacillus spp.) associadas ao cafeeiro em diferentes sistemas de produção de café no sudoeste da Etiópia.

Segundo Pratiwi et al. (2020), a diminuição da diversidade microbiana e da fertilidade do solo é um fator importante na redução da produtividade das plantas de café, por isso o uso de BPCV usadas como um biofertilizante alternativo para apoiar a saúde do solo e a produtividade das plantas, é importante no cenário atual. Estes autores realizaram a identificação, caracterização e analisaram o potencial de endófitos bacterianos isolados de raízes de café arábica, onde identificaram cepas de *Bacillus cereus* capaz de produzir AIA ($257,16 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Kluyvera intermedia* capaz de solubilizar fosfato ($4,55 \mu\text{g mL}^{-1}$); e *Pseudomonas tolaasii* capaz de produzir amônio ($1,16 \mu\text{g mL}^{-1}$). Características estas, que desempenham papéis importantes no ciclo de nutrientes e no crescimento vegetal.

Suharjono e Yuliatin (2022) também investigaram as comunidades de bactérias do solo da rizosfera do café e avaliaram a potência no apoio ao crescimento do cafeeiro, e como resultado, identificaram que cepas de *Bacillus subtilis* que produz o hormônio AIA ($104,46 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Pseudomonas putida* solubilizadora de fosfato ($4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Bacillus metilotropicus* é capaz de fixar a amônia ($21,54 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Já em trabalho de Braga Junior et al. (2021), observaram que o uso de *Bacillus subtilis* é uma alternativa que pode proporcionar benefícios para a cultura da soja, como melhor desenvolvimento e produtividade em condições de campo. Estes autores observaram que a formulação líquida à base de *Bacillus subtilis* Bs10 de 300 mL para 50 kg de sementes aumentou 31,8% o rendimento da soja.

Para a cultura do feijão comum, em trabalho de Rocha et al. (2022), foi observado que a diversidade e a abundância de bactérias associadas aos compartimentos de raiz diferem ao longo do ciclo de vida da planta. Contudo, as habilidades das bactérias na promoção do crescimento vegetal e proteção (produção de AIA, síntese de sideróforos e atividade antifúngica) tiveram um papel ativo na resposta às necessidades biológicas da planta em cada estágio, com destaque para os gêneros *Priestia*, *Variovorax*, *Kosakonia*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Leclercia*, *Mucilaginibacter* e *Cupriavidus* com capacidade de produzir fitormônio AIA. Rurangwa et al. (2018) observaram que o inóculo *Rhizobium tropici* CIAT 899 aumentou o rendimento do feijão comum em $0,6 \text{ t ha}^{-1}$, enquanto *Bradyrhizobium japonicum* USDA elevou a produtividade da soja em $4,9 \text{ t ha}^{-1}$. Este trabalho também ressalta a forte influência

do ambiente agroecológico e de estratégias cuidadosas ao direcionar tecnologias e culturas para intensificação sustentável da produção agrícola e atingir resultados de excelência.

As RPCV possuem três importantes funções: (i) biocontrole, por meio de efeitos antagonísticos contra doenças transmitidas pelo solo; (ii) biofertilização, ao aumentar a disponibilidade de nutrientes como N ou P; e (iii) bioestimulação, através da produção de fitormônios como giberelinas ou auxinas (Urgiles-Gómez et al., 2021). Neste contexto, a formulação de bioinoculantes que incluam RPCV podem aprimorar as condições de crescimento do cafeeiro e de leguminosas, diminuindo concomitantemente o uso de fertilizantes químicos, tendo como melhor formulação, do ponto de vista biológico, a utilização de produtos ativos que contenham consórcios com uma ou mais cepas benéficas (Peix et al., 2014; Urgiles-Gómez et al., 2021).

Segundo Timofeeva et al. (2023), o uso de consórcios de multiespécies é a forma mais promissora de uso das bactérias promotoras do crescimento vegetal. Para estes autores, as bactérias intimamente relacionadas à rizosfera vegetal são consideradas como tendo um maior potencial de interação e, provavelmente, contribuem significativamente para o fenótipo do hospedeiro. Além destas, bactérias endofíticas também são eficientes na formulação de bioinoculantes (Prodhan et al., 2023).

Logo, na interação planta-microrganismo, a aplicação de um consórcio de microrganismos em cafeeiro pode proporcionar uma resposta positiva. Como relatado por Asyiah et al. (2020), o consórcio de bactérias endofíticas e rizobactérias suprime efetivamente a população de *Pratylenchus coffeae* e promove o crescimento do café. Neste trabalho, os autores observaram que a aplicação do consórcio composto por *Bacillus* sp. e *Pseudomonas dimunita* deram resultados superiores ao controle, ao aumentar a altura da planta (28,02-44,51%), número de folhas (127,27-168,18%) e área foliar (278,8-425,57%).

Pimentel et al. (2008) afirmaram que, considerando os custos de manutenção das mudas de café nos viveiros durante meses até o seu plantio definitivo no campo, a inoculação das mudas com BPCV *Azospirillum brasilense* (CdT) podem ser uma alternativa para acelerar o desenvolvimento das mudas, reduzindo assim, os custos operacionais de viveiro, bem como aumentar a porcentagem de pegamento no campo.

Também, há estudos com respostas positivas quanto ao uso de BPCV e fertilizantes em leguminosas. Gabre et al. (2020), comparando o feijoeiro com

aplicação de N mineral e com diferentes consórcios, observaram que a inoculação com *Rhizobium tropici*, *Trichoderma asperellum* e BPCV (*Burkholderia* sp. 10N6 e *Bacillus subtilis*) pode promover o crescimento do feijoeiro ao aumentar o peso seco da parte aérea (63,7%) e peso seco das raízes (47,8%).

Outra descoberta também é que o uso de bactéria solubilizadora de fosfato possibilita aumentar a produtividade e reduzir a dose de aplicação de fósforo químico sem comprometer a qualidade dos grãos de feijão. Como reportado por Souza et al., (2023), que registraram que a o uso de 159 mL ha⁻¹ de bactéria solubilizadora de fosfato [*Bacillus subtilis* (CNPMS B2084—BRM034840) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119—BRM033112), com uma concentração de 4x10⁹ células viáveis mL⁻¹] aumentou a produtividade em 389 kg ha⁻¹ (12%) em relação à testemunha.

O rendimento e a qualidade da soja dependem do solo, do clima e das condições agrotécnicas, incluindo a fertilização mineral e a inoculação de sementes. A fertilização com N e a inoculação de sementes são os principais fatores que afetam o rendimento e a composição química das sementes de soja. Como leguminosa, a soja pode fixar N atmosférico livre devido à simbiose com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (Serafin-Andrzejewska et al., 2024). No entanto a combinação de *Bradyrhizobium* com BPCV, tem mostrado excelentes resultados, como também plantas de soja inoculadas somente com BPCV.

Win et al. (2024), comparado com a inoculação de *Bradyrhizobium* sozinha, a coinoculação com cepas de *Pseudomonas* levou a melhorias significativas na eficiência de nodulação, crescimento e desempenho fisiológico nas cultivares de soja Enrei e Fukuyutaka. Além disso, a coinoculação aumentou significativamente o conteúdo total de N e a absorção de íons nos brotos, levando, em última análise, a uma melhoria notável no rendimento de grãos nas cultivares Enrei e Fukuyutaka. Para estes autores a coinoculação de *Bradyrhizobium* – *Pseudomonas* representa uma estratégia de biofertilização potencialmente eficaz para a produção de soja, destacando caminhos promissores para práticas agrícolas sustentáveis.

Em uma meta-análise realizada por Zeffa et al. (2020), descobriram que a coinoculação de soja com *Bradyrhizobium* e outros RPCV pode aumentar substancialmente o número de nódulos (11,40%), a biomassa dos nódulos (6,47%), a biomassa das raízes (12,84%) e a biomassa da parte aérea (6,53%) na soja. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas para o teor de N na parte aérea e rendimento de grãos. Os gêneros bacterianos *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas*

foram mais eficazes. Por fim, estes autores enfatizam que, a tecnologia de coinoculação pode ser considerada uma estratégia economicamente viável e ambientalmente sustentável para o cultivo de soja.

Ai et al. (2022) desenvolveram um método inovador para isolar rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) com afinidade pela soja, utilizando aglutinina de soja (SBA), uma lectina específica que se liga a glicoconjugados bacterianos. A técnica emprega SBA conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-SBA), permitindo que apenas bactérias com glicoconjugados compatíveis se liguem à SBA fluorescente. A separação das bactérias marcadas é realizada por citometria de fluxo, garantindo uma triagem eficiente. Com essa abordagem, foram isoladas 33 linhagens de RPCV adaptadas à rizosfera da soja. Neste estudo, mais de 40% das cepas exibiram todas as cinco características promotoras do crescimento de plantas (produção de AIA, produção de sideróforos, solubilização de fosfato inorgânico, solubilização de fosfato orgânico e solubilização de potássio), sendo estes pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Cupriavidus* sp., *Rhizobium* sp., *Caulobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. Este estudo estabeleceu uma nova técnica usando SBA como uma ferramenta para isolar bactérias da rizosfera da soja.

Assim, a aplicação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em cafeeiro, feijão e soja tem se mostrado promissora, seja com o uso de fungos ou BPCV, com aplicação isolada ou combinada. Demonstrando que estas culturas podem ter respostas positivas à inoculação com simbioses, o que trazem benefícios para o crescimento, nutrição e fisiologia da planta hospedeira, além disso, contribuem para a produtividade das plantas e na redução da dependência de fertilizantes químicos, diminuindo os riscos ambientais decorrentes de seu uso (Pratiwi et al., 2020; Liu-Xu et al., 2024).

3.7. Consórcios bacterianos: formulação e aplicação na agricultura

Os consórcios bacterianos são combinações de bactérias com relação sinérgicas e com uma ou mais funções, que podem atuar como biofertilizantes, bioestimulantes ou biorremediadores. Estas combinações representam uma abordagem promissora para a agricultura sustentável, envolvendo a associação de diferentes bactérias com características complementares que promovem o

crescimento vegetal e melhoram a saúde do solo (Denaya et al., 2021; Florencio et al., 2022). Na agricultura, diversos microrganismos são aplicados para funções específicas: bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são usadas na fixação biológica de nitrogênio (FBN) em soja, e se destacam por serem as bactérias mais utilizadas na agricultura e nas pesquisas reportadas na literatura (Velázquez et al., 2010); *Pseudomonas* e *Bacillus*, conhecidas por promover o crescimento (solubilização de P e outros nutrientes, produção de fitohormônios do crescimento vegetal) e atuar na proteção contra patógenos (Zeffa et al., 2020; Rocha et al., 2022); e *Trichoderma* sp. é utilizado no biocontrole de fitopatógenos (Gabre et al., 2020).

Estudos indicam que a combinação de cepas bacterianas com funções distintas pode maximizar a eficiência dos bioinsumos, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes e a resistência das plantas ao estresse biótico e abiótico (Denaya et al., 2021; Prodhan et al., 2023).

Para Vassilev et al. (2015), a produção de um biofertilizante ou bioestimulante bacteriano envolve várias etapas: (i) isolamento e seleção de microrganismos com funções específicas e afinidade com a cultura alvo; (ii) caracterização morfológica e fisiológica das bactérias selecionadas, considerando o meio de cultivo e os parâmetros de fermentação; (iii) definição do método de formulação que assegure a durabilidade do consórcio no solo, mesmo sob condições de estresse; (iv) escalonamento para produção em nível comercial; (v) controle de qualidade durante a produção e armazenamento; e (vi) definição dos métodos de aplicação em campo para garantir a eficácia dos benefícios.

Na agricultura, esses consórcios são aplicados por meio de inoculantes biológicos, muitas vezes formulados com aditivos que prolongam a viabilidade das bactérias e garantem sua eficácia no campo. Pesquisas recentes têm focado na otimização desses consórcios, testando diferentes veículos de formulação, como pós e suspensões líquidas, e aditivos estabilizantes, como polímeros e agentes protetores, para aumentar a longevidade e eficiência do produto. A tecnologia de encapsulamento também tem sido explorada, permitindo uma liberação gradual dos microrganismos e aumentando sua persistência no solo. Logo, a etapa de formulação e a associação de microrganismos a um veículo (carreador) adequado com aditivos surgem como estratégias e alternativas para melhorar o tempo de prateleira e a eficiência do biofertilizante, entre outras características (Florencio et al., 2022).

Para tanto, na indústria, a produção de inoculante envolve a multiplicação de cepas bacterianas que são altamente exigentes a reatores com manipulação asséptica, requer profissionais com conhecimento de microbiologia, de processos microbiológicos e um rigoroso controle de qualidade em todas as fases do processo. Isso porque a formulação de consórcios bacterianos exige uma seleção criteriosa de microrganismos compatíveis, capazes de interagir positivamente no ambiente rizosférico, e por possuir estabilidade da formulação e além de viabilidade dos microrganismos ao longo do armazenamento e aplicação (Denaya et al., 2021).

Em relação à aplicação, independentemente do tipo da formulação do inoculante, a semente é um dos carreadores mais comuns, levando os inóculos como revestimentos. Os principais processos para aplicação em sementes se baseiam na: (i) imersão em uma suspensão contendo o inoculante, por um período pré-determinado e com posterior secagem da semente; (ii) deposição do inoculante na superfície da semente, com o auxílio de uma matriz/ligante adesiva, tal como polissacarídeos e/ou gomas; (iii) revestimento de filme; e, (iv) peletização (Florencio et al., 2022).

Segundo Kumar et al. (2017), além de aplicação na semente, pode-se aplicar o consórcio bacteriano diretamente no solo ou aplicado nas raízes das plantas. No solo pode ser aplicado geralmente na linha de plantio. Isso facilita a colonização dos microrganismos no ambiente radicular e é especialmente útil para culturas perenes ou para áreas grandes, onde a inoculação direta das sementes não é viável. Essa aplicação pode ser feita em forma líquida, sólida ou encapsulada para liberar os microrganismos gradualmente. A aplicação nas raízes de mudas como hortaliças e frutíferas – tratamento de muda, também é um método eficaz de aplicação, que pode ser realizado durante o transplante por imersão em uma solução contendo o consórcio bacteriano.

Em síntese, cada método de aplicação tem suas vantagens e limitações e deve ser escolhido com base na cultura, no tipo de solo, e nas condições ambientais. Em geral, os consórcios bacterianos ajudam a reduzir o uso de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas, aumentando a produtividade de forma sustentável.

Dessa forma, este estudo contribui para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas voltadas para a sustentabilidade agrícola, ao isolar e caracterizar bactérias tolerantes e degradadoras do glifosato, identificadas por suas propriedades benéficas às plantas. A formulação do consórcio bacteriano resultante representa um

avanço na busca por bioinoculantes eficientes, capazes de mitigar os impactos do herbicida no solo e promover o crescimento vegetal. Assim, os consórcios bacterianos se mostram uma alternativa promissora para a redução da dependência de insumos químicos, fortalecendo práticas agrícolas mais sustentáveis e resilientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Solo experimental

Amostras de solo foram coletadas em junho de 2022 em uma propriedade privada, na cidade de Marechal Floriano, Espírito Santo, Brasil (20°26'36,1"S; 40°46'05,7"O). A propriedade, dedicada ao cultivo de café, tem sido exposta a mais de 20 anos de aplicação contínua de glifosato, caracterizando um solo com histórico de uso intensivo desse herbicida no estado do Espírito Santo. As amostras foram coletadas em três regiões distintas, sendo cada uma composta por três subamostras combinadas para formar uma amostra composta. As três regiões de coleta foram: mata preservada (MP) para servir como tratamento controle, sem o efeito da aplicação de glifosato; na rizosfera do café arábica (RCA); e na rizosfera da planta daninha (RPD) – capim-amargoso (*Digitaria insularis*), presente no meio da plantação de café, visando expandir a busca por bactérias tolerantes e degradadoras deste herbicida (Figura 3). A coleta das amostras foi realizada na camada de 0-20 cm de profundidade, e as amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis, transportadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Vila Velha (UVV), Vila Velha, ES, e armazenadas a 4 °C até o uso.



Figura 3: Localização dos locais de amostragem. (a) Mapa aéreo do local de amostragem. O asterisco branco representa a plantação de café e o asterisco vermelho representa a região de mata preservada. (b) Foto representativa do local de

amostragem demonstrando a rizosfera da planta daninha (seta preta), a rizosfera do café arábica (seta branca) e a mata preservada (seta vermelha).

4.2. Produtos químicos e meios

O herbicida glifosato (Roundup Original Mais) [480 g L⁻¹ do ingrediente ativo equivalente ao ácido N-(fosfonometil) glicina] foi adquirido de um fornecedor local de produtos agrícolas em Vila Velha, Brasil. Para o isolamento de bactérias utilizando glifosato como única fonte de carbono (C), foi utilizado o meio de sais minerais 1 (MSM1). A composição do MSM1 em gramas por litro de água destilada, pH (7,0 a 7,2) foi: KH₂PO₄ (1,5), Na₂HPO₄ (0,6), NaCl (0,5), NH₄SO₄ (2), MgSO₄ × 7H₂O (0,2), CaCl₂ (0,01) e FeSO₄ × 7H₂O (0,001). Para o isolamento de bactérias utilizando glifosato como única fonte de fósforo (P), foi utilizado o meio de sais minerais 2 (MSM2). A composição do MSM2 em gramas por litro de água destilada, pH (7,0 a 7,2) foi: Tris buffer (1,0), glicose (5,0), NaCl (0,5), KCl (0,5), NH₄SO₄ (0,5), MgSO₄ × 7H₂O (0,2), CaCl₂ (0,01) e FeSO₄ × 7H₂O (0,001), conforme descrito por (Benslama e Boulahrouf, 2013). Ambos os meios foram utilizados para isolar bactérias tolerantes e degradadoras do glifosato.

4.3. Enriquecimento e isolamento de cepas tolerantes ao glifosato

Inicialmente, 5 g de solo de cada região de amostragem foram inoculados em 95 mL de meio MSM1 e MSM2 contendo 0,5 g L⁻¹ de glifosato em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL e incubados em condições escuras, com agitação a 150 rpm e 30 ± 2 °C durante sete dias. Após esse período, foi retirado uma alíquota de 5 mL e transferido para novo meio MSM1 ou MSM2 com uma concentração de 1 g L⁻¹ de glifosato, incubando novamente por sete dias. Esse processo foi repetido em três transferências consecutivas, aumentando gradualmente a concentração de glifosato para 3, 6 e 12 g L⁻¹ de glifosato, com incubação de sete dias entre cada transferência, totalizando 35 dias de enriquecimento. Ao final do processo de enriquecimento, as amostras enriquecidas foram diluídas adequadamente (10⁻³ a 10⁻⁵), plaqueadas em ágar nutriente (AN) suplementado com 1 g L⁻¹ de glifosato e incubadas a 30 °C por 24 h (Benslama e Boulahrouf, 2013). As colônias foram contadas quanto a unidades formadoras de colônias (UFC) g⁻¹ de solo seco nos dois meios (MSM1 e MSM2),

selecionadas e purificadas. Também foi realizada uma contagem de UFC resultante da diluição seriada do solo, a fim de obter as bactérias totais das regiões de coleta do solo.

4.4. Avaliação de bactérias tolerantes ao glifosato em meio sólido e líquido

Após o isolamento das cepas originárias do enriquecimento, foi realizada a análise de tolerância ao glifosato em meio sólido e líquido. Para as análises de tolerância ao glifosato em meio sólido, as cepas foram submetidas às concentrações de 0, 11, 22, 44 e 88 g L⁻¹ de glifosato, com três réplicas. Para a análise em meio líquido, foram consideradas aquelas cepas que cresceram em meio sólido contendo concentrações superiores a 22 g L⁻¹ de glifosato.

Para isso, foi realizada uma adaptação na metodologia de uma curva de crescimento bacteriano padrão para quantificar a tolerância das bactérias ao glifosato em meio líquido. Assim, 20 µL (DO 0,9-1,0) de cada bactéria foi pipetado em placas de 96 poços contendo 180 µL de meio DYGS (2 g L⁻¹ de glicose; 1,5 g L⁻¹ de peptona; 2 g L⁻¹ de extrato de levedura; 5 mL de solução a 10% de K₂HPO₄; 5 mL de solução a 10% de MgSO₄ × 7H₂O; 1,5 g L⁻¹ de ácido glutâmico; 20 mL de solução a 10% de ácido málico) suplementado com 22 g L⁻¹ de glifosato. As placas foram incubadas a 30 °C e 650 rpm em um agitador de microplacas (Ion – AGMIC4) por sete dias. A densidade ótica (DO) (630 nm) foi medida a cada 24 h usando um leitor de placas (Polaris).

Após selecionar as cepas tolerantes ao glifosato, foi feita a curva padrão de crescimento dessas bactérias. Para isso, 20 µL de cada cepa bacteriana (DO 0,9-1,0) foram pipetados em placas de 96 poços contendo 180 µL de meio DYGS. As placas foram incubadas a 30 °C e 650 rpm em um agitador de microplacas (Ion – AGMIC4) e a leitura da DO foi realizada a 630 nm nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h de crescimento.

4.5. Identificação das cepas bacterianas com base na amplificação do gene 16S rDNA

A extração de DNA e a identificação das cepas bacterianas foram realizadas de acordo com o protocolo de (Belkebla et al., 2022). Uma alçada de crescimento de

cada colônia bacteriana foi ressuspensa em um microtubo com 200 μL de tampão de extração (Proteinase K a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em 100 mM Tris-HCl e pH 9,0), pré-aquecido a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A mistura foi mantida em um banho seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante a noite (cerca de 16 h) e, inicialmente (nos primeiros 30 min de incubação), foi agitada em vórtex por períodos de 30 segundos, seguidos de cinco min sem agitação.

A extração de DNA foi realizada por amplificação do gene 16S usando o *primer forward* (356F) e o *primer reverse* (1064R). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 25 μL . A mistura foi colocada em um termociclador utilizando o seguinte protocolo: desnaturação inicial a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por cinco min, seguida de 35 ciclos consistindo em três etapas: desnaturação a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 segundos, anelamento a $46 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 segundos, extensão a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 segundos, e uma extensão final a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por sete min. Alíquotas das PCR foram retiradas do produto de PCR e colocadas em géis de agarose a 1%, corados com brometo de etídio para visualizar a presença e a qualidade do DNA extraído. Os produtos de PCR foram purificados, utilizando o kit Zymoclean DNA (Zymo Research, Irvine, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as bactérias foram enviadas para a StabVida para identificação. As sequências recém-geradas do gene 16S rRNA foram comparadas com o GenBank usando a ferramenta BLAST. Árvores de máxima verossimilhança (MV) foram construídas usando o software MEGA X (v. 10.2.6) e o modelo de substituição de nucleotídeos General Time Reversible (GTR). A árvore de MV com melhor pontuação foi estimada por meio de uma análise de *bootstrap* com 1000 replicações. As bactérias foram identificadas e depositadas na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Vila Velha, Brasil.

4.6. Caracterização morfológica e fisiológica das cepas

4.6.1. Solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido

A solubilização de fosfato foi realizada usando dois métodos: um qualitativo e outro quantitativo. Para a avaliação qualitativa, 10 μL de bactérias (DO 0,9-1,0) foram inoculados em três pontos equidistantes em uma placa de Petri contendo meio NBRIP suplementado com 15 g L^{-1} de ágar, pH 7,0 (Nautiyal et al., 1999), e incubados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 dias. Posteriormente, mediu-se o diâmetro do halo de solubilização,

correspondente à parte translúcida ao redor da colônia, em contraste com o meio opaco. A partir dessas medições, o índice de solubilização (IS) foi obtido usando a equação: $IS = \varnothing \text{ halo (mm)} / \varnothing \text{ colônia (mm)}$; e foi classificado como baixo (<2), médio (2-4) e alto (>4) (Berraquero et al., 1976).

Para a avaliação quantitativa, utilizou-se o método descrito por Fiske e Subbarow (1925), com modificações. 2 mL de cada cepa bacteriana (OD 0,9-1,0) foram inoculados em 20 mL de meio NBRIP com fosfato tricálcico e incubados em agitador orbital (Tecnal TE-145) a 30 °C e 130 rpm por 48 h. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas (Eppendorf 5417R) a 10.000 × g por 10 min e filtradas para determinar o fósforo solúvel. O restante do inóculo (18 mL) foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min, e o pH do sobrenadante foi medido. Para a quantificação do fosfato, 150 µL do sobrenadante foram transferidos para poços de uma placa de 96 poços, e 100 µL de revelador foram adicionados. Após 10 min, a absorbância foi medida a 750 nm. O revelador foi preparado misturando 1 mL de solução reveladora com 10 µL de ácido ascórbico 10% e dissolvendo 5 g de molibdato de amônio em 20.6 mL de H₂SO₄, completando o volume para 1 L com água. Foram realizados três réplicas e um controle (meio de cultura sem inóculo).

As bactérias foram classificadas de acordo com o seguinte índice: baixa solubilização (<50 µg mL⁻¹), média (50-90 µg mL⁻¹) e alta (>91 µg mL⁻¹), adaptado de Silva et al. (2019). O pH do meio também foi mensurado após 48 h de crescimento em meio NBRIP líquido.

4.6.2. Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

O AIA foi estimado cultivando 2.5 mL de cada cepa bacteriana (DO 0,9-1,0) em 50 mL de meio DYGS líquido com adição de triptofano (100 µg mL⁻¹) no escuro, por 96 h a 30 °C, com agitação a 130 rpm. O sobrenadante foi obtido centrifugando as culturas por 10 min a 10.000 × g a 25 °C. Após a centrifugação, 100 µL do sobrenadante foi adicionado a uma placa de 96 poços contendo 100 µL de reagente de Salkowski [1 mL de FeCl₃ 0,5 M 50 mL de HClO₄ 50% (v/v)]. A mistura foi deixada no escuro por 30 min a 30 °C para desenvolvimento da cor. A quantificação do fitormônio foi realizada por leitura a 530 nm em um espectrofotômetro, e a quantidade de AIA foi determinada a partir de uma curva padrão com AIA (Sigma) e expressa em µg mL⁻¹. Para cada cepa, foram realizadas três réplicas. As cepas foram classificadas

da seguinte forma: baixa ($<1 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta produção ($>11 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Hartmann et al., 1983).

4.6.3. Fixação de nitrogênio atmosférico (N_2) e coloração de Gram

Para avaliar qualitativamente as bactérias capazes de fixar N_2 , 600 μL de bactérias (DO 0,5) foram inoculados em frascos contendo 10 mL de meio semissólido livre de fonte nitrogenada (NFB) (L^{-1}): 5 g de ácido málico; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de NaCl; 0,02 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 4,5 de KOH; 4 mL de FeEDTA (solução a 1,64%); 2 mL de azul de bromotimol; 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura; 1 mL de vitamina para meio de cultura; 1,8 g de ágar; e pH 6,8, adaptado de Döbereiner et al. (1995) e Kuss et al. (2007). Os frascos foram incubados a 30 °C por cinco dias e, após esse período, a formação de uma zona de película azul indicou a capacidade de fixação de nitrogênio pelas cepas bacterianas (Kuss et al., 2007; Baldani et al., 2014).

A coloração de Gram foi realizada para identificar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, seguindo o procedimento comum: esfregaço de cultura, coloração com violeta cristal, fixação com solução de iodo, descoloração, recoloração com solução de fucsina, secagem e, finalmente, observação ao microscópio (Farias et al., 2023).

4.7. Seleção de cepas bacterianas

Para selecionar as cepas bacterianas com maior capacidade de tolerar glifosato e promover o crescimento de plantas, realizou-se uma análise multivariada usando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis com os seguintes resultados: tolerância ao glifosato, solubilização de P em meio líquido, fixação de nitrogênio e produção de AIA (Clarke et al., 2016).

4.8. Análise da degradação do glifosato (*in vitro*)

Para a degradação do glifosato, as cepas bacterianas (DO 0,9-1,0) advindas do processo de seleção (conforme descrito no item 3.7) foram cultivados em meio mínimo (caldo Czapek-Dox) e suplementado com glifosato (4,5, 9,0, 13,5 e 18,0 g L^{-1}

1) como única fonte de P, através de um método colorimétrico, adaptado de Adelowo et al. (2014). O caldo Czapek-Dox continha (g L^{-1}): 30 g de sacarose; 3 g de NaNO_3 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; e 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O meio foi tamponado com $7,9 \text{ g L}^{-1}$ de Tris (pH 7,2).

No processo, 500 μL do inóculo ajustado foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio mínimo sem fósforo (caldo Czapek-Dox) e as concentrações de glifosato (4,5, 9,0, 13,5 e $18,0 \text{ g L}^{-1}$), os tubos foram cobertos por papel alumínio e incubados a 150 rpm e 30°C por sete dias. Após a incubação, 1,5 mL do meio foi centrifugado a 4600 g por 5 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL, ao qual foram adicionados 9,5 mL de TCA 5%. A mistura foi agitada e deixada descansar por 5 min, seguida de nova centrifugação a 1500 rpm por 5 min. Em seguida, 5 mL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo Falcon, junto com 1 mL de molibdato de amônio a 2,5% e 0,5 mL de ácido 1,2,4-aminonaftosulfônico a 0,25%. A mistura foi agitada e deixada repousando por 10 min. Após esse tempo, 250 μL da mistura foram transferidos para uma placa de Elisa e a absorbância foi medida a 690 nm, permitindo a quantificação do fosfato.

Nesta análise é realizada a comparação do resultado do meio com a cepa bacteriana e a concentração de glifosato em relação a um meio não inoculado. Espera-se com esta análise, obter uma quantidade reduzida de P no meio inoculado com a bactéria, demonstrando, assim, que o microrganismo pode degradar e utilizar a molécula de glifosato como fonte de P.

Após a análise das bactérias selecionadas nas concentrações de 4,5, 9,0, 13,5 e $18,0 \text{ g L}^{-1}$ de glifosato, foi realizado um segundo teste, utilizando como base o melhor desempenho bacteriano nas concentrações do primeiro teste. Para esta análise o caldo Czapek-Dox foi suplementado com concentrações menores de glifosato (1,0, 2,0, 3,5 e $4,5 \text{ g L}^{-1}$ de glifosato).

