

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Seleção e Identificação de Bactérias Halofílicas e
Halotolerantes Solubilizadoras de Fosfato**

Érico Atílio de Paiva Teles

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –
CIÊNCIA DO SOLO**

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS HALOFÍLICAS E
HALOTOLERANTES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO**

ÉRICO ATÍLIO DE PAIVA TELES

*Sob a Orientação da Professora
Irene da Silva Coelho*

*e Coorientação do Pesquisador
Luc Felicianus Marie Rouws*

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre, no Programa de Pós-Graduação
em Agronomia - Ciência do Solo, Área
de Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Março de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T269s Teles, Érico Atílio de Paiva, 1995-
Seleção e identificação de bactérias halofílicas e halotolerantes
solubilizadoras de fosfato/Érico Atílio de Paiva Teles. – Seropédica, 2023.
39 f. : il.

Orientadora: Irene da Silva Coelho.

Coorientador: Luc Felicianus Marie Rouws.

Dissertação (Mestrado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo, 2023.

1. Estresse salino. 2. Rizobactérias. 3. Solubilização de fosfato. I. Coelho, Irene
da Silva, 1979-, orient. II. Rouws, Luc Felicianus Marie, 1976-, orient. III.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia-Ciência do Solo IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 14 / 2023 - CPGACS
(12.28.01.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.013069/2023-21

Seropédica-RJ, 08 de março de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO

ÉRICO ATÍLIO DE PÁIVA TELES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/03/2023.

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

(Orientadora)

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

Marcia Reed Rodrigues Coelho. Dra. Embrapa

(Assinado digitalmente em 08/03/2023 20:10)

EVERALDO ZONTA
IA (12.28.01.21)
Matrícula: 2213075

(Assinado digitalmente em 08/03/2023 15:54)

IRENE DA SILVA COELHO
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: 1815763

(Assinado digitalmente em 08/03/2023 16:47)

MARCIA REED RODRIGUES COELHO
CPF: 078.863.237-00

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **14**, ano: **2023**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **08/03/2023** e o código de verificação: **1e6ab04f24**

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, Manoel de Almeida
Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus queridos pais, Maria e José, por todo amor e pelos abnegados esforços a mim dedicados. Aos meus irmãos, Átila e Ítalo, pelos insensitivos, cuidados e suporte que contribuíram em minha formação.

À minha orientadora, prof.^a Irene da Silva Coelho pelo acolhimento, orientação, ensinamentos transmitidos, confiança e incentivos.

À minha companheira e amiga, Karina Lobo Hajdu, pelos anos de partilha de felicidades e tristezas e pelo apoio, incentivo e paciência durante meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

A toda a equipe do LaBac. Às amigas Hosana, Juliana, Júlia e Thereza pela ajuda disponibilizada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Rafael Leandro Amaya, Fernanda Seixas e João Vitor Gonçalves pelas horas de trabalho dedicadas ao desenvolvimento desse projeto e pelas trocas que contribuíram em minha formação.

Aos meus amigos Erick e Jéssica, que mesmo a distância se fazem presentes. Daniel e Henrique, pelos anos de parceria. Ao meu comadre Pedro Henrique, pela honra e confiança a mim concedidas. Ao camarada João Vitor, pelas conversas que me despertaram a consciência de classe.

Aos amigos Eduardo e Davi, pelas conversas diárias e momentos de descontração e a todos os companheiros do Alojamento da Pós-Graduação UFRRJ que me receberam e acolheram nesse espaço.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia–Ciência do solo pela oportunidade e conhecimento adquirido nesses anos.

Ao CNPq e a FAPERJ pela concessão das bolsas e recursos indispensáveis para minha dedicação exclusiva na realização deste trabalho.

Muito Obrigado

BIOGRAFIA

Érico Atílio de Paiva Teles, nascido em Volta Redonda - RJ, concluiu o ensino médio no ano de 2012. Possui graduação em Licenciatura em Ciências Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, 2014-2021), onde foi bolsista de iniciação científica atuando em projetos com taxonomia de algas verdes no Laboratório Integrado de Ficologia da UFRJ. Ainda na graduação atuou como aluno bolsista extensionista no Projeto Fundão Biologia UFRJ. Além disso, ainda como licenciando, atuou como estagiário vinculado em escolas municipais do Projeto Mais Educação e como acompanhante de alunos PCD. Em 2021 ingressou no Mestrado no Programa de Pós-graduação em Agronomia - Ciências do Solo pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, desenvolvendo trabalhos relacionados a solubilização de fosfato por bactérias rizosféricas isoladas de plantas halófitas.

RESUMO

TELES, Érico Atílio de Paiva. **Seleção e identificação de bactérias halofílicas e halotolerantes solubilizadoras de fosfato.** 2023. 39f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2023.

A salinização afeta gravemente a produção agrícola em todo o mundo. Esse processo ocorre naturalmente, mas é bastante agravado e acelerado por ações antrópicas. Outra questão que limita a produção agrícola é a baixa disponibilidade de fósforo para as plantas no solo. Isso ocorre devido à alta afinidade do fósforo solúvel a outros elementos presentes no solo, o que reduz a eficiência de fertilizantes fosfatados. A rizosfera de plantas halófitas abriga diversos microrganismos que contribuem para o estabelecimento desses vegetais sob estresse salino, reduzindo os efeitos deletérios da salinidade e através de atributos de promoção de crescimento vegetal. A utilização de inoculantes de bactérias solubilizadoras de fosfato tem sido considerada uma abordagem promissora para o estabelecimento e incremento da produção de culturas sob condições de deficiência nutricional e/ou outros estresses ambientais como a salinidade do solo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar 47 isolados bacterianos, previamente isolados da rizosfera de plantas halófitas, pelo sequenciamento do gene 16S rDNA, avaliá-los quanto ao desenvolvimento em concentrações crescentes de NaCl, classificá-los quanto a resposta a salinidade e avaliar a atividade de solubilização de fosfato. A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada utilizando os fosfatos minerais fosfato de cálcio dibásico (CaHPO₄) e fosfato de alumínio (AlPO₄) em meios de cultura sólido e líquido. Os gêneros identificados foram *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Kushneria* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Oceanobacillus* sp. e *Staphylococcus* sp., sendo os mais abundantes entre os isolados os gêneros *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. Não foi possível identificar o isolado 145, que apresentou maior identidade com sequências de bactérias não cultiváveis depositadas no NCBI. Quinze isolados, dos gêneros *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. e *Staphylococcus* sp., foram classificados com halofílicos e 32 isolados dos gêneros *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Halomonas* sp., *Kushneria* sp., *Pseudomonas* sp., *Oceanobacillus* sp. e *Staphylococcus* sp. foram classificadas como halotolerantes. Todos isolados apresentaram desenvolvimento de colônias em meio sólido contendo ambas as fontes de fosfato, porém três deles não apresentaram halo de solubilização no meio com fosfato de cálcio. Não foi observado halo no meio contendo fosfato de alumínio. Os isolados que apresentaram a maior capacidade de solubilização de fósforo a partir do fosfato de cálcio em meio líquido foram *Kushneria* sp. (102), *Enterobacter* sp. (186), o isolado 145 e *Bacillus* sp. (120), com 989,53 mg/L, 956,37 mg/L, 783, 82 mg/L e 757,60 mg/L, respectivamente. Para a solubilização do fosfato de alumínio os isolados que apresentaram os maiores resultados foram *Bacillus* sp. (89), *Oceanobacillus* sp. (94), que disponibilizaram 61,10 mg/L e 45,82 mg/L P no meio. Os isolados *Pantoea* sp. (150) e *Pseudomonas* sp. (183) apresentaram atividade de solubilização considerável para o fosfato de cálcio e alumínio, 436,04 mg/L e 23,89 mg/L respectivamente para o primeiro e 376,49 mg/L e 21,28 mg/L para o segundo. Os resultados confirmam que a rizosfera de plantas halófitas abriga bactérias de diversos táxons com capacidade de crescer em concentrações elevadas de sal e promover a solubilização de fosfato.

Palavras-chave: Estresse salino. Rizobactérias. Solubilização de fosfato.

ABSTRACT

TELES, Érico Atilio de Paiva. **Selection and identification of halophilic and halotolerant bacteria that solubilize phosphate.** 2023. 39p. Dissertation (Master in Agronomy, Soil Science). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2023.

Salinization severely affects agricultural production worldwide. This process occurs naturally, but is greatly aggravated and accelerated by human actions. Another issue that limits agricultural production is the low availability of phosphorus for plants in the soil. This occurs due to the high affinity of soluble phosphorus to other elements present in the soil, which reduces the efficiency of phosphate fertilizers. The rhizosphere of halophytic plants harbors several microorganisms that contribute for the establishment of these plants under saline stress, reducing the deleterious effects of salinity and through attributes of plant growth promotion. The use of phosphate-solubilizing bacterial inoculants has been considered a promising approach for establishing and increasing crop production under conditions of nutritional deficiency and/or other environmental stresses such as soil salinity. Thus, the aim of this work was to identify 47 bacterial isolates, previously isolated from the rhizosphere of halophyte plants, by sequencing of the 16S rDNA gene, to evaluate their development in increasing concentrations of NaCl, classify them according to salinity response and phosphate solubilization activity. Phosphate solubilization capacity was evaluated using the mineral phosphates dibasic calcium phosphate (CaHPO₄) and aluminum phosphate (AlPO₄) in solid and liquid culture media. The genera identified were *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Kushneria* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Oceanobacillus* sp. and *Staphylococcus* sp., and the most abundant among isolates were of the genera *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. It was not possible to identify isolate 145, which had greater identity with sequences from non-cultivable bacteria deposited at the NCBI. Fifteen isolates from the genera *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus* sp. were classified as halophilic and 32 isolates of the genus *Bacillus* sp. *Enterobacter* sp., *Halomonas* sp., *Kushneria* sp., *Pseudomonas* sp., *Oceanobacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. were classified as halotolerant. All isolates developed from colonies on solid medium containing insoluble phosphate as sources, but three of them did not show a solubilization halo in the medium with calcium phosphate. No halo was observed in the media containing aluminum phosphate. The isolates that developed the greatest ability to solubilize phosphorus from calcium phosphate in liquid medium were *Kushneria* sp. (102), *Enterobacter* sp. (186), isolate 145 and *Bacillus* sp. (120), 989.53 mg/L, 956.37 mg/L, 783, 82 mg/L and 757.60 mg/L, respectively. For the solubilization of aluminum phosphate, the isolates that presented the best results were *Bacillus* sp. (89) and *Oceanobacillus* sp. (94), which raised soluble P by 61.10 mg/L and 45.82 mg/L, respectively. *Pantoea* sp. (150) and *Pseudomonas* sp. (183) showed considerable solubilization activity for calcium and aluminum phosphate, 436.04 mg/L and 23.89 mg/L respectively for the first and 376.49 mg/L and 21.28 mg/L for the second. The results confirm that the rhizosphere of halophytic plants harbor bacteria from different taxa capable of growing in high concentrations of salt and presenting phosphate solubilization capacity.

Keywords: Salt stress. Rhizobacteria. Phosphate solubilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Solos Afetados por Sais	3
2.2 Efeitos do Estresse Salino nas Plantas	4
2.3 Microrganismos Halotolerantes e Halofílicos	5
2.4 Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal e Tolerância ao Estresse Salino.....	6
2.5 Solubilização de Fosfato	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Origem dos Isolados	9
3.2 Reativação dos Isolados	9
3.3 Identificação Genotípica dos Isolados	9
3.3.1 Extração de DNA	9
3.3.2 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA.....	9
3.4 Teste de Resposta à Salinidade e Classificação dos Isolados	10
3.5 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfato Mineral em Meio Sólido.....	10
3.6 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfato Mineral em Meio Líquido.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 Identificação das Rizobactérias a Partir do Sequenciamento Parcial do Gene de 16s rDNA.....	12
4.2 Classificação Quanto à Resposta à Salinidade.....	17
4.3 Solubilização de Fosfato em Meio Sólido	20
4.4 Solubilização de Fosfato em Meio Líquido.....	25
5. CONCLUSÕES.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

A salinização dos solos está entre os principais fatores abióticos que ameaçam a produção agrícola (JHA et al., 2012; GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al., 2022). Esse processo ocorre naturalmente em decorrência de fatores ambientais como a taxa de precipitação e evaporação da água, o intemperismo de rochas, relevo e a proximidade com o mar (GAMALERO et al., 2020). No entanto, atividades antrópicas podem causar ou intensificar a salinização, como o manejo inadequado da água e do solo e a utilização de agrotóxicos e fertilizantes químicos (SAGAR et al., 2022). Estima-se que em todo o mundo mais de 3,0% dos solos superficiais e 6% dos subsolos encontram-se salinizados, devido a processos naturais ou antrópicos (FAO, 2022). No Brasil, solos salinos e sódicos ocorrem predominantemente na região semiárida do Nordeste, e também no Rio Grande do Sul e na região do Pantanal mato-grossense (PEDROTTI et al., 2015).

Outro limitante para a produção agrícola ao redor do mundo é a baixa disponibilidade de fósforo (P) para as plantas. Esse elemento é o segundo macronutriente mais importante para o desenvolvimento de culturas agrícolas (ALORI et al., 2017). Na fase sólida do solo a maior parte do P encontra-se associado à fração mineral, principalmente ao cálcio em solos calcários, ao ferro e alumínio em solos ácidos, e a compostos orgânicos em solos ricos em matéria orgânica (GOMES et al., 2010). Desse modo, cerca de 95% a 99% do fósforo presente no solo está em formas insolúveis, não disponíveis para os vegetais. Apenas uma pequena parte está disponível na solução do solo na forma de íons, monobásicos (H_2PO_4) e dibásicos (HPO_4^{2-}).

Cerca de 98% das espécies vegetais não são capazes de se desenvolver em elevadas concentrações de sal, incluindo as culturas agrícolas, e são classificadas como glicófitas (DIAS et al., 2016; GAMALERO et al., 2020). Os efeitos nocivos causados pelo excesso de sal na planta estão relacionados com o estresse osmótico e iônico, que causam deficiências nutricionais, alterações nas vias de carbono e nitrogênio, redução da taxa de fotossintética, geração de espécies reativas de oxigênio e danos moleculares (HASHEM et al., 2016; BULGARI et al., 2019). Desse modo, a salinização associada à baixa disponibilidade natural de P no solo pode levar a efeitos deletérios acumulativos nas plantas, e consequentemente impor maiores obstáculos para a produção agrícola.

Plantas capazes de tolerar alta salinidade são classificadas como halófitas. O estresse salino induz uma variedade de respostas adaptativas nessas plantas, incluindo alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. (DIAS et al., 2016; ETESAMI & BEATTIE, 2018; GAMALERO et al., 2020). Além disso, a associação com microrganismos também contribui para o estabelecimento dessas plantas em solos salinizados (ETESAMI & BEATTIE, 2018). A rizosfera é a porção do solo aderida às raízes, na qual se encontra a maior parte da atividade microbiológica devido a produção de exsudados vegetais que servem como fonte de nutrientes para microrganismos (NADEEM et al., 2013). As comunidades microbianas presentes na rizosfera de plantas halófitas são majoritariamente formadas por microrganismos halofílicos, que necessitam se desenvolverem na presença de mais de 1% de NaCl, e halotolerantes, que podem crescer tanto na ausência como na presença de altas concentrações de sais (AMOOZEGAR et al., 2019; SINGH et al., 2019).

Rizobactérias halofílicas e halotolerantes promotoras de crescimento vegetal podem contribuir para o estabelecimento de plantas sob estresse salino a partir de inúmeros mecanismos que participam direta ou indiretamente na resposta à salinidade (GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al., 2022). Mecanismos diretos incluem a modulação dos níveis de hormônios vegetais, como citocininas, auxinas e giberelinas, a aquisição de nutrientes, a

ativação de enzimas antioxidantes das plantas e a regulação dos sistemas de defesa sob estresse, melhorando assim a saúde da planta sob estresse salino (SHAILENDRA et al., 2015; GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al., 2022). Já os mecanismos indiretos são baseados na supressão de microrganismos patogênicos, agindo assim como um agente de controle biológico (SHAILENDRA et al., 2015; FERREIRA et al., 2019; GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al., 2022).

