

**LORENA HELLEM SANTANA CARVALHO**

**Microbiota da rizosfera de *Hancornia speciosa* em reserva extrativista urbana:  
diversidade, funções e potencial biotecnológico.**

**São Cristóvão – SE  
Janeiro-2026**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS APLICADAS – CCAA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA – DEA**

**MICROBIOTA DA RIZOSFERA DE *Hancornia speciosa* EM RESERVA  
EXTRATIVISTA URBANA: DIVERSIDADE, FUNÇÕES E POTENCIAL  
BIOTECNOLÓGICO.**

**Monografia apresentada ao Departamento de  
Engenharia Agrônômica – Universidade Federal  
de Sergipe, como requisito parcial para obtenção  
do título de Engenheiro Agrônomo.**

**APROVADO em:**

**ORIENTADA: LORENA HELLEM SANTANA CARVALHO**

---

**Profa. Dra. Renata Silva Mann**  
**Orientadora**

---

**Mestre Matheus Emmanuel Oliveira Vieira**  
**Banca examinadora**

---

**Profa. Dra. Crislaine Costa Calazans**  
**Banca examinadora**

*Dedico, primeiramente, a Deus, por segurar minhas mãos em meio ao desânimo. À minha família, por me apoiar e estar presente todos os dias. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui “Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isto” (Isaiás 41:20)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças em minha trajetória, por me conceder ânimo e por me mostrar o quanto sou corajosa e forte, especialmente nas longas madrugadas ao som dos louvores. Sem Ti, nada seria possível.

Agradeço aos meus pais, Rosival e Denise, por todo o apoio que me deram, por abraçarem meus sonhos comigo, por serem minha base e por se fazerem presentes em todos os aspectos da minha vida. Ao meu pai, agradeço por sempre ter se dedicado tanto desde o início da minha vida, trabalhando em dobro para me oferecer o melhor estudo e educação. À minha mãe, agradeço por ser meu exemplo de fortaleza e garra e por me mostrar que a fé é o caminho e que, sem Deus, nada seríamos.

Agradeço aos meus irmãos, Victoria, Phelipe e Joanna, que sempre estiveram comigo e que, em meio ao cansaço dos dias difíceis, estavam ali ao meu lado, conversando e mostrando que realmente não é fácil, mas que tudo passa. À Victoria, por ser um exemplo de dedicação e cuidado; ao Phelipe, por me mostrar que sou capaz e forte, assim como ele; e à Joanna, por me ensinar que consigo ir além do que imagino e por me ajudar a confiar que sou suficiente para aprender e conquistar.

Às minhas avós, Maria Lima e Conceição, por sempre me confortarem em seus abraços sinceros. Aos meus tios, em especial ao tio Evandro e à tia Simone, por sempre arrancarem gargalhadas e mostrarem que dias comuns são especiais. Aos meus cunhados Artur e Mildres pelo carinho e apoio de sempre.

Às minhas amigas Amanda Matos, Priscila Santos e Maria Gabriela, que se tornaram irmãs, obrigada pelos dias em que estivemos juntas para conversar, rir, desabafar, apoiar, reclamar e lembrar que sempre tínhamos umas às outras. Sem vocês, a faculdade não teria sido a mesma; as aulas, o CALEA e o RESUN não teriam graça. Obrigada por todo o suporte durante esses anos — vocês foram essenciais.

Ao meu namorado, Marcos, por todo o incentivo durante esses anos, por enfrentar comigo os dias turbulentos, por enxugar minhas lágrimas e trazer alegria. Ter você comigo é a certeza de que sempre terei amor, aconchego e abrigo. Obrigada por todo o esforço para me ver bem, por trazer respostas em meio às dúvidas e pelos abraços na hora certa. Agradeço também à minha sogra, Cristina, ao meu sogro, Sr. Raimundo, e à minha cunhada (irmã), Sarah, que, mesmo sem saberem, faziam meus dias melhores e sempre me acolheram e me trataram bem.

Aos amigos que fiz durante a minha graduação — Larissa, Soenne, Vinícius, Felipe, Domingos, Ryan, João Felipe, Gustavo Ryan e Maria Guiomar — por tornarem os dias na

faculdade mais leves e engraçados. Aos meus amigos de infância — Beatriz, Júlia, Gustavo e Raianne — por se fazerem presentes, mesmo em meio à distância.

Agradeço imensamente à minha orientadora, professora Renata, pela orientação, paciência e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também ao grupo Genaplant, que contribuiu de forma essencial com conhecimento e apoio, tornando esta jornada ainda mais enriquecedora. Sou grata pela oportunidade de aprender e crescer com todos vocês.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 A Mangabeira e sua importância	10
2.2 A Rizosfera e importância dos microrganismos nativos	10
2.3 Microrganismos Promotores do Crescimento Vegetal (PGPR)	11
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio	11
2.5 Alface	12
2.6 Biocondicionamento e dinâmica temporal de respostas em plântulas	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Coleta de solo rizosférico	13
3.2 Local de execução	13
3.3 Diluições e isolamento bacteriano	13
3.4 Caracterização morfológica e coloração de Gram	14
3.5 Seleção de cepas, cultivo e preparo de inóculo	15
3.6 Bioensaio de promoção de crescimento em alface com inoculação direta	15
3.7 Análises estatísticas	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Caracterização dos isolados (fenotípica)	17
4.1.1 Caracterização dos isolados	17
4.1.2 Dendrograma UPGMA e interpretação dos grupos	19
4.2 Bactérias diazotróficas e a promoção de crescimento em alface – inoculação direta (biocondicionamento)	21
4.2.1 Síntese descritiva das variáveis morfométricas (N1 e N2)	21
4.2.2 Efeitos de Tratamento, Estádio e Interação (modelo misto / medidas repetidas)	22
4.2.3 Pós-testes (efeitos simples)	23
4.2.3 Pós-testes (efeitos simples)	25
4.3 Análises multivariadas das variáveis morfométricas	26
4.3.1 Correlações (Pearson e Spearman)	26
4.3.2 ACP (PCA) – PC1/PC2 e interpretação (crescimento geral vs contraste raiz/hipocótilo).	26
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS	32

## LISTAS DE FIGURAS

- FIGURA 1. Imagem capturada do teste de gram do isolado RRZ2A (gram-positivo). Fonte: Elaborado pelo autor (2025). 18
- FIGURA 2. Imagem capturada do teste de gram do isolado RRC2B2 (gram-negativo). Fonte: Elaborado pelo autor (2025). 18
- FIGURA 3. Dendrograma (UPGMA) de similaridade fenotípica entre os isolados bacterianos, baseado no padrão de colônia, diâmetro, reação de Gram e tempo de crescimento (distância de Hamming). 20
- FIGURA 4. Formação da película no meio LG no isolados. Fonte: Elaborado pelo autor (2025). 21
- FIGURA 5. Percentual de variância explicada pelos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) na Análise de Componentes Principais (ACP/PCA) das variáveis morfométricas. 27
- FIGURA 6. Biplot da Análise de Componentes Principais (ACP/PCA) das variáveis morfométricas, mostrando os scores das observações em N1 e N2 e os loadings (vetores) das variáveis nos eixos PC1 e PC2. 28

## LISTAS DE TABELAS

TABELA 1. Caracterização dos isolados da rizosfera de mangabeiras.	19
TABELA 2. Médias $\pm$ desvio padrão (dp) das variáveis morfométricas por tratamento e estágio (N1 e N2).	22
TABELA 3. Resumo do modelo misto (ANOVA de medidas repetidas) com testes tipo Wald (qui-quadrado).	22
TABELA 4. Pós-teste pareado (N2 vs N1) por tratamento	23
TABELA 5. Comparações entre tratamentos em N1 (Tukey) – apenas comparações significativas.	24
TABELA 6. Comparações N2 vs N1 que permanecem significativas após ajuste de Holm.	25
TABELA 7. Comparações entre tratamentos dentro de cada estágio (Tukey) – apenas comparações significativas.	25

## RESUMO

Frutíferas nativas como a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) possuem relevância socioeconômica e ambiental, e sua rizosfera constitui um reservatório de microrganismos com potencial biotecnológico. Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias rizosféricas associadas à mangabeira, coletadas na Reserva Extrativista Irmã Dulce dos Pobres (Aracaju–SE), e avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento inicial em alface (*Lactuca sativa* L.). O solo rizosférico (0–5 cm) foi coletado de três plantas de mangabeira e submetido a diluições seriadas. O isolamento dos microrganismos foi realizado em meio LG seletivo para bactérias diazotróficas, seguido de purificação e caracterização morfológica e por coloração de Gram. Foram obtidos 16 isolados, dos quais 11 foram Gram-positivos e 5 Gram-negativos; 11 apresentaram crescimento em 24h e 5 em 48h. No bioensaio com inoculação direta (biocondicionamento), três cepas representativas foram avaliadas em dois estágios (N1 e N2). Na avaliação inicial (N1), para o tratamento RRZB2 houve maior crescimento de plântulas, com destaque para o comprimento total ( $4,197 \pm 0,483$  cm) e diferença entre tratamentos, enquanto em N2 não foram detectadas diferenças significativas. A análise por modelo de medidas repetidas indicou interação Tratamento  $\times$  Estágio para variáveis de crescimento, evidenciando que a resposta ao inoculante depende do momento de avaliação. Conclui-se que a rizosfera da mangabeira abriga isolados com diversidade fenotípica e que RRZB2 se destaca como candidata para estudos posteriores de mecanismos PGPR e validação em condições controladas e de viveiro.