4.9. Testes de compatibilidade e formulação do consórcio bacteriano

O teste de compatibilidade, utilizando o método direto entre as cepas bacterianas selecionadas, foi realizado em combinações triplas. Para o teste, 10 μL de cada inóculo (DO 0,9-1,0) foram pipetados em meio sólido DYGS. Após 48 h de incubação, as interações entre as cepas foram observadas. A cepa que não foi capaz de crescer com outra cepa foi descartada para a criação do consórcio. Posteriormente,

aquelas cepas que mostraram interações positivas (ausência de halo de inibição) nas combinações e de acordo com aquelas que apresentaram os maiores valores de todas as atividades/determinações, foram consideradas promissoras para a formulação do consórcio. Cada combinação foi realizada em triplicata.

A formulação do consórcio foi realizada em meio DGYS líquido através da junção homogênea das cepas compatíveis. Para tanto, as bactérias selecionadas foram crescidas em meio DYGS líquido a 30 °C, 130 rpm, por 24 h. Após esse período, foi realizada a leitura de cada amostra em espectrofotômetro a 600 nm com DO entre 0,9-1,0, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹. Após ajuste da DO, os inóculos foram homogeneizados juntos. O consórcio formulado foi testado em grãos de café arábica, sementes de tomate, bem como plantas de feijão e soja.

4.10. Biodegradação de glifosato em grãos de *Coffea arabica* pelo consórcio bacteriano

Para avaliar o potencial do consórcio na degradação de glifosato em grãos de café (*ex vitro*), foram utilizados grãos de café arábica Catucaí Amarelo 785/15. Os grãos foram coletados no ponto de exportação (grãos verdes), da mesma plantação onde o solo foi amostrado para isolar e identificar cepas tolerantes ao glifosato (descrito na seção 3.1). Os grãos foram colhidos do terço inferior das plantas de café para obter amostras afetadas pelo glifosato de deriva, normalmente aplicado pelos produtores durante o cultivo do café, e transportados para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES. Os tratamentos foram organizados em triplicata, utilizando bandejas (8 L) com 600 g de grãos como unidades experimentais. Os tratamentos incluíram: (1) Grãos de *C. arabica* (controle), (2) Grãos de *C. arabica* + consórcio, (3) Grãos de *C. arabica* + glifosato e (4) Grãos de *C. arabica* + glifosato + consórcio.

Para os tratamentos 3 e 4, foi aplicado uma camada de Roundup Original Mais® nos grãos de café antes da inoculação do consórcio. Primeiro, 10 mL de Roundup foram diluídos em 1 L de água. Em seguida, 25 mL (correspondente a 0,192 g de glifosato) dessa diluição foi aplicado nos grãos utilizando um pulverizador de 2 L (Tramontina), simulando a concentração normalmente usada nas plantações de café. O preparo do consórcio bacteriano das cepas selecionadas foi realizado conforme item 3.9, com uma concentração final de 10^8 UFC mL⁻¹. Foram aplicados 28 mL do

consórcio bacteriano nos tratamentos 2 e 4; todos os tratamentos foram, então, mantidos em bandejas plásticas (8 L) em condições de estufa (25 °C) por 72 h para simular o ambiente de secagem do café utilizado pelos produtores. Após esse período, as amostras foram enviadas para a Mérieux Nutrisciences Brasil para determinação de glifosato (mg kg^{-1}), que foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

4.11. Promoção do crescimento vegetal

4.11.1. Promoção do crescimento vegetal em sementes de tomate (*in vitro*)

Para determinar o efeito promotor de crescimento vegetal do consórcio bacteriano selecionado, um teste de germinação *in vitro* com sementes de tomate comercial (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Cruz) foi avaliado nas seguintes condições: controle (não inoculado), cepas individualizadas e consórcio de cepas (todas as cepas selecionadas). Um ensaio de *biopriming* (processo que envolve o tratamento de sementes com microrganismos benéficos antes da germinação) foi realizado conforme descrito por Subramanian et al. (2016) e Vega-Celedón et al. (2021), com modificações. Para desinfecção, as sementes de tomate foram submersas em álcool (70%) por 2 min, depois em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) por 5 min, lavadas três vezes com água destilada estéril e mantidas embebidas em água por 2 h. As bactérias do consórcio foram homogeneizadas na mesma concentração em meio DYGS líquido (DO 0,9-1,0). Água destilada estéril foi usada como controle. As sementes de tomate desinfetadas foram imersas em 10 mL dos diferentes tratamentos por 4 h a 30 °C, com agitação a 200 rpm e, então, 10 sementes para cada tratamento foram colocadas em placas estéreis com papel de filtro embebido em 6 mL de água destilada estéril (três réplicas para cada tratamento). Esse teste foi realizado a 25 °C por 10 dias no escuro. No final do teste, a porcentagem de germinação completa (raiz + hipocótilo), comprimento da raiz, comprimento do hipocótilo e comprimento total foram avaliados.

4.11.2. Promoção do crescimento em plantas de feijão (*ex vitro*)

4.11.2.1. Localização, delineamento experimental e tratamentos

O experimento com plantas de feijão (*P. vulgaris*) foi realizado na casa de vegetação da UVV. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo uma planta por vaso. Os tratamentos utilizados foram: controle (não inoculado), cepas individualizadas e consórcio de cepas (todas as cepas selecionadas).

4.11.2.2. Condições de crescimento

A cultura utilizada nesta pesquisa foi o feijão TAA Dama, tipo carioca, na qual, as sementes foram previamente desinfestadas em álcool etílico (70%) por 2 min, seguida por hipoclorito de sódio (2,5%) por 5 min, e embebidas em água destilada estéril por 20 min e semeadas em bandejas contendo substrato composto por areia e terra vegetal (2:1). Para a esterilização, o substrato foi previamente autoclavado a 121 °C, durante 60 min. A emergência das plantas ocorreu três dias após a semeadura (DAS), o transplântio das bandejas para os vasos definitivos (com capacidade de 1,7 kg) foi realizado no sexto DAS, bem como a aplicação dos inóculos, e o desmonte aos 41 DAS. Para atender as necessidades nutricionais do feijoeiro, foi aplicado 50 mL de solução de Clark (50%), três vezes por semana intercalando com aplicações de água destilada na mesma proporção da capacidade de campo (Clark, 1975).

4.11.2.3. Aplicação do consórcio bacteriano

Os inóculos bacterianos foram aplicados durante o transplântio das bandejas para os vasos. Nesta etapa, nos tratamentos com cepas individualizadas, foram depositados sob as raízes das plantas 1 mL de cada inóculo (DO 0,9-1,0), e para as plantas do tratamento consórcio preparou-se a formulação conforme item 3.9 e, também, pipetou-se 1 mL. As plantas do tratamento controle, receberam a mesma quantidade de meio, porém, sem bactérias.

4.11.2.4. Parâmetros de crescimento da cultura do feijão

Para avaliação dos parâmetros de crescimento, foram mensurados a altura (cm) e o comprimento de raiz (cm) com o auxílio de uma régua; volume de raiz (cm³),

através do deslocamento de água em proveta; contagem do número de folhas; e o diâmetro do colo (mm), com auxílio de um paquímetro. Após a coleta e repartição, a biomassa foi seca em estufa a 60 °C por 72 h. A massa seca foi quantificada quanto a: massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST).

4.11.2.5. Análise nutricional da parte aérea e das raízes

Para a avaliação do conteúdo de nutrientes das plantas de feijão foi realizada a repartição da parte aérea e das raízes seguida de secagem a 60 °C por 72 h. Posteriormente, as amostras (n=3) foram encaminhadas ao laboratório Fulin para determinação dos teores nutricionais. Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, com determinação titulométrica; P e S através da digestão Nitro-perclórica com determinação por espectrofotometria; K, digestão Nitro-perclórica com determinação por fotometria de chama; enquanto Ca, Mg, Fe, Zn e Mn por meio da digestão Nitro-perclórica com determinação por espectrofotometria de absorção atômica (Malavolta et al., 1997).

4.11.2.6. Componentes de produção

Os dados referentes aos componentes de produção foram aferidos de todas as plantas (n=25). Foram analisados, após o desmonte do experimento, os aspectos produtivos da cultura, tais como, valores médios do: número de vagens por planta, contaram-se todas as vagens produzidas; peso da vagem (g); comprimento da vagem (cm), determinado pela média de todas as vagens produzidas em cada planta e; largura da vagem (mm), utilizando-se o paquímetro, através da média de todas as vagens produzidas em cada planta (Brasil, 1992).

4.11.3. Promoção do crescimento em plantas de soja (*ex vitro*)

4.11.3.1. Localização, delineamento experimental e tratamentos

O experimento com plantas de soja (*G. max*) foi realizado na casa de vegetação da UVV. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com as cultivares comerciais de soja TMG 7362 Intacta RR2 IPRO

(resistente ao glifosato) e soja BRS 7582 (convencional); duas condições de inoculação e; duas condições de glifosato, tendo oito repetições por tratamento e um vaso com capacidade de 1,7 kg como unidade experimental. Logo, os tratamentos utilizados nas duas cultivares de soja foram: (1) controle (planta não inoculada), (2) soja + glifosato, (3) soja + consórcio e (4) soja + consórcio + glifosato.

4.11.3.2. Condições de crescimento, aplicação do consórcio e glifosato

As sementes de soja TMG 7362 Intacta RR² IPRO e BRS 7582 foram previamente desinfestadas em álcool etílico (70%) por 2 min, seguida por hipoclorito de sódio (2,5%) por 5 min, e embebidas em água destilada estéril por 20 min. A semeadura foi realizada manualmente, depositando três sementes por vaso, o desbaste ocorreu 25 DAS, deixando a planta mais vigorosa. O substrato utilizado era composto por areia e solo de barranco (Latosolo Amarelo Distrófico típico) na proporção 1:1, que foi previamente autoclavado a 121 °C por 60 min.

A aplicação do consórcio ocorreu em dois momentos: durante a semeadura e quando todas as plantas atingiram o estágio V3, o qual foi depositado 3 mL do consórcio por vaso (formulado conforme item 3.9). As plantas dos tratamentos não inoculados receberam a mesma quantidade de meio, porém, sem bactérias.

A aplicação do glifosato foi realizada uma semana após a segunda aplicação do consórcio. Para o preparo do glifosato, 10 mL do herbicida foi diluído em 1 L de água, porém cada vaso com capacidade de 1,7 kg recebeu 50 mL desta solução, obtendo desta forma uma concentração final de 0,1 g de glifosato por planta. O experimento foi desmontado 50 DAS. Para atender as necessidades nutricionais, foi aplicado 50 mL de solução de Hoagland e Arnon (100%), três vezes por semana intercalando com aplicações iguais de água destilada (Hoagland e Arnon, 1950).

4.11.3.3. Parâmetros de crescimento da cultura da soja

Para avaliação dos parâmetros de crescimento, foram mensurados a altura (cm), comprimento de raiz (cm), volume de raiz (cm³), número de folhas e o diâmetro (mm). Cada planta foi dividida em raiz e parte aérea e pesada a massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca da raiz (MFR). Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 °C por 72 h, para aferir a MSPA, MSR e MST.

4.12. Análise estatística dos dados

Os resultados da produção de AIA, quantificação de glifosato em grãos de café arábica e efeito do consórcio bacteriano na promoção do crescimento vegetal *in vitro* e *ex vitro* foram analisados estatisticamente por ANOVA, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$. Essas análises foram conduzidas usando o programa GraphPad Prism 8.0, com nível de significância de 5% para teste de hipóteses.

Além das análises estatísticas, algumas variáveis foram avaliadas, utilizando uma classificação preexistente, como a classificação da solubilização de P (Berraquero et al., 1976; Silva et al., 2019) e a produção de AIA (Hartmann e Singh, 1983), ambas validadas em estudos anteriores. Essas classificações permitem que as variáveis sejam categorizadas de acordo com critérios estabelecidos, garantindo a padronização e a comparabilidade dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e contagem de bactérias totais

Em relação às bactérias totais, foi observada maior quantidade de bactérias na região da mata preservada (MP) com $14,2 \times 10^6$ UFC g^{-1} , quando comparada à rizosfera do café arábica (RCA) com $6,7 \times 10^6$ UFC g^{-1} e à rizosfera da planta daninha (RPD) com $4,0 \times 10^6$ UFC g^{-1} (Figuras 4a e 4c). Observando, dessa forma, uma redução significativa de 53,2% e 71,7% da MP em relação à RCA e RPD, respectivamente.

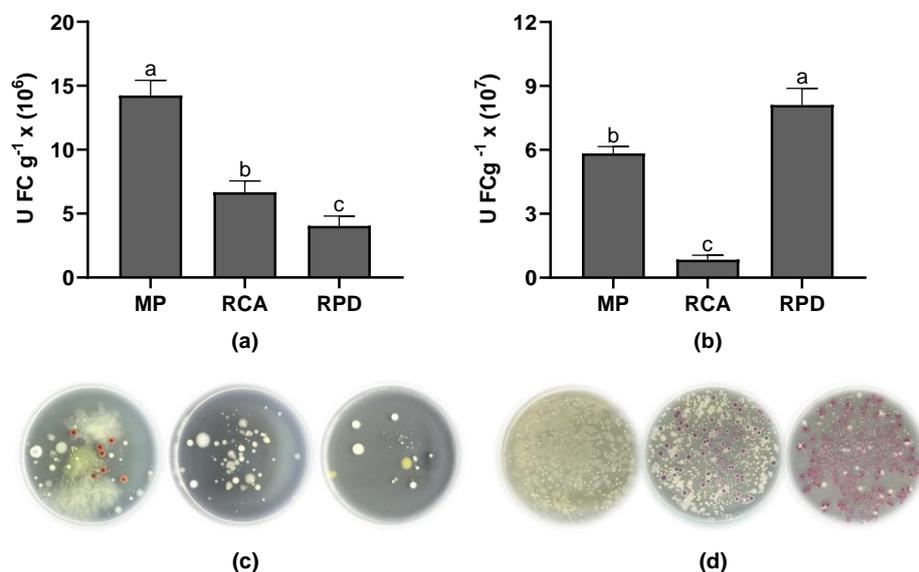


Figura 4: Total de bactérias isoladas em uma lavoura de café Arábica em Marechal Floriano – ES (a) e total de bactérias isoladas do processo de enriquecimento em meio contendo glifosato como única fonte de C (b). Figura representativa da população de bactérias isoladas em cada região de coleta (c). Figura representativa da população de bactérias isoladas do processo de enriquecimento (d). Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$). As colunas representam os valores médios de três repetições, e as barras representam o desvio padrão (DP). MP = Mata preservada, RCA = Rizosfera do café arábica e RPD = Rizosfera da planta daninha.

O enriquecimento em meio contendo glifosato como única fonte de C (MSM1), promoveu uma maior abundância de bactérias totais isoladas da RPD ($8,1 \times 10^7$ UFC

g⁻¹), seguido pela região da MP (5,83x10⁷ UFC g⁻¹) e RCA (0,84x10⁷ UFC g⁻¹) (Figura 4b e 4d). Culminando em uma redução significativa de 85,6% das bactérias totais encontradas na RCA em relação à MP, e um aumento de 38,93% na RPD em relação à MP. Após enriquecimento, houve o crescimento de apenas três cepas bacterianas no meio do glifosato como única fonte de P.

Após isolamento e triagem, foram isoladas 35 cepas bacterianas, com as cepas CaMP1-CaMP11, CaMP17, CaMP18 e CaMP31-CaMP33 originárias de MP (Mata Preservada); cepas CaRCA12-CaRCA16, CaRCA23-CaRCA29 e CaRCA34 originárias da RCA (Rizosfera do Café Arábica); e cepas CaRPD19-CaRPD22, CaRPD30 e CaRPD35 originárias da RPD (Rizosfera da Planta Daninha) (Tabela 1; Figura 5). Exceto pelas cepas CaRCA14, CaRCA15 e CaRCA16 que foram isoladas a partir do meio MSM2, todas as outras foram isoladas a partir do meio MSM1.

Tabela 1: Cepas bacterianas obtidas de três diferentes regiões dentro de uma plantação de café arábica. Regiões: MP = Mata Preservada, RCA = Rizosfera do Café Arábica e RPD = Rizosfera da Planta Daninha.

Bactérias	Origem	Bactérias	Origem	Bactérias	Origem
CaMP1	MP	CaRCA13	RCA	CaRCA25	RCA
CaMP2	MP	CaRCA14	RCA	CaRCA26	RCA
CaMP3	MP	CaRCA15	RCA	CaRCA27	RCA
CaMP4	MP	CaRCA16	RCA	CaRCA28	RCA
CaMP5	MP	CaMP17	MP	CaRCA29	RCA
CaMP6	MP	CaMP18	MP	CaRPD30	RPD
CaMP7	MP	CaRPD19	RPD	CaMP31	MP
CaMP8	MP	CaRPD20	RPD	CaMP32	MP
CaMP9	MP	CaRPD21	RPD	CaMP33	MP
CaMP10	MP	CaRPD22	RPD	CaRCA34	RCA
CaMP11	MP	CaRCA23	RCA	CaRPD35	RPD
CaRCA12	RCA	CaRCA24	RCA	–	–



Figura 5: Bactérias tolerantes ao glifosato isoladas a partir do processo de enriquecimento.

5.2. Tolerância bacteriana ao glifosato em meios sólido ou líquido

Todas as bactérias (35 cepas) foram tolerantes a 11 g L^{-1} de glifosato em meio sólido (Tabela 2). No entanto, apenas 20 cepas (CaMP2, CaMP4-CaMP6, CaMP8, CaMP10, CaMP11, CaRCA15, CaRCA16, CaMP18, CaRPD19, CaRPD21, CaRCA25, CaRCA27, CaRCA29 e CaMP31-CaRPD35) foram tolerantes a 22 g L^{-1} de glifosato. Somente as bactérias CaMP31 e CaMP32 foram tolerantes a 44 g L^{-1} , e nenhum microrganismo cresceu a uma concentração de 88 g L^{-1} de glifosato.

Tabela 2: Crescimento de bactérias isoladas do processo de enriquecimento em meio DYGS sólido contendo concentrações crescentes de glifosato (0, 11, 22, 44 e 88 g L⁻¹).

Bactérias	Concentrações de glifosato				
	[0]	[11]	[22]	[44]	[88]
CaMP1	+	+	-	-	-
CaMP2	+	+	+	-	-
CaMP3	+	+	-	-	-
CaMP4	+	+	+	-	-
CaMP5	+	+	+	-	-
CaMP6	+	+	+	-	-
CaMP7	+	+	-	-	-
CaMP8	+	+	+	-	-
CaMP9	+	+	-	-	-
CaMP10	+	+	+	-	-
CaMP11	+	+	+	-	-
CaRCA12	+	+	-	-	-
CaRCA13	+	+	-	-	-
CaRCA14	+	+	-	-	-
CaRCA15	+	+	+	-	-
CaRCA16	+	+	+	-	-
CaMP17	+	+	-	-	-
CaMP18	+	+	+	-	-
CaRPD19	+	+	+	-	-
CaRPD20	+	+	-	-	-
CaRPD21	+	+	+	-	-
CaRPD22	+	+	-	-	-
CaRCA23	+	+	-	-	-
CaRCA24	+	+	-	-	-
CaRCA25	+	+	+	-	-
CaRCA26	+	+	-	-	-
CaRCA27	+	+	+	-	-
CaRCA28	+	+	-	-	-
CaRCA29	+	+	+	-	-
CaRPD30	+	+	-	-	-
CaMP31	+	+	+	+	-
CaMP32	+	+	+	+	-
CaMP33	+	+	+	-	-
CaRCA34	+	+	+	-	-
CaRPD35	+	+	+	-	-

*Capacidade bacteriana: (+) tolerante; (-) não tolerante

Após o teste de tolerância em meio sólido, apenas as bactérias que cresceram em concentrações superiores a 22 g L^{-1} de glifosato (16 cepas) foram cultivadas em meio líquido contendo 0 ou 22 g L^{-1} de glifosato por sete dias (Figuras 6 e 7). Todas as bactérias apresentaram crescimento inferior em meio líquido suplementado com glifosato, em comparação com o controle (Figuras 6 e 7). O glifosato a 22 g L^{-1} inibiu completamente o crescimento de CaMP8 e CaMP10 durante os sete dias de análise (Figuras 6e e 6f). O crescimento das cepas CaMP2 e CaRCA15 também foi inibido pelo herbicida em comparação com o controle, com um crescimento médio e DO de 0,1 (Figuras 6a e 6h). Assim, essas quatro bactérias não foram selecionadas para as análises subsequentes. As bactérias CaMP4, CaMP5 e CaMP6 apresentaram crescimento constante em meio suplementado com glifosato, com uma DO máxima de 0,14, 0,23 e 0,22, respectivamente (Figuras 6b, 6c e 6d). Em contraste, CaMP11 exibiu crescimento exponencial em 22 g L^{-1} de glifosato, com uma DO máxima de 0,74 no sétimo dia (Figura 6g).

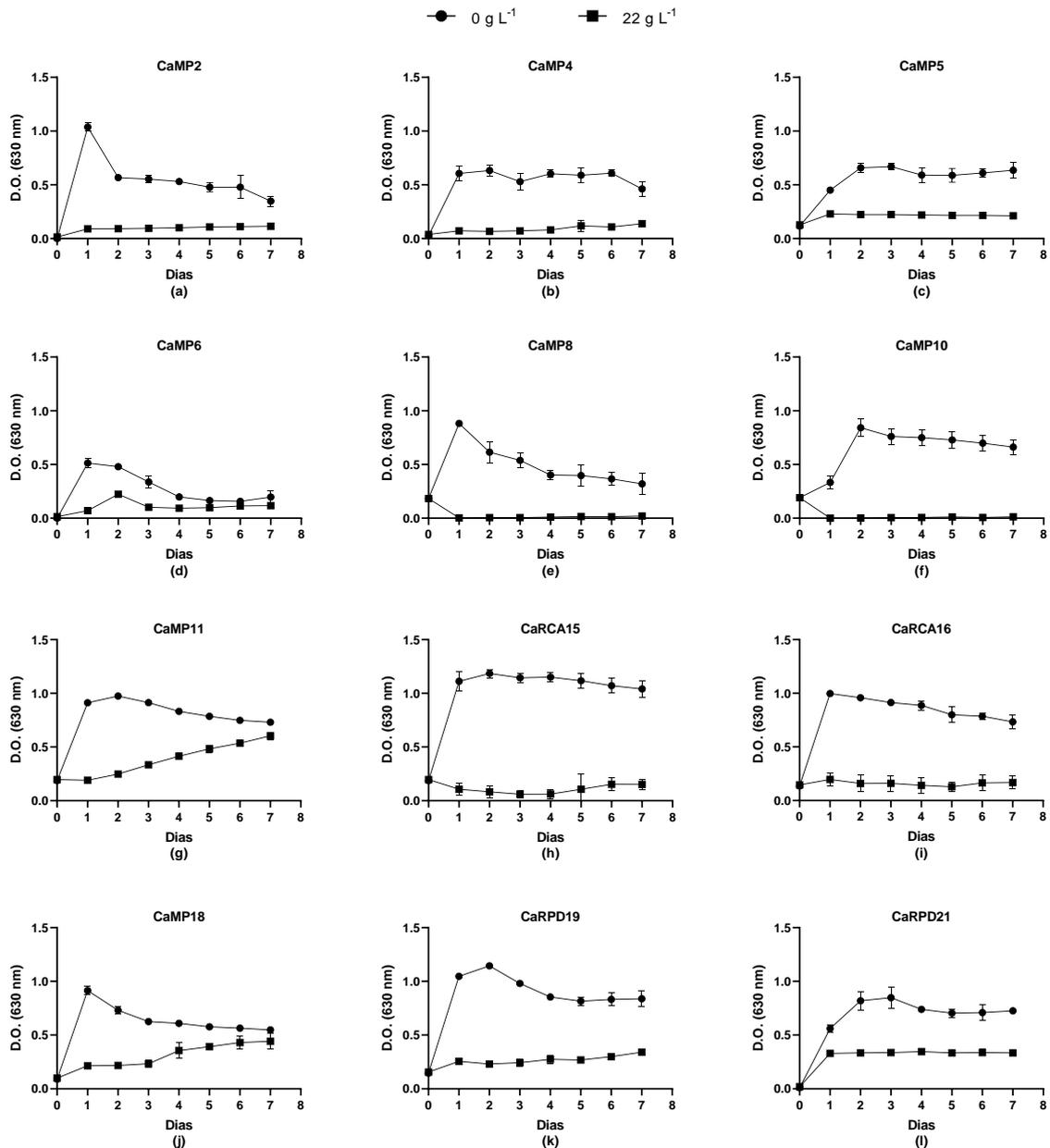


Figura 6: Inibição do crescimento dependente de glifosato, avaliada com base nas taxas de crescimento relativo em meio líquido DYGS, contendo 0 ou 22 g L⁻¹ de glifosato. Cepas: CaMP2 (a); CaMP4 (b); CaMP5 (c); CaMP6 (d); CaMP8 (e); CaMP10 (f); CaMP11 (g); CaRCA15 (h); CaRCA16 (i); CaMP18 (j); CaRPD19 (k); e CaRPD21 (l). A leitura de absorvância (DO = 630 nm) foi realizada a cada 24 h durante sete dias. Cada valor é a média \pm DP de quatro réplicas independentes.

As cepas CaRCA16, CaRPD19, CaRPD21, CaRCA25, CaRCA27, CaRCA29, CaMP33 e CaRPD35 mostraram crescimento constante em 22 g L⁻¹ de glifosato durante os sete dias de análise, com uma média de crescimento entre 0,16 e 0,34

(DO) (Figuras 6 e 7). Por fim, as cepas CaMP18, CaMP31, CaMP32 e CaRCA34 cresceram exponencialmente durante os dias em meio líquido suplementado com 22 g L⁻¹ de glifosato, com uma DO máxima de 0,44, 0,41, 0,69 e 0,6, respectivamente (Figuras 6 e 7).

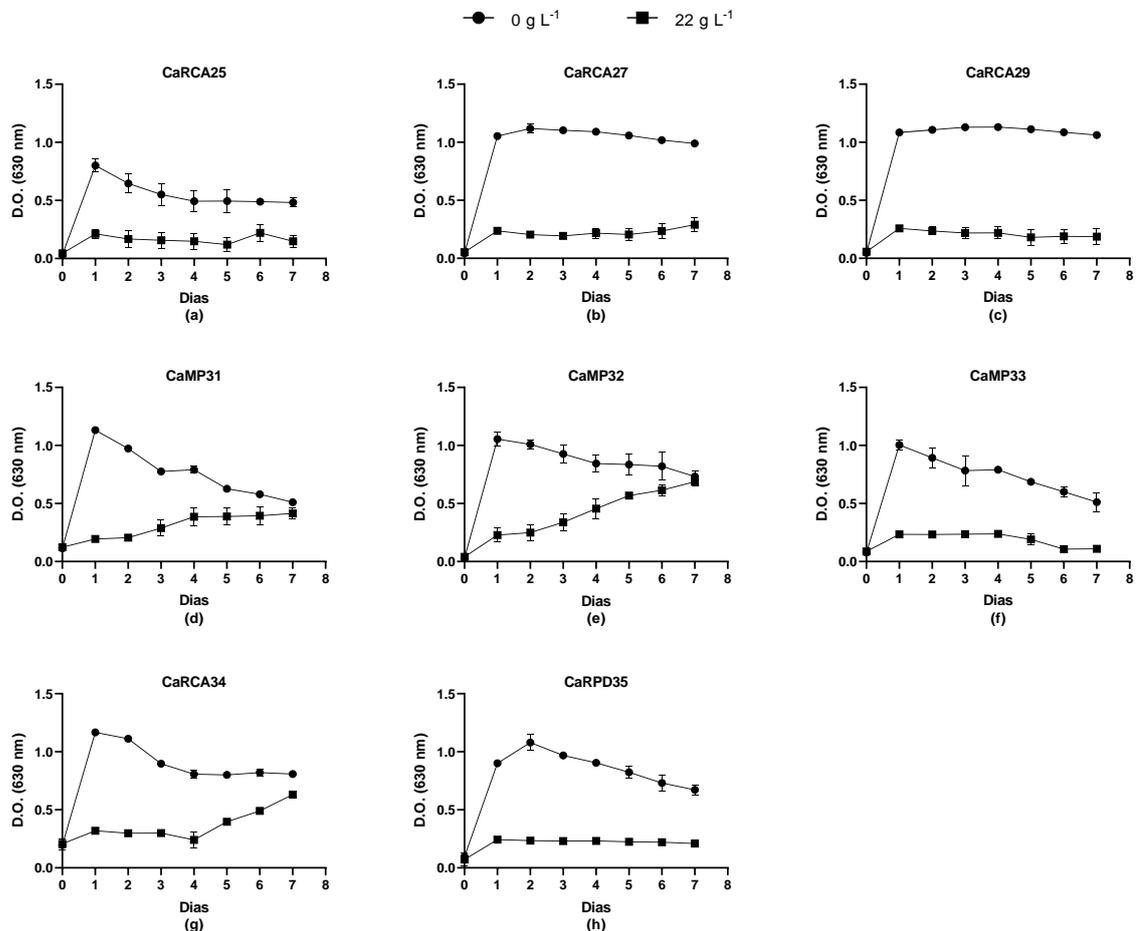


Figura 7: Inibição do crescimento dependente de glifosato, avaliada com base nas taxas de crescimento relativo em meio líquido DYGS, contendo 0 ou 22 g L⁻¹ de glifosato. Cepas: CaRCA25 (a); CaRCA27 (b); CaRCA29 (c); CaMP31 (d); CaMP32 (e); CaMP33 (f); CaRCA34 (g); e CaRPD35 (h). A leitura de absorvância (DO = 630 nm) foi realizada a cada 24 h durante sete dias. Cada valor é a média ± DP de quatro réplicas independentes.