A introdução de microrganismos halofílicos e halotolerantes promotores de crescimento em culturas agrícolas afetadas por sais pode se apresentar como uma estratégia relevante e sustentável para promover a resistência dessas culturas ao estresse salino, bem como para a manutenção dos níveis de fósforo na solução do solo (DODD & PÉREZ, 2012; GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al. 2022).

A partir do exposto, a hipótese do trabalho é que bactérias isoladas da rizosfera de plantas halófitas podem apresentar diferentes mecanismos para a mitigação dos efeitos do estresse salino e para a promoção de crescimento de culturas agrícolas.

Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar 47 bactérias previamente isoladas da rizosfera de plantas halófitas quanto a resposta a diferentes concentrações de NaCl; identificá-las a nível de gênero; e avaliar a capacidade de solubilização de fosfatos minerais, fosfato de cálcio dibásico (CaHPO_4) e fosfato de alumínio (AlPO_4) em meios de cultura sólido e líquido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Solos Afetados por Sais

Solos halomórficos são caracterizados pela presença de sais solúveis, sódio trocável ou ambos em horizontes superficiais, sendo classificados como salinos, sódicos ou salino-sódicos (PEDROTTI et al., 2015; SAGAR et al., 2022). De acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solo (SIBICS), um solo apresenta caráter salino quando possui condutividade elétrica (CE) ≥ 4 e < 7 dS. m⁻¹ e caráter sálico quando possui CE ≥ 7 dS.m⁻¹. O caráter solódico é caracterizado pela percentagem de sódio trocável (PST) variando de 6 a <15%, enquanto o caráter sódico o PST é maior ou igual a 15% (SANTOS et al, 2018).

Solos halomórficos ocorrem naturalmente em regiões de clima árido e semiárido, onde o acúmulo de sais está relacionado principalmente à condição de elevada evapotranspiração e baixa precipitação pluviométrica ao longo do ano, o que favorece a ascensão de sais para regiões mais superficiais por capilaridade (PEDROTTI et al., 2015; SAGAR et al., 2022). A salinização também ocorre naturalmente em solos com drenagem limitada, com a presença de lençol freático elevado ou com baixa permeabilidade e em regiões sob influência da água marinha (GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al., 2022). Quando o acúmulo de sal ocorre a partir de processos naturais, a salinidade é classificada como “primária”. A salinidade “secundária” ocorre pelo acúmulo de sais de forma induzida, ocasionada principalmente pelo manejo incorreto da irrigação e com o uso de água de baixa qualidade, drenagem deficiente, má gestão do solo e de fertilizantes e a remoção de vegetação. (PEDROTTI et al., 2015; GAMALERO et al. 2020).

Em regiões áridas e semiáridas, o processo de salinização ocorre principalmente pela transformação dos minerais primários, ricos em cátions como Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ e Na⁺, em minerais de argila do tipo 2:1. Estes cátions são geralmente transportados pela água para regiões mais baixas do relevo (PEDROTTI et al., 2015). Assim, a formação dos solos salinos resulta da acumulação de sais solúveis nos horizontes do solo associada a condições de drenagem limitada e elevada evapotranspiração (PEDROTTI et al. 2015). Nos períodos secos estes cátions afloram à superfície dos agregados do solo, sobretudo na camada mais superficial, e chegam a formar uma crosta de sais cristalizados (GAMALERO et al., 2020).

O Mapa Global de Solos Afetados por Sais reune dados de mais de 118 países, abrangendo 85% da superfície terrestre, e revela que mais de 3% dos solos superficiais (0-30 cm) e mais de 6% dos subsolos (30-100) são afetados pela salinidade ou sodicidade. Além disso, a maior parte desses solos, mais de dois terços, são encontrados em zonas climáticas áridas e semiáridas (FAO, 2022). No Brasil, a região do semiárido nordestino apresenta grandes áreas com solos salinizados, devido à natureza física e química dos solos, ao déficit hídrico e à elevada taxa de evaporação, com maior incidência do problema em solos mais intensamente cultivados com o uso da irrigação (PEDROTTI et al. 2015, PESSOA et al., 2018). O levantamento de solos do Ceará e da Bahia revelou a existência de 91.110 km² de solos afetados por sais e sódio, correspondendo a 9,40% da área mapeada (PEREIRA, 1982).

O Brasil também possui uma vasta zona litorânea, que abrange 7.408 km de território, dos quais 6.786 km abrigam o ecossistema manguezal (SCHAFFER-NOVELLI et al., 2000). É comum a ocorrência de apicuns, planícies hipersalinas, na área de transição entre manguezais e florestas, ocorrendo na região de supra-maré (COSTA & HERRERA, 2016). Também é comum que ao longo das regiões costeiras sob clima tropical, quente e com grande taxa de evaporação, ocorra a formação de lagoas costeiras hipersalinas e corpos d’água fechados com elevadas concentrações de sais (HÖHN et al., 1986). Nesses ambientes, a vegetação apresenta uma série de adaptações fisiológicas e morfológicas para lidar com

constantes alagamentos, salinidade e a falta de oxigênio (PELEGRINI, 2000; HADLICH et al. 2008).

2.2 Efeitos do Estresse Salino nas Plantas

Plantas podem ser classificadas em relação à tolerância a salinidade em glicófitas e halófitas. As glicófitas abrangem cerca de 98% das espécies vegetais, e são sensíveis aos efeitos nocivos da salinidade no ambiente (GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al., 2022). Os efeitos do estresse salino sobre o desenvolvimento vegetal ocorrem em dois estágios: o estágio de estresse osmótico (resposta precoce) e o de estresse iônico (resposta tardia). O estágio inicial do estresse salino é causado pelo sal presente fora do compartimento rizosférico, enquanto o estresse salino do estágio posterior é consequência dos efeitos deletérios do sal nas células (ONDRAŠEK et al., 2022; SAGAR et al., 2022).

O estresse osmótico afeta o potencial hídrico da planta, o que promove a perda de água e restringe a absorção de nutrientes, reduz a área de expansão das folhas, limita a abertura dos estômatos, incidindo na redução da taxa fotossintética e do crescimento vegetal (GAMALERO et al., 2020; MOKRANI et al., 2020; SAGAR et al., 2022). O estresse osmótico também induz a elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificam estruturas celulares e moléculas (GAMALERO et al. 2020; IQBAL et al., 2021). O estresse iônico ocasiona o acúmulo excessivo de Na^+ nas folhas mais velhas, levando ao envelhecimento prematuro e a clorose das folhas (ONDRAŠEK et al., 2022). Níveis tóxicos de sódio em órgãos vegetais danificam membranas biológicas e organelas, reduzindo o crescimento e causando desenvolvimento anormal e a morte da planta (IQBAL et al., 2021). O sal também afeta severamente processos fisiológicos, como o metabolismo do amido e fixação de nitrogênio, a formação e germinação de sementes, levando a perdas na produtividade das culturas (ZHANG et al., 2010; MOKRANI et al., 2020; IQBAL et al., 2021; ONDRAŠEK et al., 2022; SAGAR et al., 2022).

Plantas halófitas, capazes de tolerar elevada salinidade, representam 2% da diversidade vegetal. Uma série de características adaptativas permitem que halófitas completem seu ciclo de vida sob salinidade elevada (GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al., 2022). Esses mecanismos incluem alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, como a) modulação de hormônios vegetais; b) síntese de solutos e osmoprotetores compatíveis; c) controle na absorção de íons, especialmente íons de potássio (K), pelas raízes e transferência de íons para as folhas; d) acúmulo ou remoção seletiva de íons; e) produção de óxido nítrico (NO); f) ativação de enzimas antioxidantes e produção de compostos antioxidantes; g) produção de poliaminas; h) alteração das vias fotossintéticas; i) compartimentação de íons nos níveis celular e da planta inteira; e j) regulação da expressão de genes envolvidos na tolerância da planta à salinidade (ETESAMI & BEATTIE, 2018).

Diversas estratégias podem ser aplicadas a fim de manter a produtividade agrícola e aliviar o estresse ambiental em ambientes salinos. Incluindo o desenvolvimento de cultivares tolerantes, a implementação de sistemas de cultivo e práticas de manejo específicas, como irrigação por gotejamento ou drenagem do solo e aplicação compostos orgânicos, que favorecem o aumento da biomassa microbiana (GAMALERO et al., 2020; ONDRAŠEK et al., 2022). Uma estratégia alternativa que pode ser utilizada para estimular ou aumentar a resistência de espécies agrícolas a salinidade é a introdução de microrganismos halotolerantes e/ou halofílicos que promovam o crescimento vegetal, minimizando os efeitos fisiológicos e físicos do estresse salino nas plantas (DODD; PÉREZ, 2012).

2.3 Microrganismos Halotolerantes e Halofílicos

Ambientes extremos, como os pólos, regiões áridas, os oceanos profundos, fontes termais e solos salinos, apresentam uma série de limitações abióticas para o desenvolvimento da vida. Os microrganismos que se desenvolvem sob condições ambientais extremas são denominados “extremófilos” (SINGH et al., 2019). Aqueles adaptados a elevados níveis de salinidade são classificados como halofílicos ou halotolerantes. Os halofílicos se desenvolvem exclusivamente em ambientes com concentração de sais superior a 1,0%, enquanto os halotolerantes são capazes de se estabelecer em ambientes salinos ou não (AMOOZEGAR et al., 2019; SINGH et al., 2019). Os halofílicos são ainda classificados em três grupos, de acordo com condições ótimas de crescimento em diferentes concentrações de sais: halofílicos fracos, entre 1 e 5% de NaCl; moderados, entre 5 e 20% e extremos, que têm seu desenvolvimento ótimo em concentrações iguais ou superiores a 20% de NaCl (AMOOZEGAR et al., 2019; SINGH et al., 2019).

Microrganismos eucarióticos e procarióticos são capazes de se adaptar à salinidade elevada no ambiente. Os microrganismos halofílicos podem ser encontrados nos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya (RUPPEL et al., 2013). No entanto, enquanto halofílicos fracos e moderados incluem bactérias, fungos e algas, halofílicos extremos incluem apenas bactérias e alguns fungos (RUSSELL, 1989). Bactérias halofílicas e halotolerantes estão distribuídas em diversos subgrupos filogenéticos (OREN, 2002). Em uma área com solo extremamente salino-alcalino no nordeste da China foram isoladas estirpes de bactérias halofílicas e halotolerantes pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Nesterenkonia*, *Zhihengliuella*, *Halomonas*, *Stenotrophomonas*, *Alkalimonas* e *Litoribacter* (SHI et al., 2012). Zhang et al. (2018) isolaram 305 bactérias de amostra de solo provenientes de arrozais de alta produtividade em Taoyuan, China, e identificaram que 67,3% deles foram capazes de se desenvolver em concentrações iguais ou superiores a 5% de NaCl. Entre esses isolados foram identificados representantes das ordens *Bacillales*, *Actinomycetales*, *Rhizobiales* e *Oceanospirillales* (ZHANG et al., 2018).

Os mecanismos adaptativos que permitem que os microrganismos cresçam e sobrevivam sob elevada salinidade são semelhantes entre os diferentes táxons (RUPPEL et al., 2013). As principais estratégias incluem: a) evitar altas concentrações de sal no interior da célula por meio de composições específicas de membrana ou parede celular; b) bombeamento de íons para o meio externo; c) ajustar o meio intracelular a partir da síntese e acúmulo de solutos orgânicos não tóxicos e a adaptação de proteínas e enzimas a altas concentrações de sal (RUPPEL et al., 2013; SINGH et al. 2019).

Adaptações na estrutura da parede celular para evitar altas concentrações de sal no citoplasma e evitar a perda de água e a plasmólise são observadas em archaeas (RUSSELL, 1989; SUTTON et al., 1991). A membrana citoplasmática de archaeas halofílicas contém éteres lipídicos únicos que não podem ser facilmente degradados, são resistentes à temperatura e mecanicamente e altamente tolerantes ao sal. Archaeas termofílicas e acidófilas extremas possuem lipídios tetraéter transmembrana que formam uma membrana monocamada rígida que é quase impermeável a íons e prótons (RUSSELL, 1989; RUPPEL et al., 2013). Essas propriedades tornam as membranas lipídicas de archaeas mais adequadas para a vida e sobrevivência em ambientes extremos do que os lipídios de camada dupla do tipo éster de bactérias ou eucariotos (RUSSELL, 1989).

O ajuste osmótico a partir do bombeamento de íons para o meio externo é mediado por transportadores Na^+/H^+ , mantendo as concentrações intracelulares de Na^+ relativamente baixa (OREN, 2006; SINGH et al. 2019). As membranas de archaeas halofílicas possuem uma alta atividade de *antiporters* Na^+/H^+ (RUPPEL et al., 2013). Uma função crucial dos transportadores de íons é manter e reter uma relação de K^+/Na^+ favorável no citoplasma em

face a baixa relação K^+/Na^+ no ambiente (RUPPEL et al., 2013). Esses cátions possuem estruturas fisiológicas semelhantes, o que pode resultar em deficiência de K^+ em ambientes com elevada salinidade (HAGEMANN, 2011). No entanto, vários dos microrganismos do Mar Morto mantêm concentrações intercelulares de K^+ extremamente altas, o que indica a existência de sistemas regulatórios para uma absorção ativa de K^+ (HAGEMANN, 2011; RUPPEL et al., 2013).

Os microrganismos apresentam dois tipos de estratégia para equilibrar osmoticamente seu citoplasma com o meio externo: as células podem manter altas concentrações de sais intracelular, osmoticamente equivalente ao meio externo; ou as células mantêm as concentrações de sais baixas em seu citoplasma e a pressão osmótica é equilibrada pela síntese de solutos orgânicos compatíveis (OREN, 2008). Gêneros do domínio Archaea e Bacteria mantêm concentração intracelular de KCl iguais as de NaCl no ambiente salino (OREN, 2008; HAGEMANN, 2011). Esta estratégia requer uma ampla gama de adaptação das enzimas intracelulares ao sal para que as proteínas mantenham sua conformação adequada e atividade em concentrações quase saturadas de sal (OREN, 2008). Já a síntese e acumulação de solutos orgânicos compatíveis promove o equilíbrio osmótico e evita a acumulação de sais no citoplasma (OREN, 2001). A biossíntese de solutos orgânicos é energeticamente mais dispendiosa do que a síntese de altas concentrações de KCl, mas não exige nenhuma adaptação molecular na célula (OREN, 2001).

2.4 Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal e Tolerância ao Estresse Salino

A rizosfera é a porção do solo sob a influência das raízes, que exsudam diferentes compostos de açúcares, ácidos orgânicos, vitaminas, mucilagens, lisados e muitas outras substâncias nas formas sólida, líquida ou gasosa (GAMALERO et al., 2020). Por essa razão a rizosfera apresenta uma maior densidade e biodiversidade microbiana em relação ao solo não rizosférico (BAIS et al., 2006). Os principais grupos taxonômicos de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) pertencem a Proteobacteria e Firmicutes (COMPANT, 2010; FERREIRA, 2019). O gênero *Bacillus* é o gênero mais conhecido de Firmicutes indutor de promoção de crescimento vegetal. Os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Halomonas*, *Kushneria*, *Ochromobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea*, *Enterobacter* e *Rahnella* são as mais representativas do filo Proteobacteria relatadas como RPCV (BATISTA et al., 2018). Representantes de outros gêneros, como *Arhrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Kokuria*, *Kushneria*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* e já foram reconhecidos por possuírem mecanismos de tolerância a salinidade e de promoção do crescimento de plantas (ZHU et al., 2011; DESALE et al., 2013; OTEINO et al., 2015; ALORI et al., 2017; CHOPRA et al. 2020; WAN et al., 2020; AFRIDI et al., 2021).

Tem sido demonstrado que RPCV associadas a plantas halófitas apresentam capacidade metabólica de tolerar o estresse salino e de promover o crescimento e a tolerância à salinidade em plantas (GAMALERO et al., 2020; SAGAR et al. 2022). Essas bactérias atuam através de mecanismos como a regulação de enzimas que eliminam o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo a catalase, glutatona redutase e superóxido dismutase (SINGH et al. 2015; SAGAR et al., 2022), a produção de fitohormônios, como o ácido-3-indol-acético (AIA) (JHA et al. 2011; ETESAMI & BEATTIE, 2018) e na produção da enzima ACC-deaminase, que reduz os efeitos inibitórios de crescimento do etileno sobre as plantas (ETESAMI & BEATTIE, 2018; FERREIRA et al., 2020; AFRID et al. 2021). Bactérias halofílicas e halotolerantes também podem promover a nutrição das plantas através da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos (JHA et al. 2011; ETESAMI & BEATTIE, 2018; WAN et al. 2020). O microbioma vegetal tem sido

extensivamente estudado na tentativa de melhorar o crescimento das plantas e a tolerância a várias condições de estresse abiótico (EGAMBERDIEVA et al. 2021).