**Palavras-chave:** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria; fixação biológica de nitrogênio; biocondicionamento.

## 1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera nativa do Brasil com grande importância social e econômica, em áreas de vegetação protegida como as reservas extrativistas. Se destacando não apenas pela produção de frutos com uso alimentício e medicinal, mas também pelo seu potencial em contribuir com a sustentabilidade das comunidades locais que dependem da extração e cultivo dessa espécie (Ganga et al., 2010).

A rizosfera das mangabeiras constituem um ambiente biologicamente ativo e diverso, no qual microrganismos podem desempenhar papéis importantes na promoção do crescimento vegetal. Nesse contexto, destacam-se microrganismos capazes de atuar por diferentes mecanismos, incluindo a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de fitohormônios (Lopes et al., 2016; Aviz et al., 2021).

A rizosfera é reconhecida como uma zona de intensa interação entre raízes e microrganismos do solo, com destaque para as bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR). Essas bactérias podem melhorar a absorção de nutrientes, promover resistência a patógenos e estimular o crescimento por mecanismos que envolvem, entre outros, fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo (Meena et al., 2017; Backer et al., 2018). Além disso, a prospecção de microrganismos nativos tem ganhado relevância, pois esses organismos podem apresentar maior adaptação aos ecossistemas locais e, portanto, maior eficiência em condições específicas (Singh et al., 2016).

Apesar dessa relevância, ainda há lacunas no conhecimento sobre as bactérias rizosféricas associadas à mangabeira, especialmente no que se refere ao seu potencial como PGPR e à sua aplicação para aumento do vigor de sementes. Estudos indicam que microrganismos nativos da rizosfera de espécies nativas podem ser mais eficazes em contextos locais, como observado em trabalhos sobre rizobactérias no semiárido (Aviz et al., 2021).

É importante considerar que a resposta de plântulas a inoculantes e ao biocondicionamento pode variar ao longo do desenvolvimento inicial, de modo que avaliações em mais de um momento podem fornecer uma visão mais adequada da dinâmica do crescimento. Assim, a alface como planta teste é estratégica por seu ciclo rápido e por ser amplamente utilizada para avaliar efeitos de inoculantes na promoção do crescimento (Ganga et al., 2010).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias rizosféricas associadas à mangabeira em área de reserva extrativista, avaliar seu potencial como fixadoras de biológica de nitrogênio e PGPR, e testar sua capacidade de promover o crescimento inicial de alface.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A Mangabeira e sua importância**

O Brasil é um dos maiores produtores de frutas do mundo, mas muitas espécies frutíferas nativas, com propriedades nutricionais e sensoriais, ainda são pouco exploradas, como é o caso da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) (Lima *et al.*, 2015).

A mangabeira é uma frutífera da família *Apocynaceae*, originária do Brasil, encontrada nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste, nas áreas de Cerrado e Caatinga (Nascimento *et al.*, 2014). Ela também é reconhecida como uma espécie de relevância social e ambiental, contribuindo para a geração de empregos e podendo ser aplicada tanto em cultivos comerciais quanto no reflorestamento de áreas degradadas ou de baixa produtividade (Martinotto, 2006).

A mangabeira destaca seu potencial na bioeconomia, que visa a utilização sustentável dos recursos biológicos. A planta é de grande valor nas áreas de saúde e alimentação, proporcionando compostos bioativos e nutrientes. Esse modelo promove a sustentabilidade e gera novas oportunidades econômicas, fortalecendo as indústrias locais e incentivando o desenvolvimento de um mercado mais responsável e ecológico (NUNES, Valdinete Vieira *et al.*, 2022)

### **2.2 A Rizosfera e importância dos microrganismos nativos**

A riqueza de microrganismos nativos é mais comumente encontrada em regiões de vegetação protegida, uma vez que essa microbiota é favorecida pela cobertura vegetal. Onde o acúmulo de material orgânico fornece maior fonte de nutrientes para o desenvolvimento da comunidade microbiana (Alves *et al.*, 2011).

Esses microrganismos são parte integrante da biodiversidade presente no meio ambiente, de modo que os mesmos podem ser utilizados como indicadores do potencial de uso, produtividade e sustentabilidade do ecossistema, em especial no solo (EMBRAPA, 2019).

A microbiologia do solo é a área que estuda os microrganismos presentes no solo, sendo o estudo das atividades metabólicas e, contribuição para fluxo de energia e ciclagem de nutrientes associados a produtividade primária os principais focos (EMBRAPA, 2015). Os microrganismos do solo juntamente com outros agentes biológicos são considerados indicadores de qualidade, decompositores de matéria orgânica e fornecedores de nutrientes (Buzinaro; Barbosa, 2009).

A microbiota da rizosfera é fundamental para o aumento da produtividade e saúde das plantas em ambientes naturais, por meio de parcerias simbióticas com as plantas (Meena, V. S. *et al.*, 2017).

### **2.3 Microrganismos Promotores do Crescimento Vegetal (PGPR)**

Segundo Nazir (2018), os microrganismos que colonizam a rizosfera das plantas e promovem o crescimento de diversas maneiras são as Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (PGPR), as quais agem por meio de mecanismos como fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, entre outros (Borah *et al.*, 2023).

Há dois tipos de mecanismos, os diretos e indiretos. O termo "mecanismos diretos" se refere ao aproveitamento das características bacterianas que promovem diretamente o crescimento das plantas, fornecendo fitohormônios e nutrientes essenciais. Mecanismos indiretos estão relacionados às características bacterianas que restringem o crescimento e a atividade de fitopatógenos, resultando em um aumento indireto no crescimento das plantas associadas (Qbal; Singh; Chandra, 2024).

Vários dos processos destacados nos mecanismos diretos, incluindo a fixação biológica de nitrogênio. De acordo com Sun *et al.* (2021), a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo vital para a agricultura e para o meio ambiente, pois converte o nitrogênio atmosférico em formas biologicamente disponíveis para as plantas, como o amônio, sem o uso de fertilizantes químicos. Esse processo não só é fundamental para a sustentabilidade da produção agrícola, mas também contribui para a manutenção da fertilidade do solo.

### **2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio**

Vários processos no solo são mediados por microrganismos, que desempenham um papel essencial na ciclagem de nutrientes. Entre esses processos, destaca-se a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. A pesquisa sobre bactérias diazotróficas é fundamental, pois elas desempenham um papel importante no fornecimento de nitrogênio para diversos ecossistemas, tanto naturais quanto manejados (Moreira *et al.*, 2010).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo importante para a agricultura e o meio ambiente, pois fornece nitrogênio de forma eficiente e sem perdas. Esse processo é mais eficiente para os agricultores e ajuda na sustentabilidade da produção. Além disso, os microrganismos responsáveis pela FBN contribuem para a manutenção da fertilidade do solo ao mineralizar nutrientes e decompor resíduos vegetais em substâncias essenciais, como

aminoácidos e proteínas (Aviz et al., 2021).

## 2.5 Alface

O gênero *Lactuca* da família *Asteraceae* inclui *Lactuca sativa*, uma das hortaliças mais antigas e cultivadas globalmente. A alface apresenta diversos tipos, desenvolvidos por melhoramento seletivo para atender a diferentes necessidades. Atualmente, são reconhecidos sete tipos principais: Cos, Butterhead, Leaf, Stalk, Crisphead, Latin e Oilseed, cada um com características adaptadas ao mercado e aos consumidores (Hancock, 2012).