5.3. Identificação das cepas tolerantes ao glifosato

Foram selecionadas 16 cepas bacterianas para identificação após a triagem inicial de bactérias capazes de tolerar o herbicida glifosato *in vitro* (Figuras 6 e 7). As cepas selecionadas foram identificadas através da análise da sequência parcial do gene 16S rRNA (Figura 8; Tabela 3). As cepas pertencem a cinco gêneros correspondentes a *Pseudomonas* (CaMP18, CaMP31-CaRCA34), *Achromobacter* (CaRCA16, CaRCA25, CaRCA27, CaRCA29), *Burkholderia* (CaMP11, CaRPD19, CaRPD35), *Brevibacillus* (CaMP4, CaMP6) e *Priestia* (CaMP5). Bactérias dos gêneros *Brevibacillus*, *Priestia*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* foram isoladas da MP, *Achromobacter* e *Burkholderia* foram isoladas da RCA, já as cepas isoladas da RPD, foram somente bactérias do gênero *Burkholderia*. A cepa CaRPD21 não pôde ser identificada.

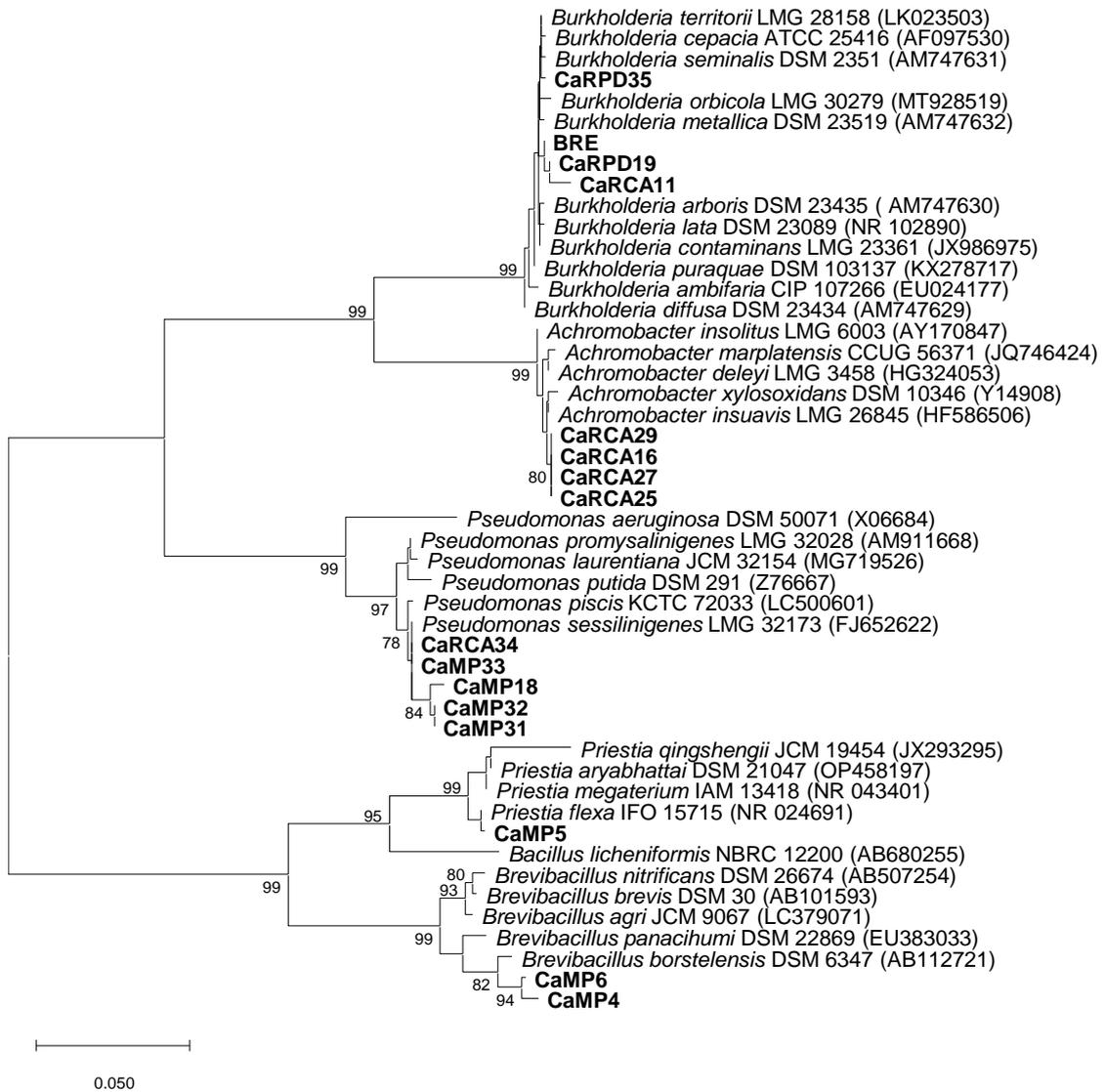


Figura 8: Árvore filogenética de máxima verossimilhança (MV) baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA. Valores de *bootstrap* >70% são mostrados nos nós. As cepas deste estudo estão indicadas em negrito. As barras de escala representam o número esperado de mudanças de nucleotídeos por local.

Tabela 3: Identificação das bactérias tolerantes ao glifosato selecionadas com base na amplificação do gene 16S rDNA. MP = Mata Preservada, RCA = Rizosfera do Café Arábica, e RPD = Rizosfera da Planta Daninha.

Bactérias	Identificação das Bactérias	Origem
CaMP4	<i>Brevibacillus</i> sp.	MP
CaMP5	<i>Priestia</i> sp.	MP
CaMP6	<i>Brevibacillus</i> sp.	MP
CaMP11	<i>Burkholderia</i> sp.	MP
CaRCA16	<i>Achromobacter</i> sp.	RCA
CaMP18	<i>Pseudomonas</i> sp.	MP
CaRPD19	<i>Burkholderia</i> sp.	RPD
CaRPD21	<i>Incapaz de identificar</i>	RPD
CaRCA25	<i>Achromobacter</i> sp.	RCA
CaRCA27	<i>Achromobacter</i> sp.	RCA
CaRCA29	<i>Achromobacter</i> sp.	RCA
CaMP31	<i>Pseudomonas</i> sp.	MP
CaMP32	<i>Pseudomonas</i> sp.	MP
CaMP33	<i>Pseudomonas</i> sp.	MP
CaRCA34	<i>Pseudomonas</i> sp.	RCA
CaRPD35	<i>Burkholderia</i> sp.	RPD

5.4. Curva padrão de crescimento bacteriano

Em relação ao crescimento das cepas tolerantes ao glifosato, as cepas CaMP4, CaMP6 e CaRPD21 apresentaram crescimento reduzido comparado às demais bactérias, em que a CaMP4 e CaMP6 declinando a partir de 24 h (Figuras 9 e 10), enquanto a cepa e CaRPD21 apresentou declínio após 12 h (Figura 9h). Os microrganismos CaMP11, CaRCA29 e CaMP32 apresentaram crescimento populacional em fase estacionária a partir de 24 h (Figuras 9d, 10c e 10e, respectivamente). A cepa CaRCA16 se manteve em crescimento exponencial, ou seja, fase log, mesmo após 48 h de avaliação (Figura 9e). Contudo, as cepas CaMP18, CaRPD19, CaRCA25, CaMP31, CaMP33, CaRCA34 e CaRPD35 entraram na fase de declínio após 24 h (Figuras 9 e 10).

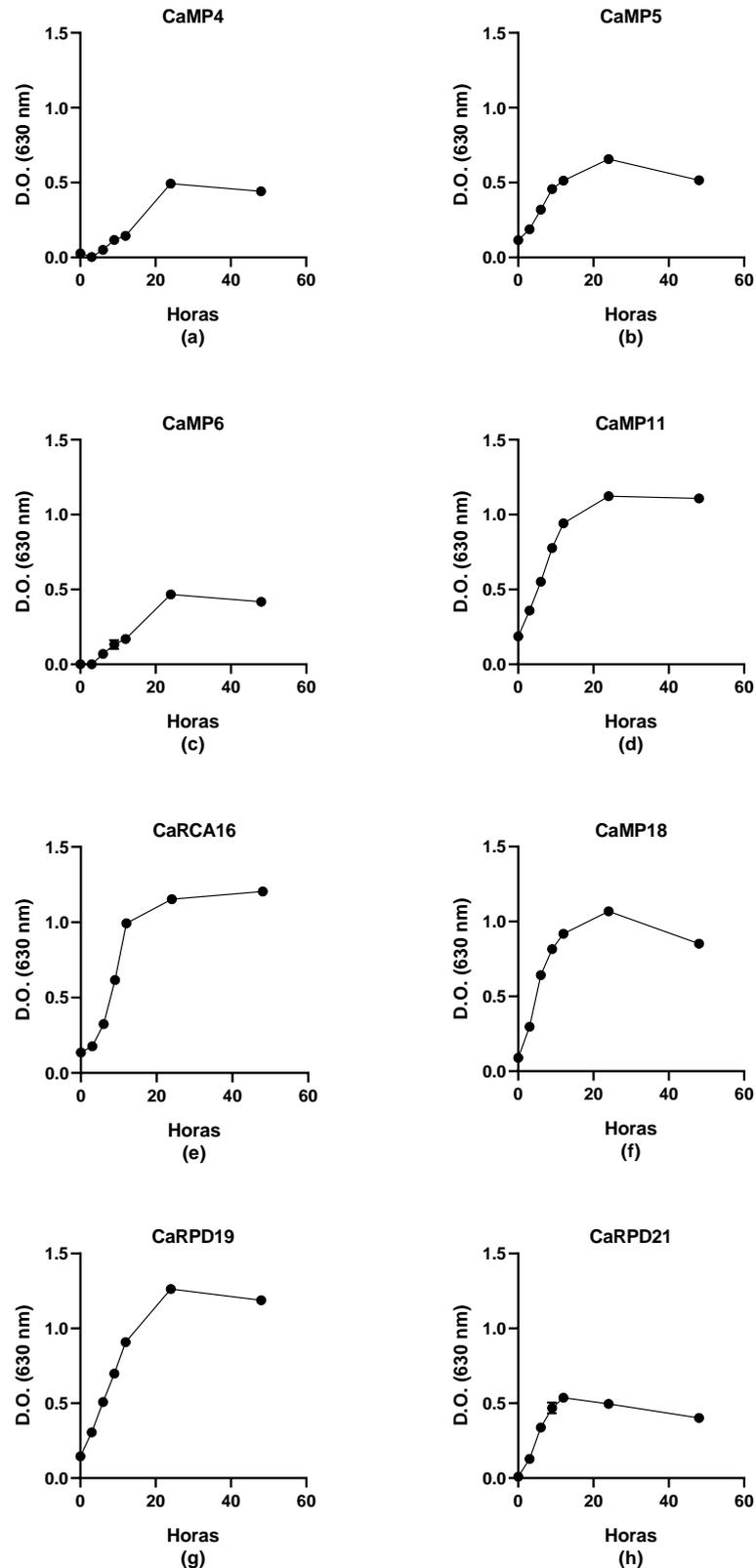


Figura 9: Curva padrão de crescimento bacteriano. Cepa CaMP4 (a), CaMP5 (b); CaMP6 (c); CaMP11 (d); CaRCA16 (e); CaMP18 (f); CaRPD19 (g); e CaRPD21 (h). A absorbância (DO = 630 nm) foi realizada nos tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h de crescimento. Cada valor é a média \pm DP de quatro réplicas independentes.

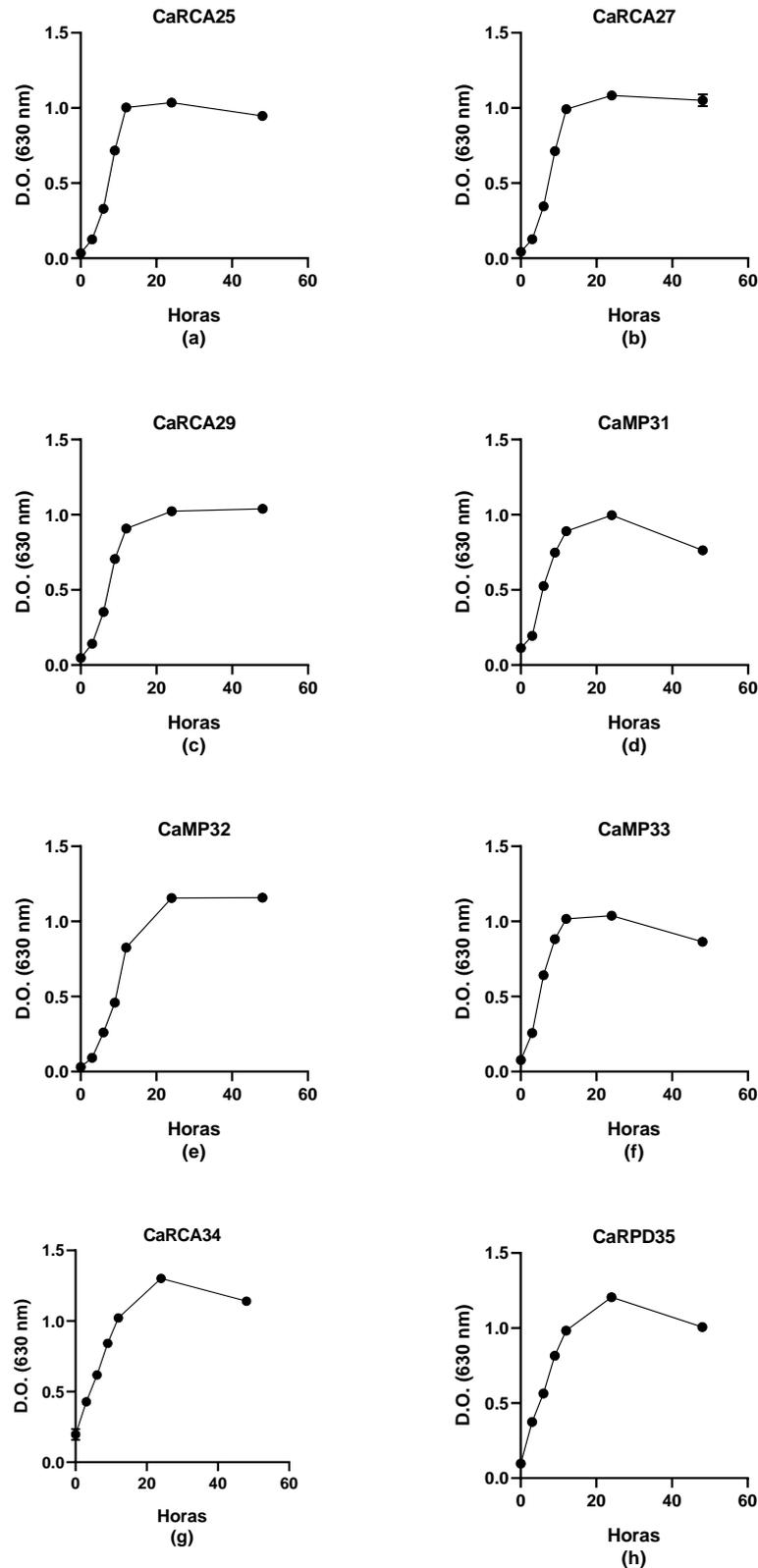


Figura 10: Curva padrão de crescimento bacteriano. Cepa CaRCA25 (a); CaRCA27 (b); CaRCA29 (c); CaMP31 (d); CaMP32 (e); CaMP33 (f); CaRCA34 (g); e CaRPD35 (h). A absorbância (DO = 630 nm) foi realizada nos tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h de crescimento. Cada valor é a média \pm DP de quatro réplicas independentes.

5.5. Caracterização fisiológica das bactérias tolerantes ao glifosato isoladas do processo de enriquecimento

5.5.1. Solubilização de fosfato inorgânico em meios sólido e líquido

As 16 bactérias tolerantes ao glifosato foram testadas quanto à sua capacidade de solubilizar fosfato tricálcico em meio NBRIP sólido e líquido. Essas bactérias diferiram em sua capacidade de solubilizar fosfato *in vitro* (Tabela 4). Em meio sólido, as cepas CaMP11, CaMP32 e CaRPD35 mostraram um alto índice de solubilização (IS), com IS de 4,97, 4,78 e 4,15 mm (Tabela 4; Figura 11). Também foi possível observar um IS médio nas cepas CaRPD19 (3,98 mm), CaRCA29 (3,47 mm) e CaRCA34 (3,34 mm).

Tabela 4: Comparação da solubilização de fosfato inorgânico pelas cepas bacterianas em meio NBRIP sólido (índice de solubilização) e meio líquido (P solubilizado).

Bactérias	Índice de solubilização (mm)	Caldo ($\mu\text{g mL}^{-1}$ P solubilizado)	pH em caldo
CaMP4	1,98	53,75	6,83
CaMP5	-	108,00	5,65
CaMP6	1,44	53,40	6,67
CaMP11	4,97	3,49	3,19
CaRCA16	-	92,22	6,18
CaMP18	2,03	14,58	3,30
CaRPD19	3,93	11,93	3,64
CaRPD21	-	51,91	6,82
CaRCA25	1,71	62,54	6,59
CaRCA27	1,59	47,53	6,92
CaRCA29	3,47	48,75	6,51
CaMP31	2,61	6,53	3,39
CaMP32	4,78	42,96	6,70
CaMP33	2,49	12,57	4,12
CaRCA34	3,34	12,93	3,40
CaRPD35	4,15	5,27	2,92

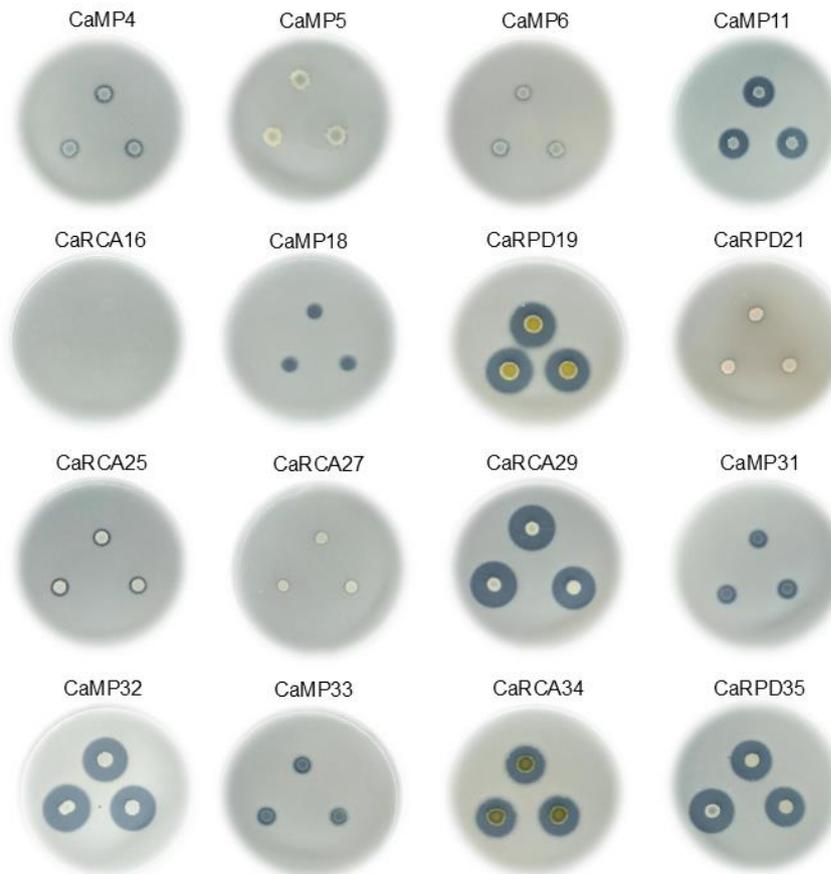


Figura 11: Formação de halo de solubilização do fosfato tricálcico em meio NBRIP sólido, pelas 16 bactérias tolerantes ao glifosato.

A análise quantitativa da solubilização de fosfato inorgânico em meio líquido pelas bactérias tolerantes ao glifosato foi diferente da observada em meio sólido. Todas as cepas que apresentaram IS médio e alto em meios sólidos tiveram baixa solubilização ($<50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P) em meios líquidos (Tabela 4). As cepas CaMP5 (*Priestia* sp.) e CaRCA16 (*Achromobacter* sp.) foram as únicas a apresentarem alta solubilização de fosfato no meio NBRIP líquido ($108,00$ e $92,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P). As cepas CaMP4, CaMP6, CaRPD21 e CaRCA25 atingiram solubilização média, variando de $51,91$ a $62,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P solubilizado (Tabela 4).

Todas as bactérias reduziram o pH do meio NBRIP líquido após 48 h de crescimento (Tabela 4). As bactérias com maior acidificação do meio foram CaMP11, CaMP18, CaMP31, CaRCA34 e CaRPD35, promovendo uma redução de mais de 50% no pH do meio em comparação com o controle (pH 7,0). CaRPD19 e CaMP33 também se destacaram com uma acidificação do pH de 48% e 41%, respectivamente.

CaMP5 e CaRCA16 acidificaram o meio em 19% e 12%, respectivamente, e as bactérias restantes promoveram baixa acidificação do meio (abaixo de 10%) em relação ao controle (Tabela 4).

5.5.2. Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

As cepas bacterianas tolerantes ao glifosato selecionadas foram testadas quanto à sua capacidade de produzir AIA em meio com adição de L-triptofano. A análise mostrou que todas as bactérias produziram esse fitormônio em diferentes quantidades (Figura 12). CaMP4, CaMP5, CaMP6, CaMP11, CaRPD19, CaRCA27, CaMP33 e CaRCA34 ($11\text{-}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$) tiveram alta produção de AIA (Figura 12). Neste estudo, a produção de AIA por todas as bactérias variou de $5,07$ a $44,31\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

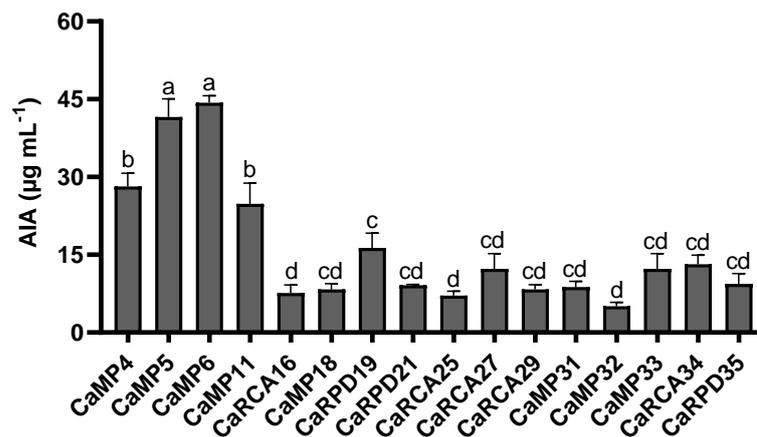


Figura 12: Produção de AIA em meio DYGS líquido com adição de L-triptofano ($100\ \mu\text{g mL}^{-1}$) por bactérias tolerantes a 22 ou $44\ \text{g L}^{-1}$ de glifosato. Cada valor é a média \pm DP de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).

As cepas com maior produção de AIA foram CaMP4 (*Brevibacillus* sp.), CaMP5 (*Priestia* sp.), CaMP6 (*Brevibacillus* sp.) e CaMP11 (*Burkholderia* sp.). A cepa CaMP6 teve a maior produção de AIA ($44,31\ \mu\text{g mL}^{-1}$), seguido por CaMP5 ($41,58\ \mu\text{g mL}^{-1}$). As cepas CaMP4 e CaMP11 tiveram uma produção $36,4\%$ e 49% menor em comparação com a cepa que mais produziu o fitormônio AIA (CaMP6), no entanto, mesmo com essa redução, estas cepas ainda são classificadas como alta produção

de AIA ($>11 \mu\text{g mL}^{-1}$). Enquanto todas as outras cepas tiveram uma redução estatisticamente significativa em relação às maiores produções de AIA, as cepas CaRPD19, CaRCA29, CaMP33 e CaRCA34 ainda são consideradas cepas com alta produção de AIA (Figura 12).

5.5.3. Fixação de nitrogênio atmosférico (N_2) e coloração de Gram

As 16 bactérias tolerantes ao glifosato (22 ou 44 g L^{-1}) em meio DYGS líquido foram caracterizadas em relação à sua capacidade potencial de fixar N_2 em meio NFB semissólido, através da formação de uma película na superfície do meio. As cepas CaMP4, CaMP6 e CaRPD21 apresentaram uma capacidade potencialmente baixa de fixar N_2 , enquanto CaMP5, CaMP11, CaRCA16, CaMP18 e CaRCA25-CaRPD35 demonstraram indicadores que poderiam estar relacionados à capacidade de fixação de N (Tabela 5). A coloração de Gram evidenciou que todas as bactérias tolerantes ao glifosato isoladas são Gram-negativas, exceto pela bactéria CaMP5 (*Priestia* sp.), que é Gram-positiva (Tabela 5; Figura 13).

Tabela 5: Potencial de fixação biológica de N_2 e teste de coloração de Gram das 16 bactérias tolerantes ao glifosato (22 ou 44 g L^{-1}) isoladas de uma lavoura em Marechal Floriano – ES.

Bactérias	Fixação biológica de N_2	Teste de Gram
CaMP4	-	-
CaMP5	+	+
CaMP6	-	-
CaMP11	+	-
CaRCA16	+	-
CaMP18	+	-
CaRPD19	+	-
CaRPD21	-	-
CaRCA25	+	-
CaRCA27	+	-
CaRCA29	+	-
CaMP31	+	-
CaMP32	+	-
CaMP33	+	-
CaRCA34	+	-
CaRPD35	+	-

(+) positiva; (-) negativa

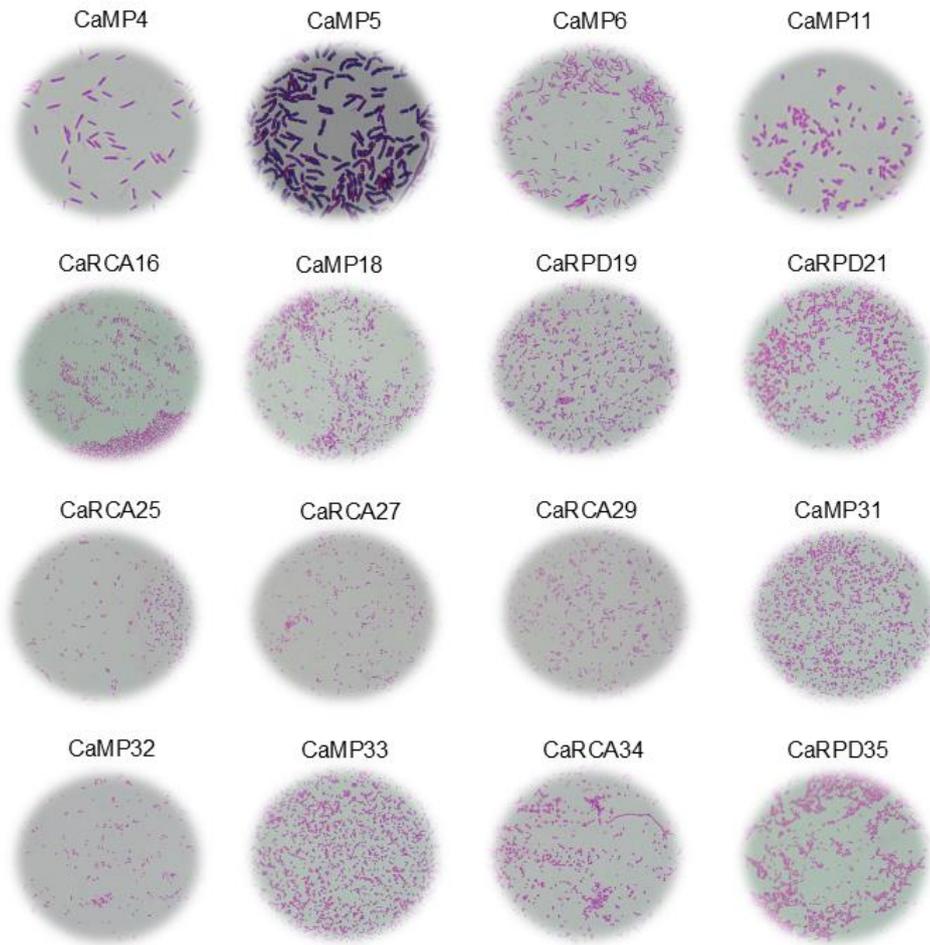


Figura 13: Teste de coloração de Gram das bactérias tolerantes ao glifosato (22 ou 44 g L⁻¹) isoladas de uma lavoura em Marechal Floriano – ES.

5.6. Seleção das bactérias promissoras para degradação do glifosato e promoção do crescimento vegetal

Em síntese, 18,75% das bactérias tolerantes ao glifosato têm alta taxa de solubilização em meio sólido, 12,5% têm alta solubilização de fosfato em meio líquido, 81,25% foram potencialmente capazes de fixar N₂, e 50% produziram alta concentração de AIA (Tabela 6). Após avaliar a tolerância ao glifosato e as características promotoras de crescimento de plantas de 16 bactérias tolerantes ao glifosato, foram analisados os níveis de similaridade desses microrganismos (Figura 14).

Tabela 6: Resumo geral da caracterização fisiológica das 16 bactérias tolerantes a 22 e 44 g L⁻¹ de glifosato, teste de coloração de Gram, capacidade de solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido (SFI_s e SFI_L), potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em meio semissólido e produção de AIA.