As inoculações com RPCV podem aumentar a tolerância ao estresse salino nas plantas e podem ser vitais para o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis em condições de estresse salino (GLICK, et al., 2020; IQBAL et al., 2021; SAGAR et al., 2022). Chopra et al. (2020) isolaram uma cepa rizosférica de *Brevibacterium sediminis* com potencial de atividade antifúngica, capacidade de produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato. Os autores apontam que mudas inoculadas com a cepa apresentaram comprimento de raiz significativamente maior, comprimento da parte aérea e massa fresca (CHOPRA et al. 2020). Bashan et al. (2000) demonstraram que a inoculação com bactérias provenientes de espécies de mangue e com cepas halotolerantes de *Azospirillum spp.* promoveram o crescimento de *Salicornia bigelovii* em condições salinas (BASHAN et al. 2000).

2.5 Solubilização de Fosfato

O fósforo (P) é o segundo macronutriente mais limitante para o desenvolvimento de culturas vegetais (ALORI et al., 2017). Esse elemento é indispensável para diversos processos metabólicos nos sistemas biológicos, como divisão celular, geração de energia, biossíntese de macromoléculas, integridade de membranas, fotossíntese e respiração, além de influenciar positivamente na nodulação de leguminosas (KROLOW et al. 2004; RAWAT et al. 2020). A maior parte do fósforo presente no solo encontra-se indisponível para os vegetais devido à precipitação com cátions, imobilização e adsorção a compostos orgânicos ou a fração mineral (GOMES et al., 2010; RASUL et al., 2019). Em média, o conteúdo de fósforo nos solos é de 0,05 % (massa/massa), no entanto, apenas 0,1% desse total encontra-se diretamente disponível às plantas em forma de íons solúveis, monobásicos ($H_2PO_4^-$) e dibásicos (HPO_4^{2-}) (ZHU et al., 2011; SINGH et al., 2015).

O fósforo orgânico é derivado de processos metabólicos como assimilação de ortofosfatos e efluentes microbianos, vegetais ou animais. Estes são categorizados com base na ligação de fósforo em três classes: a) ésteres de fosfato (fosfatos de açúcar, fosfolipídios, ácidos nucléicos, fosfatos de inositol); b) fosfonatos (ligações C-P); e c) anidridos de ácido fosfórico (trifosfatos de adenosina e difosfatos de adenosina) (HUANG et al., 2017). Fosfatos minerais encontram-se majoritariamente associados ao cálcio em solos calcáreos e, ao ferro e alumínio em solos ácidos (GOMES, 2010). Os fosfatos minerais representam cerca de 60–80% do P total em solos agrícolas (ZHU et al. 2018).

Para manter a produção agrícola a utilização de fertilizantes fosfatados tem aumentado nos últimos anos (FAO, 2019). No entanto, o fosfato adicionado ao solo é rapidamente imobilizado e se torna inacessível às plantas, ocasionando um baixo aproveitamento do fertilizante fosfatado aplicado, entre 10 e 25 % em todo o mundo (SANTOS et al., 2008; RASUL et al., 2019). Ademais, a aplicação e o acúmulo de fertilizantes fosfatados promovem a eutrofização de corpos d'água e a contaminação por metais no solo, acarretando danos à saúde vegetal, animal e humana (KATHERINE & WOLFF, 2010; AZZI et al., 2017).

Uma série de reações dependentes do pH influenciam a proporção de reservatórios de P solúvel e insolúvel no solo, como dessorção e solubilização de fosfatos inorgânico rapidamente trocável, absorção de P por microrganismos e plantas, a liberação de P de resíduos vegetais ou fertilizantes orgânicos para a solução do solo e a liberação de e a solubilização de P por microrganismos a partir de fontes minerais e orgânica (FROSSARD et al., 2011). O fósforo associado com (hidr)óxidos de Fe (Fe-P) E (hidr)óxidos de Al (Al-P) são sensíveis a condições redutoras e a trocas de ligantes com ácidos orgânicos e precipitados de fosfato de cálcio são mais sensíveis às mudanças de pH (ZHU et al. 2018).

Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) disponibilizam fosfatos orgânicos e minerais por uma diversidade de mecanismos: a) acidificação do meio pela extrusão de H^+ e/ou de ácidos orgânicos; b) complexação de metais; c) redução de metais; d) extrusão de fosfatases; e e) dissolução indireta de fosfato através do estímulo de produção de ácidos pelas plantas (BASHAN et al. 2013; KRISHNARAJ et al. 2015). A solubilização de fosfato inorgânico por bactérias isoladas de ambientes salinos já foi constatada em isolados de diversos gêneros, como *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Kushneria*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (ZHU et al. 2011; CHOPRA et al., 2020; HUSSAIN et al., 2020; WAN et al., 2020).

Atualmente o Brasil é dependente do comércio internacional de fertilizantes fosfatados, que representam 23% do total de importações de fertilizantes do país, sendo 14% desse total proveniente da Rússia (GLOBAFERT, 2019). Dessa forma, os atuais conflitos no leste europeu podem prejudicar a produção nacional. Assim, a bioprospecção de bactérias solubilizadoras de fosfato pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da agricultura nacional partir da produção de bioinoculantes adequados para a aplicação em conjunto com diferentes fontes de fertilizantes fosfatados de baixa solubilidade e na elaboração de estratégias para a disponibilização de P em solos ricos em fosfatos de ferro e alumínio, mais abundantes em solos ácidos (GOMES et al., 2010).

Atualmente há poucos produtos agrícolas como bioinoculantes ou fertilizantes organominerais baseados em microrganismos solubilizadores de fosfato aprovados pelo MAPA. Entre eles podemos citar o inoculante BiomaPhos®, que contém inóculos das cepas BRM 119 (*Bacillus megaterium*) (OLIVEIRA et al., 2009) e BRM 2084 (*Bacillus subtilis*) (ABREU et al., 2017). Outro exemplo são os organofertilizantes BioAtivo, produzidos pelo Instituto de Fosfato Biológico Ltda., a partir da solubilização biológica de rochas fosfáticas e de material orgânico por meio de um processo da inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato mineral. A bioprospecção de bactérias solubilizadoras de fosfato que também possam conferir resistência ao estresse salino pode contribuir para o desenvolvimento de produtos semelhantes, contribuindo para a ampliação do acesso a produtos e manejos agrícolas sustentáveis e para o estabelecimento de culturas capazes de se estabelecer em solos salinizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem dos Isolados

Para o desenvolvimento desse trabalho foram selecionadas 47 cepas bacterianas isoladas da rizosfera das plantas halófitas *Sporobolus virginicus*, *Cyperus ligularis*, *Blutaparon portulacoides*, *Salicornia gaudichadiana* em diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro, sendo estas: planícies hipersalinas (Guaratiba-RJ), salina desativada (São Pedro da Aldeia-RJ) e entorno da lagoa hipersalina (Araruama-RJ). Os isolados bacterianos foram coletados e isoladas em meios de cultura Agar Nutritivo acrescidos de 1% a 30% de NaCl e, após o isolamento, foram estocados a -4°C em microtubos de 1,5 mL contendo meio Agar Nutritivo acrescido de 0,5% a 10% de NaCl (XAVIER, 2021).

3.2. Reativação dos Isolados

A reativação dos isolados foi feita a partir das culturas estoque, aos quais foram adicionados 100 µL de caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) contendo 3% de NaCl, posteriormente os microtubos foram incubados por 12h a 30°C. Após esse período os isolados foram inoculados em placas de petri contendo meio Agar Nutritivo acrescido de 3% de NaCl com o auxílio de alça de platina e novamente incubadas nas condições descritas anteriormente. Posteriormente, novos estoques foram feitos em meio de cultura DYGS (DÖBEREINER et al., 1999) contendo 3% de NaCl.

3.3. Identificação Genotípica dos Isolados

3.3.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura DYGS acrescido de 3% de NaCl incubados por 12h a 30°C. Após o período de incubação, colônias de cada isolado foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio DYGS acrescido 3% de NaCl e incubados a temperatura ambiente por 12 horas sob agitação de 120 rpm. Posteriormente, 1,5 mL de cada cultura foram transferidos para microtubos e centrifugados a 12.000g por 3 min. Esse processo foi repetido por três vezes a fim de concentrar o maior número de células possível. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensido no vortex em 600 µL de tampão de lise (TRIS-HCl mM pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, SDS 1% e NaCl 25 mM) e incubado a 60 °C por 30 min. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente. O produto foi homogeneizado por 2 minutos com 600 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), e em seguida, centrifugado a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado igual volume de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). Em seguida as amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo o mesmo volume de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas a -20°C por 12 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 13.000 g por 30 min. Por fim o precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% por duas vezes, seco a temperatura ambiente e ressuspensido em 30 µL de água ultrapura e armazenado a -20°C.

3.3.2 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA

Um fragmento de aproximadamente 1000 pb do gene 16S rDNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados primers universais 338F 5'-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1378R 5'-CGGTGTGTACAAGGCCGGAACG-3'. Foram utilizados os seguintes reagentes para cada reação de PCR: 1X de tampão de reação, 1 U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP e 0,4 µM de cada primer. A reação foi realizada em termociclador, com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 56°C por 40 s; e extensão a 72°C por 1 min e 30 s; extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% sob luz UV no sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante, e o sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA), no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. Ambas as fitas foram sequenciadas para assegurar fidelidade.

As sequências foram editadas utilizando o programa BioNumerics (v. 7.6), e foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI utilizando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997) para inferência da espécie. Estas sequências e outras sequências disponíveis no banco de dados do NCBI foram importadas para o programa MEGAX (v. 10), e alinhadas utilizando o programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994). Os múltiplos alinhamentos resultantes foram otimizados manualmente. O dendrograma foi construído utilizando o método algorítmico neighbor joining (NJ), utilizando o modelo de distância p no programa MEGAX (v. 10). A robustez de cada ramo foi determinada usando o teste não paramétrico de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições. Uma sequência de *Arthrobacter oryzae* (NR 041545.1) foi utilizada como grupo externo.

3.4 Teste de Resposta à Salinidade e Classificação dos Isolados

Colônias de cada isolado bacteriano foram diluídas em água salina 0,9% com auxílio de uma alça de platina até alcançar a turbidez equivalente à concentração de 1,5 x 10⁸ UFC.mL⁻¹ na escala de McFarland. A seguir, triplicatas de cada isolado foram semeadas por estrias simples em placas contendo meio DYGS acrescidos de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% de NaCl e incubadas em estufa a 36°C. O desenvolvimento dos isolados foi avaliado por um período de 14 dias após a inoculação. Foram consideradas concentrações ótimas para cada isolado aquelas nas quais as colônias foram capazes de se desenvolver em até 24 horas. Os isolados foram classificados quanto a resposta à salinidade de acordo com seu intervalo de crescimento ótimo em: halotolerantes, crescimento ótimo entre 0,5% e 20%; halofílicos fracos, 1% a 5%; halofílicos moderados, 5% a 20% e, halofílicos extremos em concentrações superiores a 20% (AMOOZEGAR et al., 2019; SINGH et al., 2019).

Após as análises de resposta à salinidade, a concentração de 3% de NaCl foi estabelecida para o cultivo das bactérias nos demais meios e teste realizados, pois todos os isolados apresentaram boas respostas de crescimento nessa concentração.

3.5 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfato Mineral em Meio Sólido

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 9 mL de meio DYGS acrescido 3% de NaCl e incubados por 12 horas a 120 rpm. Posteriormente, a densidade óptica (DO) de cada cultura foi averiguada por espectrofotometria e ajustada a absorbância a 600 nm de 0,9-1,0. Uma alíquota de 10 µL das culturas foi inoculada em discos de papel de 6 mm dispostos equidistantemente sobre meio sólido NBRIP (National Botanic Research Institutes's phosphate) (NAUTIYAL, 1999) acrescido 3% de NaCl e contendo CaHPO₄ (fosfato de cálcio dibásico) ou AlPO₄ (fosfato de alumínio) como fonte de fosfato,

pH 7,0. Como controle positivo para a solubilização de fosfato mineral foi inoculada em cada placa a estirpe de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 05. A determinação do halo de solubilização formado ao redor das colônias foi realizada no terceiro e décimo dia após a inoculação. Os índices de solubilização (IS) foram calculados através da fórmula:

$$IS = \text{diâmetro do halo (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$$

Os isolados foram classificados quanto à capacidade de solubilização em baixa (IS<2), média (2≤ IS≤4) e alta (IS>4) (BERRAQUERA et al., 1976). Os testes foram realizados em triplicatas. A partir das respostas ao teste de solubilização foi produzido um gráfico que representa média mais desvio padrão com auxílio do programa GraphPad Prism versão 8.0.

3.6 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfato Mineral em Meio Líquido

Os isolados bacterianos foram cultivados e tiveram suas densidades ópticas ajustadas como descrito anteriormente. Foi utilizado o meio de cultura líquido NBRIP acrescido 3% de NaCl e contendo CaHPO₄ (fosfato de cálcio dibásico) ou AlPO₄ (fosfato de alumínio) como fonte de fosfato, pH 7,0. Após o ajuste da DO, 300 µL de cada cultura bacteriana foi inoculada em tubos falcon de 50 mL contendo 35 mL de meio NBRIP e mantidas sob agitação de 150 rpm por 14 dias. Os testes foram realizados em triplicatas. Uma alíquota de 10 mL de cada unidade amostral foi transferida para tubos falcon de 15 mL e centrifugada a 6000g por 10 min para que o fosfato não solubilizado decantasse. O sobrenadante foi filtrado com auxílio de filtro de seringa com membrana de 0,22 µm para a remoção das células bacterianas do meio. O filtrado foi usado para a determinação do pH e diluído para a determinação de fósforo solúvel. A concentração de fósforo solúvel foi avaliada no dia da inoculação (tempo 0) e ao fim do período de incubação (14 dias) a partir de adaptações do método descrito por Teixeira et al. (2017).

Esta técnica se baseia na formação de complexo fósforomolibdico de cor azul obtido após redução do molibdato com ácido ascórbico e determinação por espectrofotometria. Para tal, foi preparada uma solução ácida de molibdato de amônio, que foi posteriormente diluída em água destilada na proporção 300 mL da solução para o volume final de 1 L. A determinação do fósforo solúvel foi feita a partir da adição de 5 mL de solução ácida de molibdato de amônio e aproximadamente 30 mg de ácido ascórbico em pó em 10 mL do meio filtrado e diluído de cada unidade amostral dispostas em copos descartáveis. A diluição de cada amostra vai variar de acordo com o isolado e a fonte de P. Em seguida, cada copo foi agitado manualmente por 1 a 2 minutos com movimentos circulares, e então foram deixados em repouso por 1 hora para o devido desenvolvimento da cor. Por fim, foi feita a leitura da DO por espectrofotometria a 660 nm. A curva padrão foi determinada de acordo com Teixeira et al. (2017). A conversão das leituras em teor de fósforo em mg/L foi feita a partir da seguinte equação, adaptada de Teixeira et al. (2017).

$$P = \frac{L - b}{a} * d$$

Em que:

P – concentração de fósforo disponível, em mg/L

L – leitura da amostra, em absorbância

a – coeficiente angular da reta dos padrões (intercepto)

b – coeficiente linear da reta dos padrões

d – fator de diluição

A partir das respostas ao teste de solubilização foi produzido um gráfico que representa média mais desvio padrão com auxílio do programa GraphPad Prism versão 8.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das Rizobactérias a Partir do Sequenciamento Parcial do Gene de 16S rDNA

A partir da análise de sequência parcial do gene 16S rDNA, 63,8% (30/47) dos isolados pertencem ao filo Proteobacteria e 36,2% (17/47) pertencem ao filo Firmicutes (Tabela 1). Na árvore filogenética dos isolados do filo Proteobacteria foi observada a separação das bactérias em diferentes gêneros, com a formação de quatro clados (Figura 1). No primeiro há um agrupamento dos isolados 99, 102, 104, 151 e 162 com os membros do gênero *Kushneria* sp. depositados no banco de dados, o que indica que estes isolados pertencem a este gênero. No segundo clado houve um agrupamento dos isolados 08, 16, 148, 149 e 157 com bactérias do gênero *Halomonas* sp.; no terceiro clado o agrupamento dos isolados 48, 51, 134, 140, 141, 161, 183 e 197 com isolados do gênero *Pseudomonas* sp. e no quarto, o agrupamento dos isolados 11, 12, 15, 34, 67, 97, 127, 143, 164 e 150 com membros do gênero *Pantoea* sp. e *Enterobacter* sp. As sequências dos isolados 15 e 150 apresentaram maior identidade com sequências depositadas no NCBI de *Pantoea* sp. e as demais com sequências de diferentes espécies do gênero *Enterobacter*. *Pantoea* foi delineado como gênero há aproximadamente 30 anos (WALTERSON et al., 2015).