É amplamente consumida em todo o mundo e cultivada em diversas regiões, sendo encontrada em praticamente todas as áreas do Brasil, desde que sejam respeitados os aspectos de adaptação da cultivar (CARVALHO et al., 2009; BARBOSA et al., 2018).

A alface apresenta grande dependência do uso de fertilizantes. Nesse contexto, a utilização de microrganismos para promover o crescimento vegetal surge como uma alternativa viável para reduzir o uso de fertilizantes químicos, mantendo o objetivo de aumentar a produtividade (BARBOSA et al., 2018; TAVARES et al., 2019)

A alface é uma planta ideal para estudos devido ao seu ciclo de crescimento rápido, com a colheita ocorrendo normalmente entre 45 e 60 dias. Segundo os dados mais recentes da FAOSTAT de 2023, na Europa, a área dedicada ao cultivo de alface foi de 127.311 ha, resultando em uma produção total de 3.332.479,7 toneladas. Na Espanha, a produção de alface foi de 864.570 toneladas, o que corresponde a 26% da produção total europeia, o que torna uma cultura modelo para pesquisa.

## 2.6 Biocondicionamento e dinâmica temporal de respostas em plântulas

O biocondicionamento é uma estratégia de tratamento de sementes que combina hidratação com a inoculação de microrganismos benéficos, favorecendo a colonização precoce e podendo contribuir para o aumento do vigor inicial das plântulas (Singh et al., 2016).

Do ponto de vista biológico, respostas associadas à inoculação com microrganismos tendem a ser dinâmicas durante o estabelecimento da plântula. No início do desenvolvimento, a colonização na superfície da semente/radicula e a ativação de processos associados a PGPR podem influenciar parâmetros morfométricos iniciais, como alongamento de hipocótilo e crescimento radicular. Esses efeitos são coerentes com os mecanismos atribuídos a PGPR, como melhora da absorção de nutrientes e estímulo ao crescimento vegetal (Meena et al., 2017; Backer et al., 2018), bem como com a relevância de microrganismos adaptados ao ecossistema local (Singh et al., 2016).

Entretanto, à medida que a plântula avança no desenvolvimento, é comum que parte das diferenças iniciais reduza ou se estabilize, seja por mudanças na alocação de recursos (raiz/parte aérea), por variações na intensidade da colonização microbiana ao longo do tempo, ou porque o próprio crescimento passa a ser mais fortemente influenciado por condições ambientais e disponibilidade de nutrientes no substrato. Por isso, a avaliação em mais de um momento do crescimento inicial é metodologicamente adequada: ela permite distinguir efeitos que ocorrem na fase de estabelecimento/vigor inicial daqueles que persistem (ou não) em um estágio subsequente, fornecendo uma interpretação mais robusta do desempenho de inoculantes e do biocondicionamento (Singh et al., 2016).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta de solo rizosférico**

A coleta do solo rizosférico foi realizada em plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa*) localizadas na Área de Reserva Irmã Dulce dos Pobres, no município de Aracaju, Sergipe (10°59'49" S; 37°05'45" W). Foram selecionadas três plantas a partir da diversidade fenotípica avaliada em estudo anterior. Para cada planta, foi coletado aproximadamente 50 g de solo aderido às raízes, caracterizado como solo rizosférico, na projeção da copa, na profundidade de 0–5 cm.

Em cada planta, a coleta foi realizada em três pontos distintos, constituindo subamostras que foram posteriormente homogeneizadas, formando uma amostra composta por planta. Ao final, obtiveram-se três amostras compostas, identificadas como C (Caçula), Z (Zenaide) e H (Hildo).

As coletas foram realizadas no mês de março de 2024, utilizando ferramentas previamente esterilizadas. As amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em caixa térmica até o laboratório, onde permaneceram armazenadas até a realização das análises.

#### **3.2 Local de execução**

Os procedimentos foram realizados nos laboratórios de Ensino e Tecnologia de Sementes e de Fitopatologia do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe (Campus São Cristóvão, São Cristóvão–SE).

#### **3.3 Diluições e isolamento bacteriano**

Para cada amostra composta, 10 g de solo foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 190 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85%). As suspensões foram submetidas à

agitação em agitador orbital, ajustado para 150 rpm, com a finalidade de promover a homogeneização da amostra e o desprendimento dos microrganismos aderidos às partículas do solo. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas decimais até a diluição  $10^{-8}$ , com cinco repetições por diluição, possibilitando o isolamento e a seleção de bactérias diazotróficas viáveis, conforme descrito por Brock Biology of Microorganisms (Madigan et al., 2015).

Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram inoculadas em tubos de vidro contendo meio LG semissólido, conforme metodologia proposta por Lipman (1904). Para o preparo do meio semissólido, utilizou-se 5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar, como agente solidificante, enquanto para o meio sólido foram utilizados 15  $\text{g L}^{-1}$ , com o pH ajustado para 7,0. O meio LG é seletivo para bactérias diazotróficas por não conter fontes assimiláveis de nitrogênio mineral, favorecendo o crescimento de microrganismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico, conforme descrito por Döbereiner et al. (1995).

Os tubos foram incubados em estufa a 28 °C, sendo monitorados quanto à formação de películas características de bactérias fixadoras de nitrogênio segundo Döbereiner et al. (1995). As culturas consideradas positivas foram repicadas para meio LG sólido e avaliadas quanto à variação de pH. Posteriormente, as colônias obtidas foram purificadas em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), meio de caráter generalista, no qual as bactérias apresentaram adaptação satisfatória.

### **3.4 Caracterização morfológica e coloração de Gram**

Após a purificação, as bactérias foram incubadas em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), a 28 °C. As colônias obtidas foram caracterizadas quanto ao tempo de crescimento, diâmetro, padrão de distribuição (isoladas ou confluentes), coloração de Gram e morfologia celular, considerando comprimento e largura.

A coloração de Gram foi realizada conforme o método clássico descrito por Gram (1884). Inicialmente, esfregaços bacterianos foram preparados em lâminas de vidro e fixados pelo calor. Posteriormente, corados com cristal violeta por 1 minuto, em seguida, aplicou-se solução de lugol por 1 minuto, procedendo-se à descoloração com álcool etílico por aproximadamente 30 segundos. Depois realizou-se a contra-coloração com safranina por 1 minuto. As lâminas foram lavadas com água destilada entre as etapas e secas à temperatura ambiente para posterior observação microscópica.

A observação morfológica das células bacterianas foi realizada em microscópio óptico com aumento de até 1000 $\times$ , utilizando óleo de imersão. As medições de comprimento e largura

celular, expressas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), foram obtidas por meio de software de análise de imagens S-EYE, acoplado ao microscópio.

### **3.5 Seleção de cepas, cultivo e preparo de inóculo**

Dentre as 16 cepas bacterianas (RRC21, RRC2B1, RRC2B2, RRH1A, RRH4A, RRH4D, RRH72B, RRH82A, RRH82B, RRZ2A, RRZ32, RRZ43B, RRZ63A, RRZ63B, RRZ83B e RRZB2) previamente isoladas da rizosfera de *H. speciosa*, foram selecionadas três (RRC2B2, RRH4D e RRZB2) para os ensaios de promoção de crescimento. O critério de seleção das três cepas considerou a representatividade das três áreas de coleta dentro da reserva extrativista, de modo que uma cepa representativa de cada área foi escolhida, preservando a diversidade genética funcional entre ambientes.

As cepas selecionadas foram cultivadas em meio Caldo Nutriente (CN) sob agitação constante (150 rpm), a 28 °C, por 24 h. O inóculo bacteriano foi padronizado por meio do ajuste da densidade óptica a 600 nm, conforme descrito por Madigan et al. (2015), que destacam o uso da densidade óptica como método indireto para estimativa e padronização da concentração celular em culturas bacterianas líquidas. As sementes utilizadas nos ensaios in vivo foram de alface (var. Americana)

### **3.6 Bioensaio de promoção de crescimento em alface com inoculação direta**

Para o ensaio de germinação com inoculação direta, as sementes foram previamente submetidas ao processo de biocondicionamento que consiste em um tratamento que associa a hidratação controlada das sementes à inoculação com microrganismos benéficos, favorecendo a colonização precoce e o aumento do vigor inicial das plântulas (Singh et al., 2016). Para tanto, as sementes foram embebidas em solução bacteriana diluída a 1%, sob oxigenação contínua, por um período de 5 minutos.