Bactérias	Características Fisiológicas						
	Tolerantes a 22 g L ⁻¹	Tolerantes a 44 g L ⁻¹	Gram	SFI _s ¹	SFI _L ²	FBN	AIA ³
CaMP4	+	-	-	-	+	-	+
CaMP5	+	-	+	-	++	+	+
CaMP6	+	-	-	-	+	-	+
CaMP11	+	-	-	++	-	+	+
CaRCA16	+	-	-	-	++	+	-
CaMP18	+	-	-	-	-	+	-
CaRPD19	+	-	-	+	-	+	+
CaRPD21	+	-	-	-	+	-	-
CaRCA25	+	-	-	-	+	+	-
CaRCA27	+	-	-	-	-	+	+
CaRCA29	+	-	-	+	-	+	-
CaMP31	+	+	-	-	-	+	-
CaMP32	+	+	-	++	-	+	-
CaMP33	+	-	-	-	-	+	+
CaRCA34	+	-	-	+	-	+	+
CaRPD35	+	-	-	++	-	+	-

(+) positivo, (-) negativo. ¹(++) > 4 mm, (+) > 3 mm, (-) < 3 mm. ²(++) > 90 µg mL⁻¹, (+) > 50 µg mL⁻¹, (-) < 50 µg mL⁻¹. ³(+) > 11 µg mL⁻¹, (-) < 11 µg mL⁻¹

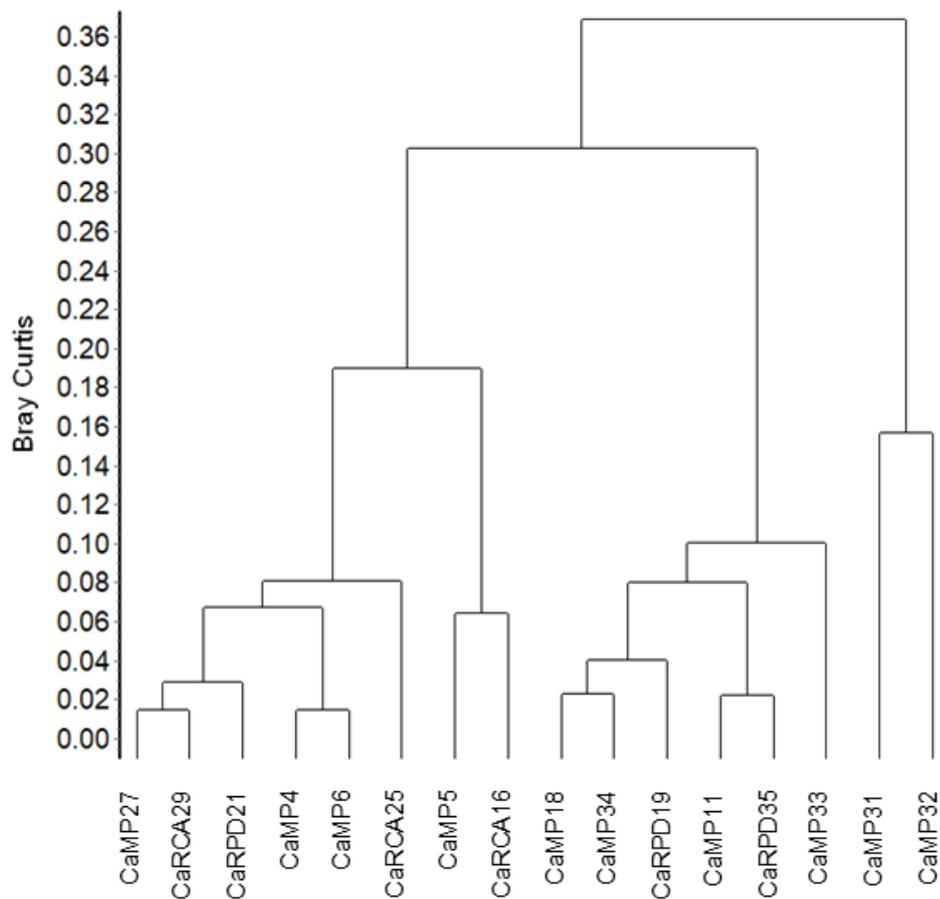


Figura 14: Coeficiente de similaridade de Bray Curtis agrupado pelo método Group Average (UPGMA). Índice de Correlação Cofenética 0,8708.

As cepas CaMP4, CaMP6, CaRPD21, CaRCA25, CaRCA27 e CaRCA29 apresentaram valores intermediários de solubilização de P e altos valores de produção de AIA, sendo que CaRCA25, CaRCA27 e CaRCA29 também foram capazes de fixar N_2 . CaMP5 e CaRCA16 apresentaram alta similaridade devido aos maiores valores de solubilização de P inorgânico e capacidade de fixar N_2 , e apesar das cepas CaMP18, CaRCA34, CaRPD19, CaMP33 e CaMP31 apresentarem baixa solubilização de P, elas têm em comum a capacidade de fixar N_2 e produzir AIA (Tabela 6). Embora todas as cepas tenham apresentado tolerância a 22 g L^{-1} de glifosato, CaMP31 e CaMP32 apresentaram a maior tolerância ao herbicida (44 g L^{-1}), além de fixar N_2 (Tabela 6). No geral, esta análise revelou padrões de similaridade que sugerem uma evolução convergente de cepas bacterianas em características

promotoras de crescimento de plantas e tolerância ao glifosato para a formulação de um bioinoculante.

Foram selecionadas cinco cepas bacterianas com base em dois critérios principais: coeficiente de similaridade (Figura 14) e estabilidade de crescimento durante as multiplicações *in vitro* (Figuras 9 e 10). As cepas escolhidas pertencem aos gêneros *Priestia* (CaMP5), *Achromobacter* (CaRCA16) e *Pseudomonas* (CaMP31, CaMP32 e CaMP33), conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e tolerantes ao glifosato com base nos resultados obtidos pelos testes de caracterização fisiológica, quanto à solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido (SFI_s e SFI_L), potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de AIA.

Bactérias	Identificação das bactérias	Características promotoras de crescimento vegetal
CaMP5	<i>Priestia</i> sp.	SFI _L , FBN e AIA
CaRCA16	<i>Achromobacter</i> sp.	SFI _L e FBN
CaMP31	<i>Pseudomonas</i> sp.	FBN
CaMP32	<i>Pseudomonas</i> sp.	SFI _s , SFI _L e FBN
CaMP33	<i>Pseudomonas</i> sp.	FBN e AIA

5.7. Análise da degradação do glifosato *in vitro*

Em relação à degradação do glifosato pelas bactérias isoladas, observou-se que as bactérias não foram capazes de degradar o glifosato em concentração superior a 4,5 g L⁻¹ de glifosato, exceto CaMP5, que degradou o glifosato até 9,0 g L⁻¹, porém esta degradação não foi significativa (Figura 15). As cepas CaMP5, CaRCA16 e CaMP32 não apresentaram estabilidade com o aumento das concentrações, ou seja, não demonstraram consistência com o aumento das concentrações, apresentando variações nos dados. Contudo, a cepa CaMP33 degradou significativamente o herbicida na concentração de 4,5 g L⁻¹, com uma redução de 29,8%.

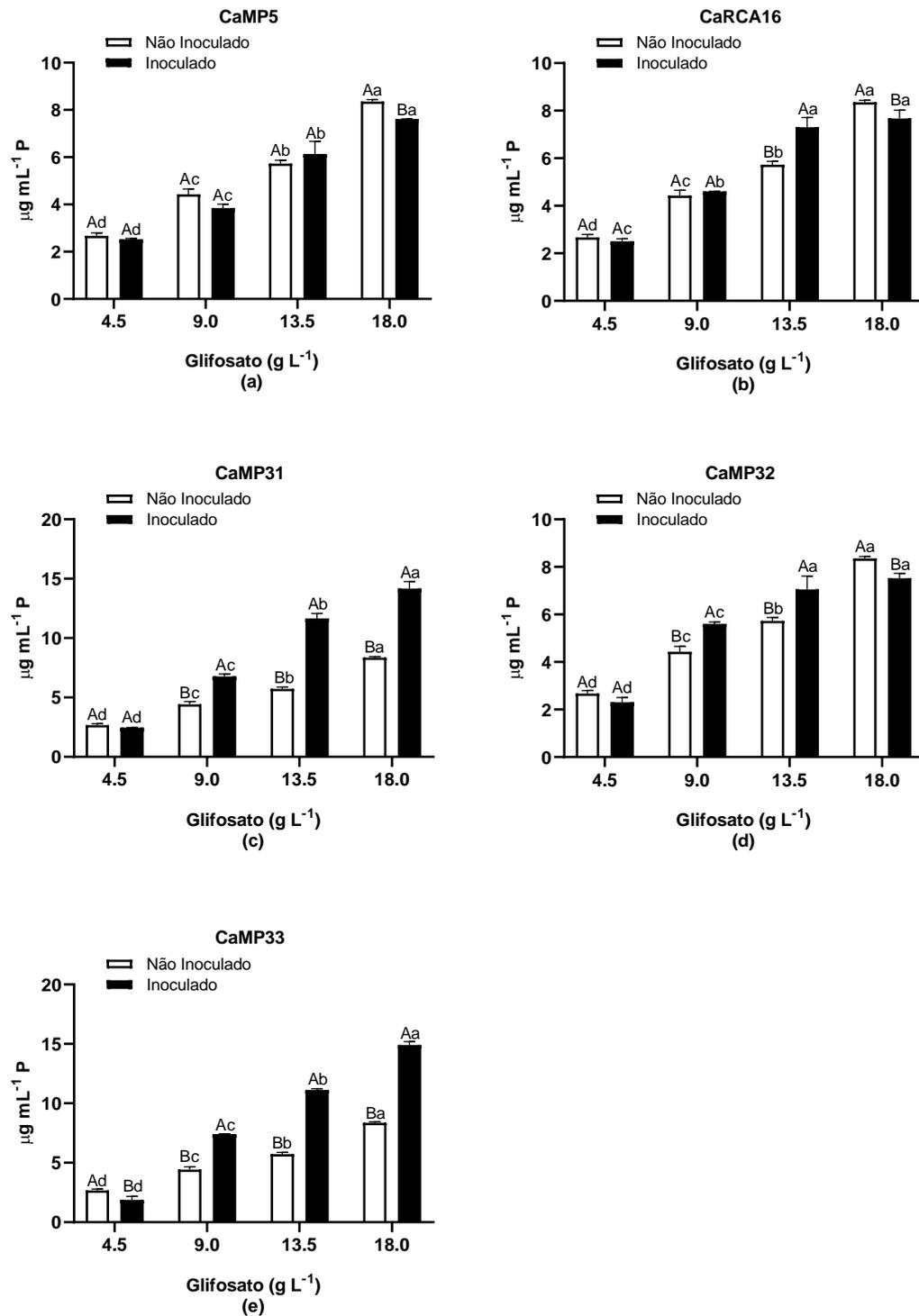


Figura 15: Degradação da molécula de glifosato através da quantificação do íon fosfato liberado pelas cepas CaMP5 (a), CaRCA16 (b), CaMP31 (c), CaMP32 (d) e CaMP33 (e), em diferentes concentrações do herbicida (4,5, 9,0, 13,5 e 18,0 g L⁻¹), analisadas por espectrofotometria. Letras maiúsculas diferentes na mesma concentração de glifosato; e letras minúsculas diferentes na mesma inoculação,

indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$). Cada valor é a média \pm DP de cinco réplicas independentes.

Em seguida, testaram-se as bactérias com melhor desempenho neste primeiro teste (CaMP5, CaRCA16 e CaMP33) em meio suplementado com menores concentrações de glifosato (1,0, 2,0, 3,5 e 4,5 g L⁻¹ de glifosato) (Figura 16). Nesta análise, foi possível observar que a cepa CaRCA16 foi capaz de degradar a molécula de glifosato em concentrações de até 3,5 g L⁻¹ (30,8%, 17,4% e 5,0%, respectivamente), enquanto a cepa CaMP33 degradou em todas as concentrações, registrando uma degradação significativa (44,1%) somente na concentração de 1,0 g L⁻¹ de glifosato. Adicionalmente a cepa CaMP33 degradou o herbicida em 27%, 16,1% e 7% nas concentrações de 2,0, 3,5 e 4,5 g L⁻¹ de glifosato.

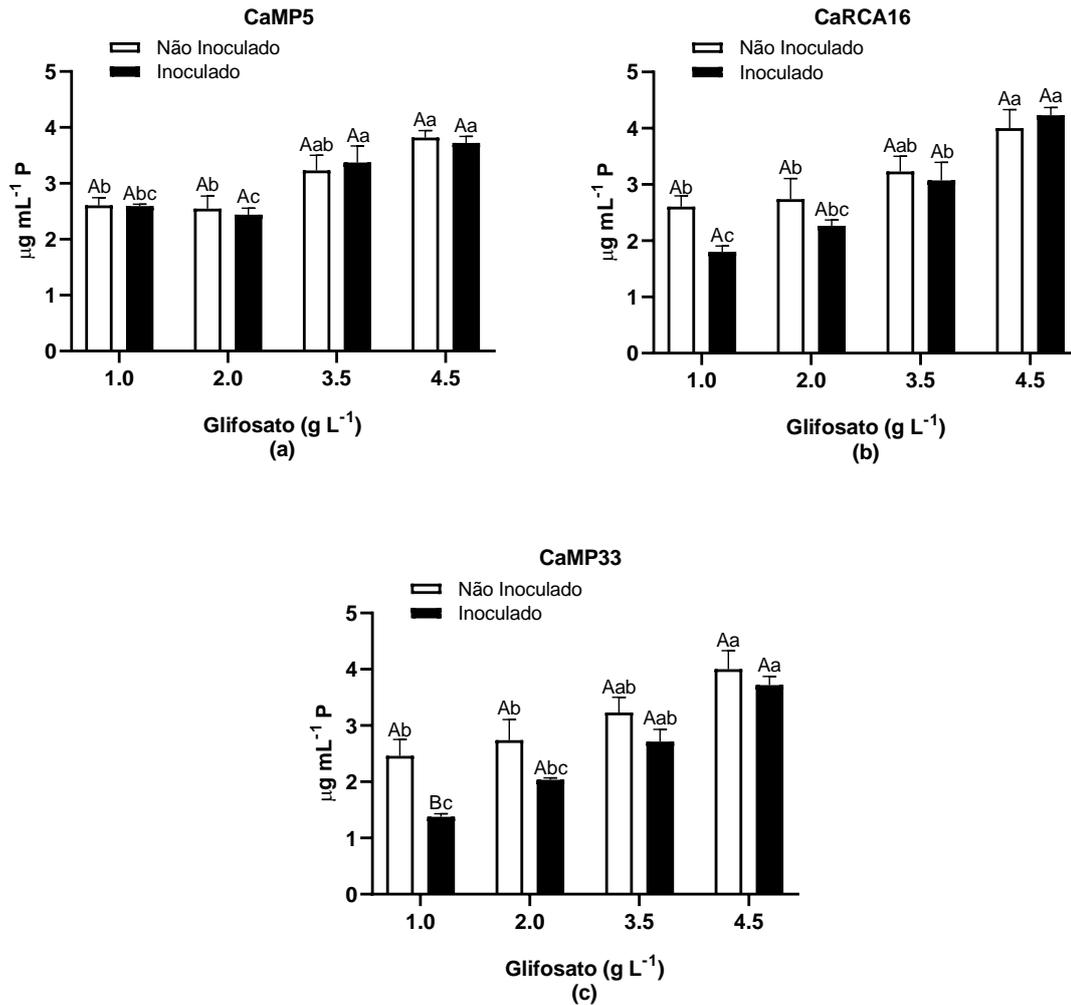


Figura 16: Degradação da molécula de glifosato através da quantificação do íon fosfato liberado pelas cepas CaMP5 (a), CaRCA16 (b) e CaMP33 (c), em diferentes concentrações do herbicida (1,0, 2,0, 3,5 e 4,5 g L⁻¹) analisadas por espectrofotometria. Letras maiúsculas diferentes na mesma concentração de glifosato; e letras minúsculas diferentes na mesma inoculação, indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$). Cada valor é a média \pm DP de cinco réplicas independentes.

5.8. Biodesign das bactérias isoladas com base em habilidade fisiológica

As combinações entre as cinco cepas mostraram que CaMP5/CaRCA16/CaMP31, CaMP5/CaRCA16/CaMP32, CaMP5/CaMP32/CaMP33, CaRCA16/CaMP31/CaMP32, CaRCA16/CaMP31/CaMP33 e CaMP31/CaMP32/CaMP33 não tiveram interação

positiva, uma vez que houve comportamento de inibição de crescimento, sendo, portanto, desconsideradas para a confecção do consórcio (Tabela 8; Figura 17).

As combinações (CaMP5/CaRCA16/CaMP33) e (CaMP5/CaMP31/CaMP32) exibiram comportamento de compatibilidade, crescendo próximas umas das outras sem sinais de inibição. Desses dois consórcios, foi escolhido aquele com maior diversidade genética (CaMP5/CaRCA16/CaMP33), com três gêneros distintos e por serem degradadoras da molécula do glifosato (Figura 16). Assim, as combinações CaMP5/CaRCA16/CaMP33 foram selecionadas para a formulação do consórcio microbiano e para testes em plantas e na degradação do herbicida glifosato *in vivo* (Tabela 9).

Tabela 8: Compatibilidade entre cepas bacterianas selecionadas.

Bactérias	CaMP5 x CaRCA16	CaMP5 x CaMP31	CaMP5 x CaMP32	CaRCA16 x CaMP31	CaRCA16 x CaMP32	CaMP31 x CaMP32
CaMP5				-	-	-
CaRCA16		-	-			-
CaMP31	-		-		-	
CaMP32	-	+		-		
CaMP33	+	-	-	-	-	-

(+) positiva; (-) negativa

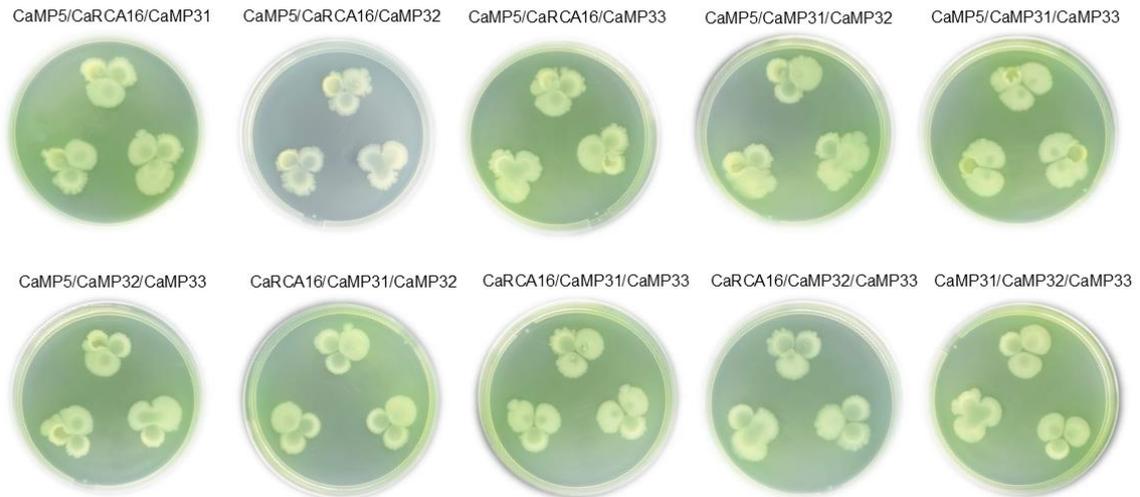


Figura 17: Consórcio triplo em meio DYGS sólido das 5 bactérias selecionadas a partir da caracterização fisiológica (CaMP5, CaRCA16, CaMP31, CaMP32 e CaMP33).

Tabela 9: Características do consórcio bacteriano selecionado com base nos resultados obtidos quanto à solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido (SFIS e SFIL), potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de AIA e degradação da molécula do glifosato.

Bactérias	Identificação das bactérias	Características promotoras do crescimento vegetal	Capacidade de degradação do glifosato
CaMP5	<i>Priestia</i> sp.	SFIL, FBN e AIA	—
CaRCA16	<i>Achromobacter</i> sp.	SFIL e FBN	até 3,5 g L ⁻¹
CaMP33	<i>Pseudomonas</i> sp.	FBN e AIA	até 4,5 g L ⁻¹

5.9. Teste de degradação do glifosato *in vivo*

Após teste de degradação do glifosato *in vitro*, seleção do consórcio com base na compatibilidade das cepas bacterianas, foi realizado o teste *in vivo* em grãos de café. Neste teste, o consórcio bacteriano torna-se o produto microbiológico que possa reduzir os níveis de glifosato nos grãos de café, reduzindo assim o problema da exportação de grãos de café para a Europa devido às altas concentrações de glifosato.

Nesta avaliação, foi descoberto que há glifosato residual nos grãos de café e que o consórcio microbiano degrada a molécula de glifosato (Tabela 10), uma vez que

a determinação de glifosato em grãos de café arábica tratados com o herbicida mostrou que o consórcio bacteriano reduziu significativamente a quantidade de glifosato em 17,32% em comparação com o tratamento com apenas glifosato. Além disso, os grãos tratados com o consórcio apresentaram uma redução de 31,25% do glifosato residual em relação ao controle, passando de 0,16 mg kg⁻¹ para 0,11 mg kg⁻¹.

Tabela 10: Biodegradação do herbicida glifosato em grãos de café arábica Catucaí Amarelo 785/15 por um consórcio de bactérias tolerantes ao glifosato e promotoras de crescimento de plantas. Consórcio bacteriano: CaMP5 - *Priestia* sp.; CaRCA16 - *Achromobacter* sp., e CaMP33 - *Pseudomonas* sp. Cada valor é a média ± DP de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, p<0,05).

Tratamentos	Glifosato (mg kg ⁻¹)
Grãos de <i>Coffea arabica</i> (controle)	0,16 ± 0,02 c
Grãos de <i>Coffea arabica</i> + Consórcio bacteriano	0,11 ± 0,01 d
Grãos de <i>Coffea arabica</i> + Glifosato	4,04 ± 0,43 a
Grãos de <i>Coffea arábica</i> + Glifosato + Consórcio bacteriano	3,34 ± 0,36 b

Essa degradação é particularmente relevante quando comparada aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos para o glifosato. No Brasil, o LMR permitido em grãos de café é de 1,0 mg kg⁻¹, enquanto na Europa, é 0,1 mg kg⁻¹, dez vezes inferior ao valor brasileiro. A redução observada demonstra que o consórcio bacteriano tem potencial para mitigar os resíduos de glifosato, aproximando os valores aos padrões mais restritivos exigidos internacionalmente.

Portanto, as cepas bacterianas CaMP5, CaRCA16 e CaMP33 comprovaram seu potencial de biodegradação ao reduzir significativamente a presença desse herbicida nos grãos de *C. arabica*, evidenciando sua aplicabilidade na diminuição da contaminação química em sistemas agrícolas.

5.10. Promoção do crescimento vegetal em sementes de tomate (*in vitro*)

O teste *in vitro* em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) revelou que o uso do consórcio formado por cepas de *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp.

(CaRCA16) e *Pseudomonas* sp. (CaMP33) influenciou positivamente os parâmetros de crescimento de plântulas de tomate, já que sementes inoculadas e não inoculadas apresentaram uma média de germinação completa superior a 90% (Figura 18a). As sementes inoculadas com a cepa CaRCA16 e com o consórcio apresentaram melhor resposta no comprimento de raiz (113,9% e 86,8%), comprimento do hipocótilo (140,3% e 135,4%) e comprimento total (124,6% e 109,8%) (Figuras 18 e 19). Todas as cepas individualizadas ou em consórcio tiveram efeito positivo no comprimento do hipocótilo, embora CaRCA16 e o consórcio tenham proporcionado respostas superiores no comprimento do hipocótilo, as sementes de tomate tratadas com as cepas CaMP5 e CaMP33 incrementaram 28,8% e 29,8%, respectivamente. No geral, o efeito do consórcio para esta análise mostrou-se similar à utilização da cepa CaRCA16 (Figuras 18 e 19).

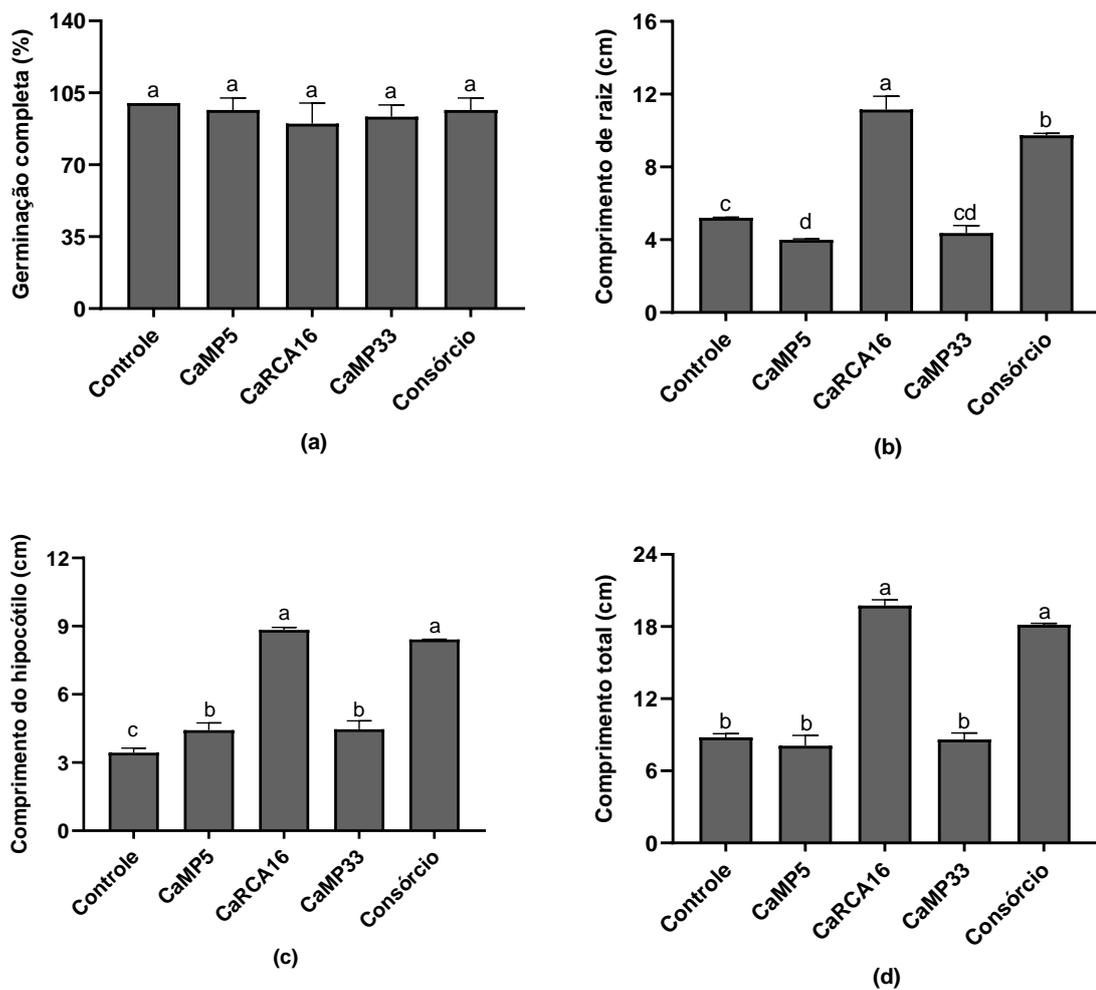


Figura 18: Efeito do consórcio bacteriano selecionado no crescimento de sementes de tomate no ensaio de *biopriming*. Germinação completa (a), comprimento de raiz (b), comprimento do hipocótilo (c) e comprimento total (d). *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33). Cada valor é a média \pm DP de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).



Figura 19: Fotografia representativa do crescimento de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33).

5.11. Promoção do crescimento vegetal em plantas de feijão (*ex vitro*)

Quanto aos parâmetros de crescimento, plantas de feijão inoculadas com a cepa CaRCA16 obteve a maior altura (49,3%) quando comparada ao controle e, também, diferiram estatisticamente dos demais tratamentos (Figuras 20a e 21). Ao analisar o número de folhas e diâmetro, notou-se que as plantas inoculadas tiveram respostas semelhantes ao controle, exceto plantas com a bactéria CaMP5 que reduziram número de folhas (28,6%) e plantas inoculadas com CaRCA16 que tiveram uma redução do diâmetro (43,1%). Adicionalmente, o volume e comprimento de raiz aumentaram significativamente com a inoculação CaMP33 (20%; 10,6%) e com o consórcio (17,1%; 12,5%) (Figuras 20d e 20e).

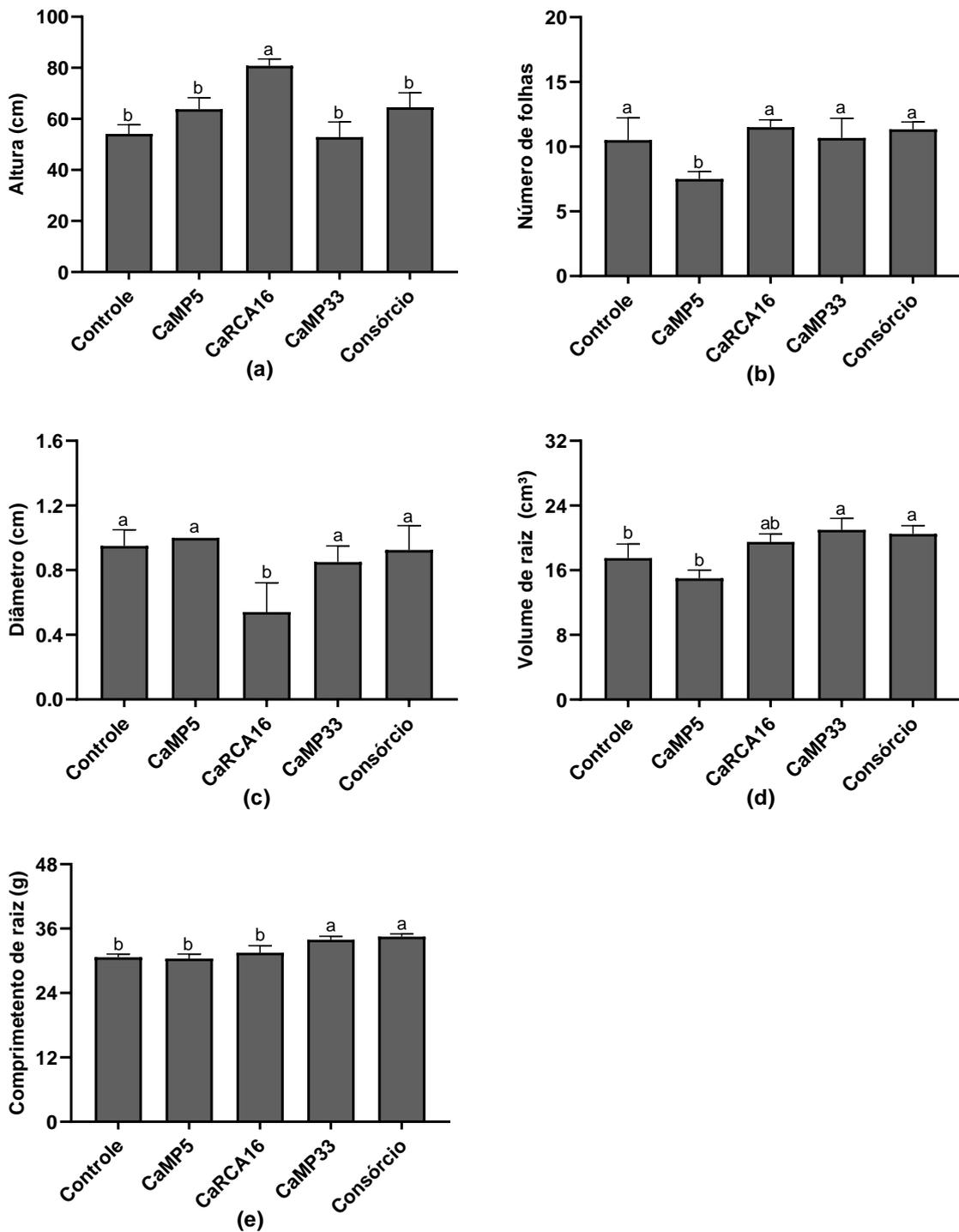


Figura 20: Altura (a), número de folhas (b), diâmetro (c) volume de raiz (d) e comprimento de raiz (e) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33). Cada valor é a média \pm DP de cinco réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).