A taxonomia inicial dos membros do gênero *Pantoea* é bastante complexa, com alguns dos primeiros membros do grupo sendo classificados como *Bacillus agglomerans* e *Enterobacter agglomerans* (WALTERSON et al., 2015). Diversos isolados bacterianos mais tarde reconhecidos com membros desse gênero foram descritos como espécies de diferentes gêneros ao longo do século XX, como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* e *Pseudomonas* (TINDALL et al., 2014; WALTERSON et al., 2015). Nomes associados a membros deste grupo como *Bacterium herbicola*, *Pseudomonas herbicola*, *Erwinia herbicola* e *E. milletiae*, foram estabelecidos como sinônimo por Ewing e Fife (1972, apud TINDALL, 2014). Posteriormente, *E. herbicola*, *E. milletiae* e *E. agglomerans* também foram reconhecidos como sinônimos por Gavini et al. (1989, apud TINDALL, 2014). O grupo recebeu o nome proposto *Pantoea agglomerans*, que serviu como tipo nomenclatural para o estabelecimento do gênero *Pantoea* (TINDALL, 2014).

O isolado 145 agrupou-se junto aos isolados do filo Proteobacteria, mas não se associou a nenhum clado. A sequência do banco de dados NCBI mais próxima com a desse isolado foi a de bactérias não cultiváveis, com identidade entre seus genes 16S rDNA de 93,44% (Tabela 1). Isso sugere a possibilidade de se tratar de uma nova espécie bacteriana. O sequenciamento de outras regiões do genoma ou sua totalidade deve ser realizada para confirmação.

Tabela 1. Identificação dos isolados bacterianos com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

Isolado	Identificação/NCBI blast	Tamanho (pb)	E-value	% de identificação
8	<i>Halomonas</i> sp./MT509796.1	524	0	100,00%
10	<i>Staphylococcus</i> sp./LC511705.1	983	0	99,90%
11	<i>Enterobacter</i> sp./EF198245.1	868	0	99,77%
12	<i>Enterobacter</i> sp./MT409542.1	885	0	100,00%
15	<i>Pantoea</i> sp./KF003383.1	782	0	96,34%
16	<i>Halomonas</i> sp./MT760104.1	998	0	99,90%
19	<i>Staphylococcus</i> sp./KT261167.1	951	0	99,79%
34	<i>Enterobacter</i> sp./MH988744.1	811	0	99,26%
48	<i>Pseudomonas</i> sp./CP111030.1	805	0	100,00%
49	<i>Bacillus</i> sp./OP910009.1	526	0	98,29%
51	<i>Pseudomonas</i> sp./CP111030.1	775	0	100,00%
58	<i>Halobacillus</i> sp./MT433871.1	807	0	99,88%
67	<i>Citrobacter</i> sp./MT263019.1	606	0	97,19%
85	<i>Bacillus</i> sp./CP049019.1	963	0	100,00%
88	<i>Oceanobacillus</i> sp./MH118526.1	951	0	99,89%
89	<i>Bacillus</i> sp./CP049019.1	962	0	100,00%
94	<i>Oceanobacillus</i> sp./MH118526.1	982	0	99,49%
96	<i>Staphylococcus</i> sp./LC511705.1	746	0	100,00%
97	<i>Enterobacter</i> sp./MK872311.1	899	0	99,44%
99	<i>Kushneria</i> sp./NR_044001.1	970	0	100,00%
100	<i>Staphylococcus</i> sp./MT550814.1	601	0	98,34%
101	<i>Staphylococcus</i> sp./MT353655.1	625	0	100,00%
102	<i>Kushneria</i> sp./NR_044001.1	998	0	99,90%
104	<i>Kushneria</i> sp./LR655847.1	672	0	99,70%
120	<i>Bacillus</i> sp./MT126504.1	578	0	86,90%
127	<i>Enterobacter</i> sp./MK559552.1	703	0	99,15%
132	Uncultured <i>Bacillus</i> /FJ957715.1	857	0	100,00%
134	<i>Pseudomonas</i> sp./OP737584.1	455	0	100,00%
140	<i>Pseudomonas</i> sp./OP737584.1	923	0	100,00%
141	<i>Pseudomonas</i> sp./KY072850.1	885	0	99,89%
143	<i>Enterobacter</i> sp./MT579677.1	605	0	100,00%
145	Uncultured bacterium/HQ143327.1	841	0	93,44%
146	<i>Bacillus</i> sp./MH046849.1	524	0	92,18%
148	<i>Halomonas</i> sp./KP715923.1	719	0	99,86%
149	<i>Halomonas</i> sp./KY436502.1	578	0	98,62%
150	<i>Pantoea</i> sp./MH915636.1	525	0	88,95%
151	<i>Kushneria</i> sp./AB970650.1	635	0	100,00%
157	<i>Halomonas</i> sp./MT760104.1	750	0	99,47%
161	<i>Pseudomonas</i> sp./OP737584.1	962	0	99,79%
162	<i>Kushneria</i> sp./KF560351.1	702	0	100,00%
164	<i>Enterobacter</i> sp./MT613378.1	856	0	99,30%
183	<i>Pseudomonas</i> sp./MN625859.1	577	0	93,59%
186	<i>Enterobacter</i> sp./KR189294.1	873	0	99,66%
197	<i>Pseudomonas</i> sp./OP737601.1	473	0	100,00%
231	<i>Bacillus</i> sp./CP115738.1	962	0	100,00%
294	<i>Bacillus</i> sp./KX456341.1	981	0	100,00%
308	<i>Straphylococcus</i> sp./MT550814.1	861	0	100,00%

Para os isolados do filo Firmicutes, também foi possível a distinção dos diferentes gêneros bacterianos (Figura 2), com a formação de quatro clados na árvore filogenética. Os isolados 49, 85, 89, 120, 146, 231 e 294 agruparam-se com diferentes espécies do gênero *Bacillus* sp., os isolados 88 e 94 agruparam-se no segundo clado com membros de *Oceanobacillus* sp., no terceiro clado, os isolados 10, 19, 96, 100, 101, 132 e 308 agruparam-se com *Staphylococcus* sp., e o isolado 58 com *Halobacillus* sp.

Nas últimas décadas o sequenciamento de fragmentos do gene 16S rDNA vem sendo amplamente utilizado para a identificação de bactérias (WOO et al., 2008; PARKS et al., 2018). Esse método representou grande avanço para estudos taxonômicos e é particularmente importante para a identificação de bactérias com características fenotípicas incomuns, bactérias raras, aquelas de crescimento lento ou não cultiváveis (WOO et al., 2008). No entanto, análises taxonômicas microbianas baseadas nas relações do gene 16S rDNA têm limitações, como a baixa resolução filogenética nas classificações taxonômicas mais altas e mais baixas e sequências químéricas produzidas por PCR que podem corromper topologias de árvores reunindo grupos díspares (PARKS et al., 2018). Por outro lado, Johnson et al. (2019) defendem que o sequenciamento de todo o comprimento das sequências de 16s rDNA tem o potencial de fornecer resolução taxonômica de comunidades bacterianas em nível de espécie e cepa. Apesar das limitações, o sequenciamento de fragmentos do gene 16s rDNA continua sendo uma importante ferramenta para a identificação inicial de bactérias até o nível de gênero. Para a confirmação da identificação dos isolados a nível de espécie será necessário o sequenciamento de outros genes marcadores, como 23s rDNA, genes *housekeeping* ou mesmo o sequenciamento de todo o genoma (SARETHY et al., 2014; PARKS et al., 2018).

Os principais grupos taxonômicos de bactérias promotoras de crescimento vegetal pertencem a Proteobacteria e Firmicutes. Sendo *Bacillus* sp. o gênero mais reconhecido de Firmicutes como indutor de crescimento vegetal. Os gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Enterobacter* e *Rahnella* são os mais representativos do filo Proteobacteria (GAMALERO et al. 2020). Uma vez que estes isolados bacterianos foram isolados da rizosfera de plantas halófitas em meios contendo alta concentração de NaCl, é importante que seja avaliada à sua habilidade de crescimento em diferentes concentrações de sal.

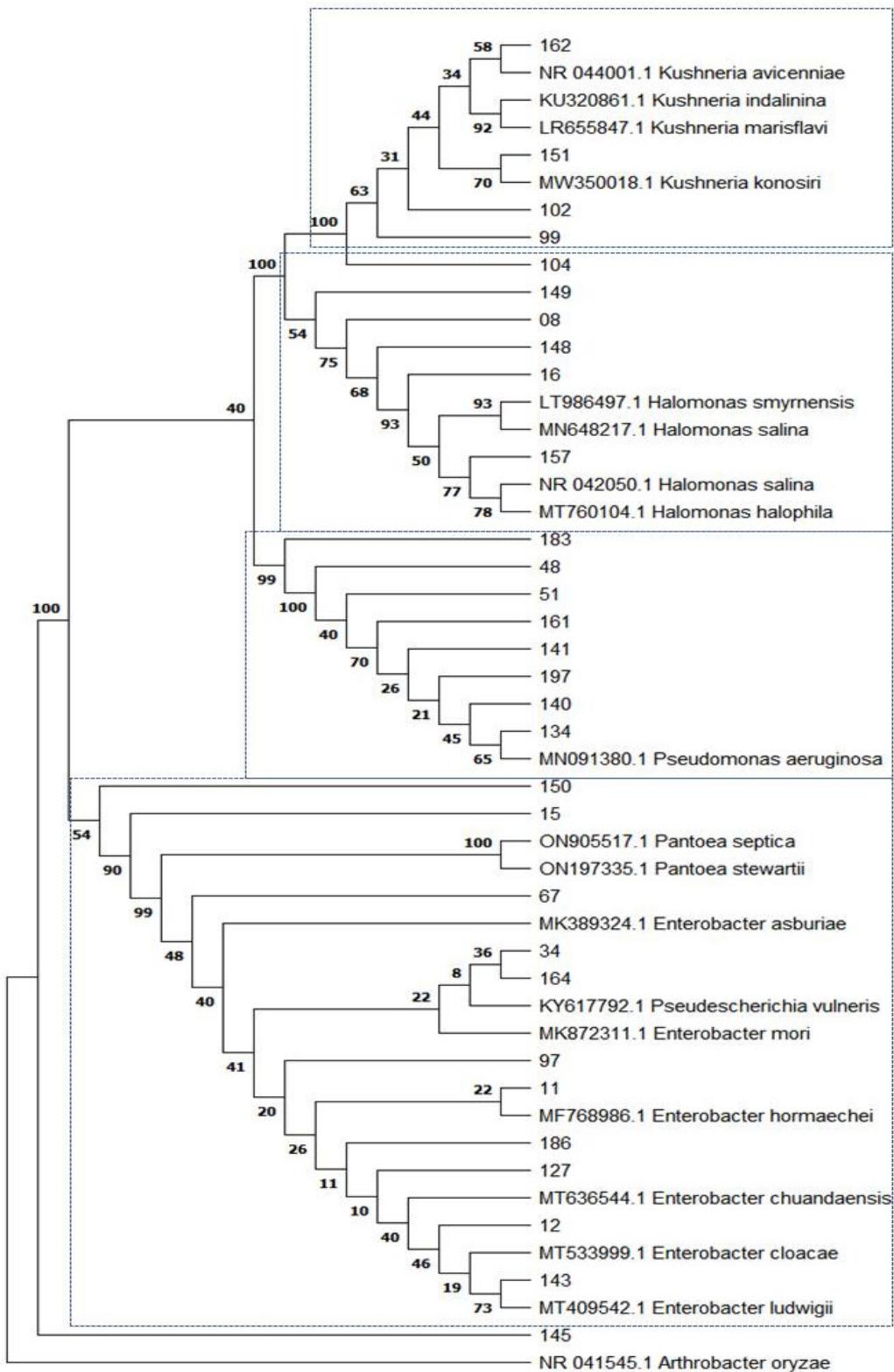


Figura 1. Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining e modelo Tajima-Nei baseada nas sequências do gene 16S rDNA de bactérias do filo Proteobacteria isoladas da rizosfera de plantas halófitas. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap a partir de 1.000 réplicas.

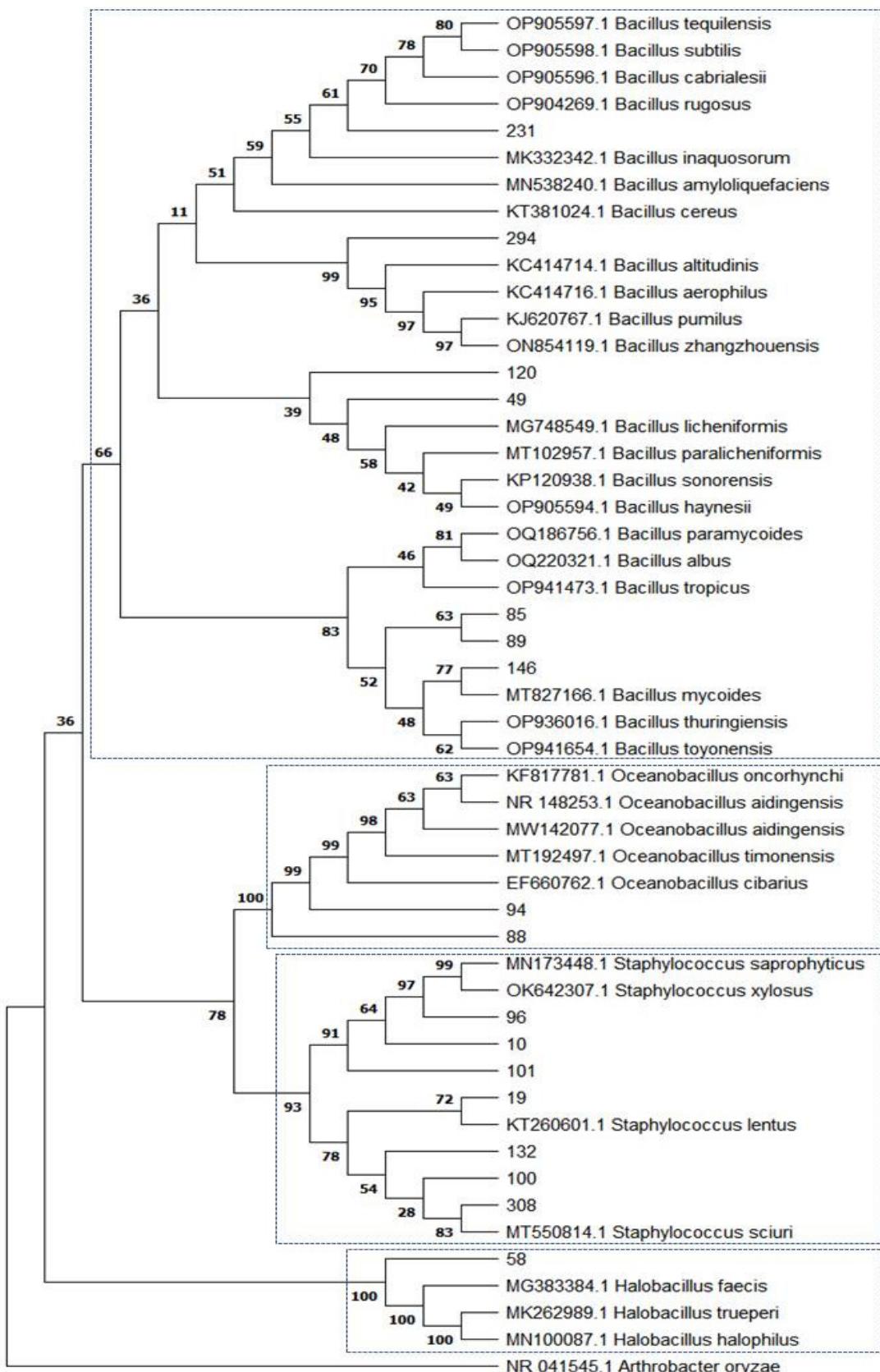


Figura 2. Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining e modelo Tajima-Nei baseada nas sequências do gene 16S rDNA de bactérias do filo Firmicutes isoladas da rizosfera de plantas halófitas. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap a partir de 1.000 réplicas.