As sementes tratadas foram dispostas para germinação em Gerbox® (caixa para teste de germinação) com papel germitest, previamente umedecido com água destilada em volume equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Em seguida, permaneceram acondicionadas em germinador do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), mantido à temperatura de 20 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz.

As avaliações ocorreram em diferentes estádios (N1 e N2). Foram analisadas as seguintes variáveis: quantidade de sementes germinadas, sementes duras, sementes deterioradas e plântulas anormais. Consideraram-se germinadas as plântulas que apresentaram todas as estruturas essenciais devidamente desenvolvidas.

Para a avaliação do desenvolvimento das plântulas, procedeu-se à quantificação da área das plântulas (cm<sup>2</sup>), da razão raiz/hipocótilo, bem como do comprimento do hipocótilo, da raiz primária e do comprimento total da plântula. As medições foram realizadas por meio do equipamento de análise de imagens GroundEye®.

### 3.7 Análises estatísticas

A análise de agrupamento fenotípico foi conduzida no ambiente estatístico R, empregando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Para a construção dos dendrogramas e análise de similaridade entre os isolados, foram utilizados os pacotes ggplot2, gg dendro e cluster, possibilitando a formação de grupos de similaridade com base nas características morfológicas avaliadas.

Para o bioensaio de inoculação direta os dados foram organizados, considerando os tratamentos: (controle meio, controle sem inoculação, RRZB2, RRC2B2 e RRH4D) duas repetições por tratamento, os estádios de avaliação (N1 e N2) como fatores.

Inicialmente, foi realizada análise descritiva (média, desvio padrão e erro padrão) por tratamento e estágio. A suposição de normalidade foi verificada por meio do teste de Shapiro–Wilk, aplicado separadamente para N1 e N2. Como a variável razão apresentou comportamento não normal, análises envolvendo essa variável foram interpretadas preferencialmente por métodos robustos e/ou com transformação, utilizando-se log(razão) quando necessário para modelagem paramétrica.

A associação entre variáveis foi avaliada por meio de matrizes de correlação de Pearson (associação linear) e Spearman (associação monotônica, robusta à não normalidade), calculadas para o conjunto geral (N1+N2) e separadamente por estágio. A significância das correlações foi testada e apresentada em nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para explorar a estrutura multivariada do conjunto de variáveis, foi conduzida uma Análise de Componentes Principais (ACP), com padronização prévia das variáveis (z-score). Foram obtidos os percentuais de variância explicada por componente e construído biplot para interpretação conjunta dos scores e cargas.

Para testar os efeitos de Tratamento, Estádio (N1 vs N2) e da interação Tratamento × Estádio, foi ajustado um modelo linear misto (análogo à ANOVA de medidas repetidas), considerando tratamento, estágio e sua interação como efeitos fixos e intercepto aleatório para o “sujeito” (repetição dentro de tratamento), a fim de contemplar a correlação intrassujeito entre N1 e N2. A significância dos efeitos foi avaliada por testes do tipo Wald (qui-quadrado).

Quando identificada interação significativa, foram conduzidos pós-testes de efeitos simples: (i) comparação pareada entre N2 e N1 dentro de cada tratamento (teste t pareado quando apropriado; caso contrário, teste de Wilcoxon), e (ii) comparação entre tratamentos dentro de cada estágio, empregando Tukey para as variáveis com distribuição aproximadamente normal. Para controle do erro tipo I em comparações múltiplas, utilizou-se ajuste de p-valores pelo método de Holm (e adicionalmente FDR quando aplicável).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização dos isolados (fenotípica)**

#### **4.1.1 Caracterização dos isolados**

Foram obtidos 16 isolados da rizosfera de mangabeiras: (RRC21, RRC2B1, RRC2B2, RRH1A, RRH4A, RRH4D, RRH72B, RRH82A, RRH82B, RRZ2A, RRZ32, RRZ43B, RRZ63A, RRZ63B, RRZ83B e RRZB2) (tabela 1). O tempo de crescimento variou entre 24 e 48 horas: 11 isolados apresentaram crescimento visível em 24 h (RRC21, RRC2B1, RRH1A, RRH4A, RRH4D, RRH82AB, RRZ2A, RRZ32, RRZ63B, RRZ83B e RRZB2), enquanto 5 isolados necessitaram de 48 h para crescimento visível (RRC2B2, RRH72B, RRH82A, RRZ43B e RRZ63A), refletindo a diversidade de estratégias fisiológicas e velocidades de multiplicação. Essa diversidade é típica da rizosfera, onde os exsudatos radiculares favorecem microrganismos com diferentes capacidades de adaptação (Costa et al., 2014; Assumpção et al., 2009).

Quanto ao padrão de crescimento, 7 isolados formaram colônias maiores que 1 cm (RRC21, RRC2B2, RRH72B, RRH82AB, RRZ2A, RRZ63A e RRZB2), enquanto 9 isolados apresentaram colônias menores, com diâmetro inferior a 1 cm (RRC2B1, RRH1A, RRH4A, RRH4D, RRH82A, RRZ32, RRZ43B, RRZ63B e RRZ83B). Colônias maiores podem estar associadas a uma maior produção de exopolissacarídeos, o que favorece a adesão e a estabilidade microbiana, enquanto as colônias menores refletem estratégias de colonização diferentes, sem necessariamente indicar menor potencial funcional (Berg et al., 2005; Madigan et al., 2015).

A análise da reação de Gram dos isolados revelou predominância de bactérias Gram-positivas com 11 isolados apresentando esse comportamento: RRH1A, RRH72B, RRH82A, RRH82B, RRZ2A, RRZ32, RRZ43B, RRZ63A, RRZ63B, RRZ83B e RRZB2 (Figura 1).

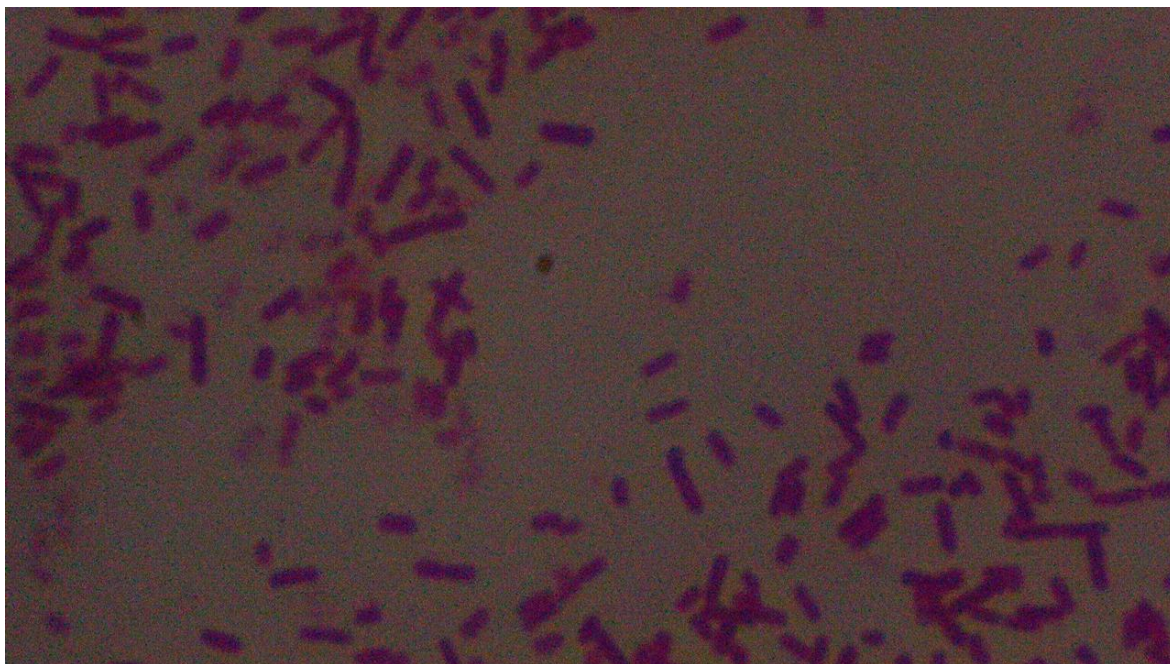


Figura 1. Imagem capturada do teste de gram do isolado RRZ2A (gram-positivo). Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Já os isolados RRC21, RRC2B1, RRC2B2, RRH4A e RRH4D apresentaram comportamento Gram-negativo (Figura 2).