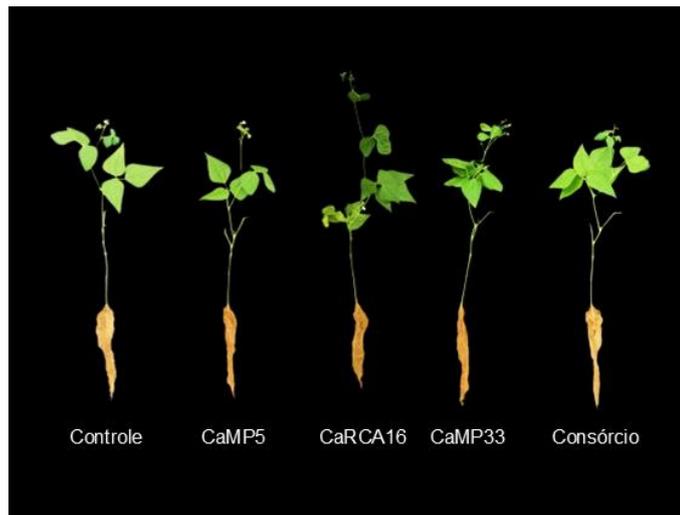


Figura 21: Visualização frontal do experimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33).

A inoculação das bactérias individualmente ou em consórcio, aumentou a MSPA das plantas de feijão, com incremento significativo em plantas com CaRCA16 (21,0%), CaMP33 (12,7%) e com o consórcio (27,0%), sendo que o consórcio proporcionou o maior incremento em MSPA entre os tratamentos (Figura 22a). Em contrapartida, todas as plantas de feijão inoculadas tiveram uma redução da MSR comparada ao controle (Figura 22b). Já a MST das plantas com CaRCA16 e com o consórcio não diferiram do controle, enquanto plantas tratadas com CaMP5 e CaMP33 apresentaram redução da MST em 21,8% e 17,3% (Figura 22c).

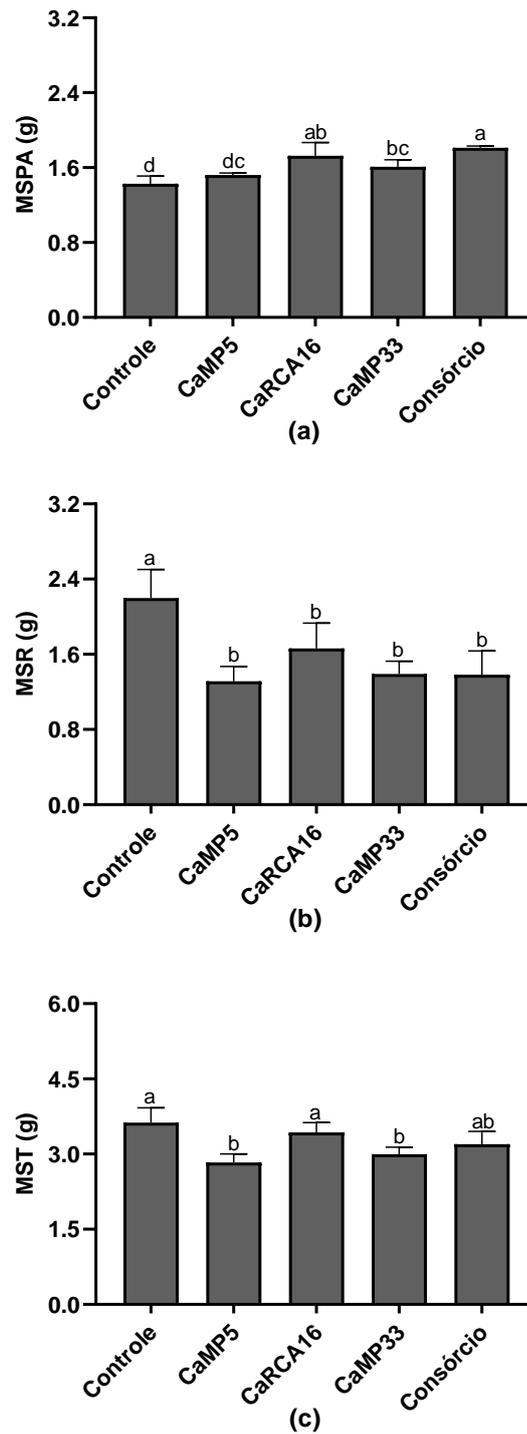


Figura 22: Massa seca da parte aérea (MSPA) (a), massa seca da raiz (MSR) (b) e massa seca total (MST) (c) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33). Cada valor é a média \pm DP de cinco réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).

5.11.1. Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea e raiz

O uso do consórcio bacteriano composto por cepas de *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) aumentou em 20,1% o conteúdo de N na parte aérea das plantas de feijão (Figura 23a). Enquanto, a cepa CaRCA16 e o consórcio aumentaram significativamente o conteúdo do P (25,2%; 33,0%), K (25,4%; 30,8%) e Mg (24,2% e 18,2%) (Figuras 23b, 23c e 23e). No entanto, somente as plantas tratadas com CaRCA16 obtiveram incremento em Ca (52,3%) e S (26,6%) (Figuras 23d e 23f). Nas raízes de feijão, observou-se que somente o conteúdo de Mg aumentou, com incremento de 19,6% nas plantas inoculadas com a cepa CaRCS16 (Figura 24e).

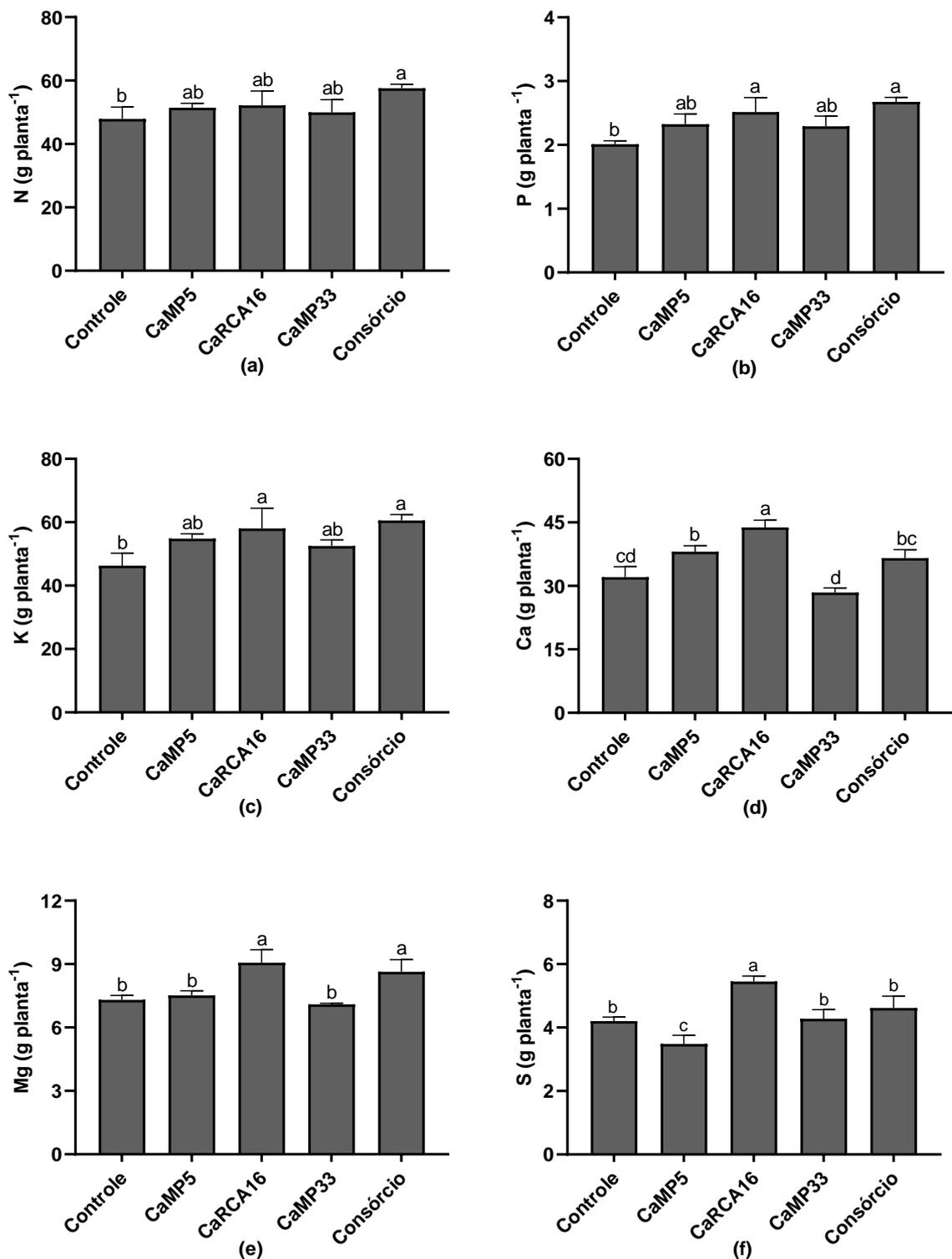


Figura 23: Conteúdo de macronutrientes na parte aérea de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33). Cada valor é a média \pm DP de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).

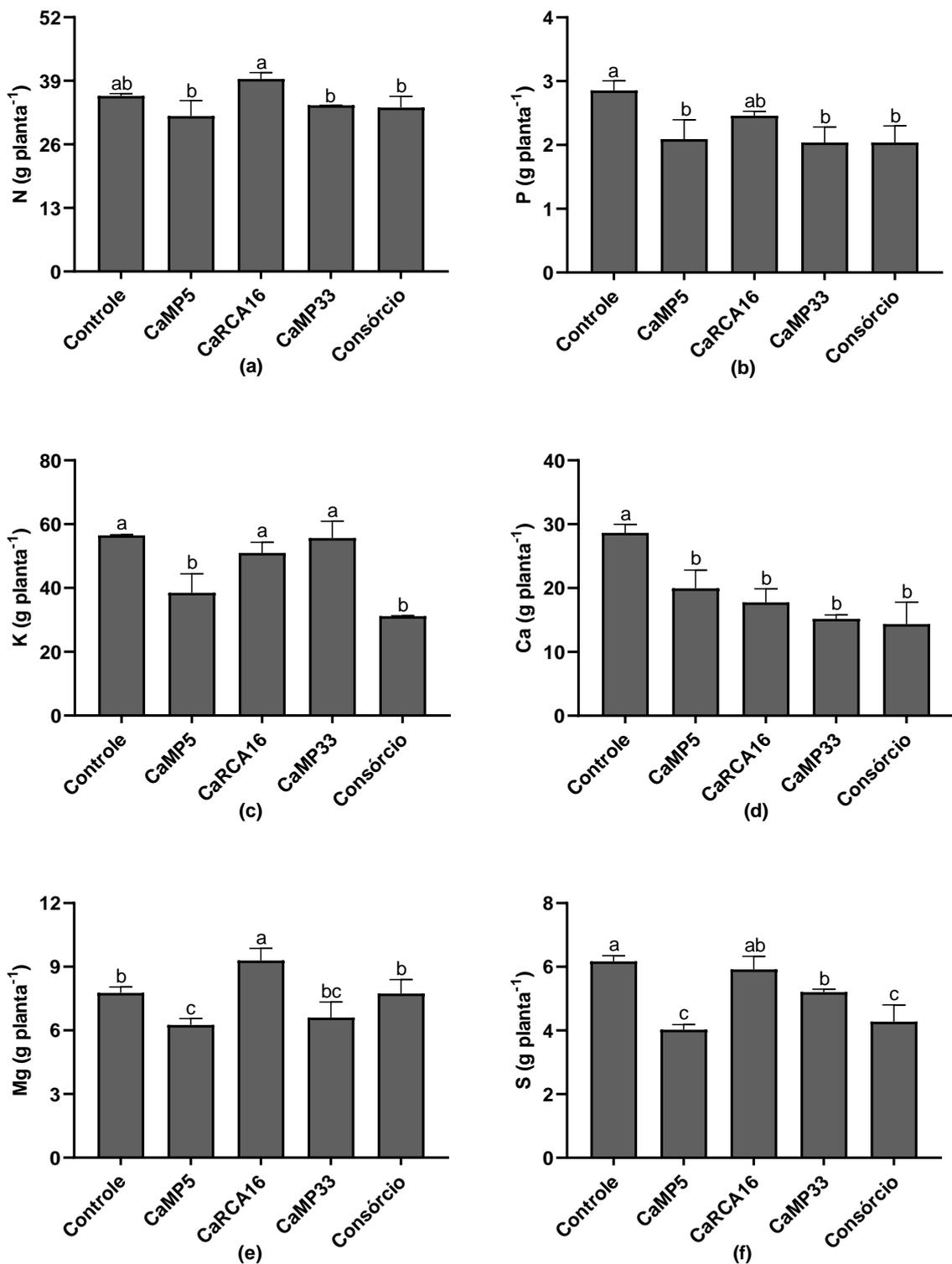


Figura 24: Conteúdo de macronutrientes na raiz de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33). Cada valor é a média \pm DP de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).

O conteúdo de micronutrientes na parte aérea também teve efeito do consórcio bacteriano. O conteúdo de Fe da parte aérea aumentou em todas as plantas inoculadas, com incremento significativo para CaRCA16 (29,6%), CaMP33 (25,6%) e consórcio (37,2 %) (Figura 25a). O conteúdo de Zn de todas as plantas aumentou em 41,4% (CaMP5), 70,8% (CaRCA16), 57,4% (CaMP33) e 58,1% (consórcio) (Figura 25b). Já o conteúdo de Mn na parte aérea das plantas, teve incremento significativamente somente nas plantas tratadas com o consórcio (54,8%) (Figura 25c). O conteúdo de micronutrientes (Fe, Zn e Mn) nas raízes das plantas inoculadas foi inferior ao controle (Figura 26).

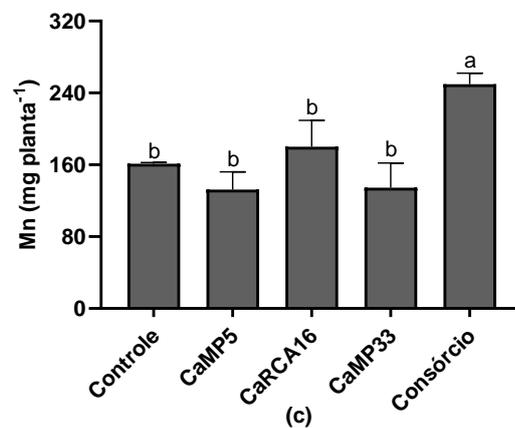
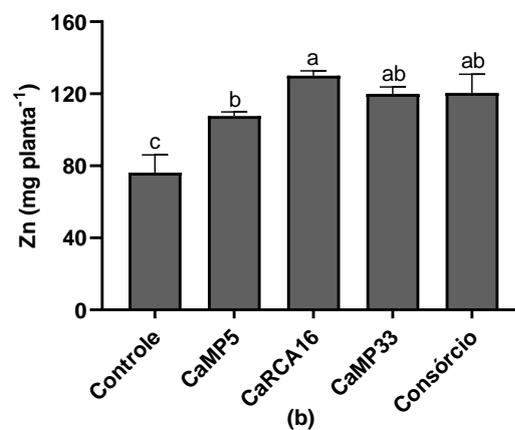
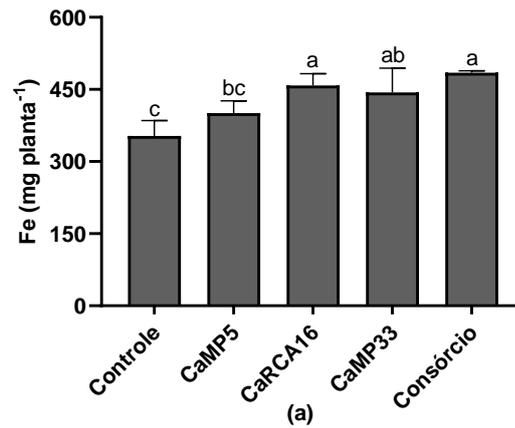


Figura 25: Conteúdo de micronutrientes na parte aérea de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33). Cada valor é a média \pm DP de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).

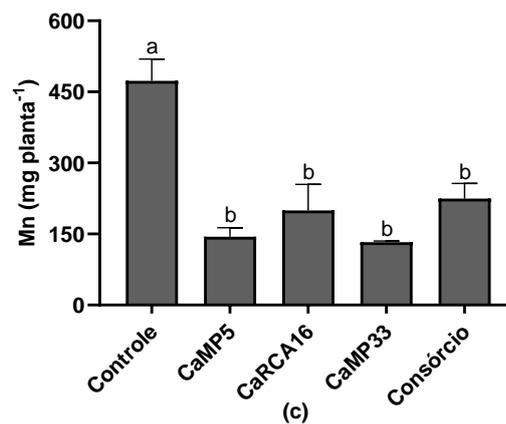
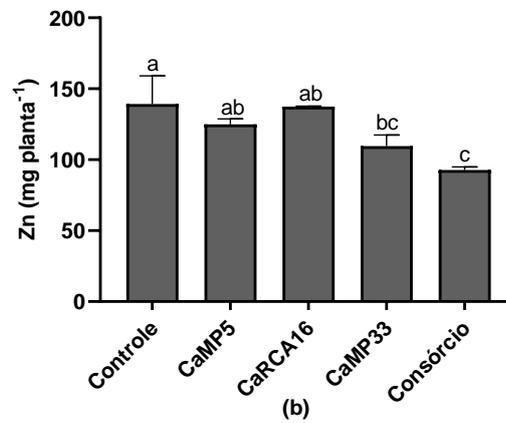
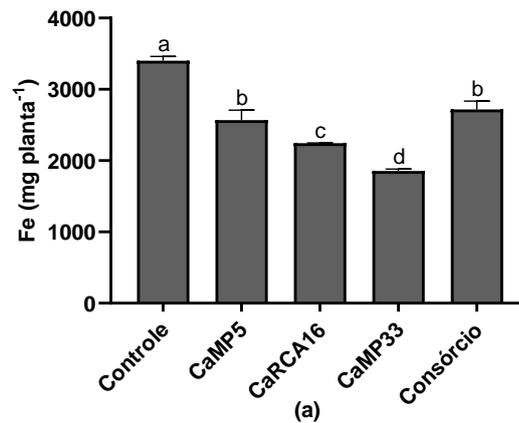


Figura 26: Conteúdo de micronutrientes na raiz de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33). Cada valor é a média \pm DP de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$).

5.11.2. Impacto da inoculação bacteriana na produção do feijão TAA Dama

Após colheita das vagens, foi possível observar que o consórcio impactou positivamente nos dados de produção de feijão, uma vez que plantas inoculadas com o consórcio tiveram um aumento de 50% no número de vagens. O Comprimento da vagem também aumentou nas plantas tratadas com CaRCA16 (41,0%), CaMP33 (49,2%) e com o consórcio (43,1%). Peso da vagem e largura da vagem não diferiram (Tabela 11; Figura 27).

Tabela 11: Dados de produção de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33).

Tratamentos	Nº de vagens (planta ⁻¹)	Peso da vagem (g)	Comprimento da vagem (mm)	Largura da vagem (mm)
Controle	6 ^b	1,03 ^a	43,57 ^b	4,50 ^a
CaMP5	5 ^c	0,79 ^a	52,00 ^{ab}	3,25 ^a
CaRCA16	7 ^b	1,02 ^a	61,43 ^a	4,56 ^a
CaMP33	5 ^{bc}	1,10 ^a	65,00 ^a	3,75 ^a
Consórcio	9 ^a	1,03 ^a	62,33 ^a	4,42 ^a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna (n=5), não diferem entre si, ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey

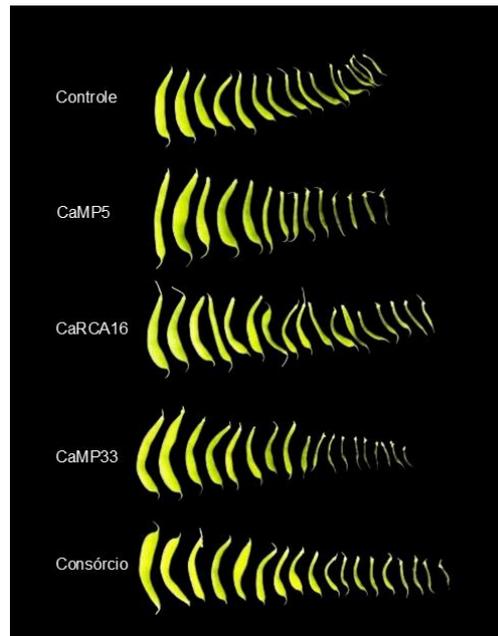


Figura 27: Produção de vagens de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) TAA Dama inoculadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16), *Pseudomonas* sp. (CaMP33) e consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33).

5.12. Promoção do crescimento vegetal em plantas de soja (*ex vitro*)

As plantas de soja resistentes ao glifosato (SRR) tiveram maior desempenho em altura, diâmetro, volume de raiz, MFPA, MFR, MSPA, MSR e MST quando comparados às plantas de soja convencional (SC). Em relação à altura, ambas as cultivares tiveram respostas semelhantes com a utilização do consórcio, contudo, houve diferença estatística na altura das plantas tratadas com glifosato em que a SC obteve uma redução de 30,1% em relação à SRR e no tratamento consórcio + glifosato, um decréscimo de 26,1% (Figura 28a). Embora o número de folhas das plantas SRR tenha sido superior às plantas de SC, plantas SRR com o consórcio não diferiram do controle e plantas com o consórcio + glifosato não diferiram de plantas tratadas somente com o glifosato. No entanto planta de SC com o consórcio + glifosato tiveram um incremento significativo de 192,8% em relação às plantas de SC tratadas com glifosato (Figura 28b). O diâmetro de todas as plantas de SRR foi superior à SC, com destaque para o diâmetro das plantas tratadas com o consórcio, com um incremento de 363,3% (Figura 28c).

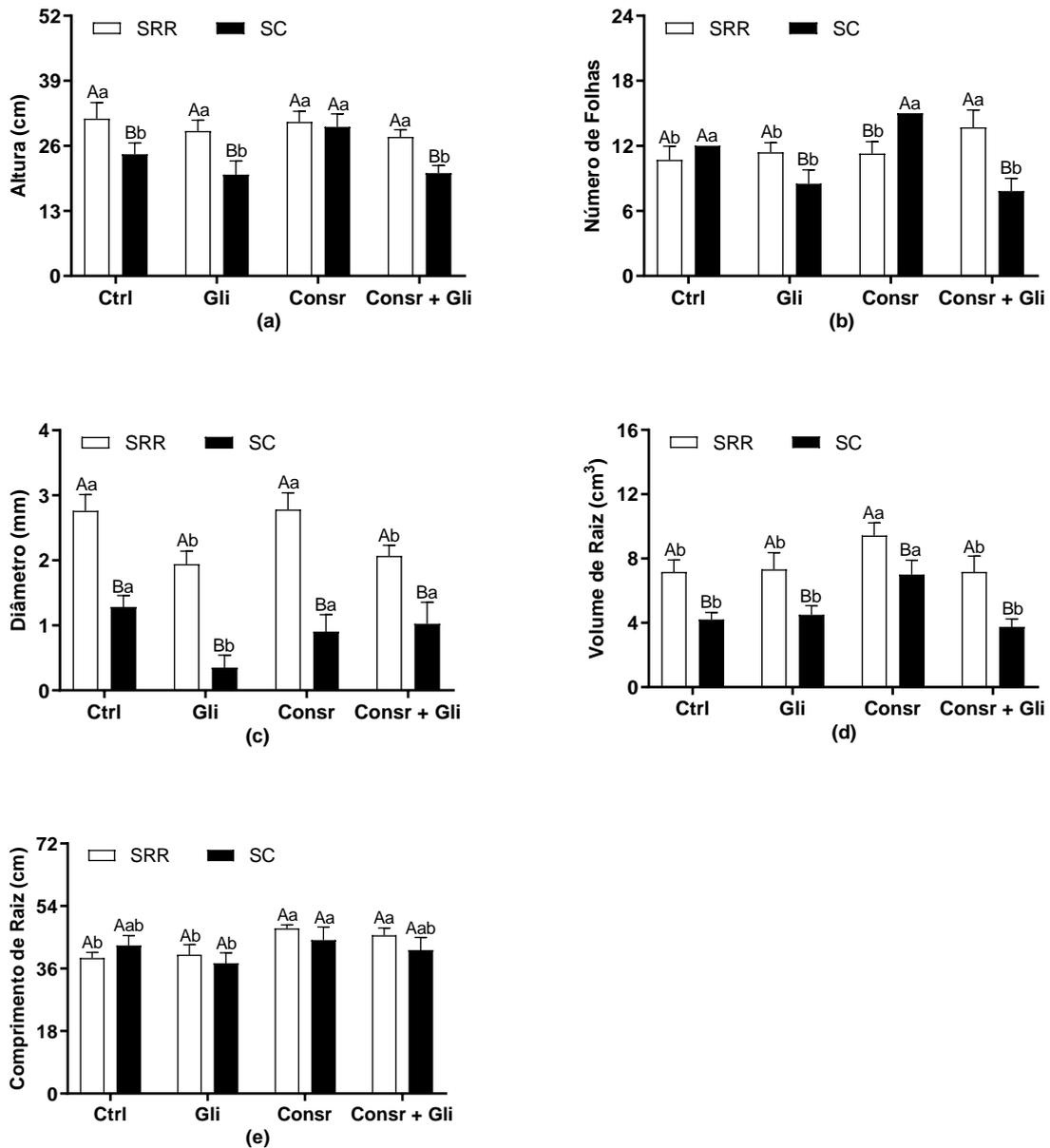


Figura 28: Altura (a), número de folhas (b), diâmetro (c), volume de raiz (d) e comprimento de raiz (e) de duas cultivares de soja: TMG 7362 Intacta RR2 IPRO (soja resistente ao glifosato; SRR) e soja BRS 7582 (soja convencional; SC) inoculadas com um consórcio bacteriano capaz de promover o crescimento vegetal e degradar a molécula do glifosato. Formulação do consórcio: *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16) e *Pseudomonas* sp. (CaMP33). Controle (Ctrl), glifosato (Gli), consórcio (Consr) e consórcio + glifosato (Consr + Gli). As letras maiúsculas diferentes entre as duas cultivares de soja, sob o mesmo tratamento; e as letras minúsculas diferentes entre os tratamentos e sob mesma cultivar, indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$). Cada valor é a média \pm DP de cinco réplicas independentes.

A aplicação do consórcio bacteriano proporcionou um aumento no volume de raiz (Figuras 28d e 29). Para este parâmetro, a SC com o consórcio mesmo com resultados menores (25,7%) do que a SRR com o consórcio, ambas ainda tiveram os melhores ganhos, a SRR com o consórcio obteve um incremento de 31,6% em relação ao controle, e a SC 66,7% (Figura 28d). A aplicação do glifosato ou consórcio + glifosato não prejudicou o comprimento e volume das raízes de ambas as sojas, já que se mantiveram semelhantes aos seus controles (Figuras 28d e 28e). No entanto, no comprimento de raiz, a aplicação do consórcio + glifosato na SRR manteve-se semelhante às plantas que receberam somente o consórcio, evidenciando o efeito bioprotetor do consórcio sob o glifosato (Figura 28e).



Figura 29: Visualização frontal do experimento de duas cultivares de soja: TMG 7362 Intacta RR2 IPRO (soja resistente ao glifosato; SRR) e soja BRS 7582 (soja convencional; SC) inoculadas com um consórcio bacteriano capaz de promover o crescimento vegetal e degradar a molécula do glifosato. Formulação do consórcio: *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16) e *Pseudomonas* sp. (CaMP33). Controle (Ctrl), glifosato (Gli), consórcio (Consr) e consórcio + glifosato (Consr + Gli).

A SRR obteve respostas superiores a SC quanto à MFPA, MSPA e MST em todos os tratamentos (Figuras 30a, 30c e 30e). A aplicação do consórcio + glifosato não diferiram das plantas tratadas somente com glifosato para nenhuma destas variáveis. No entanto, as plantas de SRR somente com o consórcio tiveram maior

incremento na MSPA (23,4%) e MST (16,0%) comparada ao controle (Figuras 30c e 30e).