4.2 Classificação Quanto à Resposta à Salinidade

Há divergências na literatura quanto à classificação dos microrganismos em relação à salinidade, especialmente em relação aos halofílicos, que se dividem entre fracos, moderados e extremos. AMOOZEGAR et al. (2019) determinam que halófilos fracos apresentam crescimento ótimo entre 1 a 5% de NaCl, moderados de 5 a 20% e extremos de 20 a 30% de NaCl. Diferentemente, SINGH et al. (2019) consideram como halófilos fracos microrganismos aqueles que apresentam crescimento ótimo em meios com 1% a 3% de NaCl, moderados 3% e 15% e halófilos extremos com crescimento ótimo acima de 15% de NaCl. Já em relação aos microrganismos halotolerante, é bem aceito que esses são capazes de crescer em ambientes com concentrações elevadas de sal, mas que apresentam crescimento ótimo na ausência dele (AMOOZEGAR et al., 2019; SINGH et al., 2019). Neste trabalho consideramos como halotolerantes as bactérias que apresentaram seu desenvolvimento ótimo em meios contendo 0,5% de NaCl nas primeiras 24 horas após a inoculação, mesmo que também tenham crescido em concentrações mais elevadas no mesmo período (Tabela 2).

Entre os 47 isolados, 15 foram classificados como halofílicos. Ao se considerar a classificação proposta por AMOOZEGAR et al. (2019), nove foram considerados halofílicos fracos e seis como halofílicos moderados. Já de acordo com a classificação de SINGH et al. (2019) os 15 isolados halofílicos foram considerados halofílicos moderados (Tabela 2). Entre os 15 isolados classificados como halofílicos, duas foram identificadas como representantes do gênero *Halomonas* (8, 16 e 149), duas como *Pseudomonas* (48 e 134), duas *Enterobacter* (12, 34 e 127), dois *Staphylococcus* (19, 96 e 100), um *Bacillus* (49), um *Halobacillus* (58) e os isolados 15 e 150, pertencentes à família Enterobacteriaceae.

As 32 bactérias classificadas como halotolerantes, que apresentam crescimento ótimo em meios contendo 0,5% de NaCl, cresceram em uma ampla faixa de concentrações de sal, desenvolvendo-se em sua maioria até as concentrações de até 15% de NaCl. Seis dos isolados halotolerantes pertencem ao gênero *Kushneria* (99, 102 e 104), *Pseudomonas* (51), *Oceanobacillus* (94) e *Bacillus* (132) se desenvolveram em meios com até 20% de sal. Durante o período de incubação, apenas quatro isolados halotolerantes apresentaram um intervalo de tolerância a salinidade menor, até 5%, sendo dois pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (161 e 197), um *Bacillus* (231) e um *Enterobacter* (164).

Tabela 2. Crescimento ótimo, intervalo de crescimento e classificação quanto à salinidade de bactérias isoladas da rizosfera de plantas halófitas (continua)

Isolado	Identificação	Crescimento ótimo	Intervalo de crescimento	Classificação quanto a salinidade*	Classificação quanto a salinidade**
8	<i>Halomonas sp.</i>	2,0% - 10%	1,0% - 10%	Halofílico moderado	Halofílico moderado
10	<i>Straphylococcus sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
11	<i>Enterobacter sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
12	<i>Enterobacter sp.</i>	2,5% - 5%	1,0% - 10%	Halofílico fraco	Halofílico moderado
15	<i>Pantoea sp.</i>	2,5% - 10%	1,0% - 10%	Halofílico moderado	Halofílico moderado
16	<i>Halomonas sp.</i>	2,5% - 10%	1,5% - 10%	Halofílico moderado	Halofílico moderado
19	<i>staphylococcus sp.</i>	1,5% - 10%	0,5% - 15%	Halofílico moderado	Halofílico moderado
34	<i>Enterobacter sp.</i>	1,5% - 5%	0,5% - 15%	Halofílico fraco	Halofílico moderado
48	<i>Pseudomonas sp.</i>	2,0% - 5%	0,5% - 15%	Halofílico fraco	Halofílico moderado
49	<i>Bacillus sp.</i>	1,5% - 5%	0,5% - 15%	Halofílico fraco	Halofílico moderado
51	<i>Pseudomonas sp.</i>	0,5% - 10%	0,5% - 20%	Halotolerante	Halotolerante
58	<i>Halobacillus sp.</i>	1,0% - 5%	0,5% - 15%	Halofílico fraco	Halofílico moderado
67	<i>Citrobacter sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
85	<i>Bacillus sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
88	<i>Oceanobacillus sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
89	<i>Bacillus sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
94	<i>Oceanobacillus sp.</i>	0,5% - 3,0%	0,5% - 20%	Halotolerante	Halotolerante
96	<i>Staphylococcus sp.</i>	1,0% - 5%	0,5% - 15%	Halofílico fraco	Halofílico moderado
97	<i>Enterobacter sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
99	<i>Kushneria sp.</i>	0,5% - 10%	0,5% - 20%	Halotolerante	Halotolerante
100	<i>Staphylococcus sp.</i>	5%	3,0% - 15%	Halofílico moderado	Halofílico moderado
101	<i>Staphylococcus sp.</i>	0,5% - 5%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
102	<i>Kushneria sp.</i>	0,5% - 10%	0,5% - 20%	Halotolerante	Halotolerante
104	<i>Kushneria sp.</i>	0,5% - 10%	0,5% - 20%	Halotolerante	Halotolerante
120	<i>Bacillus sp.</i>	0,5% - 15%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
127	<i>Enterobacter sp.</i>	1,5% - 10%	0,5% - 15%	Halofílico moderado	Halofílico moderado
132	<i>uncultured Bacillus sp.</i>	0,5% - 10%	0,5% - 20%	Halotolerante	Halotolerante
134	<i>Pseudomonas sp.</i>	1,5% - 10%	0,5% - 15%	Halofílico moderado	Halofílico moderado

Tabela 2. Continuação

Isolado	Identificação	Crescimento ótimo	Intervalo de crescimento	Classificação quanto a salinidade*	Classificação quanto a salinidade**
140	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5% - 10%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
141	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5% - 10%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
143	<i>Enterobacter</i> sp.	0,5% - 10%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
145	<i>Uncultured bacterium</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
146	<i>Bacillus</i> sp.	0,5% - 10%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
148	<i>Halomonas</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
151	<i>Kushneria</i> sp.	0,5% - 15%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
157	<i>Halomonas</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
161	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 5%	Halotolerante	Halotolerante
162	<i>Kushneria</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
164	<i>Enterobacter</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 5%	Halotolerante	Halotolerante
183	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5% - 10%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
186	<i>Enterobacter</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante
197	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 5%	Halotolerante	Halotolerante
231	<i>Bacillus</i> sp.	0,5% - 5%	0,5% - 5%	Halotolerante	Halotolerante
294	<i>Bacillus</i> sp.	0,5% - 10%	0,5% - 10%	Halotolerante	Halotolerante
308	<i>Straphylococcus</i> sp.	0,5% - 10%	0,5% - 15%	Halotolerante	Halotolerante

* Classificação segundo AMOOZEGAR et al. (2019). ** Classificação segundo SINGH et al. (2019).

Diversos trabalhos relatam a identificação de rizobactérias halofílicas e halotolerantes que apresentam uma série de fatores de promoção de crescimento e capacidade de atenuar os efeitos do estresse salino em plantas. Egamberdieva et al. (2008) isolaram uma cepa de *Staphylococcus saprophytus* da rizosfera de plantas de trigo cultivadas em solos salinizados no Uzbequistão que foi capaz de aumentar o crescimento das raízes e da parte aérea quando inoculada em sementes de trigo sob estresse salino. Din et al. (2019) constataram a capacidade de diferentes isolados do gênero *Bacillus sp.* em mitigar o efeito do estresse salino na germinação de sementes de trigo. Jah et al. (2012) identificou um isolado identificado como *Pseudomonas sp.* proveniente da rizosfera de *Salicornia brachiata* que apresentou atividades significativas de promoção do crescimento de plantas quando inoculada em sementes da mesma planta. Zhu et al. (2011) identificaram um isolado de *Kushneria sp.* halotolerante do sedimento da salina de Daqiao na costa leste da China com alta solubilização de fosfato em meios de cultura com concentrações de até 20% de NaCl. Mukhtar et al., (2019) observaram que sementes de milho pertencentes a uma variante sensível ao sal inoculadas com isolados bacterianos de linhagens de *Bacillus sp.*, *Kocuria rosea*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas veronii* halofílicas apresentaram melhor crescimento de raiz e parte aérea em comparação com plantas controle (com ou sem sal).

4.3 Solubilização de Fosfato em Meio Sólido

Todos os isolados cresceram no meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio dibásico (CaHPO_4) como fonte de fosfato, no entanto não foi observado a formação de halos nos isolados identificados como *Bacillus sp.* (49), *Pseudomonas sp.* (140) e *Halomonas sp.* (157). Entre os demais isolados, 32% (15/47) apresentaram índice de solubilização baixo, 60% (28/47) médio e 2% (1/47) alto (Tabela 3). O último, identificado como *Halobacillus sp.* (58), apresentou um índice de solubilização médio e constante até o décimo dia após a inoculação e apresentou o aumento no índice de solubilização entre o décimo e o décimo sétimo dia após a inoculação (Figura 3). A maioria dos isolados também cresceram no meio de cultura contendo fosfato de alumínio (AlPO_4) como fonte de P, porém não houve a formação de halos.

A utilização do fosfato de cálcio para a seleção de bactérias potencialmente solubilizadoras de fosfato é imprecisa, pois sua solubilidade é facilmente alcançada com pequenas mudanças no pH (BASHAN et al., 2013). A solubilidade do fosfato de cálcio aumenta exponencialmente com a diminuição do pH para níveis inferiores a 6,5. Já o fosfato de alumínio possui uma baixa solubilidade entre do pH 5,5 e 4,5 e aumenta abaixo de pH 3,5 (MERBACH et al. 2009; BASHAN et al., 2013). Um dos principais mecanismos de solubilização do fosfato de cálcio por bactérias é a liberação de prótons (H^+) ou de ácidos inorgânicos de fácil dissolução (MERBACH et al. 2009; BASHAN et al., 2013).

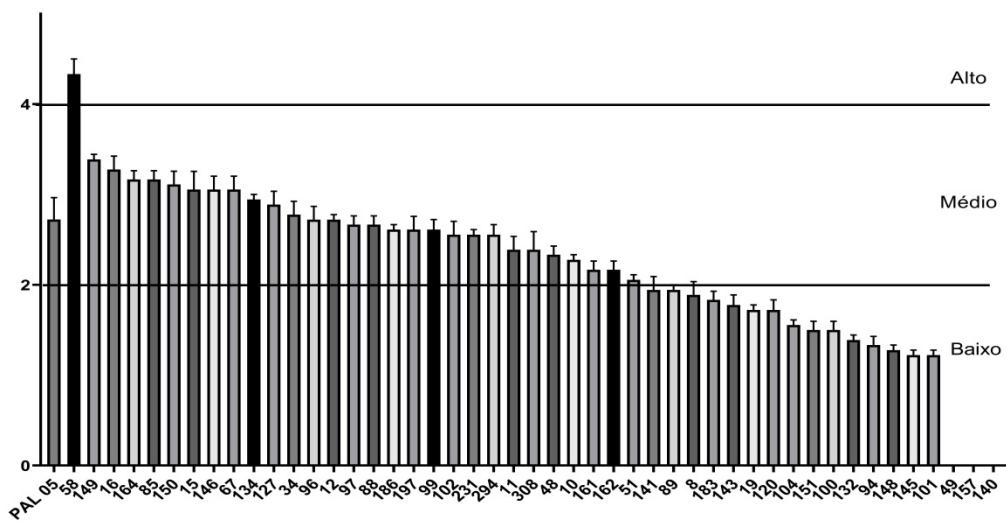
Tabela 3. Índice de solubilização em meio de cultura sólido com CaHPO₄ e quantificação do P solubilizado e valor de pH final em meio de cultura líquido contendo CaHPO₄ e AlPO₄ (continua)

Isolado	Identificação	Índice de Solub.	P solúvel (CaHPO ₄) (mg/kg)	pH final (CaHPO ₄)	P solúvel (AlPO ₄) (mg/kg)	pH final (AlPO ₄)
8	<i>Halomonas sp.</i>	Baixa	494,77	4,46	6,89	4,57
10	<i>Straphylococcus sp.</i>	Média	517,95	4,27	11,29	3,51
11	<i>Enterobacter sp.</i>	Média	549,81	4,28	2,56	3,73
12	<i>Enterobacter sp.</i>	Média	383,86	4,06	6,12	3,76
15	<i>Pantoea sp.</i>	Média	271,16	4,62	14,56	3,02
16	<i>Halomonas sp.</i>	Média	497,86	4,43	13,08	4,64
19	<i>staphylococcus sp.</i>	Baixa	190,32	5	2,91	3,7
34	<i>Enterobacter sp.</i>	Média	230,03	5,26	4,28	3,62
48	<i>Pseudomonas sp.</i>	Média	570,02	4,38	4,10	3,85
49	<i>Bacillus sp.</i>	Baixa	311,34	4,96	14,62	4,48
51	<i>Pseudomonas sp.</i>	Média	366,74	4,41	3,09	4,57
58	<i>Halobacillus sp.</i>	Alta	424,51	4,35	9,15	3,55
67	<i>Citrobacter sp.</i>	Média	556,47	3,69	4,22	2,87
85	<i>Bacillus sp.</i>	Média	474,80	4,17	2,50	2,82
88	<i>Oceanobacillus sp.</i>	Média	310,39	4,13	4,22	4,28
89	<i>Bacillus sp.</i>	Baixa	210,65	4,5	61,10	2,94
94	<i>Oceanobacillus sp.</i>	Baixa	218,14	5,11	45,83	3,76
96	<i>Staphylococcus sp.</i>	Média	344,27	4,74	7,55	4,8
97	<i>Enterobacter sp.</i>	Média	327,98	4,75	5,29	4,7
99	<i>Kushneria sp.</i>	Média	274,25	4,95	13,02	4,98
100	<i>Staphylococcus sp.</i>	Baixa	532,57	4,72	14,68	4,69
101	<i>Staphylococcus sp.</i>	Baixa	466,36	4,78	11,12	3,53
102	<i>Kushneria sp.</i>	Média	989,59	4,12	10,88	3,19
104	<i>Kushneria sp.</i>	Baixa	345,34	4,31	2,50	3,64
120	<i>Bacillus sp.</i>	Baixa	757,61	3,85	4,99	2,84
127	<i>Enterobacter sp.</i>	Média	442,94	4,44	3,27	3,92
132	<i>uncultured Bacillus sp.</i>	Baixa	167,14	4,82	5,77	3,62