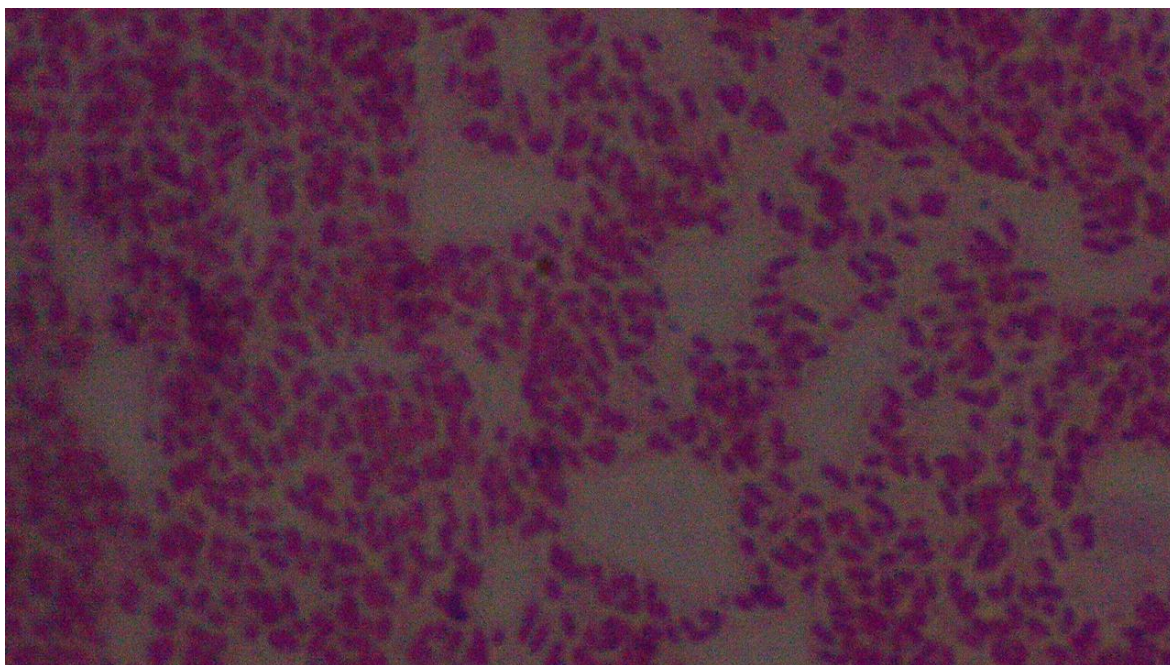


Figura 2. Imagem capturada do teste de gram do isolado RRC2B2 (gram-negativo). Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

A predominância de bactérias Gram-positivas é relevante, já que muitas delas atuam como bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), contribuindo para o desenvolvimento inicial das plântulas. No entanto, a reação de Gram, sozinha, não permite

determinar a patogenicidade, sendo necessária a realização de testes complementares para avaliar o potencial biotecnológico e fitossanitário dos isolados (Lopes et al., 2016; Backer et al., 2018)

Tabela 1. Caracterização dos isolados da rizosfera de mangabeiras.

Isolado	Padrão de colônia	de Diâmetro > 1 cm	Gram	Tempo de crescimento (h)
RRC21	Unido	+	-	24
RRC2B1	Separado	-	-	24
RRC2B2	Unido	+	-	48
RRH1A	Unido	-	+	24
RRH4A	Separado	-	-	24
RRH4D	Unido	-	-	24
RRH72B	Separado	+	+	48
RRH82A	Unido	-	+	48
RRH82AB	Unido	+	+	24
RRZ2A	Separado	+	+	24
RRZ32	Separado	-	+	24
RRZ43B	Separado	-	+	48
RRZ63A	Unido	+	+	48
RRZ63B	Separado	-	+	24
RRZ83B	Separado	-	+	24
RRZB2	Separado	+	+	24

Diâmetro: (+) superior a 1 cm; (-) inferior a 1 cm. Gram: (+) Gram-positivas; (-) Gram-negativas. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

#### 4.1.2 Dendrograma UPGMA e interpretação dos grupos

Com base nas características fenotípicas registradas para os isolados (padrão de colônia, diâmetro, reação de Gram e tempo de crescimento), foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA (Figura 3).



Os agrupamentos observados refletem a influência conjunta dos descritores avaliados e são consistentes com a ideia de que microrganismos da rizosfera podem organizar-se em conjuntos funcionais/fenotípicos com diferentes estratégias de crescimento e persistência no ambiente.

#### **4.2 Bactérias diazotróficas e a promoção de crescimento em alface – inoculação direta (biocondicionamento)**

As respostas dos isolados ao meio LG, que é seletivo para bactérias diazotróficas por não conter fontes de nitrogênio mineral assimiláveis, favorecendo, assim, o crescimento de microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, formaram a película característica de bactérias fixadoras de nitrogênio, conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Isso caracterizou os isolados: RRZB2, RRH4D e RRC2B2 como bactérias diazotróficas, sendo indicadas para utilização no biocondicionamento (Figura 4).



Figura 4. Formação da película no meio LG no isolados. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O bioensaio de inoculação direta (biocondicionamento) permitiu avaliar respostas de crescimento inicial de plântulas de alface sob diferentes tratamentos bacterianos em dois momentos de avaliação (N1 e N2). Considerando que efeitos associados a PGPR podem variar ao longo do desenvolvimento inicial, a análise foi organizada por estágio, permitindo comparar tanto diferenças entre tratamentos dentro de cada avaliação quanto mudanças de N1 para N2 dentro de cada tratamento.

##### **4.2.1 Síntese descritiva das variáveis morfométricas (N1 e N2)**

A síntese descritiva das variáveis morfométricas obtidas por GroundEye® (Tabela 2) apresenta médias e desvios padrão por tratamento em N1 e N2 para as variáveis área, comprimento de hipocótilo, comprimento de raiz, comprimento total e razão raiz/hipocótilo.

Tabela 2. Médias  $\pm$  desvio padrão (dp) das variáveis morfométricas por tratamento e estágio (N1 e N2).

Tratamento	N	Área	Hipocótilo	Razão	Raiz	Total
RRC2B2	N1	0.31 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.31	2.33 $\pm$ 1.02	1.98 $\pm$ 0.53	2.90 $\pm$ 0.65
RRC2B2	N2	0.44 $\pm$ 0.03	1.29 $\pm$ 0.15	1.64 $\pm$ 0.27	2.11 $\pm$ 0.33	3.40 $\pm$ 0.41
RRH4D	N1	0.41 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.12	2.46 $\pm$ 0.64	2.53 $\pm$ 0.47	3.58 $\pm$ 0.42
RRH4D	N2	0.38 $\pm$ 0.07	1.30 $\pm$ 0.38	1.59 $\pm$ 0.79	1.84 $\pm$ 0.26	3.14 $\pm$ 0.35
RRZB2	N1	0.45 $\pm$ 0.04	1.53 $\pm$ 0.22	1.76 $\pm$ 0.32	2.66 $\pm$ 0.38	4.20 $\pm$ 0.48
RRZB2	N2	0.39 $\pm$ 0.05	1.35 $\pm$ 0.24	1.35 $\pm$ 0.53	1.74 $\pm$ 0.41	3.09 $\pm$ 0.41
controle SI	N1	0.33 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.13	2.23 $\pm$ 0.74	2.16 $\pm$ 0.56	3.14 $\pm$ 0.55
controle SI	N2	0.37 $\pm$ 0.07	1.42 $\pm$ 0.31	1.56 $\pm$ 0.21	2.17 $\pm$ 0.28	3.59 $\pm$ 0.56
controle meio	N1	0.34 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.24	1.87 $\pm$ 0.62	1.90 $\pm$ 0.42	2.95 $\pm$ 0.50
controle meio	N2	0.40 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.27	1.37 $\pm$ 0.34	1.85 $\pm$ 0.14	3.24 $\pm$ 0.23

Valores expressos como média  $\pm$  dp. N por célula = 5 (repetições) para cada tratamento em cada estágio. Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

#### 4.2.2 Efeitos de Tratamento, Estádio e Interação (modelo misto / medidas repetidas)

Para testar simultaneamente os efeitos de Tratamento, Estádio (N1 vs N2) e da interação Tratamento $\times$ N sobre as variáveis morfométricas, foi ajustado um modelo misto (ANOVA de medidas repetidas), considerando as duas avaliações por unidade experimental e utilizando testes tipo Wald (qui-quadrado). Para a variável razão (raiz/hipocótilo) foi aplicada transformação  $\log(\text{razão})$  devido à não-normalidade (Tabela 3)

Tabela 3. Resumo do modelo misto (ANOVA de medidas repetidas) com testes tipo Wald (qui-quadrado).