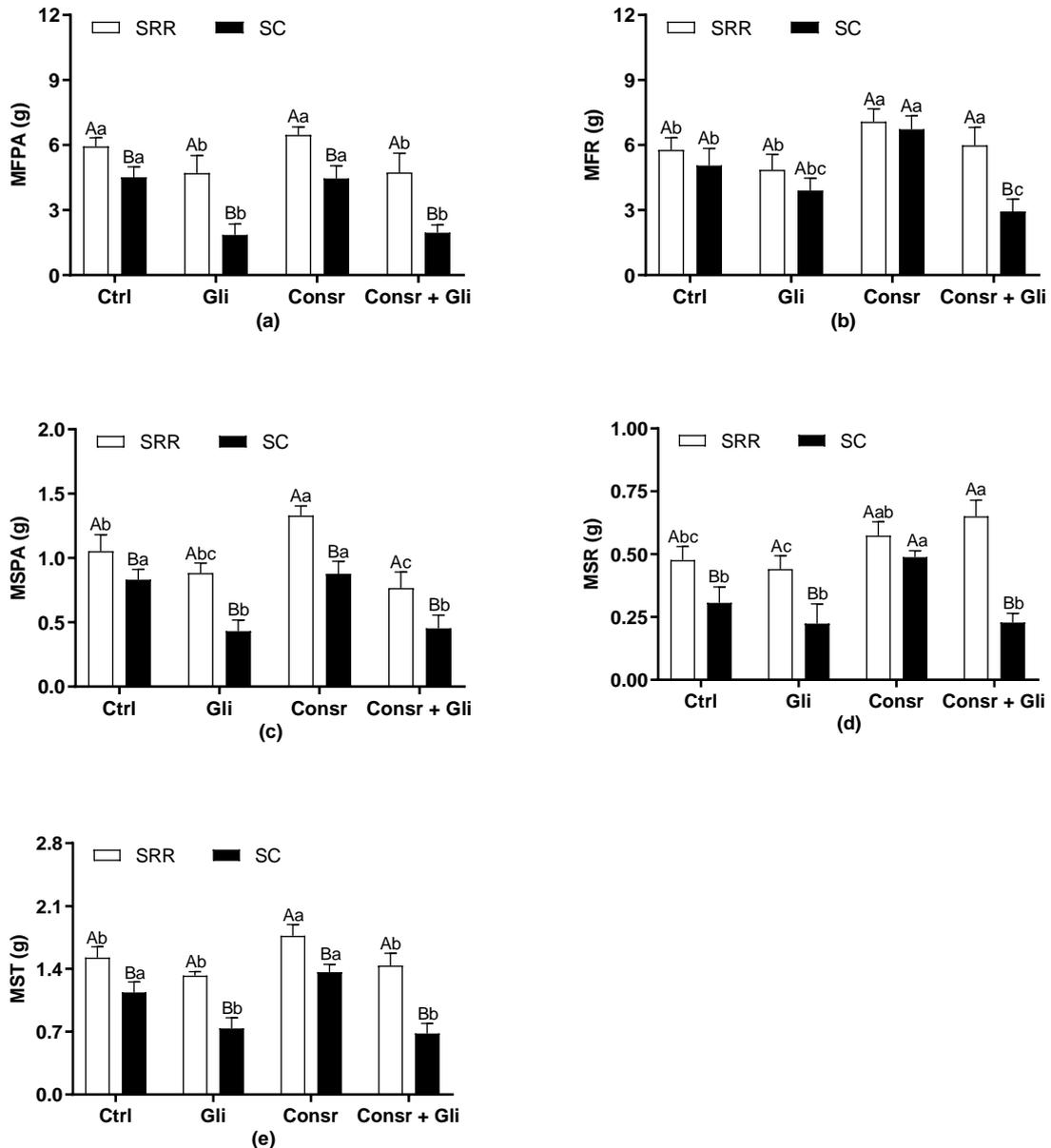


Figura 30: Massa fresca da parte aérea (MFPA) (a), massa fresca da raiz (MFR) (b), massa seca da parte aérea (MSPA) (c), massa seca da raiz (MSR) (d) e massa seca total (MST) (e) de duas cultivares de soja: TMG 7362 Intacta RR2 IPRO (soja resistente ao glifosato; SRR) e soja BRS 7582 (soja convencional; SC) inoculadas com um consórcio bacteriano capaz de promover o crescimento vegetal e degradar a molécula do glifosato. Formulação do consórcio: *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16) e *Pseudomonas* sp. (CaMP33). Controle (Ctrl), glifosato (Gli), consórcio (Consr) e consórcio + glifosato (Consr + Gli). As letras maiúsculas diferentes

entre as duas cultivars de soja, sob o mesmo tratamento; e as letras minúsculas diferentes entre os tratamentos e sob mesma cultivar, indicam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$). Cada valor é a média \pm DP de cinco réplicas independentes.

A aplicação do consórcio bacteriano proporcionou um aumento na MFR e MSR (Figuras 29b e 29d). Houve um aumento na MFR das plantas de SRR com o consórcio (22,6%) em relação ao controle e 23,3% da SRR com consórcio + glifosato em relação ao tratamento com glifosato (Figura 29b). Já na MSR, somente a SC com consórcio obteve incremento significativo em relação ao controle (59,5%), enquanto com aplicação do consórcio + glifosato somente a SRR aumentou MSR (47,7%) comparado às plantas que receberam somente o herbicida (Figura 29d). Ambas as sojas tiveram respostas semelhantes sob a aplicação do consórcio para MFR e MSR (Figuras 29b e 29d).

6. DISCUSSÃO

A maior abundância de bactérias observada na mata preservada em relação à rizosfera do café arábica e à rizosfera de planta daninha (Tabela 1) pode ter ocorrido devido esse habitat oferecer condições mais favoráveis para o crescimento bacteriano em comparação ao solo agrícola, além de possuir menores perturbações ambientais (Holden e Treseder, 2013; Hermans et al., 2017). A perturbação do solo pode induzir alterações na aeração, umidade e no status de nutrientes do solo (como a relação C/N), o que altera a abundância microbiana (Bao et al., 2019). Além disso, a presença de resíduos de herbicidas e outros agroquímicos em solos agrícolas pode impactar a composição microbiana, reduzindo a diversidade e/ou favorecendo microrganismos mais resistentes. Portanto, a abundância de bactérias no solo reflete a diversidade de nichos ecológicos existentes e as conexões tróficas entre eles e outros componentes do ecossistema (Boyarshin et al., 2023).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma planta daninha que ganhou considerável importância devido à sua resistência ao glifosato (Gonçalves Netto, 2021). Segundo Tétard-Jones et al. (2016), se bactérias simbióticas e desintoxicantes estiverem presentes em plantas resistentes a herbicidas, elas podem contribuir para a biorremediação dos herbicidas devido à sua capacidade de metabolizar xenobióticos. No entanto, encontramos uma grande abundância de bactérias tolerantes ao glifosato na região da mata preservada (Figura 4 e Tabela 3). Joly et al. (2014) relataram que áreas de mata preservada podem sofrer distúrbios antropogênicos quando localizadas próximas a plantações agrícolas, impactando, assim, a estrutura das comunidades biológicas e as funções do ecossistema. Além disso, bactérias que degradam glifosato podem ser encontradas em solos não contaminados (naturais) devido à sua capacidade de usar compostos organofosforados como fonte de fósforo por meio de seus complexos de C-P liase, especialmente em condições de deficiência de fósforo (Ruffolo et al., 2023), que é o caso típico em áreas não cultivadas (nativas) no estado do Espírito Santo, Brasil (Pavinato et al., 2021).

As cepas selecionadas e identificadas como tolerantes ao glifosato (Tabela 3) já foram mencionadas em vários estudos como bactérias tolerantes ao glifosato, com destaque para os gêneros *Priestia* (Elarabi et al., 2020), *Burkholderia* (Hertel et al.,

2022), *Achromobacter* (Shushkova et al., 2016) e *Pseudomonas* (Mohy-Ud-Din et al., 2023). A prevalência de bactérias Gram-negativas identificadas neste trabalho (Tabela 3) pode estar relacionada às atividades agrícolas que influenciam a composição microbiana (Xue et al., 2018), especialmente na rizosfera do café arábica e da planta daninha, como descrito por Teshome et al. (2017), que isolaram bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera do café arábica e observou que 73,2% das cepas eram Gram-negativas.

A tolerância das bactérias a concentrações de 22 e 44 g L⁻¹ de glifosato pode estar relacionada à enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). O mecanismo de ação do glifosato ocorre por meio da inibição específica da síntese de EPSPS bacteriana, atuando como um agente antimicrobiano. No entanto, foi demonstrado que em bactérias que crescem em ambientes com glifosato, a enzima produzida é menos sensível ao herbicida (Teshome et al., 2017). Dois tipos de EPSPS (classe I e II) foram descritos, ambos documentados de acordo com sua sensibilidade ao glifosato, sendo que a classe I de EPSPS é sensível ao glifosato e a classe II é tolerante (Funke et al., 2007).

As bactérias com melhor desempenho ao crescer em meio suplementado com glifosato foram cepas do gênero *Pseudomonas* (tolerantes a 44 g L⁻¹) (Tabela 2). Isso pode estar relacionado ao fato de algumas cepas de *Pseudomonas* possuírem um gene que aumenta o efluxo de glifosato para fora da célula (Staub et al., 2012). Além disso, as cepas de *Pseudomonas* podem degradar o glifosato via C-P liase e/ou oxidoreductase de glifosato (Zhao et al., 2015). Segundo Zhao et al. (2015), cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de solo contaminado têm potencial de biorremediação de glifosato a uma concentração de 0,5 g L⁻¹ de glifosato. Já Moneke et al. (2010) relataram uma tolerância de *Pseudomonas fluorescens* a 250 g L⁻¹ de glifosato, que é 5.68 vezes maior do que a maior concentração tolerada por bactérias neste estudo. De acordo com Nivanthi et al. (2018), um consórcio de *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. pode ser utilizado como agentes de biorremediação eficazes para o tratamento de solos e aquíferos contaminados com glifosato. Nesse contexto, essas características tornam as *Pseudomonas* organismos promissores para a biorremediação de ambientes contaminados com glifosato, destacando seu potencial para aplicações práticas na agricultura e na restauração ambiental.

Bactérias promotoras do crescimento vegetal são um grupo relevante de bactérias benéficas que prosperam na rizosfera das plantas ou no solo e, por meio de

interações sinérgicas, podem promover o crescimento vegetal, melhorar a nutrição e fornecer tolerância a estresses bióticos e abióticos das plantas hospedeiras (Basu et al., 2021). A fixação de nitrogênio atmosférico (N_2), solubilização de fosfato inorgânico e produção de AIA são alguns dos mecanismos específicos deste grupo de bactérias que resultam no aumento do crescimento vegetal (Olanrewaju et al., 2017). Essas características, observadas nas bactérias isoladas neste trabalho e selecionadas para a formulação do consórcio, são de extremo interesse para o cultivo de *Coffea arabica* L., uma vez que esta é uma planta exigente em termos nutricionais e possui um histórico de interação sinérgica com alguns grupos de bactérias do solo (Martins et al., 2019; Suharjono e Yuliatin, 2022).

As bactérias isoladas neste trabalho, também, demonstraram potencial para fixar N atmosférico (Tabela 5). Esse grupo de microrganismos desempenha um papel vital na conversão biológica do N molecular (N_2) em compostos inorgânicos contendo N, como a amônia (NH_3), que é a principal via de fixação biológica de N (Das e De, 2017). Essa conversão é mediada principalmente pela enzima nitrogenase ferromolibdênio (FeMo), codificada pelos genes do complexo nif (*nifH*, *nifD*, *nifK*) (Rodrigues et al., 2018).

Cepas bacterianas dos gêneros *Priestia*, *Burkholderia*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* apresentaram características potenciais de fixação de N_2 (Tabela 5), já que essas cepas formaram película, como observado no teste em meio NFB (Baldani et al., 2014; Msimbira et al., 2020; Rutledge et al., 2020; Cordova-Rodriguez et al., 2022). O N é o macronutriente requerido em maior quantidade pelas plantas, e sua deficiência limita principalmente o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Kraiser et al., 2011).

Em relação ao gênero *Achromobacter*, vários estudos indicaram o potencial de fixação de N com base na detecção do gene *nifH* por PCR e no crescimento em meios sem N (Silveira et al., 2016; Husseiny et al., 2021). Contudo, a capacidade das cepas de *Achromobacter* de fixar N ainda não foi confirmada por métodos mais confiáveis, como o ensaio de redução de acetileno. Quanto às *Pseudomonas*, este gênero é um dos grupos mais abundantes de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e é conhecido por suas interações associativas com fertilizantes nitrogenados, aumentando a produtividade vegetal e a fertilidade do solo (Arif et al., 2016). Certas espécies, como *Pseudomonas koreensis* (IB-4), são capazes de fixar N, enquanto

outras, como *Pseudomonas laurentiana* (ANT-17), podem sintetizar AIA e fixar N (Rafikova et al., 2020; Kuzina et al., 2022).

A solubilização de fosfato inorgânico (Pi) atribuída às bactérias do solo pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo a produção de ácidos orgânicos, atividade de fosfatase e uma conseqüente redução do pH, como observado por Pande et al. (2017). No entanto, observamos uma divergência interessante em nossos resultados: enquanto todas as cepas promoveram uma redução no pH do meio, aquelas que induziram uma acidificação substancial mostraram menor solubilização de fosfato. Por outro lado, cepas que exibiram maior solubilização causaram apenas uma pequena diminuição no pH do meio (Tabela 3). Este achado contrasta com as observações de Amri et al. (2023), nas quais a redução do pH variou de acordo com o tempo de crescimento das bactérias solubilizadoras de fosfato (3 e 7 dias), diferindo dos resultados obtidos neste estudo, que envolveu apenas uma incubação de dois dias. Apesar dos resultados contradizerem a literatura existente, que geralmente associa uma maior concentração de fósforo solubilizado a um pH mais baixo, a redução observada no pH ainda apoia a ideia de que a acidificação do meio auxilia na solubilização de fosfato (Pande et al., 2020).

No solo, essas bactérias solubilizadoras de fosfato podem ajudar as plantas a acessarem o reservatório de fósforo na fração não lábil do solo, liberando-o de suas formas recalcitrantes, já que o Pi, quando complexado com Ca, pode ser solubilizado por ácidos orgânicos ou íons H exsudados por esses microrganismos (Backer et al., 2018).

Além de aumentar a absorção de nutrientes como N e P, as bactérias promotoras do crescimento vegetal podem elevar a produção do fitormônio auxina (Suharjono e Yuliatin, 2022), geralmente na forma de AIA, uma auxina produzida principalmente através da via metabólica do L-triptofano (Nehra et al., 2016). Bactérias dos gêneros *Priestia*, *Brevibacillus* e *Burkholderia* apresentaram alta produção de AIA (Figura 12). *Priestia megaterium* é conhecida por possuir vias metabólicas que permitem a produção de AIA a partir de precursores como o triptofano (Shi et al., 2023). Nesse processo, o triptofano é absorvido pelas bactérias, e os precursores do AIA são convertidos em AIA ativo através da enzima indole-3-acetamida hidrolase (Liu et al., 2019), como observado em *Priestia megaterium* (Homthong et al., 2022) e *Priestia aryabhatai* (Park et al., 2017).

Espécies do gênero *Brevibacillus*, como *Brevibacillus agri*, destacam-se pela alta produção de AIA ($126 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Inthasan et al., 2020). Trabalhos realizados por Nehra et al. (2016) com *Brevibacillus brevis* observaram uma produção de $18,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA em meio suplementado com $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de L-triptofano, diferindo de nossa pesquisa, na qual verificamos uma produção de $28,2$ e $44,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA em meio suplementado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de L-triptofano. Ficou evidente que bactérias do gênero *Brevibacillus* (CaMP4 e CaMP6) apresentaram alta síntese de AIA (Figura 12).

Bactérias do gênero *Burkholderia*, também, demonstraram alta produção de AIA em meio com triptofano, mostrando que essas cepas podem metabolizar esse precursor por meio de suas vias metabólicas. Foi demonstrado que *Burkholderia gladioli* 1Ma4 pode produzir até $114,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Barrera-Galicia et al., 2021), enquanto *Burkholderia contaminans* produz aproximadamente $110 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Heo et al., 2022), promovendo o crescimento vegetal através da produção de AIA e da solubilização de fosfato inorgânico. Esse resultado indica que esses microrganismos podem utilizar uma das cinco vias biossintéticas para produzir AIA a partir de L-triptofano: indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrila (IAN), indol-3-piruvato (IPyA), triptamina (TAM) e oxidase de cadeia lateral do triptofano (TSO) (Patten et al., 2013; Di et al., 2016; McClerklin et al., 2018).

A análise da tolerância ao glifosato em meios sólidos e líquidos levou ao isolamento de 16 bactérias. No entanto, após análises *in vitro* adicionais, três bactérias foram selecionadas por suas múltiplas características promotoras do crescimento vegetal (solubilização de fosfato, fixação de N_2 e produção de AIA) e simultaneamente por sua compatibilidade de crescimento. Segundo Di Benedetto et al. (2017), isso sugere que essas cepas podem coexistir harmoniosamente sem interferir no crescimento umas das outras. Além disso, Urgiles-Gómez et al. (2021), destacaram que o uso de cepas de diferentes gêneros oferece vantagens em relação ao uso de cepas do mesmo gênero, pois essa abordagem aumenta a diversidade funcional e a resiliência. Diferentes gêneros podem contribuir com atividades metabólicas complementares e mecanismos de resistência ao estresse, levando a bioprocessos mais robustos e eficientes.

O consórcio bacteriano selecionado (*Priestia* sp. CaMP5, *Achromobacter* sp. CaRCA16 e *Pseudomonas* sp. CaMP33) demonstrou a capacidade de metabolizar glifosato como fonte de energia, como indicado pela redução nos níveis do herbicida em grãos de café inoculados com o consórcio em todos os tratamentos (Tabela 10).

Também é importante destacar que os grãos de café coletados da área amostrada já continham concentrações de glifosato que excediam o Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela Europa (segundo maior comprador de café do Brasil), que é de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$. No entanto, o consórcio bacteriano conseguiu reduzir a concentração de glifosato nesses grãos, aproximando-a do limite aceitável estabelecido pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos. Esse processo ocorre por meio da degradação enzimática da molécula de glifosato, que consiste em um átomo de fósforo ligado a um grupo metil e a um grupo amino. De acordo com Zhao et al. (2015), espécies de *Pseudomonas* podem degradar o glifosato por uma quebra o glifosato em AMPA e glicoxilato, e outra que o converte em sarcosina que é, então, transformada em formaldeído e glicina. Espécies de *Achromobacter* podem complementar esse processo metabolizando sarcosina por meio da enzima sarcosina oxidase, convertendo-a em glicina e formaldeído, que são incorporados nas vias metabólicas bacterianas (Sviridov et al., 2012).

Espécies do gênero *Priestia* também podem contribuir para a degradação do glifosato por meio da enzima glifosato oxidase dependente de FAD, que desempenha um papel crucial na quebra do glifosato em compostos menos nocivos, facilitando sua remoção do ambiente (Elarabi et al., 2020). Alternativamente, a degradação do glifosato pode ocorrer por meio da atividade de C-P liase ou glifosato oxirredutase (Fan et al., 2012). Essa ação sinérgica dentro do consórcio bacteriano permite a utilização do glifosato como fonte de P e C, apoiando a sobrevivência bacteriana em ambientes contaminados e contribuindo para a degradação eficiente do glifosato em grãos de café, sendo, portanto, uma estratégia sustentável para a biorremediação de resíduos agrícolas.

O efeito significativo do consórcio na germinação e no crescimento de plântulas de tomate pode ser atribuído ao potencial fisiológico das cepas selecionadas (*Priestia* sp. CaMP5, *Achromobacter* sp. CaRCA16 e *Pseudomonas* sp. CaMP33). *Priestia* sp. CAMP5 foi a bactéria com maior solubilização de fosfato inorgânico em meio líquido (Tabela 4). De fato, um estudo com cepas de *Priestia* sp. LWS1 demonstrou uma solubilização de fosfato de $87,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Lin et al., 2022). Este microrganismo é conhecido por sua notável diversidade genética e metabólica, contribuindo para o ciclo de nutrientes, tolerância ao estresse (por exemplo, salinidade e metais pesados) e outras funções ecológicas em ecossistemas do solo (Shi et al., 2023). Além disso, espécies de *Priestia megaterium* podem promover o crescimento

vegetal por meio da fixação de N, utilizando um sistema enzimático que regula a absorção e transformação de N, disponibilizando, assim, N para o crescimento das plantas (Kraiser et al., 2011). *Priestia megaterium* e *Priestia aryabhatai* também são capazes de produzir AIA a partir de precursores como o triptofano (Shi et al., 2023), que é convertido em AIA ativo por meio da enzima indol-3-acetamida hidrolase (Nehra et al., 2016; Liu et al., 2019; Homthong et al., 2022).

Ma et al. (2024) descreveram que a aplicação de consórcios bacterianos de duas ou três cepas melhora significativamente os parâmetros de crescimento das plantas em comparação com cepas isoladas. Esse efeito pode ocorrer porque sementes germinadas exsudam nutrientes e compostos orgânicos, como ácidos orgânicos e triptofano, que facilitam a simbiose bacteriana e, em última análise, promovem o crescimento das plantas. Além disso, em um ambiente com raízes ativas podem desenvolver microambientes favoráveis à fixação de N (Cassán et al., 2009; Silva et al., 2012; Shi et al., 2023). O efeito promotor de crescimento da *Achromobacter* sp. CaRCA16 em plântulas de tomate foi semelhante ao do consórcio bacteriano, sem diferenças significativas observadas entre os tratamentos em todos os parâmetros analisados (Figura 18). Isso sugere que o efeito positivo do consórcio nas plântulas de tomate pode ter sido impulsionado principalmente pelo *Achromobacter* sp. CaRCA16, destacando o papel dessa cepa no aumento da resiliência das plantas, potencialmente por meio de genes de adaptação e comunicação bactéria-planta (Vázquez et al., 2024). No entanto, o papel do consórcio não deve ser subestimado. Os resultados indicam que as cepas do consórcio podem coexistir e não terem efeitos prejudiciais ao crescimento das plantas, reforçando seu potencial para uso na promoção do desenvolvimento vegetal, ao mesmo tempo em que degradam o glifosato, que é um objetivo principal deste estudo.

6.1. Efeito do uso do consórcio bacteriano em feijoeiro

O consórcio bacteriano proporcionou uma influência positiva no crescimento do feijoeiro e na produção de grãos. Quanto aos parâmetros de crescimento, o aumento observado na altura e MSPA das plantas inoculadas com cepas de *Achromobacter* está relacionado ao aumento do acúmulo dos nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, Fe e Zn das plantas de feijão inoculadas, os quais favoreceram o crescimento e desenvolvimento vegetal. Segundo Bertrand et al. (2000), plantas inoculadas com

Achromobacter tem um aumento nos parâmetros de crescimento, através do aumento da disponibilidade de nutrientes essenciais para o crescimento da planta.

Segundo Jha e Kumar (2009), o gênero *Achromobacter* pode possuir nível apreciável de atividade de nitrogenase, além de atuar na produção de AIA e capacidade de solubilização de P, o que intensifica sua atividade promotora de crescimento vegetal, ao passo que aumenta a aquisição de nutrientes. Esta característica é vantajosa especialmente em solos pobres em N, pois oferece uma fonte adicional desse nutriente, a síntese de proteínas e a produção de clorofila (Kraiser et al., 2011). Além disso, ao solubilizar P e K através de ácidos orgânicos e enzimas ou produzir sideróforos – compostos que quelam o K, Fe e Zn no solo e facilitam sua absorção pelas plantas, *Achromobacter* contribui diretamente para o desenvolvimento da parte aérea (Devi et al., 2022).

A aplicação do consórcio (CaMP5/CaRCA16/CaMP33) proporcionou incremento na MSPA. Este fato pode estar relacionado às interações microbianas no consórcio terem intensificado a disponibilização de nutrientes, culminando em uma melhor distribuição para a biomassa na parte aérea (Devi et al., 2022). Mukherjee et al. (2018) descreveram que, enquanto individualmente, as cepas bacterianas podem ter um efeito variável no crescimento vegetal, quando em consórcio podem maximizar a eficiência de inúmeros parâmetros como o aparato fotossintética e otimizar o metabolismo da planta, promovendo o acúmulo de biomassa, e indicando um efeito sinérgico entre as cepas no consórcio, e do consórcio com a planta.

Além de uma maior biomassa vegetal, Redondo-Gómez et al. (2022), também, registraram que o efeito sinérgico do consórcio de rizobactérias proporcionaram melhorias no crescimento e floração de morango. Estes autores ressaltam que, muito além de melhora da taxa fotossintética das plantas, os consórcios que tinham capacidade de solubilização de fosfato, fixação de N₂, produção de sideróforos para absorção de Fe e síntese de AIA, tiveram melhores respostas.

Kumar et al. (2016), observaram um incremento no comprimento da muda, MSPA e MSR de feijoeiro tratados com inoculação individual ou em consórcio (*Rhizobium leguminosarum* RPN5, *Bacillus* sp. BPR7 e *Pseudomonas* sp.), no entanto os resultados do uso do consórcio foram superiores a inoculação com uma única cepa, assim como nesta pesquisa.

O conteúdo de N aumentou com a aplicação do consórcio. Este aumento pode ser explicado possivelmente pelo fato de as três cepas atuarem de maneira complementar e sinérgicas na fixação e disponibilização de N. Algumas cepas de *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Priestia* podem fixar N₂ em condições de baixa disponibilidade no solo através da enzima nitrogenase, regulando a conversão em formas assimiláveis, e beneficiando a absorção e acúmulo na planta (Silveira et al., 2016; Rodrigues et al., 2018; Hussein et al., 2021; Kuzina et al., 2022; Bizjak et al., 2023).

A utilização do consórcio também incrementou o acúmulo de P, K, Mg, Fe e Mn, que pode estar relacionado ao fato de cada bactéria do consórcio possuir capacidades distintas que, combinadas, criam um ambiente mais rico nutricionalmente. Assim, como relatado por Redondo-Gómez et al. (2022), estudando cinco biofertilizantes em plantas de morango. Estes autores observaram que os biofertilizantes 1 (cepas: *Pseudomonas composti* SDT3, *Aeromonas aquariorum* SDT13 e *Bacillus thuringiensis* SDT14) e 3 (cepas: *Bacillus methylotrophicus* SMT38, *Bacillus aryabhatai* SMT48 e *Bacillus licheniformis* SMT51) tiveram as melhores respostas, dado que tinham consórcios constituídos de cepas com capacidade de solubilização de fosfato, fixação de N₂, produção de sideróforos para absorção de Fe e síntese de AIA, além de melhorias nos aspectos morfológicos, como o aumento de raiz. Isso por sua vez, não apenas melhora a absorção de água e nutrientes, mas também pode aumentar a eficiência na captação de macronutrientes (P, K e Mg) e micronutrientes (Mn, Fe e Zn).

Outra característica é que bactérias como *Priestia*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* podem produzir sideróforos aumentando o acúmulo de Fe, que pode contribuir para uma melhor fotossíntese e metabolismo, o que estimula o crescimento geral e a absorção de outros nutrientes essenciais, como Mn e Zn (Devi et al., 2022). Isso justifica o acúmulo significativo desses micronutrientes nos tratamentos com as cepas individuais e com consórcio em relação ao controle.

Em relação aos dados de produção, o consórcio proporcionou melhorias no número e comprimento da vagem. Para Kumar et al. (2016), a otimização de consórcio de bactérias melhora a absorção de nutrientes, a nodulação e o crescimento do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Estes autores observaram que feijoeiro inoculado com consórcio ou com cepas individualizadas tiveram incremento no número de vagens e no comprimento da vagem, assim como nesta pesquisa. O ganho dos dados de

produção de feijão pode estar associado pelo estímulo do consórcio do crescimento da raiz, através da produção de AIA, o qual beneficiou a aquisição de nutrientes (Sanchés et al., 2014).

6.2. Interação entre consórcio bacteriano e glifosato em soja RR e convencional

A utilização do consórcio proporcionou benefícios para o crescimento de ambas as cultivares de soja. O incremento na altura das plantas de SRR e SC inoculadas com o consórcio pode estar relacionado à promoção do crescimento vegetal através de diferentes mecanismos das bactérias (Muleta et al., 2013; Caldwell et al., 2015), como a capacidade de algumas cepas de *Pseudomonas* e *Achromobacter* em produzirem AIA (Ma et al., 2008; Assumpção et al., 2009). E, ainda, melhorar a disponibilidade de nutrientes essenciais para as plantas, como o N e P, favorecendo, desta forma, o crescimento da parte aérea das plantas (Suharjono e Yuliatin, 2022), tal qual observado no experimento com feijão (Figuras 23 e 24).

O aumento no volume e na massa de raízes pode ser um reflexo da capacidade das bactérias de promoverem um ambiente radicular mais favorável. O consórcio bacteriano pode ter aumentado a solubilização de nutrientes e a atividade enzimática no solo, favorecendo a absorção de água e nutrientes pelas raízes (Ferraro et al. (2023). Bactérias como *Priestia* têm mostrado potencial na degradação de compostos orgânicos e aumento da disponibilidade de nutrientes no solo, como o P, o que pode contribuir para uma maior formação de biomassa (Rocha et al., 2022), como foi registrado nesta pesquisa, em que a cepa CaMP5 obteve a maior solubilização de fosfato inorgânico (Tabela 4).

Em relação ao impacto da aplicação do glifosato, a SRR, obteve os melhores resultados nos parâmetros de crescimento, uma vez que a SRR tem maior tolerância e resistência ao glifosato em comparação à SC devido a modificações genéticas específicas (enzima EPSPS modificada) que tornam a planta capaz de resistir aos efeitos do herbicida. Isso ocorre principalmente por alterações na via do chiquimato, que é o alvo do glifosato. A SC não possui essa enzima modificada e, portanto, sua EPSPS nativa é inibida pelo glifosato, interrompendo ou reduzindo a rota do chiquimato (Menezes et al., 2004, Duke e Powles, 2008).

Neste experimento, a SC teve diminuição na MSPA após aplicação do herbicida, possivelmente, o glifosato pode ter sido absorvido pelas raízes e

translocado via xilema para a parte aérea. Nesse processo, o herbicida poderia se acumular em folhas e tecidos meristemáticos, onde exerce maior influência no metabolismo da planta, estressando-a (Monquero et al., 2004; Shaner, 2009). O impacto na MSPA está relacionado à interferência na rota do chiquimato nesses tecidos, reduzindo a eficiência na produção de aminoácidos essenciais e prejudicando o crescimento da parte aérea (Duke e Powles, 2008; Gravena et al., 2012).