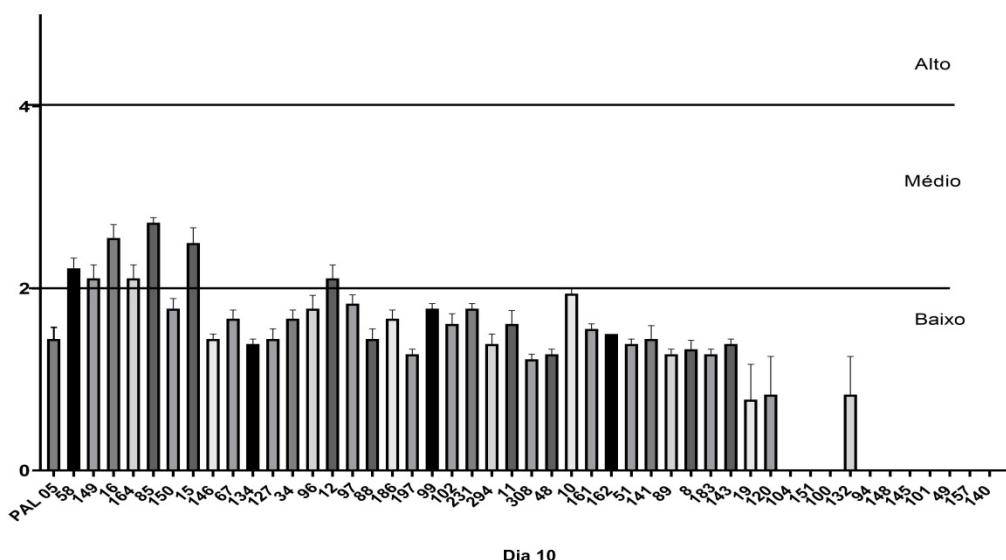
Tabela 3. Continuação

Isolado	Identificação	Índice de Solub.	P solúvel (CaHPO4) (mg/kg)	pH final (CaHPO4)	P solúvel (AlPO4) (mg/kg)	pH final (AlPO4)
134	<i>Pseudomonas</i> sp.	Média	485,62	3,92	9,21	3,76
140	<i>Pseudomonas</i> sp.	Baixa	365,43	4,4	8,98	3,7
141	<i>Pseudomonas</i> sp.	Baixa	410,01	4,67	6,30	3,8
143	<i>Enterobacter</i> sp.	Baixa	260,58	4,78	5,29	4,88
145	<i>Uncultured bacterium</i> sp.	Baixa	783,29	5,55	1,84	4
146	<i>Bacillus</i> sp.	Média	557,77	4,47	11,77	3,01
148	<i>Halomonas</i> sp.	Baixa	553,73	4,05	3,27	3,39
149	<i>Halomonas</i> sp.	Média	213,86	4,67	7,91	3,63
150	<i>Pantoea</i> sp.	Média	436,04	4,57	23,89	3,47
151	<i>Kushneria</i> sp.	Baixa	266,29	4,43	9,75	3,15
157	<i>Halomonas</i> sp.	Baixa	401,45	4,47	9,75	2,96
161	<i>Pseudomonas</i> sp.	Média	292,80	4,74	3,39	4,84
162	<i>Kushneria</i> sp.	Média	587,73	4,32	5,41	4,57
164	<i>Enterobacter</i> sp.	Média	648,12	4,2	7,01	4,59
183	<i>Pseudomonas</i> sp.	Baixa	376,49	4,23	21,28	3,41
186	<i>Enterobacter</i> sp.	Média	956,37	3,9	12,36	3,63
197	<i>Pseudomonas</i> sp.	Média	687,59	4,96	4,22	4,78
231	<i>Bacillus</i> sp.	Média	500,48	4,49	1,84	4,31
294	<i>Bacillus</i> sp.	Média	351,64	4,72	8,02	3,65
308	<i>Straphylococcus</i> sp.	Média	240,49	4,63	12,60	4,31
Pal 05	<i>G. diazotrophicus</i>	Média	290,06	4,84	6,06	2,15

Data 17



Dia 3



Dia 10

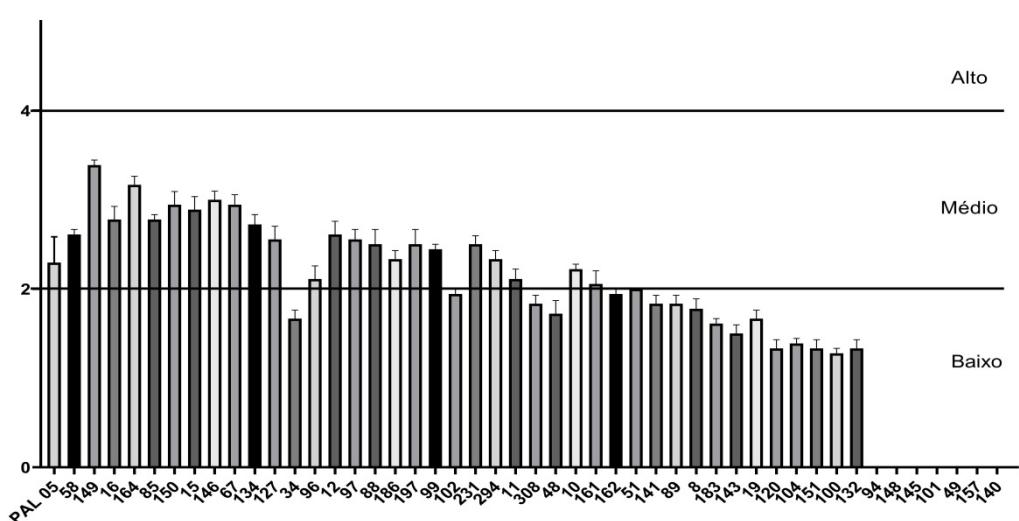


Figura 3. Índice de solubilização de fosfato de cálcio dibásico em meio de cultura sólido no terceiro, décimo e décimo sétimo dia após a incubação com bactérias isoladas da rizosfera de plantas halófitas.

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato no meio de cultura sólido é uma técnica de simples execução e pouco custosa e serviu como um indicador universal para a solubilização de fosfato por mais de meio século (BASHAN et al. 2013). Esse método se baseia na formação de um halo translúcido de solubilização ao redor das colônias (Figura 4). Porém, a disponibilização do P a partir de fontes minerais pelas bactérias pode se dar pela exsudação de ácidos orgânicos ou agente quelantes (BASHAN et al. 2013; KRISHNARAJ et al., 2015). Essas substâncias formam complexos insolúveis com os íons de Ca^{2+} , Al^{3+} ou Fe^{3+} , liberando o fósforo sem necessariamente levar a formação de halo de solubilização no meio de cultura sólido (MERBACH et al. 2009; BASHAN et al. 2013). Assim, a capacidade de solubilização de fosfato deve ser confirmada em meio de cultura líquido ou caracterização genética de potenciais bactérias solubilizadoras de fosfato (MERBACH et al. 2009; ZHU et al., 2011; LIU et al., 2014) .

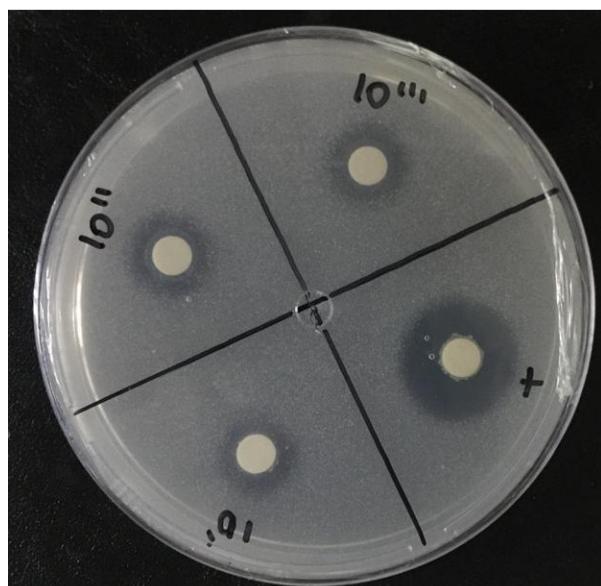


Figura 4. Meio de cultura sólido NBRIP inoculado com o isolado *Staphylococcus* sp. (10) e com o controle positivo *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 05.

4.4 Solubilização de Fosfato em Meio Líquido

Todos os 47 isolados apresentaram variações na quantidade de P disponível e redução no pH nos testes em meio líquido contendo CaHPO_4 (Figura 5, Tabela 3). Os isolados *Kushneria* sp. (102), *Enterobacter* sp. (186), (145) e *Bacillus* sp. (120) foram os que propiciaram a maior disponibilização de P no meio, 989,53 mg/L, 956,37 mg/L, 783, 82 mg/L e 757,60 mg/L, respectivamente. O pH final nos meios variou entre 5,43 e 3,71. O isolado *Kushneria* sp. (102) e *Enterobacter* sp. (186) apresentaram índice de solubilização médio no meio de cultura sólido com CaHPO_4 e os isolados (145) e *Bacillus* sp. (120) apresentaram baixo índice de solubilização no teste em meio sólido. Já o isolado *Halobacillus* sp. (58), com alto índice de solubilização no meio sólido, foi capaz de disponibilizar 424,51 mg/L, consideravelmente menos P em comparação aos demais isolados citados. Em uma comparação semelhante, Merbach et al. (2009) observaram que a cepa que disponibilizou a maior quantidade de fósforo a partir de fosfato de cálcio em meio líquido não formou halo de solubilização nos meios de cultura sólidos.

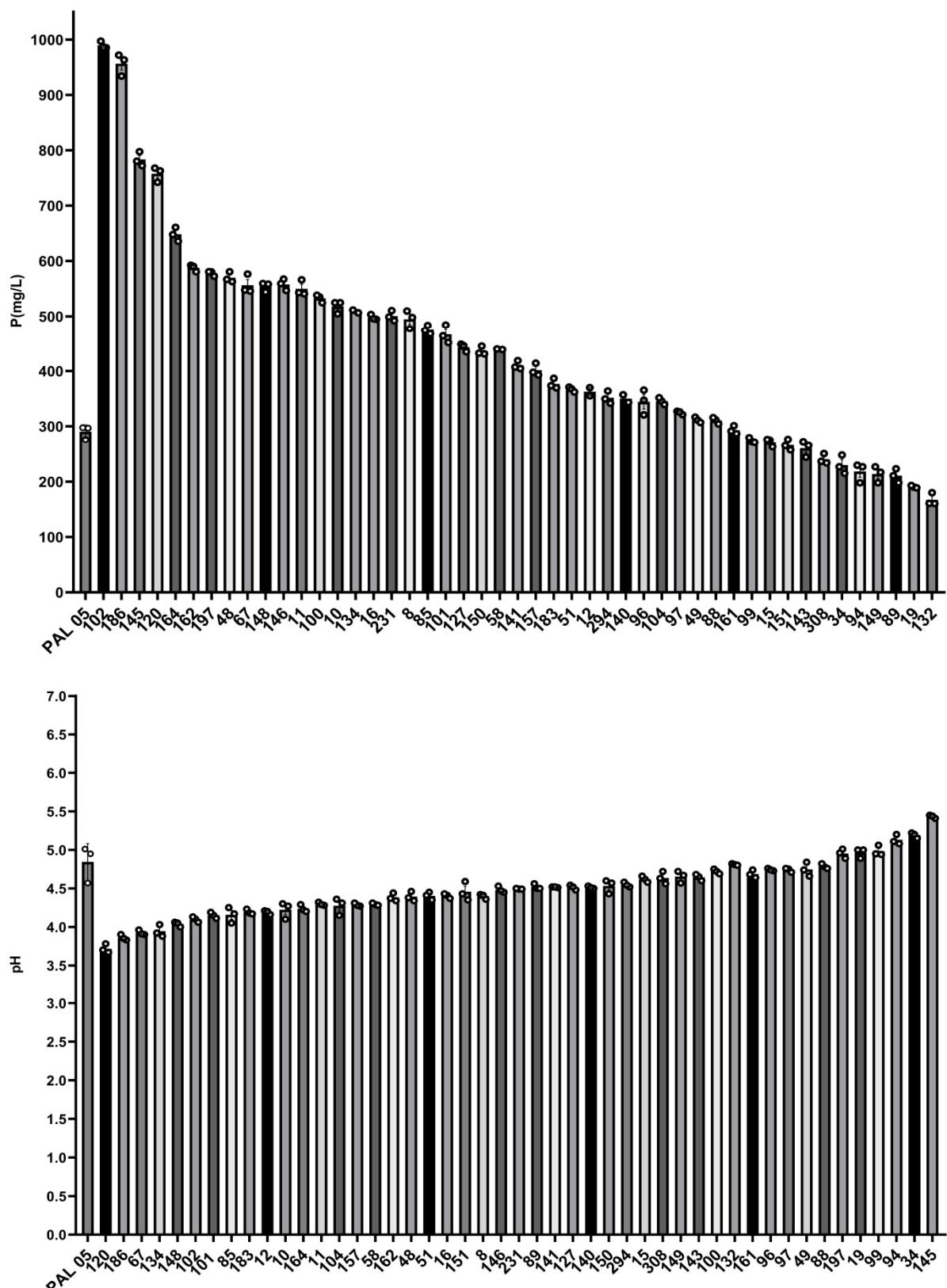


Figura 5. Quantidade de P solubilizado e pH em meios de cultura líquido contendo fosfato de cálcio dibásico como fonte de fósforo após 14 dias de incubação com bactérias isoladas da rizosfera de plantas halófitas.

Nos testes com fosfato de alumínio ($AlPO_4$) como fonte de P, todos os isolados apresentaram capacidade de solubilização. No entanto, a maioria chegou a quantidades inferiores a 20 mg/L, com um mínimo de 1,84 mg/L (Figura 6, Tabela 3). Os valores mais elevados de P disponível foram promovidos pelos isolados *Bacillus* sp. (89), *Oceanobacillus* sp. (94), *Pantoea* sp. (150) e *Pseudomonas* sp. (183), com 61,10 mg/L, 45,82 mg/L, 23,99 mg/L e 21,7 mg/L de P, respectivamente. O pH dos meios reduziu mais do que o observado nos meios contendo $CaHPO_4$, variando entre 4,98 e 2,82, mas não foi observada uma correlação com a solubilização (Figura 7). Os meios cultivados com os isolados *Bacillus* sp. (89), *Oceanobacillus* sp. (94), *Pantoea* sp. (150) e *Pseudomonas* sp. (183) apresentaram pH 2,9, 3,76, 3,47 e 3,41, respectivamente, no final do período de incubação. Por outro lado, o isolado *Staphylococcus* sp. (101) que reduziu o pH do meio a 2,8 foi capaz de solubilizar apenas 11,11 mg/L de P.

Ao se comparar o conjunto de resultados de solubilização entre cada uma das fontes, pode-se apontar que apesar da acidificação ser um dos fatores relacionados à dissolução do fosfato de alumínio nos meios que apresentaram pH final inferior a 3,5, não houve correlação entre a queda do pH e solubilização de P a partir do fosfato de alumínio (Figura 7). O principal mecanismo de solubilização do fósforo ligado a íons metálicos é a produção de ácidos orgânicos que atuam na formação de complexos metálicos e quelatos (BASHAN et al., 2013). Ânions de ácidos orgânicos têm a capacidade de realizar reações de troca de ligantes, mobilizando ânions de fosfato adsorvidos às superfícies cristalinas de $Fe(OH)^3$ e $Al(OH)^3$ (ARCAND & SCHNEIDER, 2006). A quelação envolve a formação de duas ou mais ligações coordenadas entre uma molécula aniónica ou polar e um cátion, resultando em um complexo de estrutura em anel fosfato (ARCAND & SCHNEIDER, 2006).

Formas insolúveis de fosfato podem ser dissolvidas por ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como ácidos cítrico e glucônico, que são produzidos e liberados por bactérias e fungos solubilizadores de fósforo (MERBACH et al. 2009; WAN et al. 2020). Merbach et al. (2009) observaram a produção de diversos ácidos orgânicos em bactérias com capacidade de solubilizar diferentes fontes de fosfato mineral. Esses autores apontam que isolados bacterianos mais eficientes em mobilizar P a partir de fosfato de cálcio produziram grandes quantidades de citrato e tartarato e em menor proporção, malato. Já as cepas solubilizadoras de fosfatos de ferro e alumínio os carboxilatos mais importantes foram o tartarato e o malato (MERBACH et al., 2009).