Variável	Efeito	Wald $\chi^2$	Gl	P	p (Holm)
Área	Tratamento	24.363	4	0.000068	0.000203
Área	N (N1 vs N2)	15.016	1	0.000107	0.000213
Área	Tratamento $\times$ N	19.121	4	0.000744	0.000744
Hipocótilo	Tratamento	23.494	4	0.000101	0.000303
Hipocótilo	N (N1 vs N2)	7.386	1	0.006575	0.013149
Hipocótilo	Tratamento $\times$ N	13.090	4	0.010845	0.013149
Razão (log)	Tratamento	5.289	4	0.258885	0.517770
Razão (log)	N (N1 vs N2)	3.898	1	0.048351	0.145053
Razão (log)	Tratamento $\times$ N	1.403	4	0.843693	0.843693

Raiz	Tratamento	18.241	4	0.001107	0.002215
Raiz	N (N1 vs N2)	0.389	1	0.532847	0.532847
Raiz	Tratamento× N	19.688	4	0.000575	0.001726
Total	Tratamento	32.979	4	0.000001	0.000004
Total	N (N1 vs N2)	3.542	1	0.059845	0.059845
Total	Tratamento× N	27.073	4	0.000019	0.000038

Nota: para a variável Razão (raiz/hipocótilo) utilizou-se log(razão). Valores de p (Holm) correspondem ao ajuste por Holm dentro de cada variável.

#### 4.2.3 Pós-testes (efeitos simples)

Como a interação Tratamento×N foi significativa para parte das variáveis no modelo misto, foram conduzidos pós-testes (efeitos simples) para identificar onde estavam as diferenças: (A) comparação pareada entre N2 vs N1 dentro de cada tratamento; e (B) comparação entre tratamentos dentro de cada estágio (N1 e N2).

##### (A) Comparação N2 vs N1 dentro de cada tratamento (pareado)

Na comparação pareada por tratamento e variável, com ajuste de p-valor por Holm (por variável, cinco tratamentos), observou-se que apenas uma comparação permaneceu significativa após o ajuste: RRZB2 para “comprimento total”, apresentando redução de N1 para N2 ( $\Delta$  médio N2–N1 = -1,104), com  $p(\text{Holm})=0,0352$ .

As demais variações entre N1 e N2 dentro dos tratamentos não se mantiveram significativas após o ajuste, indicando que, de modo geral, as mudanças temporais foram heterogêneas, mas sem evidência robusta de diferença pareada na maioria das combinações tratamento-variável.

##### (B) Comparação entre tratamentos dentro de cada estágio (Tukey)

Como complemento, foram realizadas comparações múltiplas dentro de N1 e dentro de N2, aplicando Tukey para as variáveis aproximadamente normais. A tabela do relatório lista apenas as comparações significativas, com maior concentração de diferenças em N1 (fase inicial), o que é coerente com o padrão de interação observado no modelo misto. Como existe interação, os pós-testes entram para explicar onde estão as diferenças

Tabela 4. Pós-teste pareado (N2 vs N1) por tratamento.

Tratamento	Variável	$\Delta$ Médio (N2–N1)	Teste	p	p (Holm)
RRC2B2	Área	0,1320	t pareado	0,0505	0,2526

RRH4D	Área	-0,0291	t pareado	0,6120	0,7949
RRZB2	Área	-0,0544	t pareado	0,2381	0,7144
controle SI	Área	0,0358	t pareado	0,3974	0,7949
controle meio	Área	0,0636	t pareado	0,1064	0,4255
RRC2B2	Hipocótilo	0,3689	t pareado	0,0888	0,3551
RRH4D	Hipocótilo	0,2522	t pareado	0,1891	0,3781
RRZB2	Hipocótilo	-0,1835	t pareado	0,2436	0,3781
controle SI	Hipocótilo	0,4283	t pareado	0,0349	0,1746
controle meio	Hipocótilo	0,3386	t pareado	0,1033	0,3551
RRC2B2	Raiz	0,1320	Wilcoxon	0,6250	1,0000
RRH4D	Raiz	-0,6875	t pareado	0,0213	0,1067
RRZB2	Raiz	-0,9207	Wilcoxon	0,0625	0,2500
controle SI	Raiz	0,0149	t pareado	0,9597	1,0000
controle meio	Raiz	-0,0528	t pareado	0,8162	1,0000
RRC2B2	Total	0,5010	t pareado	0,2084	0,7395
RRH4D	Total	-0,4353	t pareado	0,1849	0,7395
<b>RRZB2</b>	<b>Total</b>	<b>-1,1041</b>	<b>t pareado</b>	<b>0,0070</b>	<b>0,0352</b>
controle SI	Total	0,4431	t pareado	0,2984	0,7395
controle meio	Total	0,2858	t pareado	0,4129	0,7395
RRC2B2	Razao	-0,6867	t pareado	0,2295	0,4406
RRH4D	Razao	-0,8743	t pareado	0,0370	0,1848
RRZB2	Razao	-0,4127	t pareado	0,2203	0,4406
controle SI	Razao	-0,6704	t pareado	0,0930	0,3720
controle meio	razao	-0,4938	t pareado	0,1438	0,4313

Nota:  $\Delta$  médio ( $N2-N1$ )  $> 0$  indica aumento de  $N1$  para  $N2$ ;  $\Delta < 0$  indica redução.  $p$  (Holm) = ajuste de Holm para as 5 comparações dentro de cada variável. Destaque: RRZB2–total permaneceu significativo após ajuste ( $p(\text{Holm})=0,0352$ ). Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Tabela 5. Comparações entre tratamentos em  $N1$  (Tukey) – apenas comparações significativas.

Variável	Grupo 1	Grupo 2	Dif. média (G1–G2)	p-aj (Tukey)	IC95% inf	IC95% sup
Área	RRC2B2	RRZB2	0,1411	0,0129	0,0247	0,2574
Área	RRZB2	controle SI	-0,1176	0,0468	-0,2339	-0,0012
hipocótilo	RRC2B2	RRZB2	0,6072	0,0021	0,1980	1,0164
Hipocótilo	RRZB2	controle SI	-0,5439	0,0059	-0,9531	-0,1347
Hipocótilo	RRH4D	RRZB2	0,4830	0,0159	0,0738	0,8922
Hipocótilo	RRZB2	controle meio	-0,4779	0,0173	-0,8871	-0,0687
Total	RRC2B2	RRZB2	1,2932	0,0074	0,2956	2,2909
Total	RRZB2	controle meio	-1,2444	0,0102	-2,2421	-0,2468
Total	RRZB2	controle SI	-1,0517	0,0357	-2,0494	-0,0541

Nota: Dif. média refere-se a (Grupo 1 – Grupo 2). IC95% = intervalo de confiança de 95% para a diferença. Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

### 4.2.3 Pós-testes (efeitos simples)

Como a interação Tratamento×N foi significativa para algumas variáveis, foram conduzidos pós-testes para identificar onde ocorrem as diferenças: (i) comparação pareada N2 vs N1 dentro de cada tratamento e (ii) comparação entre tratamentos dentro de cada estágio (Tukey).

Tabela 6. Comparações N2 vs N1 que permanecem significativas após ajuste de Holm.

Tratamento	Variável	$\Delta$ médio (N2–N1)	Teste	p	p (Holm)
RRZB2	Total	-1.1041	t pareado	0.0070	0.0352

Tabela 7. Comparações entre tratamentos dentro de cada estágio (Tukey) – apenas comparações significativas.