Em contrapartida a aplicação do glifosato não comprometeu a altura e o volume e MSR de ambas as cultivares de soja. Este fato pode estar relacionado ao consórcio bacteriano tolerante ao glifosato que pode ter ajudado a proteger as raízes das plantas ao degradar parte do herbicida no solo, reduzindo sua toxicidade local. Contudo, a degradação do glifosato pode gerar subprodutos (como AMPA, ácido aminometilfosfônico) que, em concentrações subletais podem, ainda, afetar a parte aérea ao serem transportados para esses tecidos (Zhan et al., 2018). Nesta pesquisa, a SC somente com o glifosato e a SC com consórcio glifosato não tiveram diferenças nos parâmetros de crescimento, evidenciando que o consórcio não conseguiu inibir o efeito do glifosato. No entanto, quando aplicado individualmente, o consórcio promoveu o crescimento vegetal.

Todavia, o uso do consórcio nas plantas de SRR com glifosato aumentou o comprimento da raiz, MFR e MSR em relação às plantas tratadas somente com glifosato. Este fato pode estar relacionado ao consórcio bacteriano formado por *Priestia*, *Pseudomonas* e *Achromobacter* provavelmente contribuir para a degradação do glifosato no solo, reduzindo sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, seu impacto nas raízes, como através da degradação do glifosato, ou alterar a dinâmica do herbicida no solo.

Para Andersen e Vermeer (2023), além de degradar o glifosato, o consórcio bacteriano pode estimular a rizogênese – formação de raízes secundárias e maior exploração do solo – o que aumenta o volume, e da biomassa de raízes promovendo o crescimento vegetal. Este aumento nas raízes é um processo fundamental para a adaptação das plantas ao ambiente e para a absorção eficiente de água e nutrientes. No contexto da interação com microrganismos benéficos, como os presentes no consórcio bacteriano (*Priestia*, *Pseudomonas* e *Achromobacter*), esse estímulo pode ser significativamente potencializado.

Neste estudo, ao comparar a SRR e SC em condições de aplicação de glifosato tornaram-se evidentes os impactos diferenciados do herbicida, e como a

aplicação de um consórcio bacteriano pode atenuar esses impactos e promover o crescimento vegetal. A SRR apresentou maior tolerância ao glifosato comparada à SC. O consórcio incrementou no crescimento da SRR individualmente e, também, com a aplicação do glifosato, já na SC, a aplicação do consórcio proporcionou melhorias somente quando aplicado individualmente. Este fato pode estar relacionado à modificação genética da SRR (enzima EPSPS resistente) e à compatibilidade do consórcio com as plantas (Menezes et al., 2004; Duke e Powles, 2008; Rocha et al., 2022). Demonstrando assim, que o consórcio bacteriano pode ser uma solução promissora, para ambas as cultivares de soja, uma vez que foi capaz de promover o crescimento em plantas sob estresse por herbicida (SRR) e promover o crescimento vegetal em plantas sem estresse (SC).

7. CONCLUSÕES

O uso de meio enriquecido com glifosato facilitou a seleção de cepas bacterianas tolerantes e com baixa sensibilidade ao herbicida, incorporando diversidade funcional e resiliência no consórcio selecionado. Este estudo é o primeiro a relatar o isolamento de bactérias capazes de degradar glifosato e promover o crescimento de plantas a partir de solos de plantações de café com mais de 20 anos de aplicação de glifosato no estado do Espírito Santo. A exposição prolongada ao glifosato nas propriedades alvo apresenta uma oportunidade única para a bioprospecção e isolamento, podendo contribuir para o desenvolvimento de um produto que garanta a segurança alimentar para consumidores de café, brasileiros e internacionais.

Estudar o glifosato é crucial em todo o mundo, e os resultados apresentados neste trabalho contribuirão significativamente para a pesquisa aplicada, especialmente no design de microrganismos para uso em culturas de café, bem como em outras culturas submetidas a aplicações excessivas de glifosato, como soja, milho e algodão. A capacidade do consórcio de reduzir significativamente os níveis de glifosato nos grãos indica que essas bactérias não apenas promovem o crescimento das plantas, mas também desempenham um papel vital na biorremediação de contaminantes. Ao utilizar o glifosato como fonte de C e P, o consórcio bacteriano pode degradar o herbicida, facilitando a remoção de resíduos tóxicos do ambiente e melhorando a qualidade dos grãos de café. Estudos futuros se concentrarão na avaliação da inoculação desse consórcio em plantas de café para analisar tanto sua atividade promotora de crescimento quanto sua capacidade de degradação do glifosato, com o objetivo de reduzir a concentração desse herbicida nos grãos de café.

Os resultados desta pesquisa demonstraram que o consórcio bacteriano composto por *Priestia* sp. (CaMP5), *Achromobacter* sp. (CaRCA16) e *Pseudomonas* sp. (CaMP33), além de suas características promotoras do crescimento vegetal (fixação de N₂, produção de AIA e solubilização de fosfato), é promissor para aplicações nas culturas de feijão e soja. No feijão, atuou como biofertilizante, aumentando o acúmulo de nutrientes (N, P, K, Mg, Fe e Mn) e como bioestimulante do crescimento. Em ambas as cultivares de sojas, destacou-se como bioestimulante e protetor contra os efeitos do glifosato, promovendo maior desenvolvimento radicular.

O uso de consórcios bacterianos em integração com herbicidas, como o glifosato, representa uma estratégia inovadora para mitigar seus efeitos adversos e otimizar o potencial produtivo das culturas. Esta abordagem integra biotecnologia, microbiologia agrícola e manejo sustentável, oferecendo uma alternativa eficaz para reduzir a dependência de insumos químicos, promover a sustentabilidade do solo e atender às demandas da agricultura moderna.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelowo, F.E., Olu-Arotiowa, O.A., Amuda, O.S. (2014) Biodegradation of glyphosate by fungi species. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2:104–118.

Aerts, R., Berecha, G., Gijbels, P., Hundera, K., Van Glabeke, S., Vandepitte, K., Muys, B., Roldán-Ruiz, I., Honnay, O. (2013) Genetic variation and risks of introgression in the wild *Coffea arabica* gene pool in south-western Ethiopian montane rainforests. *Evolutionary Applications*, 6:243–252. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00285.x>.

Ahkami, A.H., Allen White, R., Handakumbura, P.P., Jansson, C. (2017) Rhizosphere engineering: enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere*, 3:233–243. DOI doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.012.

Ai, W., Guo, T., Lay, K.D., Ou, K., Cai, K., Ding, Y., Liu, G, Cao, Y. (2022) Isolation of soybean-specific plant growth-promoting rhizobacteria using soybean agglutin and evaluation of their effects to improve soybean growth, yield, and soil nutritional status. *Microbiologica Research*, 261:127076. DOI doi.org/10.1016/j.micres.2022.127076.

Aloo, B.N., Tripathi, V., Makumba, B.A., Mbega, E.R. (2022) Plant growth-promoting rhizobacterial biofertilizers for crop production: The past, present, and future. *Frontiers in Plant Science*, 13:1002448. DOI doi.org/10.3389/fpls.2022.1002448.

Amarante Junior, O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L. (2002) Glyphosate: properties, toxicity, use and legislation. *Química Nova*, 25:589–593. DOI doi.org/10.1590/S0100-40422002000400014.

Amri, M., Rjeibi, M.R., Gatrouni, M., Mateus, D.M.R., Asses, N., Pinho, H.J.O., Abbes, C. (2023) Isolation, identification, and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from tunisian soils. *Microorganisms*, 11:783. DOI doi.org/10.3390/microorganisms11030783.

Andersen, T.G., Vermeer, J.E. (2023) Bacterial gas-lighting of lateral root formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120:e2303919120. DOI doi.org/10.1073/pnas.2303919120.

ANVISA (2024) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pesticides monographs. Brasília, 7p. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4378json-file-1>>. Acesso em: 11 de outubro de 2024.

Arif, M.S., Riaz, M., Shahzad, S.M., Yasmeen, T., Akhtar, M.J., Riaz, M.A., Jassey, V.E.J., Bragazza, I., Buttler, A. (2016) Associative interplay of plant growth promoting rhizobacteria (*Pseudomonas aeruginosa* QS40) with nitrogen fertilizers improves sunflower (*Helianthus annuus* L.) productivity and fertility of aridisol. *Applied Soil Ecology*, 108:238–247. DOI doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.08.016.

Assumpção, L.D.C., Lacava, P.T., Dias, A.C.F., Azevedo, J.L.D., Menten, J.O.M. (2009) Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44:503–510. DOI doi.org/10.1590/S0100-204X2009000500010.

Asyiah, I.N., Mudakir, I., Hoesain, M., Pradana, A.P., Djunaidy, A., Sari, R.F. (2020) Consortium of endophytic bacteria and rhizobacteria effectively suppresses the population of *Pratylenchus coffeae* and promotes the growth of robusta coffee. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21:4702–4708. DOI doi.org/10.13057/biodiv/d211032.

Avanzi, M., Matsumoto, L., Albino, U., Rampazo, L., Barazetti, A., Santos, I., Liuti, G., Mattos, J., Dealis, M., Niekawa, E., Andreatta, M., Andrade, G. (2019) Glyphosate impact on C and N microbial functional groups in soybean rhizosphere. *Agronomy Science and Biotechnology*, 5:1. DOI doi.org/10.33158/ASB.2019v5i1p1.

Babalola, O.O., Akindolire, A.M. (2011) Identification of native rhizobacteria peculiar to selected food crops in Mmabatho municipality of South Africa. *Biological Agriculture & Horticulture*, 27(3-4):294–309. DOI doi.org/10.1080/01448765.2011.647798.

Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L. (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9:1473. DOI doi.org/10.3389/fpls.2018.01473.

Baer, K.N., Marcel, B.J. (2014) Glyphosate. *Encyclopedia of Toxicology*, 2:767–769. DOI doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00148-2.

Balbinot Junior, A.A., Oliveira Procópio, S., Debiassi, H., Franchini, J.C., Panison, F. (2015) Semeadura cruzada em cultivares de soja com tipo de crescimento determinado. *Semina: Ciências Agrárias*, 36:1215–1226. DOI doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3p1215.

Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H., Baldani, V.L.D. (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: A practical guide for microbiologists. *Plant Soil*, 384:413–431. DOI doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6.

Bao, T., Zhao, Y., Yang, X., Ren, W., Wang, S. (2019) Effects of disturbance on soil microbial abundance in biological soil crusts on the Loess Plateau, China. *Journal of Arid Environments*, 163:59–67. DOI doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.01.003.

Bardin-Camparotto, L., Camargo, M.B.P.D., Moraes, J.F.L.D. (2012) Estimated time of grain ripening of different arabica coffee cultivars for the São Paulo State, Brazil. *Ciência Rural*, 42:594–599. DOI doi.org/10.1590/S0103-84782012000400003.

Barrera-Galicia, G.C., Peniche-Pavía, H.A., Peña-Cabriales, J.J., Covarrubias, S.A., Vera-Núñez, J.A., Délano-Frier, J.P. (2021) Metabolic footprints of *Burkholderia* sensu lato rhizosphere bacteria active against maize *Fusarium* pathogens. *Microorganisms*, 9(10):2061. DOI doi.org/10.3390/microorganisms9102061.

Basso, C.J., Santi, A.L., Lamego, F.P., Giroto, E. (2011) Foliar application of manganese in transgenic soybean tolerant to glyphosate. *Ciência Rural*, 41:1726–1731. DOI doi.org/10.1590/S0103-84782011001000008.

Basu, A., Prasad, P., Das, S.N., Kalam, S., Sayyed, R.Z., Reddy, M.S., Enshasy, H.E.I. (2021) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13(3):1–20. DOI doi.org/10.3390/su13031140.

Bazzo, J., Monteiro, J., Marinho, J. (2021) Inoculação e coinoculação de *Azospirillum* e *Bradyrhizobium*, via sementes e em cobertura, na qualidade fisiológica de sementes de soja. *Revista Cultura Agronômica*, 29:426–436. DOI doi.org/10.32929/2446-8355.2020v29n4p426-436.

Belkebla, N., Bessai, S.A., Melo, J., Caeiro, M.F., Cruz, C., Nabti, E.-h. (2022) Restoration of *Triticum aestivum* growth under salt stress by phosphate-solubilizing bacterium isolated from southern Algeria. *Agronomy*, 12(9):2050. DOI doi.org/10.3390/agronomy12092050.

Benslama, O., Boulahrouf, A. (2023) Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(49):5587–5595. DOI doi.org/10.5897/AJMR2013.6080.

Berraquero, F.R., Baya, A.M., Cormenzana, A.R. (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Revista Ars Pharmaceutica*, 17(4):399–406. DOI doi.org/10.30827/ars.

Bertagnolli, C.M., Tillmann, M.Â.A., Villela, F.A. (2006) Hydroponic system in the detection of genetically modified soybean seeds resistant to glyphosate. *Revista Brasileira de Sementes*, 28:182–192. DOI doi.org/10.1590/S0101-31222006000200024.

Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J.C. (2000). Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 46(3):229–236. DOI doi.org/10.1139/w99-137.

Bervaldo, C.M.P., Mendes, C.R., Timm, F.C., de Moraes, D.M., Barros, A.C.S.A., Peske, S.T. (2010) Physiological performance of soybean seeds from conventional

and transgenic cultivars treated with glyphosate. *Revista Brasileira de Sementes*, 32:9–18. DOI doi.org/10.1590/S0101-31222010000200001.

Borges, M.P. da S., Silva, D.V., Souza, M. de F., Silva, T.S., Teófilo, T.M. da S., da Silva, C.C., Pavão, Q.S., Passos, A.B.R. de J., dos Santos, J.B. (2021) Glyphosate effects on tree species natives from Cerrado and Caatinga brazilian biome: assessing sensitivity to two ways of contamination. *Science of The Total Environment*, 769. DOI doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144113.

Boyarshin, K.S., Adamova, V.V., Wentao, Z., Obuhova, O.Y., Kolkova, M.V., Nesterenko, V.A., Bepalova, O.S., Kluyeva, V.V., Degtyareva, K.A., Kurkina, Y.N., Makanina, O.A., Batlutskaya, I.V. (2023) The effect of long-term agricultural use on the bacterial microbiota of chernozems of the forest-steppe zone. *Diversity*, 15(2):191. DOI doi.org/10.3390/d15020191.

Braga Junior, G.M., Chagas Junior, A.F., Chagas, L.F.B., Martins, A.L.L., de Oliveira, R.S. (2021) *Bacillus subtilis* as a growth promoter inoculant on soybean plants in field. *Brazilian Journal of Development*, 7:107220–107237. DOI doi.org/10.34117/bjdv7n11-384.

Brasil (1992) Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNAD/CLAV, 365p.

Busby, P.E., Soman, C., Wagner, M.R., Friesen, M.L., Kremer, J., Bennett, A., Morsy, M., Eisen, J.A., Leach, J.E., Dangl, J. L. (2017) Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS Biology*, 15(3):1–14. DOI doi.org/10.1371/journal.pbio.2001793.

Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y., Ozturk, L. (2009) Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of Agronomy*, 31:114–119. DOI doi.org/10.1016/j.eja.2009.07.001.

Caldwell, A.C., Silva, L.C.F., Da Silva, C.C., Ouverney, C.C. (2015) Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional coffee farms in Brazil.

PLoS One, 10:1–17. DOI doi.org/10.1371/journal.pone.0106355.

Câmara, G.M.S. (2015) Introdução ao agronegócio soja. Piracicaba, SP: USP/ESALQ/LPV. 30p.

Cañal, M.J., Tamés, R.S., Fernández, B. (1987) Glyphosate-increased levels of indole-3-acetic acid in yellow nutsedge leaves correlate with gentisic acid levels. *Physiologia Plantarum*, 71:384–388. DOI doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04360.x.

Carvalho, C.H.S.D., Bartelega, L., Sera, G.H., Matiello, J.B., Almeida, S.R.D., Santinato, F., Hotz, A.L. (2022) Catálogo de cultivares de café arábica. Brasília, DF: Embrapa Café, 115p.

Carvalho, L.B. (2011) Interference of *Digitaria insularis* on *Coffea arabica* and responses of these species to glyphosate. Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal – SP, 119p.

Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V. (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1):28–35. DOI doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005.

Clark, R.B. (1975) Characterization of phosphates in intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23:458–460. DOI doi.org/10.1021/jf60199a002.

Clarke, K.R., Somerfield, P.J., Gorley, R.N. (2016) Clustering in non-parametric multivariate analyses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 483:147–155. DOI doi.org/10.1016/j.jembe.2016.07.010.

CONAB (2024a) Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: café available online. Brasília, DF. 11(3):1–58. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 04 de julho de 2024.

CONAB (2024b) Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos Safra 2023/24. Brasília, DF. 11(12): 1–116. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?>>.

Acesso em: 04 de novembro de 2024.

Contiero, R.L., Fernando, D., Catapan, V. (2018) Tecnologia de Aplicação. *In*: Brandão Filho, J.U.T., Freitas, P.S.L., Berian, L.O.S., Goto, R. (ed.) Hortaliças-fruto [online]. Maringá: EDUEM, p. 401–449.

Cordova-Rodriguez, A., Rentería-Martínez, M.E., López-Miranda, C.A., Guzmán-Ortíz, J.M., Moreno-Salazar, S.F. (2022) Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures. *MethodsX*, 9:101917. DOI doi.org/10.1016/j.mex.2022.101917.

Dall’Agnol, A.A.A (2016) Embrapa soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições. Brasília, DF: Embrapa, 72p.

Das, S., De, T.K. (2018) Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *MethodsX*, 5:909–914. DOI doi.org/10.1016/j.mex.2017.11.010.

Debortoli, M.P., Tormen, N.R., Balardin, R.S., Favera, D.D., Stefanello, M.T., Pinto, F.F., Uebel, J.D. (2012) Spray droplet spectrum and control of asian soybean rust in cultivars with different plant architecture. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47:920–927. DOI doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700007.

Denaya, S., Yulianti, R., Pambudi, A., Effendi, Y. (2021) Novel microbial consortium formulation as plant growth promoting bacteria (PGPB) agent. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 637(1):012030. DOI doi.org/10.1088/1755-1315/637/1/012030.

Devi, R., Kaur, T., Kour, D., Yadav, A., Yadav, A.N., Suman, A., Ahluwalia, A.S., Saxena, A.K. (2022) Minerals solubilizing and mobilizing microbiomes: A sustainable approach for managing minerals’ deficiency in agricultural soil. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3):1245–1272. DOI doi.org/10.1111/jam.15627.

Di Benedetto, N.A., Corbo, M.R., Campaniello, D., Cataldi, M.P., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Flagella, Z. (2017) The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: A focus on wheat. *AIMS Microbiology*, 3(3):413–434. DOI doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413.

Di, D.W., Zhang, C., Luo, P., An, C.W., Guo, G.Q. (2016) The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant Growth Regulation*, 78:275–285. DOI doi.org/10.1007/s10725-015-0103-5.

Döbereiner, J, Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. 1.ed. Brasília: Embrapa, 60p.

Duke, S.O., Lydon, J., Koskinen, W.C., Moorman, T.B., Chaney, R.L., Hammerschmidt, R. (2012) Correction to glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:12745–12745. DOI doi.org/10.1021/jf405497g.

Duke, S.O., Powles, S.B. (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 63:1100–1106. DOI doi.org/10.1002/ps.1518.

Duong, B., Marraccini, P., Maeght, J.L., Vaast, P., Lebrun, M., Duponnois, R. (2020) Coffee microbiota and its potential use in sustainable crop management. A Review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. DOI doi.org/10.3389/fsufs.2020.607935.

Duong, B., Nguyen, H.X., Phan, H.V., Colella, S., Trinh, P.Q., Hoang, G.T., Nguyen, T.T., Marraccini, P., Lebrun, M., Duponnois, R. (2021) Identification and characterization of vietnamese coffee bacterial endophytes displaying in vitro antifungal and nematicidal activities. *Microbiological Research*, 242:126613. DOI doi.org/10.1016/j.micres.2020.126613.

EFSA (2019) European Food Safety Authority. Review of the existing maximum residue levels for glyphosate according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005–revised version to take into account omitted data. *EFSA Journal*, 17(10):1–211. DOI doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5862.

Eker, S., Ozturk, L., Yazici, A., Erenoglu, B., Romheld, V., Cakmak, I. (2006) Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:10019–10025. DOI doi.org/10.1021/jf0625196.

Elarabi, N.I., Abdelhadi, A.A., Ahmed, R.H., Saleh, I., Arif, I. A., Osman, G., Ahmed, D.S. (2020) *Bacillus aryabhatai* FACU: A promising bacterial strain capable of manipulate the glyphosate herbicide residues. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9):2207–2214. DOI doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.050.

Etesami, H., Emami, S., Alikhani, H.A. (2017) Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects. A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4):897–911. DOI doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005.

Fan, J., Yang, G., Zhao, H., Shi, G., Geng, Y., Hou, T., Tao, K. (2012) Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(4):263–271. DOI doi.org/10.2323/jgam.58.263.

FAO (2024) Food and Agriculture Organization. Bean: Crop description and climate. Disponível em: <<https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/bean/en/>>. Acesso em: 07 de outubro de 2024.

Farah, A., dos Santos, T.F. (2015) The coffee plant and beans: an introduction. *In: Preedy, V.R. (ed.) Coffee in health and disease prevention*. London, UK: Academic Press. p. 5–10.

Farias, L.R., Panero, J.S., Riss, J.S.P., Correa, A.P.F., Vital, M.J.S., Panero, F.S. (2023) Rapid and green classification method of bacteria using machine learning and NIR spectroscopy. *Sensors*, 23(17):7336. DOI doi.org/10.3390/s23177336.

Ferrão, R.G., Dos Santos, W.G., Ferrão, M.A.G., Spadeto, J., Riva-Souza, E.M., Da Fonseca, A.F.A. (2021) Indicação de cultivares de café arábica para o estado do

Espírito Santo e avaliação comparativa com o conilon em altitude elevada. Brasília, DF: Embrapa, 45p.

Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Ferrão, M.A.G., Filho, A.C.V., Volpi, P.S., Muner, L.H., Lani, J.A., Prezotti, L.C., Ventura, J.A., Martins, D.S., Mauri, A.L., Marques, E.M.G., Zucateli, F. (2012) Café conilon: técnicas de produção com variedades melhoradas. 4.ed. Vitória, ES: Incaper, 74p.

Ferraro, A.C., França, A.C., Machado, C.M.M., Aguiar, F.R., Oliveira, L.L., Braga, A.M., Oliveira, R.G. (2023) Commercial characteristics of coffee seedlings produced with different sources of phosphorus and plant growth-promoting bacteria. *Brazilian Journal of Biology*, 83:e270262. DOI doi.org/10.1590/1519-6984.270262.

Ferreira, E.A., Santos, J.B., Silva, A.A., Oliveira, J.A., Vargas, L. (2006) Glyphosate translocation in italian ryegrass biotypes (*Lolium multiflorum*). *Planta Daninha*, 24:365–370. DOI doi.org/10.1590/S0100-83582006000200021.

Ferreira, L.D.V.M., Carvalho, F.D., Andrade, J.F.C., Moreira, F.M.D.S. (2018) Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland. *Scientia Agricola*, 75:461–469. DOI doi.org/10.1590/1678-992X-2017-0049.

Filipini, L.D., Pilatti, F.K., Meyer, E., Ventura, B.S., Lourenzi, C.R., Lovato, P.E. (2021) Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. *Archives of Microbiology*, 203:1033–1038. DOI doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7.

Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2):375–400. DOI doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84756-1.

Florencio, C., Bortoletto-Santos, R., Favaro, C.P., Brondi, M.G., Velloso, C.C., Klaic, R., Ribeiro, C., Farinas, C.S., Mattoso, L.H. (2022) Advances in the production and formulation of microbial inoculants for a more sustainable agriculture. *Química Nova*, 45(9):1133–1145. DOI doi.org/10.21577/0100-4042.20170909.

Freitas, F.O. (2006) Genetic-archaeological evidences about the origin of common bean in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:1199–1203. DOI doi.org/10.1590/S0100-204X2006000700018.

Funke, T., Healy-Fried, M.L., Han, H., Alberg, D.G., Bartlett, P.A., Schönbrunn, E. (2007) Differential inhibition of class I and class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases by tetrahedral reaction intermediate analogues. *Biochemistry*, 46:13344–13351. DOI doi.org/10.1021/bi701095u.

Gabre, V.V., Venancio, W.S., Moraes, B.A., Furmam, F.D.G., Galvão, C.W., Gonçalves, D. R.P., Etto, R.M. (2020) Multiple effect of different plant growth promoting microorganisms on beans (*Phaseolus vulgaris* L.) crop. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63:e20190493. DOI doi.org/10.1590/1678-4324-solo-2020190493.

Gaines, T.A., Duke, S.O., Morran, S., Rigon, C.A.G., Tranel, P.J., Anita Küpper, Dayan, F.E. (2020) Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295:10307–10330. DOI doi.org/10.1074/jbc.REV120.013572.

Galli, A.J.B., Montezuma, M.C. (2005) Glifosato: Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Santo André: ACADCOM Gráfica e Editora. 66p.

Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., Bonfante, P. (2020) Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18:649–660. DOI doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3.

Gomes, M.P., da Silva Cruz, F.V., Bicalho, E.M., Borges, F.V., Fonseca, M.B., Juneau, P., Garcia, Q.S. (2017) Effects of glyphosate acid and the glyphosate-commercial formulation (Roundup) on *Dimorphandra wilsonii* seed germination: interference of seed respiratory metabolism. *Environmental Pollution*, 220:452–459. DOI doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.087.

Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., Juneau, P. (2014) Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65:4691–4703. DOI doi.org/10.1093/jxb/eru269.

Gonçalves Netto, A., Cordeiro, E.M.G., Nicolai, M., de Carvalho, S.J.P., Ovejero, R.F.L., Brunharo, C.A.C.G., Zucchi, M.I., Christoffoleti, P.J. (2021) Population genomics of *Digitaria insularis* from soybean areas in Brazil. *Pest Management Science*, 77(12):5375–5381. DOI doi.org/10.1002/ps.6577.

Gouda, S., Das, G., Sen, S.K., Shin, H.S., Patra, J.K. (2016) Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7:1–8. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538.

Gravena, R., Filho, R.V., Alves, P.L.C.A., Mazzafera, P., Gravena, A.R. (2012) Glyphosate has low toxicity to citrus plants growing in the field. *Canadian Journal of Plant Science*, 92:119–127. DOI doi.org/10.4141/cjps2011-055.

Hammerschmidt, R. (2018) How glyphosate affects plant disease development: it is more than enhanced susceptibility. *Pest Management Science*, 74:1054–1063. DOI doi.org/10.1002/ps.4521.

Hartmann, A., Singh, M., Klingmüller, W. (1983) Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(8):916–923. DOI doi.org/10.1139/m83-147.

Helander, M., Saloniemi, I., Omacini, M., Druille, M., Salminen, J.P., Saikkonen, K. (2018) Decreases mycorrhizal colonization and affects plant-soil feedback. *Science of The Total Environment*, 642:285–291. DOI doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.377.

Heo, A.Y., Koo, Y.M., Choi, H.W. (2022) Biological control activity of plant growth promoting rhizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 against tomato *Fusarium* wilt and bacterial speck diseases. *Biology*, 11(4):619. DOI doi.org/10.3390/biology11040619.

Hermans, S.M., Buckley, H.L., Case, B.S., Curran-cournane, F., Taylor, M. (2017) Bacteria as emerging indicators of soil condition. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1):1–13. DOI doi.org/10.1128/AEM.02826-16.

Hertel, R., Schöne, K., Mittelstädt, C., Meißner, J., Zschoche, N., Collignon, M., Kohler,

C., Friedrich, I., Schneider, D., Hoppert, M., Kuhn, R., Schwedt, I., Scholz, P., Poehlein, A., Martiensen, M., Ischebeck, T., Daniel, R., Commichau, F.M. (2022) Characterization of glyphosate-resistant *Burkholderia anthina* and *Burkholderia cenocepacia* isolates from a commercial Roundup® solution. *Environmental Microbiology Reports*, 14(1):70–84. DOI doi.org/10.1111/1758-2229.13022.

Hindersah, R., Condrosari, P., Komarya, A., Suryatmana, P., Mulyani, O., Haryadi, H.R. (2021) Role of soil bacterial consortia on glyphosate degradation and growth of maize seedlings. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 8:2569–2575. DOI doi.org/10.15243/jdmlm.2021.082.2569.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950) *The water culture method for growing plants without soils*. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.

Holden, S.R., Treseder, K.K. (2013) A meta-analysis of soil microbial biomass responses to forest disturbances. *Frontiers in Microbiology*, 4:1–17. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2013.00163.

Homthong, M., Kaewpuk, W., Yamsuan, S., Thongsima, A., Mekkapan, K., Pikulthong, V. (2022) Screening of indole-3-acetic acid PGPB from three agricultural systems at Nakhon Pathom, Thailand. *Biodiversitas*, 23(11):5935–5941. DOI doi.org/10.13057/biodiv/d231147.

Husseiny, S., Dishisha, T., Soliman, H.A., Adeleke, R., Raslan, M. (2021) Characterization of growth promoting bacterial endophytes isolated from *Artemisia annua* L. *South African Journal of Botany*, 143:238–247. DOI doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.042.

ICO (2024a) International Coffee Organization. Coffee market report 2024. Disponível em: <https://www.icocoffee.org/documents/cy2024-25/cmr-1024-e.pdf>. Acesso em: 11 de outubro de 2024.

ICO (2024b) International Coffee Organization. Aspectos botânicos. Disponível em: https://www.ico.org/pt/botanical_p.asp. Acesso em: 24 de junho de 2024.

Inthasan, J., Dechjirarattanasiri, C., Boonmee, P. (2020) Effect of bacteria-producing indole-3-acetic acid (IAA) on growth and nutrient contents of bird chili (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agriculture*, 33:333–344.