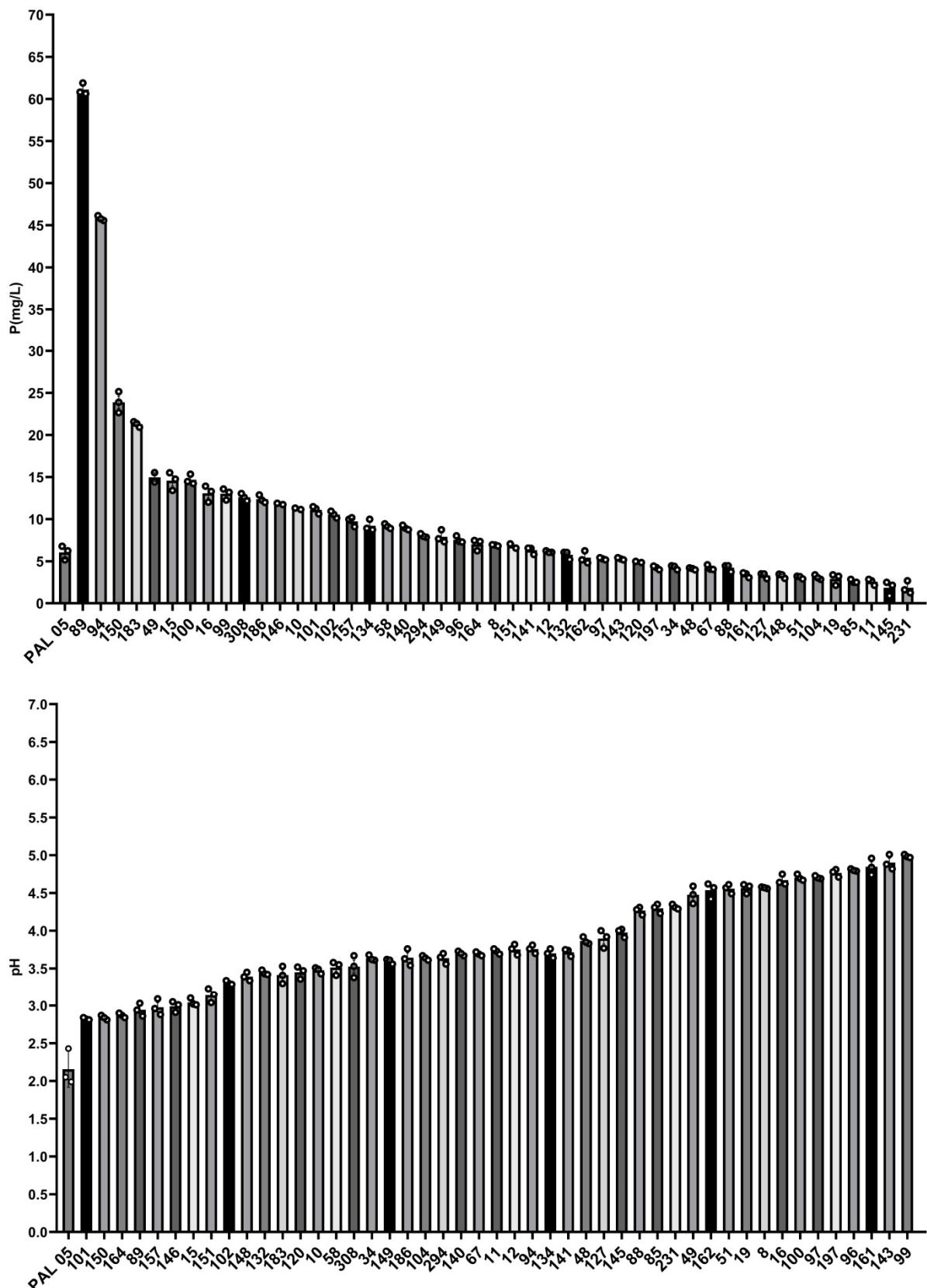


Figura 6. Quantidade de P solubilizado e pH em meios de cultura líquido contendo fosfato de alumínio como fonte de fósforo após 14 dias de incubação com bactérias isoladas da rizosfera de plantas halófitas.

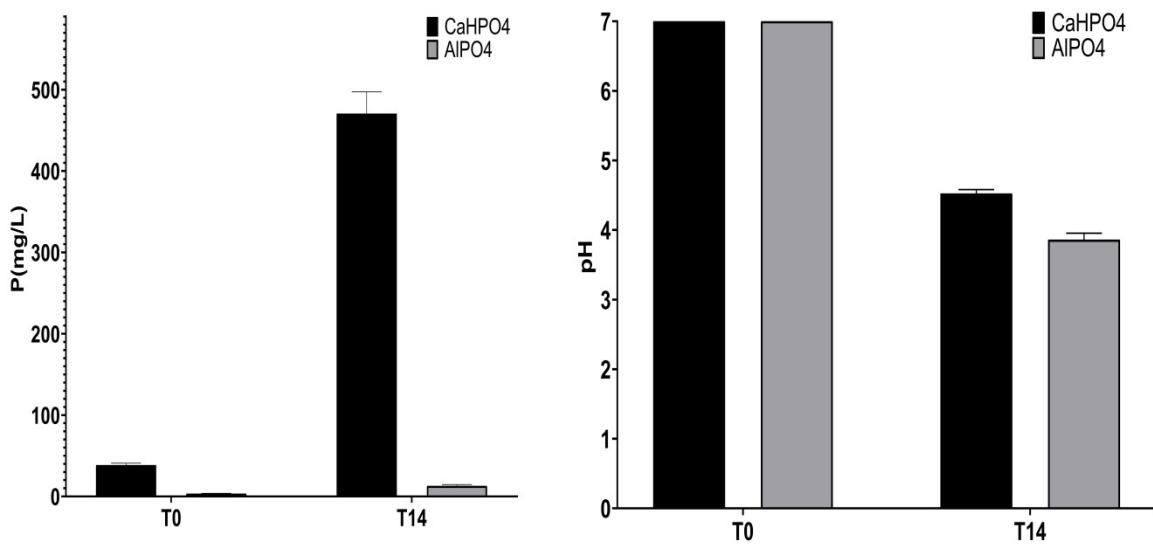


Figura 7. Médias de pH e P disponível em mg/L nos meios de cultura contendo CaHPO₄ e Al PO₄ no dia da inoculação (T0) e ao fim do período de incubação (T14).

Wan et al. (2020) identificaram um isolado de *Acinetobacter pitti* como bom solubilizador de fosfato. Este isolado foi capaz de disponibilizar cerca de 250 mg/L de P em meio líquido contendo fosfato de cálcio e 80 mg/L em meios com fosfato de alumínio. Zhu et al. (2011) isolaram uma cepa de *Kushneria* sp. que foi capaz de disponibilizar cerca de 280 mg/L de P a partir de fosfato de cálcio. Esse isolado foi posteriormente descrito como uma nova espécie nomeada com *Kushneria phosphatilytica* (DU et al., 2021). A cepa de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) utilizada pra a produção do inoculante BiomaPhos® foi capaz de disponibilizar 120,42 mg/L de P a partir do Ca₃(PO₄)₂ (ABREU et al., 2017). Já a cepa de *Bacillus megaterium* (CNPMS B119), que também compõe o referido inoculante, foi capaz de disponibilizar 37,3 mg/L de P a partir da mesma fonte (OLIVEIRA et al. 2009).

Nos meios contendo fosfato de cálcio, os maiores valores de P solúvel observados foram alcançados pelo isolado *Kushneria* sp. (102), 989,53 mg/L de P, *Enterobacter* sp. (186), 956,37 mg/L, isolado (145), 783, 82 mg/L e *Bacillus* sp. (120), 757,60 mg/L. Ao comparar os resultados para o P solubilizado a partir do fosfato de cálcio no presente trabalho com outros estudos, observa-se que aqui obtivemos valores bastante elevados. Isso pode estar relacionado ao fato de o CaHPO₄ ser mais facilmente solubilizado do que o Ca₃(PO₄)₂, utilizado em outros estudos (BASHAN et al., 2013).

Já a solubilização do fosfato a partir do fosfato de alumínio foi mais acentuada para os isolados *Bacillus tropicus* (89), *Oceanobacillus* sp. (94), que elevaram o P solúvel em 61,10 mg/L e 45,82 mg/L, respectivamente. Ambos os isolados apresentaram uma capacidade relativamente baixa de solubilização do fosfato de cálcio em comparação com os demais, atingindo os valores de 210,65 mg/L, 218,14 mg/L de P. Wan et al (2020) observou um comportamento semelhante para uma cepa de *Bacillus* sp. que foi capaz de solubilizar cerca de 60 mg/L de P a partir de fosfato de cálcio, mas apresentou capacidade consideravelmente elevada para fosfato de ferro e alumínio, cerca de 30 mg/L e 50 mg/L, respectivamente. Os isolados *Pantoea* sp. (150) e *Pseudomonas* sp. (183) também apresentaram atividade de solubilização de fosfato de alumínio superior aos demais, elevando o P solúvel no meio para 23,99 mg/L e 21,7 mg/L, respectivamente. Os mesmos apresentaram valores intermediários para o fosfato de cálcio, 436,04 mg/L e 376,49 mg/L de P solúvel.

Os isolados *Bacillus* sp. (89), *Oceanobacillus* sp. (94) solubilizaram os maiores teores de P a partir do AlPO₄. Já os isolados *Kushneria* sp. (102), *Bacillus* sp. (120), *Enterobacter*

sp. (186) e o (145), foram os que apresentaram a solubilização mais expressiva para o CaHPO₄. Os isolados *Pantoea* sp. (150) e *Pseudomonas* sp. (183) apresentaram capacidade de solubilização expressiva para ambas as fontes testadas. Em relação a resposta a salinidade, esses isolados foram classificados com halotolerantes, com exceção do isolado *Pantoea* sp. (150), que foi classificado como halofílico moderado tanto pela classificação de Amoozegar et al. (2019), quanto para Singh et al. (2019), uma vez que seu crescimento ótimo variou entre 1,5% e 10%. Além disso, todos foram capazes de se desenvolver em meios com até 10% a 20% de NaCl. Desse modo, esses isolados são candidatos para testes com outras fontes de fosfato e para avaliação da atividade promotora de crescimento vegetal a partir inoculação de sementes, bem como para avaliações em experimentos em casa de vegetação e no campo.

5. CONCLUSÕES

Isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Kushneria* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Oceanobacillus* sp. e *Staphylococcus* sp. estão presentes na rizosfera de plantas halófitas. O isolado 145 apresentou maior similaridade com sequências de 16S rDNA de bactérias não cultivadas, o que indica que possivelmente pode se tratar de uma espécie não descrita.

Em relação a resposta a salinidade, 15 isolados dos gêneros, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Halomonas* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. e *Staphylococcus* sp. foram classificados com halofílicos fracos e moderados e 32 bactérias dos gêneros *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Halomonas* sp., *Kushneria* sp., *Pseudomonas* sp., *Oceanobacillus* sp. e *Staphylococcus* sp. foram classificadas como halotolerantes.

Os isolados foram capazes de se desenvolver em meios de cultura sólido com ambas as fontes de fosfato e apresentaram capacidade de solubilizar ambas as fontes nos meios líquidos. A solubilização do fosfato de cálcio foi mais expressiva que a do fosfato de alumínio. Os isolados de *Kushneria* sp. (102), *Enterobacter* sp. (186), 145 e *Bacillus* sp. (120) apresentaram maior eficiência na solubilização de fosfato de cálcio. Os isolados de *Bacillus* *tropicus* (89) e *Oceanobacillus* sp. (94) foram os mais expressivos na solubilização de fosfato de alumínio.

A ausência de halos translúcidos ao redor das colônias nos testes de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido não deve ser determinante para indicar a ausência de atividade de solubilização de fosfato. A atividade de solubilização de fosfato deve ser avaliada em meio de cultura líquido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. S.; FIGUEIREDO, J. E. F.; OLIVEIRA, C. A.; DOS SANTOS, V. L.; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. A.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, vol. 16, no. 1, 16 Feb. 2017.
- AFRIDI, M. S.; VAN HAMME, J. d.; BUNDSCHUH, J.; SUMAIRA; KHAN, M. N.; SALAM, A.; WAQAR, M.; MUNIS, M. F. H.; CHAUDHARY, H. J. Biotechnological approaches in agriculture and environmental management - bacterium *Kocuria rhizophila* 14ASP as heavy metal and salt- tolerant plant growth- promoting strain. **Biologia**, vol. 76, no. 10, p. 3091–3105, Oct. 2021.
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in microbiology**, vol. 8, p. 971, 2 Jun. 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- AMNA; UD DIN, B.; SARFRAZ, S.; XIA, Y.; KAMRAN, M. A.; JAVED, M. T.; SULTAN, T.; HUSSAIN MUNIS, M. F.; CHAUDHARY, H. J. Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC- deaminase producing *Bacillus* strains under induced salinity stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 183, p. 109466, 15 Nov. 2019.
- AMOOZEGAR, M. A.; SAFARPOUR, A.; NOGHABI, K. A.; BAKHTIARY, T.; VENTOSA, A. Halophiles and their vast potential in biofuel production. **Frontiers in microbiology**, vol. 10, p. 1895, 22 Aug. 2019.
- AZZI, V.; KANSO, A.; KAZPARD, V.; KOBEISSI, A.; LARTIGES, B.; EL SAMRANI, A. *Lactuca sativa* growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination. **Soil and Tillage Research**, vol. 165, p. 1–10, Jan. 2017.
- ARCAND, M. M.; SCHNEIDER, K. D. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, vol. 78, no. 4, p. 791–807, Dec. 2006.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual review of plant biology**, vol. 57, p. 233–266, 2006.
- BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 4, p. 465–479, May 2013.

BASHAN, Y.; MORENO, M.; TROYO, E. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. **Biology and fertility of soils**, vol. 32, no. 4, p. 265–272, 23 Nov. 2000.

BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; BONATELLI, M. L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E. W.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, vol. 206, p. 33–42, Jan. 2018.

BERRAQUERA, F. R.; BAYA, A.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars. Pharm.**, 1976.

BOITT, G.; SIMPSON, Z. P.; TIAN, J.; BLACK, A.; WAKELIN, S. A.; CONDRON, L. M. Plant biomass management impacts on short-term soil phosphorus dynamics in a temperate grassland. **Biology and Fertility of Soils**, vol. 54, no. 3, p. 397–409, Apr. 2018.

BULGARI, R.; FRANZONI, G.; FERRANTE, A. Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. **Agronomy**, vol. 9, no. 6, p. 306, 12 Jun. 2019.

CHEN, Q.; LIU, S. Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. **Frontiers in microbiology**, vol. 10, p. 2171, 19 Sep. 2019.

CHOPRA, A.; KUMAR VANDANA, U.; RAHI, P.; SATPUTE, S.; MAZUMDER, P. B. Plant growth promoting potential of *Brevibacterium sediminis* A6 isolated from the tea rhizosphere of Assam, India. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, vol. 27, p. 101610, Aug. 2020.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 42, no. 5, p. 669–678, May 2010.

COSTA, C. S. B.; HERRERA, O. B. Halophytic life in brazilian salt flats: biodiversity, uses and threats. In: KHAN, M. A.; BOËR, B.; ÖZTÜRK, M.; CLÜSENER-GODT, M.; GUL, B.; BRECKLE, S.-W. (eds.). **Sabkha Ecosystems**. Tasks for vegetation science. Cham: Springer International Publishing, 2016. vol. 48, p. 11–27.

DASSARMA, S.; DASSARMA, P. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 25, p. 120–126, 9 Jun. 2015.

DESALE, P.; PATEL, B.; SINGH, S.; MALHOTRA, A.; NAWANI, N. Plant growth promoting properties of *Halobacillus* sp. and *Halomonas* sp. in presence of salinity and heavy metals. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 54, no. 8, p. 781–791, Aug. 2014.

DIAS, N.S.; BLANCO F.F.; SOUZA E.R.; FERREIRA J.F.S.; NETO, O.N.S.; QUEIROZ, I.S.R. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Eds.). **Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados**. Fortaleza, INCTSAL. p.11-19, 2016.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. D. O.; BALDANI, V. L. D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**. 1999.

DODD, I. C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Microbial amelioration of crop salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, vol. 63, no. 9, p. 3415–3428, May 2012.

DU, G.-X.; QU, L.-Y.; HONG, X.-G.; LI, C.-H.; DING, D.-W.; GAO, P.; XU, Q.-Z. *Kushneria phosphatilytica* sp. nov., a phosphate-solubilizing bacterium isolated from a solar saltern. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 71, no. 2, Feb. 2021.