Estágo	Variável	Grupo 1	Grupo 2	Dif. Média	p-aj (Tukey)	IC95% inf	IC95% sup
N1	Área	RRC2B2	RRZB2	0.14	0.013	0.025	0.257
N1	Área	RRZB2	controle SI	-0.12	0.047	-0.234	-0.001
N1	Hipocótilo	RRC2B2	RRZB2	0.61	0.002	0.198	1.016
N1	Hipocótilo	RRH4D	RRZB2	0.48	0.016	0.074	0.892
N1	Hipocótilo	RRZB2	controle SI	-0.54	0.006	-0.953	-0.135
N1	Hipocótilo	RRZB2	controle meio	-0.48	0.017	-0.887	-0.068
N1	Total	RRC2B2	RRZB2	1.29	0.007	0.296	2.291
N1	Total	RRZB2	controle SI	-1.05	0.036	-2.049	-0.054
N1	Total	RRZB2	controle meio	-1.24	0.010	-2.242	-0.247

Dif. média refere-se a (Grupo 1 – Grupo 2). IC95% = intervalo de confiança de 95% para a diferença. Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

De forma integrada, os pós-testes confirmam que a principal evidência robusta de mudança temporal dentro de um mesmo tratamento ocorreu para RRZB2 em comprimento total, com redução significativa de N1 para N2 ( $\Delta$  N2–N1 = -1,104; p(Holm)=0,0352). Esse resultado é consistente com os gráficos de interação Tratamento×N, nos quais RRZB2 apresenta desempenho mais elevado na avaliação inicial e queda na avaliação subsequente, contribuindo para a significância da interação observada no modelo misto. Além disso, os gráficos de interação para área, hipocótilo, raiz e total evidenciam que os tratamentos não seguem um padrão temporal uniforme: enquanto alguns mantêm valores semelhantes entre N1 e N2, outros

apresentam variações em sentidos distintos, reforçando que a resposta ao biopriming é cepa-dependente e dependente do estágio. Assim, a interpretação dos efeitos deve priorizar o comportamento conjunto (N1 e N2), uma vez que diferenças pontuais em N1 podem não se manter em N2, especialmente para variáveis relacionadas ao crescimento global (área e total) e à contribuição relativa de órgãos (raiz e hipocótilo).

### **4.3 Análises multivariadas das variáveis morfométricas**

#### **4.3.1 Correlações (Pearson e Spearman)**

As correlações entre as variáveis morfométricas foram avaliadas pelos coeficientes de Pearson (associação linear) e Spearman (associação monotônica, mais robusta quando há não-normalidade), considerando o conjunto geral (N1+N2) e, complementarmente, cada estágio separadamente. De forma geral, observou-se alta coerência interna entre as variáveis de crescimento: o comprimento total apresentou associação forte e positiva com o comprimento de raiz (Pearson  $r \approx 0,846$ ; Spearman  $\rho \approx 0,807$ ;  $p < 0,001$ ), indicando que o crescimento total é fortemente influenciado pelo componente radicular. Também foram observadas correlações positivas relevantes entre área e total (Spearman  $\rho \approx 0,564$ ;  $p < 0,001$ ), reforçando que plântulas maiores tendem a apresentar maior área capturada na análise de imagem.

A variável razão raiz/hipocótilo exibiu um padrão esperado e biologicamente interpretável: correlacionou-se positivamente com raiz (Spearman  $\rho \approx 0,683$ ;  $p < 0,001$ ) e negativamente com hipocótilo (Spearman  $\rho \approx -0,654$ ;  $p < 0,001$ ), o que confirma que a razão é sensível ao balanço entre crescimento radicular e alongamento do hipocótilo. Como a razão tende a apresentar distribuição menos aderente à normalidade, a interpretação desse indicador deve priorizar Spearman e/ou transformação (ex.: log-razão) quando utilizado em modelos paramétricos.

#### **4.3.2 ACP (PCA) – PC1/PC2 e interpretação (crescimento geral vs contraste raiz/hipocótilo).**

A Análise de Componentes Principais (ACP/PCA) foi aplicada às variáveis área, hipocótilo, raiz, total e razão, após padronização (z-score), com o objetivo de resumir a variação conjunta e identificar quais medidas mais explicam as diferenças entre observações. Os dois primeiros componentes explicaram a maior parte da variabilidade do conjunto (PC1  $\approx 50,9\%$  e PC2  $\approx 39,4\%$ , totalizando  $\approx 90,4\%$ ).

A interpretação indicou que o PC1 representa predominantemente um eixo de “tamanho/crescimento geral”, pois recebe contribuições consistentes do comprimento total, raiz, hipocótilo e área (isto é, quando uma plântula cresce mais, essas medidas tendem a

aumentar conjuntamente). Já o PC2 é fortemente influenciado pela razão raiz/hipocótilo e pelo contraste entre raiz e hipocótilo, funcionando como um eixo de balanço morfológico: valores mais altos nesse componente tendem a refletir maior predominância do crescimento radicular em relação ao alongamento do hipocótilo. Assim, a ACP complementa a análise univariada ao mostrar que as diferenças entre observações envolvem tanto crescimento global quanto padrões de alocação entre raiz e parte aérea.

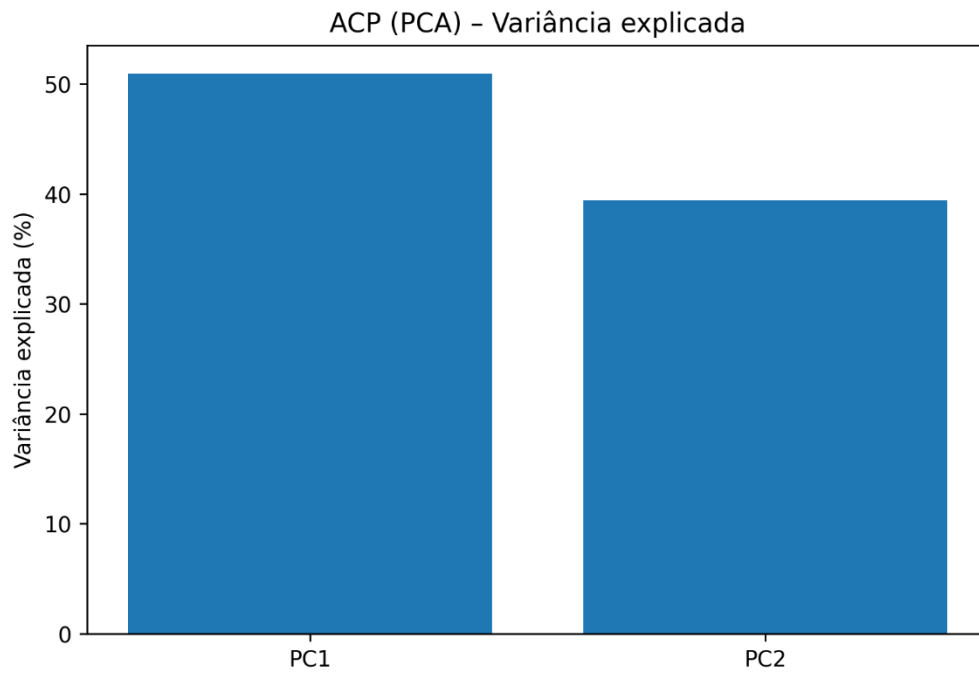


Figura 5. Percentual de variância explicada pelos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) na Análise de Componentes Principais (ACP/PCA) das variáveis morfométricas.

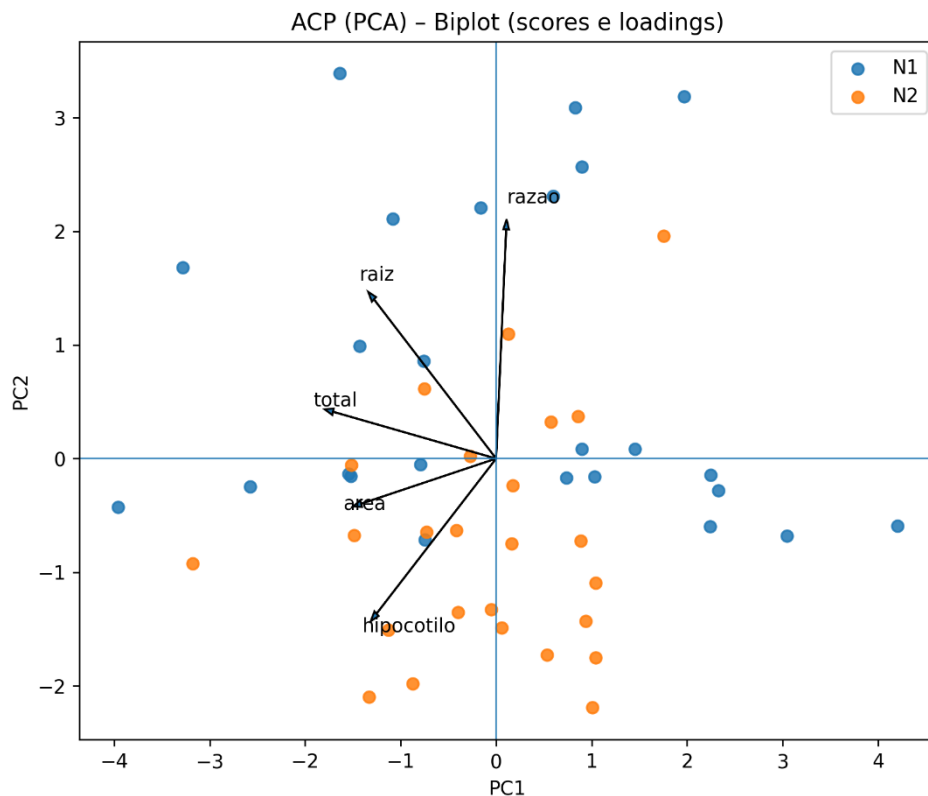


Figura 6. Biplot da Análise de Componentes Principais (ACP/PCA) das variáveis morfométricas, mostrando os scores das observações em N1 e N2 e os loadings (vetores) das variáveis nos eixos PC1 e PC2.