Iqbal, B., Li, G., Alabbosh, K.F., Hussain, H., Khan, I., Tariq, M., Javed, Q., Naeem, M., Ahmad, N. (2023) Advancing environmental sustainability through microbial reprogramming in growth improvement, stress alleviation, and phytoremediation. *Plant Stress*, 10:100283. DOI doi.org/10.1016/j.stress.2023.100283.

Jha, P., Kumar, A. (2009) Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbial Ecology*, 58:179–188. DOI doi.org/10.1007/s00248-009-9485-0.

Johal, G.S., Huber, D.M. (2009) Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy*, 31:144–152. DOI doi.org/10.1016/j.eja.2009.04.004.

Joly, C.A., Metzger, J.P., Tabarelli, M. (2014) Experiences from the brazilian atlantic forest: ecological findings and conservation initiatives. *New Phytologist*, 204(3):459–473. DOI doi.org/10.1111/nph.12989.

Kanissery, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O., Alferez, F. (2019) Glyphosate: its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. *Plants*, 8:1–11. DOI doi.org/10.3390/plants8110499.

Kraiser, T., Gras, D.E., Gutiérrez, A.G., González, B., Gutiérrez, R.A. (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(4):1455–1466. DOI doi.org/10.1093/jxb/erq425.

Kremer, R.J., Means, N.E., Kim, S. (2005) Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85:1165–1174. DOI doi.org/10.1080/03067310500273146.

Kumar, P., Pandey, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2016) Bacteria consortium optimization improves nutrient uptake, nodulation, disease suppression and growth of

the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in both pot and field studies. *Rhizosphere*, 2:13–23. DOI doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.09.002.

Kumar, R., Kumawat, N., Sahu, Y.K. (2017) Role of biofertilizers in agriculture. *Popular Kheti*, 5(4):63–66.

Kuss, A.V., Kuss, V.V., Lovato, T., Flôres, L. (2007) Nitrogen fixation and in vitro production of indolacetic acid by endophytic diazotrophic bacteria. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(10):1459–1465. DOI doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013.

Kuzina, E. Mukhamatdyarova, S., Sharipova, Y., Makhmutov, A., Belan, L., Korshunova, T. (2022) Influence of bacteria of the genus *Pseudomonas* on leguminous plants and their joint application for bioremediation of oil contaminated soils. *Plants (Basel)*, 11(23):3396. DOI doi.org/10.3390/plants11233396.

Lin, X. -R., Chen, H. -B., Li, Y. -X., Zhou, Z. -H., Li, J. -B., Wang, Y. -Q., Zhang, H., Zhang, Y., Han, Y. -H., Wang, S. -S. (2022) *Priestia* sp. LWS1 Is a selenium-resistant plant growth-promoting bacterium that can enhance plant growth and selenium accumulation in *Oryza sativa* L. *Agronomy*, 12(6):1301. DOI doi.org/10.3390/agronomy12061301.

Liu, W.H., Chen, F.F., Wang, C.E., Fu, H.H., Fang, X.Q., Ye, J.R., Shi, J.Y. (2019) Indole-3-acetic acid in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007: Enzymatic identification of the indole-3-acetamide synthesis pathway. *Frontiers in Microbiology*, 10:1–12. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2019.02559.

Liu-Xu, L., González-Hernández, A.I., Camañes, G., Vicedo, B., Scalschi, L., Llorens, E. (2024) Harnessing green helpers: nitrogen-fixing bacteria and other beneficial microorganisms in plant–microbe interactions for sustainable agriculture. *Horticulturae*, 10:621. DOI doi.org/10.3390/horticulturae10060621.

Ma, X., Huang, C., Zhang, J., Pan, J., Guo, Q., Yang, H., Xue, X. (2024) Comparative analysis of plant growth-promoting rhizobacteria's effects on alfalfa growth at the seedling and flowering stages under salt stress. *Microorganisms*, 12(3):616. DOI

doi.org/10.3390/microorganisms12030616.

Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H. (2009) Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Management*, 90(2):831–837. DOI doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.01.014.

Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 319p.

Malfatti, A. L.R., Mallmann, G.C., Oliveira Filho, L.C.I., Carniel, L.S.C., Cruz, S.P., Klauber-Filho, O. (2021) Ecotoxicological test to assess effects of herbicides on spore germination of *Rhizophagus clarus* and *Gigaspora albida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207. DOI doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111599.

Martinez, D.A., Loening, U.E., Graham, M.C. (2018) Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: A Review. *Environmental Sciences Europe*, 30:1–14. DOI doi.org/10.1186/s12302-018-0131-7.

Martins, L.D., Ferreira, D.S., Rodrigues, W.N., Colodetti, T.V., Brinate, S.B., Côgo, A.D., Barros, V.M.S., Partelli, F.L., Amaral, J.F.T., Tomaz, M.A. (2019) Exploring the nutritional efficiency of genotypes of *Coffea arabica* L. from different parental lineages in contrasting environments for N availability. *African Journal of Biotechnology*, 18(20):435–443. DOI doi.org/10.5897/AJB2019.16796.

Martis, B.S., Mohan, A.K., Chiplunkar, S., Kamath, S., Goveas, L.C., Rao, C.V. (2021) Bacterium isolated from coffee waste pulp biosorbs lead: investigation of EPS mediated mechanism. *Current Research in Microbial Sciences*, 2:100029. DOI doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100029.

Massot, F., Gkorezis, P., Van Hamme, J., Marino, D., Trifunovic, B.S., Vukovic, G., d'Haen, J., Pintelon, I., Giulietti, A.M., Merini, L., Vangronsveld, J., Thijs, S. (2021) Isolation, biochemical and genomic characterization of glyphosate tolerant bacteria to perform microbe-assisted phytoremediation. *Frontiers in Microbiology*, 11:598507.

DOI doi.org/10.3389/fmicb.2020.598507.

McClerklin, S.A., Lee, S.G., Harper, C.P., Nwumeh, R., Jez, J.M., Kunkel, B.N. (2018) Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS Pathogens*, 14(1):e1006811. DOI doi.org/10.1371/journal.ppat.1006811.

Meert, L., Fernandes, F.B., Müller, M.M.L., Rizzardi, D.A., Espindola, J.S. (2020) Coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean crop. *Ciência Rural*, 29:118–129. DOI doi.org/10.32929/2446-8355.2020v29n1p118-129.

Menezes, S.M.D., Tillmann, M.Â.A., Dode, L.B., Villela, F.A. (2004) Detection of soybean genetically modified tolerant to glyphosate methods based on the activity of enzymes. *Revista Brasileira de Sementes*, 26(2):150–155. DOI doi.org/10.1590/S0101-31222004000200021.

Mesquita, F.R., Corrêa, A.D., Abreu, C.M.P.D., Lima, R.A.Z., Abreu, A.D.F.B. (2007) Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines: chemical composition and protein digestibility. *Ciência e Agrotecnologia*, 31:1114–1121. DOI doi.org/10.1590/S1413-70542007000400026.

Mohy-Ud-Din, W., Akhtar, M.J., Bashir, S., Asghar, H.N., Nawaz, M.F., Chen, F. (2023) Isolation of glyphosate-resistant bacterial strains to improve the growth of maize and degrade glyphosate under axenic condition. *Agriculture*, 13(4):886. DOI doi.org/10.3390/agriculture13040886.

Moneke, A.N., Okpala, G.N., Anyanwu, C.U. (2010) Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *African Journal of Biotechnology*, 9(26):4067–4074.

Monquero, P.A., Christoffoleti, P.J., Osuna, M.D., De Prado, R.A. (2004) Absorption, translocation and metabolism of glyphosate by plants tolerant and susceptible to this herbicide. *Planta Daninha*, 22:445–451. DOI doi.org/10.1590/S0100-83582004000300015.

Msimbira, L.A., Smith, D. L. (2020) The roles of plant growth promoting microbes in enhancing plant tolerance to acidity and alkalinity stresses. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4:1–14. DOI doi.org/10.3389/fsufs.2020.00106.

Mukherjee, G., Saha, C., Naskar, N., Mukherjee, A., Mukherjee, A., Lahiri, S., Mukherjee, G., Saha, C. (2018) An endophytic bacterial consortium modulates multiple strategies to improve arsenic phytoremediation efficacy in *Solanum nigrum*. *Scientific Reports*, 8:6979. DOI doi.org/10.1038/s41598-018-25306-x.

Muleta, D. (2007) Microbial inputs in coffee (*Coffea arabica* L.) production systems, southwestern Ethiopia: Implications for Promotion of Biofertilizers and Biocontrol Agents. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences/Uppsala, 67p.

Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E., Granhall, U. (2013) Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12:73–84. DOI doi.org/10.1016/j.jssas.2012.07.002.

Nagata, R.T., Dusky, J.A., Ferl, R.J., Torres, A.C., Cantliffe, D.J. (2000) Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125:669–672. DOI doi.org/10.21273/JASHS.125.6.669.

Nautiyal, C.S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170:265–270. DOI doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.

Nehra, V., Saharan, B.S., Choudhary, M. (2016) Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *Springerplus*, 5(1):948. DOI doi.org/10.1186/s40064-016-2584-8.

Nivanthi, W., Yapa, P.N. (2018) Assessment of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on potential biodegradation of glyphosate in contaminated soil and aquifers. *Groundwater for Sustainable Development*, 7:465–469. DOI doi.org/10.1016/j.gsd.2018.02.001.

Noguera, O.M.N., Salgueiro, J.L.G., Francisco, E.A., Ottoni, J.R., Passarini, M.R.Z. (2021) Tolerance of eukaryotic microorganisms to glyphosate herbicide. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 42:103. DOI doi.org/10.5433/1679-0367.2021v42n1p103.

Nuyttens, D., Schampheleire, M., Baetens, K., Brusselman, E., Dekeyser, D., Verboven, P. (2011) Drift from field crop sprayers using an integrated approach: results of a five-year study. *Transactions of the ASABE*, 54:403–408. DOI doi.org/10.13031/2013.36442.

Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O. (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11):1–16. DOI doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9.

Oliveira, M.A., Mandarino, J.M.G., Leite, R.S. (2018) Características físico-químicas das sementes de soja: teor de proteína, teor de óleo, acidez do óleo e teor de clorofila. *In: Lorini, I. Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil – safra 2016/2017*. Londrina: Embrapa Soja, p.97–111.

Owen, D., Williams, A.P., Griffith, G.W., Withers, P.J.A. (2015) Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86:41–54. DOI doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012.

Pádua, S.D., Florentino, L.A. (2022) Use of phonolite and potassium-solubilizing bacteria in bean crops. *Research, Society and Development*, 11(2):e53711226248. DOI doi.org/10.33448/rsd-v11i2.26248.

Pande, A., Kaushik, S., Pandey, P., Negi, A. (2020) Isolation, characterization, and identification of phosphate-solubilizing *Burkholderia cepacia* from the sweet corn cv. Golden Bantam rhizosphere soil and effect on growth-promoting activities. *International Journal of Vegetable Science*, 26(6):591–607. DOI doi.org/10.1080/19315260.2019.1692121.

Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., Kaushik, S. (2017) Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the

growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2):379–391. DOI doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005.

Paraginski, J.A., Moraes, M.P., Souza, R.R.D., Mello, A.D.C., Toebe, M. (2024) Correlation between productive components and grain yield of soybean cultivars sown in the northwest region of Rio Grande do Sul. *Revista Ceres*, 71:e71017. DOI doi.org/10.1590/0034-737X2024710017.

Park, Y.G., Mun, B.G., Kang, S.M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C.W., Kim, A.Y., Lee, S.U., Oh, K.Y., Lee, D.Y., Lee, I.J., Yun, B.W. (2017) *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PloS One*, 12(3):e0173203. DOI doi.org/10.1371/journal.pone.0173203.

Pascale, A., Proietti, S., Pantelides, I.S., Stringlis, I.A. (2020) Modulation of the root microbiome by plant molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, 10:1–23. DOI doi.org/10.3389/fpls.2019.01741.

Patten, C.L., Blakney, A.J.C., Coulson, T.J.D. (2013) Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4)395–415. DOI doi.org/10.3109/1040841X.2012.716819.

Paula, G.F.D., Demétrio, G.B., Matsumoto, L.S. (2021) Biotechnological potential of soybean plant growth-promoting rhizobacteria. *Revista Caatinga*, 34:328–338. DOI doi.org/10.1590/1983-21252021v34n209rc.

Pavinato, P.S., Rocha, G.C., Cherubin, M.S., Harris, I., Jones, D.J., Withers, P.J.A. (2021) Map of total phosphorus content in native soils of Brazil. *Scientia Agricola*, 78(6):e20200077. DOI doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0077.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2014) Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34:17–42. DOI doi.org/10.1080/07352689.2014.897899.

Peng, R.H., Tian, Y.S., Xiong, A.S., Zhao, W., Fu, X.Y., Han, H.J., Chen, C., Jin, X.F., Yao, Q.H. (2012) A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Rahnella aquatilis* with significantly reduced glyphosate sensitivity. PLoS One, 7:1–10. DOI doi.org/10.1371/journal.pone.0039579.

Pimentel, M.S., Freire, S., Santos, S., Costa, J.R., Lúcia, V. (2008) Desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeeiro inoculadas com bactérias promotoras de crescimento. Revista Brasileira de Agrociência, 14:221–230. DOI doi.org/10.18539/cast.v14i2.1905.

Pinho, L.G.R., Henrique, X.M.B., Luciene, L.B., Loren, C., Mercier, B.M. (2021) Reversal of glyphosate phytotoxicity with amino acid application in Conilon Coffee seedlings (*Coffea canephora* P.) clone LB.1 Demuner. Revista Ifes Ciência, 7:01–11. DOI doi.org/10.36524/ric.v7i1.1017.

Pípolo, A.E., Hungria, M., Franchini, J.C., Balbinot, A.A., Debiasi, H., Mandarino, J. M. G. (2015) Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria. Londrina: Embrapa Soja, 14p.

Porch, T.G., Cichy, K., Wang, W. (2017) Nutritional composition and cooking characteristics of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* Gray) in comparison with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Genetic Resources and Crop Evolution, 64:935–953. DOI doi.org/10.1007/s10722-016-0413-0.

Posse, S.C.P., Riva-Souza, E.M., Silva, G.M., Fasolo, L.M., Silva, M.B., Rocha, M.A.M., Rocha, M.A.M. (2010) Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2009-2011. Vitória, ES: Incaper, 245p.

Pratiwi, E.R., Ardyati, T., Suharjono, S. (2020) Plant growth promoting endophytic bacteria of *Coffea canephora* and *Coffea arabica* L. in UB forest. Journal of Experimental Life Science, 10:119–126. DOI doi.org/10.21776/ub.jels.2020.010.02.07.

Prodhan, M.Y., Rahman, M.B., Rahman, A., Akbor, M.A., Ghosh, S., Nahar, M.N.-E.-N., Simo, Shamsuzzoha, M., Cho, K.M., Haque, M.A. (2023) Characterization of

growth-promoting activities of consortia of chlorpyrifos mineralizing endophytic bacteria naturally harboring in rice plants — a potential bio-stimulant to develop a safe and sustainable agriculture. *Microorganisms*, 11:1821. DOI doi.org/10.3390/microorganisms11071821.

Rafikova, G.F., Kuzina, E.V., Korshunova, T.Y., Loginov, O.N. (2020) New bacterial strains of *Pseudomonas laurentiana*: promising agents for agrobiotechnology. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 75(4):206–211. DOI doi.org/10.3103/S0096392520040082.

Redondo-Gómez, S., García-López, J.V., Mesa-Marín, J., Pajuelo, E., Rodriguez-Llorente, I.D., Mateos-Naranjo, E. (2022) Synergistic effect of plant-growth-promoting rhizobacteria improves strawberry growth and flowering with soil salinization and increased atmospheric CO₂ levels and temperature conditions. *Agronomy*, 12:2082. DOI doi.org/10.3390/agronomy12092082.

Reis, L.A.C., Carvalho, F.P., França, A.C., Francino, D.M.T., Pinto, N.A.V.D., Freitas, A.F. (2018) Leaf morphoanatomy and biochemical variation on coffee cultivars under drift simulation of glyphosate. *Planta Daninha*, 36:e018143560. DOI doi.org/10.1590/S0100-83582018360100149.

Rezende, P.M.D., Gris, C.F., Gomes, L.L., Tourino, M.C.C., Botrel, É.P. (2004) Efeito da semeadura a lanço e da população de plantas no rendimento de grãos e outras características da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Ciência e Agrotecnologia*, 28:500–504. DOI doi.org/10.1590/S1413-70542004000300003.

Ribeiro-Barros, A.I., Silva, M.J., Moura, I., Ramalho, J.C., Máguas-Hanson, C., Ribeiro, N.S. (2018) The potential of tree and shrub legumes in agroforestry systems. *In: Amanullah, Fahad, S. (Eds.), Nitrogen in Agriculture - Updates. InTech*. 259p.

Rocha, R., Lopes, T., Fidalgo, C., Alves, A., Cardoso, P., Figueira, E. (2022) Bacteria associated with the roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different development stages: diversity and plant growth promotion. *Microorganisms*, 11:57. DOI doi.org/10.3390/microorganisms11010057.

Rodrigues, N.D, Souza, A.P.F, Morais, P.P.P., Braga, D.P.V., Crivellari, A.C., Favoretto, L.R.G., Berger, G.U. (2021) Residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in genetically modified glyphosate tolerant soybean, corn and cotton crops. *Ciência Rural*, 51(1):1–13. DOI doi.org/10.1590/0103-8478cr20190244.

Rodríguez, M.P., Melo, C., Jiménez, E., Dussán, J. (2019) Glyphosate bioremediation through the sarcosine oxidase pathway mediated by *Lysinibacillus sphaericus* in soils cultivated with potatoes. *Agriculture*, 9:217. DOI doi.org/10.3390/agriculture9100217.

Ruffolo, F., Dinhof, T., Murray, L., Zangelmi, E., Chin, J.P., Pallitsch, K., Peracchi, A. (2023) The microbial degradation of natural and anthropogenic phosphonates. *Molecules*, 28(19):6863. DOI doi.org/10.3390/molecules28196863.

Rurangwa, E., Vanlauwe, B., Giller, K.E. (2018) Benefits of inoculation, P fertilizer and manure on yields of common bean and soybean also increase yield of subsequent maize. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 261:219–229. DOI doi.org/10.1016/j.agee.2017.08.015.

Rutledge, H.L., Tezcan, F.A. (2020) Electron transfer in nitrogenase. *Chemical Reviews Journal*, 120(12):5158–5193. DOI doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00663.

Sánchez, A.C., Gutiérrez, R.T., Santana, R.C., Urrutia, A.R., Fauvart, M., Michiels, J., Vanderleyden, J. (2014). Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*, 62:105–112. DOI doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.004.

Santos, J.B., Gavilanes, M.L. (2006) Botânica. *In*: Vieira, C., Paula Júnior, T.J. Borém, A. Feijão. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 41–65.

Satchivi, N.M., Wax, L.M., Stoller, E.W., Briskin, D.P. (2000) Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. *Weed Science*, 48:675–679. DOI doi.org/10.1614/0043-1745(2000)048[0675:AATOGI]2.0.CO;2.

Sediyama, T., Teixeira, R.C., Reis, M.S. (1999) Melhoramento da soja. *In*: Borém, A., Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p. 478–533.

Serafin-Andrzejewska, M., Jama-Rodzeńska, A., Helios, W., Kozak, M., Lewandowska, S., Zalewski, D., Kotecki, A. (2024) Influence of nitrogen fertilization, seed inoculation and the synergistic effect of these treatments on soybean yields under conditions in south-western Poland. *Scientific Reports*, 14:6672. DOI doi.org/10.1038/s41598-024-57008-y.

Serra, A.P., Marchetti, M.E., Candido, A.C. da S., Dias, A.C.R., Christoffoleti, P.J. (2011) Influência do glifosato na eficiência nutricional do nitrogênio, manganês, ferro, cobre e zinco em soja resistente ao glifosato. *Ciência Rural*, 41:77–84. DOI doi.org/10.1590/S0103-84782011000100013.

Shaner, D.L. (2009) Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Science*, 57:118–123. DOI doi.org/10.1614/WS-08-050.1.

Shi, L., Zhu, X., Qian, T., Du, J., Du Y., Ye, J. (2023) Mechanism of salt tolerance and plant growth promotion in *Priestia megaterium* ZS-3 revealed by cellular metabolism and whole-genome studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21):15751. DOI doi.org/10.3390/ijms242115751.

Shushkova, T.V., Vinokurova, N.G., Baskunov, B.P., Zelenkova, N.F., Sviridov, A.V., Ermakova, I. T., Leontievsky, A.A. (2016) Glyphosate acetylation as a specific trait of *Achromobacter* sp. Kg 16 physiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2):847–855. DOI doi.org/10.1007/s00253-015-7084-1.

Silva, C.S., Santos J.M. C., Silva, J.M., Tenório, F.A., Guedes-Celestino, E.L.F., Cristo, C.C.N., Nascimento, M.S., Montaldo, Y.C., Oliveira, J.U.L., Santos, T.M.C. (2019) Bioprospecting of endophytic bacteria (*Bacillus* spp.) from passionfruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) for plant growth promotion. *Australian Journal of Crop Science*, 13(7):1369–1374. DOI doi.org/10.21475/ajcs.19.13.08.p1837.

Silva, K., Souza Cassetari, A., Silva Lima, A., Brandt, E., Pinnock, E., Vandamme, P., Souza Moreira, F.M. (2012) Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the

Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(4):253–262. DOI doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.001.

Silveira, A.P.D., Sala, V.M.R., Cardoso, E.J.B.N., Labanca, E.G., Cipriano, M.A.P. (2016) Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. *Applied Soil Ecology*, 107:313–319. DOI doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.005.

Souza, A.E.S.D., Filla, V.A., Silva, J.P.M.D., Barbosa Júnior, M.R., Oliveira-Paiva, C.A.D., Coelho, A.P., Lemos, L.B. (2023) Application of *Bacillus* spp. phosphate-solubilizing bacteria improves common bean production compared to conventional fertilization. *Plants*, 12:3827. DOI doi.org/10.3390/plants12223827.

Souza, F.D.F., Santos, J.C.F., Costa, J.N.M., Santos, M.M. Dos (2004) Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. Embrapa Rondônia, 21p.

Staub, J.M., Brand, L., Tran, M., Kong, Y., Rogers, S.G. (2012) Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39:641–647. DOI doi.org/10.1007/s10295-011-1057-x.

Subramanian, P., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Mageswari, A., Selvakumar, G., Sa, T. (2016) Cold stress tolerance in psychrotolerant soil bacteria and their conferred chilling resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under low temperatures. *PLoS One*, 11(8):e0161592. DOI doi.org/10.1371/journal.pone.0161592.

Suharjono, S., Yuliatin, E. (2022) Bacteria communities of coffee plant rhizosphere and their potency as plant growth promoting. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(11):5822–5834. DOI doi.org/10.13057/biodiv/d231136.

Sviridov, A.V., Shushkova, T.V., Zelenkova, N.F., Vinokurova, N.G., Morgunov, I.G., Ermakova, I.T., Leontievsky, A.A. (2012) Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2):787–796. DOI doi.org/10.1007/s00253-011-3485-y.

Tagliaferre, C., Santos, T.J., Santos, L.D.C., Santos Neto, I.J.D., Rocha, F. A., Paula, A.D. (2013) Características agrônômicas do feijão caupi inoculado em função de lâminas de irrigação e de níveis de nitrogênio. *Revista Ceres*, 60:242–248. DOI doi.org/10.1590/S0034-737X2013000200013.

Teshome, B., Wassie, M., Abatneh, E. (2017) Isolation, screening and biochemical characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 8(3). DOI doi.org/10.4172/2471-2728.1000188.

Tétard-Jones, C., Edwards, R. (2016) Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Management Science*, 72(2):203–209. DOI doi.org/10.1002/ps.4147.

Timofeeva, A.M., Galyamova, M.R. Sedykh, S.E. (2023) Plant growth-promoting bacteria of soil: designing of consortia beneficial for crop production. *Microorganisms*, 11:2864. DOI doi.org/10.3390/microorganisms11122864.

Tocheto, G.H.G., Boiago, N.P. (2020) Formas de aplicação de *Rhizobium tropici* e *Azopirillum brasiliense* coinoculados na cultura do feijão. *Revista Cultivando o Saber*, 13:37–48.

Toledo, T.C.F.D., Canniatti-Brazaca, S.G. (2008) Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. *Food Science and Technology*, 28:355–360. DOI doi.org/10.1590/S0101-20612008000200013.

Tuffi Santos, L.D., Sant'Anna-Santos, B.F., Meira, R.M.S.A., Tiburcio, R.A.S., Ferreira, F.A., Melo, C.A.D., Silva, E.F.S. (2008) Visible and anatomic damages caused by glyphosate in *Eucalyptus grandis* leaves. *Planta Daninha*, 26:9–16. DOI doi.org/10.1590/S0100-83582008000100002.

Tuffi Santos, L.D., Wagner Júnior, A., Silva, J.O.C., Pimentel, L.D., Santos, C.E.M., Bruckner, C.H., Ferreira, F.A. (2006) Herbicide drift simulation and effect of fungicide u herbicide on peach tree seedlings. *Planta Daninha*, 24:505–512. DOI doi.org/10.1590/S0100-83582006000300012.

Urgiles-Gómez, N., Avila-Salem, M.E., Loján, P., Encalada, M., Hurtado, L., Araujo, S., Collahuazo, Y., Guachanamá, J., Poma, N., Granda, K., Robles, A., Senés, C., Cornejo, P. (2021) Plant growth-promoting microorganisms in coffee production: from isolation to field application. *Agronomy*, 11(8):1–12. DOI doi.org/10.3390/agronomy11081531.

USDA (2024a) United States Department of Agriculture. Coffee: World Markets and Trade. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>. Acesso em: 11 outubro de 2024.

USDA (2024b) United States Department of Agriculture. Soybeans Production 2023/2024. Disponível em: <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/2222000>. Acesso em: 07 de outubro de 2024.

van Bruggen, A.H.C., Finckh, M.R., He, M., Ritsema, C.J., Harkes, P., Knuth, D., Geissen, V. (2021) Indirect effects of the herbicide glyphosate on plant, animal and human health through its effects on microbial communities. *Frontiers in Environmental Science*, 9:1–22. DOI doi.org/10.3389/fenvs.2021.763917.

Vassilev, N., Vassileva, M., Lopez, A., Martos, V., Reyes, A., Maksimovic, I., Eichler-Löbermann, B., Malusà, E. (2015) Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12):4983–4996. DOI doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4.

Vázquez, K.R.J., López-Hernández, J., García-Cárdenas, E., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J. S., Téxon, A.C., Ibarra-Laclette, E., López-Bucio, J. (2024) The plant growth promoting rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1, rescues *Arabidopsis* seedlings from alkaline stress by enhancing root organogenesis and hormonal responses. *Microbiological Research*, 281:127594. DOI doi.org/10.1016/j.micres.2023.127594.

Vega-Celedón, P., Bravo, G., Velásquez, A., Cid, F.P., Valenzuela, M., Ramírez, I., Vasconez, I. -N., Álvarez, I., Jorquera, M.A., Seeger, M. (2021) Microbial diversity of

psychrotolerant bacteria isolated from wild flora of Andes mountains and Patagonia of Chile towards the selection of plant growth-promoting bacterial consortia to alleviate cold stress in plants. *Microorganisms*, 9(3):538. DOI doi.org/10.3390/microorganisms9030538.

Veja, M.E.G., Rodríguez, A.H., Díaz, Y.H., Espino, J.Á.L., Viva, M.F., Ardisana, E.F.H., Pérez-Álvarez, S. (2020) Characterization and plant growth promoting potential of microbial groups associated with a *Coffea* sp. collection. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 32(5):358–367. DOI doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i5.2105.

Velázquez, E., Silva, L., Peix, A. (2010) Legumes: a healthy and ecological source of flavonoids. *Current Nutrition & Food Science*, 6:109–144. DOI doi.org/10.2174/157340110791233247.

Velini, E.D., Alves, E., Godoy, M.C., Meschede, D.K., Duke, R.T.S., Duke, S.O. (2008) Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science*, 64:489–496. DOI doi.org/10.1002/ps.1562.

Wang, C., Li, Y., Li, M., Zhang, K., Ma, W., Zheng, L., Xu, H., Cui, B., Liu, R., Yang, Y., Zhong, Y, Liao, H. (2021) Functional assembly of root-associated microbial consortia improves nutrient efficiency and yield in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(6):1021–1035. DOI doi.org/10.1111/jipb.13073.

Wijekoon, N., Yapa, N. (2018) Assessment of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on potential biodegradation of glyphosate in contaminated soil and aquifers. *Groundwater for Sustainable Development*, 7:465–469. DOI doi.org/10.1016/j.gsd.2018.02.001.

Win, K.T., Tanaka, F., Minamisawa, K., Imaizumi-Anraku, H. (2024) Growth and yield dynamics in three japanese soybean cultivars with plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. and *Bradyrhizobium ottawaense* co-inoculation. *Microorganisms*, 12(7):1478. DOI doi.org/10.3390/microorganisms12071478.

Xue, P.P., Carrillo, Y., Pino, V., Minasny, B., McBratney, A.B. (2018) Soil properties drive microbial community structure in a large scale transect in south eastern Australia.

Scientific Reports, 8:1–11. DOI doi.org/10.1038/s41598-018-30005-8.

Zeffa, D.M., Fantin, L.H., Koltun, A., de Oliveira, A.L.M., Nunes, M.P.B.A., Canteri, M.G., Gonçalves, L.S.A. (2020) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. PeerJ, 8:e7905. DOI doi.org/10.7717/peerj.7905.

Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., Chen, S. (2018) Recent advances in glyphosate biodegradation. Applied Microbiology and Biotechnology, 102:5033–5043. DOI doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0.

Zhao, H., Tao, K., Zhu, J., Liu, S., Gao, H., Zhou, X. (2015) Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains isolated from contaminated soil. The Journal of General and Applied Microbiology, 61(5):165–170. DOI doi.org/10.2323/jgam.61.165.

Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., de Oliveira, R.S., Constantin, J. (2010) Glyphosate affects photosynthesis in first and second generation of glyphosate-resistant soybeans. Plant Soil, 336:251–265. DOI doi.org/10.1007/s11104-010-0474-3.

Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira, R.S., Constantin, J. (2011) Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology, 99:53–60. DOI doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.10.005.