EGAMBERDIEVA, D.; ALIMOV, J.; SHURIGIN, V.; ALAYLAR, B.; WIRTH, S.; BELLINGRATH-KIMURA, S. D. Diversity and Plant Growth-Promoting Ability of Endophytic, Halotolerant Bacteria Associated with *Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze. **Plants**, vol. 11, no. 1, 24 Dec. 2021.

EGAMBERDIEVA, D.; KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; GAFUROVA, L.; KUCHAROVA, Z.; LUGTENBERG, B. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, vol. 10, no. 1, p. 1–9, Jan. 2008.

ETESAMI, H.; BEATTIE, G. A. Mining Halophytes for Plant Growth-Promoting Halotolerant Bacteria to Enhance the Salinity Tolerance of Non-halophytic Crops. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 148, 8 Feb. 2018.

FAO; GLOBAL MAP OF SALT-AFFECTED SOILS | FAO SOILS PORTAL | FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO** [s. d.]. Disponível em: <https://www.fao.org/soils-portal/data-hub/soil-maps-and-databases/global-map-of-salt-affected-soils/en/#:~:text=With%20the%20current%20information%20from%20118%20countries%20covering,saline%2C%2010%25%20are%20sodic%20and%205%25%20are%20saline-sodic>. Acesso em jun. 2022

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, vol. 39, no. 4, p. 783–791, Jul. 1985.

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **The Science of the Total Environment**, vol. 682, p. 779–799, 10 Sep. 2019.

FERREIRA, J P; VIDAL, M S and BALDANI, J I. Método para detecção e quantificação da atividade de ACC deaminase em bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal. **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**. out. 2020.

FROSSARD, E.; ACHAT, D. L.; BERNASCONI, S. M.; BÜNEMANN, E. K.; FARDEAU, J. C.; JANSA, J.; MOREL, C.; RABEHARISOA, L.; RANDRIAMANANTSOA, L.; SINAJ, S.; TAMBURINI, F.; OBERSON, A. The use of tracers to investigate phosphate cycling in soil-plant systems. In: BÜNEMANN, E.; OBERSON, A.; FROSSARD, E.

(eds.). **Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling.** Soil Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. vol. 26, p. 59–91.

GAMALERO, E.; BONA, E.; TODESCHINI, V.; LINGUA, G. Saline and Arid Soils: Impact on Bacteria, Plants, and their Interaction. **Biology**, vol. 9, no. 6, 2 Jun. 2020.

GLICK, B. R. Introduction to Plant Growth-Promoting Bacteria. **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–37.

GLOBALFERT. Fosfatados – Principais origens de importação no Brasil em 2018. **GlobalFert**. 21 mai. 2019. Boletins. Disponível em: <https://www.globalfert.com.br/boletins/fosfatados-principais-origens-de-importacao-no-brasilem-2018-2/>. Acesso em jun. 2022.

GOMES, E. A.; SOUZA, F. A.; SOUSA, S. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; MARRIEL, I. E.; SILVA, U. C. Prospecção de Comunidades Microbianas do Solo Ativas no Aproveitamento Agrícola de Fontes de Fósforo de Baixa Solubilidade. **Documentos 107**, 2010.

GHOSH, P. K.; DE, T. K.; MAITI, T. K. Role of ACC Deaminase as a Stress Ameliorating Enzyme of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Useful in Stress Agriculture: A Review. In: MEENA, V. S. (ed.). **Role of rhizospheric microbes in soil**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 57–106.

HADLICH, G. M.; UCHA, J. M.; CELINO, J. J. Apicuns na Baía de Todos os Santos: distribuição espacial, descrição e caracterização física e química. In: Queiroz, A. F. de S.; CELINO, J. J. (Org.). **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**, cap. 2, p. 59-72. Salvador: UFBA 2008.

HAGEMANN, M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 35, no. 1, p. 87–123, Jan. 2011.

HANIF, M. K.; HAMEED, S.; IMRAN, A.; NAQQASH, T.; SHAHID, M.; VAN ELSAS, J. D. Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium Bacillus subtilis strain KPS-11 for growth promotion of potato (Solanum tuberosum L.). **Frontiers in microbiology**, vol. 6, p. 583, 9 Jun. 2015.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, M. M.; BHOWMIK, P. C.; HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, M. M.; PRASAD, M. N. V.; OZTURK, M.; FUJITA, M. Potential use of halophytes to remediate saline soils. **BioMed research international**, vol. 2014, p. 589341, 6 Jul. 2014

HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; AL-HUQAIL, A. A.; SHAH, M. A. Induction of Osmoregulation and Modulation of Salt Stress in *Acacia gerrardii* Benth. by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Bacillus subtilis* (BERA 71). **BioMed research international**, vol. 2016, p. 6294098, 15 Aug. 2016.

HIGGINS, DESMOND G. CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. In: **Computer analysis of sequence data**. Springer, Totowa, NJ. p.307-318, 1994.

HÖHN, A.; TOBSCHALL, H. J.; MADDOCK, J. E. L. Biogeochemistry of a hypersaline lagoon east of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of The Total Environment**, vol. 58, no. 1–2, p. 175–185, Dec. 1986.

HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. **Agricultural and biological chemistry**, vol. 42, no. 10, p. 1825–1831, Oct. 1978.

HUANG, L.; LI, Q.-C.; HOU, Y.; LI, G.-Q.; YANG, J.-Y.; LI, D.-W.; YE, J.-R. *Bacillus velezensis* strain HYEB5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicus*. **Biocontrol science and technology**, vol. 27, no. 5, p. 636–653, 4 May 2017.

HUSSAIN, A.; AHMAD, M.; MUMTAZ, M. Z.; ALI, S.; SARFRAZ, R.; NAVEED, M.; JAMIL, M.; DAMALAS, C. A. Integrated Application of Organic Amendments with *Alcaligenes* sp. AZ9 Improves Nutrient Uptake and Yield of Maize (*Zea mays*). **Journal of plant growth regulation**, vol. 39, no. 3, p. 1277–1292, Sep. 2020.

IQBAL, S.; HUSSAIN, S.; ABDUL QAYYAUM, M.; ASHRAF, M.; SAIFULLAH. The Response of Maize Physiology under Salinity Stress and Its Coping Strategies. In: HOSSAIN, A. (ed.). **Plant Stress Physiology**. [S. l.]: IntechOpen, 2021.

JHA, B.; GONTIA, I.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant and soil**, vol. 356, no. 1–2, p. 265–277, Jul. 2012.

KATHERINE, K. Environmental impacts of agricultural technologies. **Evans School Policy Analysis & Research (EPAR). EPAR Brief**, n. 65, p. 20, 2010.

JOHNSON, J. S.; SPAKOWICZ, D. J.; HONG, B.-Y.; PETERSEN, L. M.; DEMKOWICZ, P.; CHEN, L.; LEOPOLD, S. R.; HANSON, B. M.; AGRESTA, H. O.; GERSTEIN, M.; SODERGREN, E.; WEINSTOCK, G. M. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. **Nature Communications**, vol. 10, no. 1, p. 5029, 6 Nov. 2019.

KRISHNARAJ, P. U. DAHALE U. P. Mineral phosphate solubilization: concepts and prospects in sustainable agriculture. **Proc Indian Natl Sci Acad**. 2014. p. 389–405.

KROLOW, R. H.; MISTURA, C.; COELHO, R. W.; SIEWERDT, L.; ZONTA, É. P. Efeito do fósforo e do potássio sobre o desenvolvimento e a nodulação de três leguminosas anuais de estação fria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 33, no. 6 suppl 3, p. 2224–2230, Dec. 2004.

KUMAR ARORA, N.; FATIMA, T.; MISHRA, J.; MISHRA, I.; VERMA, S.; VERMA, R.; VERMA, M.; BHATTACHARYA, A.; VERMA, P.; MISHRA, P.; BHARTI, C. Halotolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. **Journal of advanced research**, vol. 26, p. 69–82, Nov. 2020.

LIU, Z.; LI, Y. C.; ZHANG, S.; FU, Y.; FAN, X.; PATEL, J. S.; ZHANG, M. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. **Applied Soil Ecology**, vol. 96, p. 217–224, Nov. 2015.

MERBACH, W.; FANKEM, H.; DEUBEL, A. Influence of rhizosphere bacteria of African oil palm (*Elaeis guineensis*) on calcium, iron, and aluminum phosphate in vitro mobilization. In: **International symposium “Root Research and Applications”**, 2–4 BOKU, Vienna, Austria. Sep. 2009. URL: <http://asrr.boku.ac.at/fileadmin/files/RRcd/session03/poster/042.pdf>

MOKRANI, S.; NABTI, E.; CRUZ, C. Current advances in plant growth promoting bacteria alleviating salt stress for sustainable agriculture. **Applied Sciences**, vol. 10, no. 20, p. 7025, 10 Oct. 2020.

MUKHTAR, S.; ZAREEN, M.; KHALIQ, Z.; MEHNAZ, S.; MALIK, K. A. Phylogenetic analysis of halophyte-associated rhizobacteria and effect of halotolerant and halophilic phosphate solubilizing biofertilizers on maize growth under salinity stress conditions. **Journal of Applied Microbiology**, 25 Oct. 2019.

NADEEM, S. M.; ZAHIR, Z. A.; NAVeed, M.; NAWAZ, S. Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. **Annals of microbiology**, vol. 63, no. 1, p. 225–232, Mar. 2013.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1 Jan. 1999.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 41, no. 9, p. 1782–1787, Sep. 2009.

ONDRASEK, G.; RATHOD, S.; MANOHARA, K. K.; GIREESH, C.; ANANTHA, M. S.; SAKHARE, A. S.; PARMAR, B.; YADAV, B. K.; BANDUMULA, N.; RAIHAN, F.; ZIELIŃSKA-CHMIELEWSKA, A.; MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; REYES-DÍAZ, M.; KHAN, A.; PANFILOVA, O.; SEGUEL FUENTEALBA, A.; ROMERO, S. M.; NABIL, B.; WAN, C. C.; HORVATINEC, J. Salt stress in plants and mitigation approaches. **Plants**, vol. 11, no. 6, 8 Mar. 2022.

OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, vol. 28, no. 1, p. 56–63, Jan. 2001.

OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, vol. 4, p. 2, 15 Apr. 2008.

OREN, A. Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. **Environmental Microbiology**, vol. 13, no. 8, p. 1908–1923, Aug. 2011.

OTEINO, N.; LALLY, R. D.; KIWANUKA, S.; LLOYD, A.; RYAN, D.; GERMAINE, K. J.; DOWLING, D. N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in microbiology**, vol. 6, p. 745, 22 Jul. 2015.

PARKS, D. H.; CHUVOCHINA, M.; WAITE, D. W.; RINKE, C.; SKARSHEWSKI, A.; CHAUMEIL, P.-A.; HUGENHOLTZ, P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology**, vol. 36, no. 10, p. 996–1004, Nov. 2018.

PEDROTTI, A.; CHAGAS, R. M.; RAMOS, V. C.; PRATA, A. P. M.; LUCAS A. A. T.; SANTOS P. B. S. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, 2015.

PELLEGRINI, J. A. C. **Caracterização da planície hipersalina (Apicum) associada a um bosque de mangue em Guaratiba, Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro - RJ.** 2000. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PEREIRA, J. R.; Solos salinos e sodicos.In: **Reuniao Brasileira De Fertilidade Do Solo, Acidez e calagem no Brasil.** Campinas: p. 127-143., SBCS, 1982.

PESSOA, L. G. M.; FREIRE, M. B. G. dos S.; FILHO, J. C. de A.; SANTOS, P. R.; MIRANDA, M. F. A.; FREIRE, F. J. Characterization and classification of halomorphic soils in the semiarid region of northeastern brazil. **Journal of Agricultural Studies**, vol. 11, no. 4, p. 405, 15 Mar. 2019

RASUL, M.; YASMIN, S.; SULEMAN, M.; ZAHEER, A.; REITZ, T.; TARKKA, M. T.; ISLAM, E.; MIRZA, M. S. Glucose dehydrogenase gene containing phosphobacteria for biofortification of Phosphorus with growth promotion of rice. **Microbiological Research**, vol. 223–225, p. 1–12, 22 Mar. 2019.

RAWAT, P.; DAS, S.; SHANKHDHAR, D.; SHANKHDHAR, S. C. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of soil science and plant nutrition**, vol. 21, no. 1, p. 49–68, Mar. 2021.

RUPPEL, S.; FRANKEN, P.; WITZEL, K. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. **Functional Plant Biology**, vol. 40, no. 9, p. 940, 2013.

RUSSELL, N. J. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, vol. 21, no. 1, p. 93–113, Feb. 1989

SAGAR, A.; RAI, S.; ILYAS, N.; SAYYED, R. Z.; AL-TURKI, A. I.; EL ENSHASY, H. A.; SIMARMATA, T. Halotolerant Rhizobacteria for Salinity-Stress Mitigation: Diversity, Mechanisms and Molecular Approaches. **Sustainability**, vol. 14, no. 1, p. 490, 3 Jan. 2022.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R., ALMEIDA, J. A. de; ARAUJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos.** Brasília, DF: Embrapa, 2018.

SANTOS, D. R. DOS; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 576–586, Apr. 2008.

SARETHY, I. P.; PAN, S.; DANQUAH, M. K. Modern taxonomy for microbial diversity. In: GRILLO, O. (ed.). **Biodiversity - The Dynamic Balance of the Planet.** [S. l.]: InTech, 2014.

SARI, I.; DIN, Z. B. Effects of salinity on the uptake of lead and cadmium by two mangrove species *Rhizophora apiculata* Bl. and *Avicennia alba* Bl. **Chemistry and Ecology**, vol. 28, no. 4, p. 365–374, Aug. 2012.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic ecosystem health & management**, vol. 3, no. 4, p. 561–570, 1 Jan. 2000.

SHAILENDRA SINGH, G. G. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, vol. 07, no. 02, 2015.

SHI, W.; TAKANO, T.; LIU, S. Isolation and characterization of novel bacterial taxa from extreme alkali-saline soil. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2147–2157, May 2012.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, vol. 14, no. 3, p. 407–426, Sep. 2015.

SINGH, P.; JAIN, K.; DESAI, C.; TIWARI, O.; MADAMWAR, D. Microbial community dynamics of extremophiles/extreme environment. **Microbial diversity in the genomic era.** [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 323–332.

SUTTON, G. C.; RUSSELL, N. J.; QUINN, P. J. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, vol. 1061, no. 2, p. 235–246, Jan. 1991.

TEIXEIRA, P. C., DONAGEMMA, G. K., FONTANA, A., & TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo.** Brasília, DF: Embrapa, 2017. 3. ed. rev. e ampl., 574 p. 2017

TINDALL, B. J. The combination *Enterobacter agglomerans* is to be cited as *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 and the combination *Pantoea agglomerans* is to be cited as *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini et al. 1989. Opinion 90. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 64, no. Pt 10, p. 3582–3583, Oct. 2014.

WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 39, no. 6, p. 968–984, Nov. 2015.

WAN, W.; QIN, Y.; WU, H.; ZUO, W.; HE, H.; TAN, J.; WANG, Y.; HE, D. Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources

utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil. **Frontiers in microbiology**, vol. 11, p. 752, 23 Apr. 2020.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 14, no. 10, p. 908–934, Oct. 2008.

XAVIER, J. F.; **Isolamento e Caracterização de Bactérias Associadas À Rizosfera de Plantas Halófitas**. 2021. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2021.

ZHANG, H.; IRVING, L. J.; MCGILL, C.; MATTHEW, C.; ZHOU, D.; KEMP, P. The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. **Annals of Botany**, vol. 106, no. 6, p. 1027–1035, Dec. 2010.

ZHANG, S.; FAN, C.; WANG, Y.; XIA, Y.; XIAO, W.; CUI, X. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 64, no. 12, p. 968–978, Dec. 2018.

ZHU, F.; QU, L.; HONG, X.; SUN, X. Isolation and Characterization of a Phosphate-Solubilizing Halophilic Bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the Coast of Yellow Sea of China. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2011, p. 615032, 2 Jun. 2011.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. **The Science of the Total Environment**, vol. 612, p. 522–537, 15 Jan. 2018.