A predominância de Gram-positivos (11/16) é coerente com a literatura que aponta a alta adaptação de *Bacillus* spp. e outros Gram-positivos ao ambiente do solo e da rizosfera, em parte devido à tolerância a estresses ambientais e à capacidade de persistência (incluindo formação de estruturas resistentes) e produção de metabólitos. Estudos clássicos e revisões indicam que *Bacillus* frequentemente compõe parcela relevante de comunidades rizosféricas e é recorrente em isolamentos cultiváveis, o que torna plausível que parte importante dos seus isolados pertença a esse grupo (hipótese a ser confirmada por identificação molecular) (Pandey; Palni 1997).

A obtenção de 16 isolados a partir do solo rizosférico de mangabeira, com variação em morfologia colonial, diâmetro, reação de Gram e tempo de crescimento, reforça a noção de que a rizosfera é um “hotspot” de diversidade microbiana e de seleção funcional mediada pela planta.

Revisões sobre PGPR descrevem que os exsudatos radiculares e as condições físico-químicas do microambiente rizosférico modulam a estrutura e o desempenho dos microrganismos, favorecendo grupos com estratégias metabólicas e de colonização distintas, o

que é compatível com a heterogeneidade observada no conjunto isolado (Backer, Rachel et al. 2018).

Os padrões de colônias unidas (confluentes) *versus* separadas (discretas) podem ser interpretados como expressões fenotípicas de estratégias distintas de crescimento e organização. A literatura sobre biofilmes destaca que a produção de matriz extracelular/exopolissacarídeos aumenta coesão, adesão e estabilidade estrutural, com potencial relevância ecológica para persistência e colonização em superfícies, como a rizoplana. Assim, a presença de isolados com maior coalescência colonial é compatível com um perfil potencialmente mais associado à formação de agregados/biofilmes (Backer et al., 2018).

A variação no diâmetro colonial (>1 cm vs <1 cm) e no tempo de crescimento (24 vs 48 h) também sugere coexistência de perfis com diferentes velocidades de multiplicação e exigências. Em ecologia microbiana aplicada, esse contraste é frequentemente discutido como “trade-offs” entre rapidez de crescimento em condições favoráveis e estratégias mais conservativas (por exemplo, maior tolerância, maior eficiência ou especialização), o que é compatível com comunidades rizosféricas complexas (Fadiji et al., 2022).

Por fim, o dendrograma UPGMA baseado em descritores fenotípicos sintetiza a similaridade entre isolados e indica que parte do conjunto compartilha “pacotes” de características (Gram/tempo/colônia/diâmetro), ao mesmo tempo em que alguns isolados apresentam perfis mais singulares. Embora fenotipagem não substitua identificação taxonômica, a literatura reconhece que análises de agrupamento auxiliam na triagem de diversidade e na seleção de candidatos para testes funcionais, sobretudo quando o objetivo é prospecção de microrganismos com potencial biotecnológico (Backer et al., 2018).

Os resultados indicaram que os efeitos do biocondicionamento foram dependentes do estágio, com evidência de interação Tratamento×N para variáveis-chave (área, hipocótilo, raiz e total). Esse padrão é amplamente consistente com o que a literatura descreve para tratamentos de sementes com microrganismos: benefícios podem ser fortes no início (emergência/vigor) e reduzir ou mudar à medida que a planta cresce, devido à dinâmica de colonização, competição com a microbiota residente e transição do controle fisiológico da plântula para estágios subsequentes.

Revisões específicas sobre biocondicionamento e sobre tratamento de sementes com microrganismos enfatizam essa variabilidade e dependência de condições e do tempo (Mahmood et al., 2016).

No seu ensaio, a cepa RRZB2 se destacou em N1 (maiores valores médios em variáveis de crescimento), mas esse padrão não se sustentou em N2, e o pós-teste mostrou queda

significativa do comprimento total (N1→N2) em RRZB2 após ajuste (Holm). Um resultado assim é biologicamente plausível, uma vez que, mecanismos de PGPR como produção/modulação de fitohormônios (ex.: auxinas) e sinais voláteis podem acelerar respostas iniciais (alongamento, expansão), porém, dependendo do genótipo vegetal, dose/condição e equilíbrio hormonal, efeitos podem estabilizar ou até se tornar contextualmente desfavoráveis em fases subsequentes. Revisões e artigos recentes discutem justamente a natureza dependente de contexto (concentração, sensibilidade do hospedeiro, ambiente) e a possibilidade de respostas não lineares quando há sobre-estímulo hormonal ou alterações na arquitetura radicular/parte aérea (Martinez-Viveros et al., 2010; Etesami et al., 2025; Adjei et al., 2025).

Além disso, estudos e revisões sobre PGPR reforçam que os efeitos podem variar com o tempo por mudanças na colonização e na dinâmica da comunidade, o inoculante pode ter impacto inicial, mas ao longo dos dias a microbiota residente e o próprio ambiente rizosférico se reorganizam, modulando a persistência do efeito e gerando “legados” e dinâmicas temporais complexas. Isso ajuda a interpretar porque diferenças claras em N1 nem sempre permanecem em N2 (Moore, 2022; Backer et al., 2018).

No caso específico da alface, há literatura experimental mostrando que tratamentos com microrganismos podem aumentar vigor e parâmetros de crescimento/produção, mas com magnitude variável conforme o tipo de microrganismo, formulação/consórcio e condições de cultivo. Isso reforça a necessidade das suas recomendações finais, identificar RRZB2 e testar mecanismos (FBN, solubilização, fitohormônios/ACC deaminase), bem como validar em condições controladas e com acompanhamento temporal (Jaoudé, 2025; Suarez-Stella, 2023; Poštic et al., 2021).

As correlações mostraram forte coerência entre as variáveis estruturais (total, raiz, hipocótilo e área), o que é esperado em morfometria de plântulas, um eixo de “crescimento geral” tende a capturar o aumento conjunto de medidas relacionadas ao tamanho. A razão raiz/hipocótilo, por sua vez, comporta-se como um indicador de balanço/alocação, exibindo correlação positiva com raiz e negativa com hipocótilo — padrão também coerente com a interpretação fisiológica do indicador. Trabalhos de revisão sobre PGPR destacam que alterações em arquitetura radicular e em equilíbrio raiz/parte aérea são rotas comuns de promoção de crescimento (via hormônios, aquisição de nutrientes e modulação de estresse), o que sustenta a utilidade desses indicadores para interpretar respostas no início do desenvolvimento (Grover, 2021).

A ACP reforçou essa leitura ao separar dois eixos principais, PC1 associado ao crescimento geral (contribuições de total/raiz/hipocótilo/área) e PC2 associado ao

contraste/balço envolvendo a razão e o antagonismo entre componentes radiculares e de parte aérea. Esse padrão é típico quando o conjunto de variáveis inclui medidas de tamanho absoluto e uma variável de “proporção”, e fortalece a interpretação de que os tratamentos podem alterar tanto a magnitude do crescimento quanto a forma/estratégia de alocação, em linha com mecanismos reportados para PGPR (Grover et al., 2021).

## 5. CONCLUSÃO

Foram isoladas 16 bactérias da rizosfera de mangabeira em área de reserva extrativista, evidenciando diversidade fenotípica quanto ao padrão de colônias, diâmetro, reação de Gram e tempo de crescimento. A predominância de isolados com crescimento em 24 horas e a variedade de padrões coloniais sugerem ampla adaptabilidade e heterogeneidade ecológica no ambiente rizosférico.

No ensaio de inoculação direta em alface, os resultados indicaram que os efeitos sobre as variáveis morfométricas foram dependentes do tempo de avaliação, com evidência de interação Tratamento  $\times$  Estádio (N1 vs N2) para variáveis de crescimento (especialmente área, hipocótilo, raiz e comprimento total). Em termos práticos, a cepa RRZB2 se destacou na avaliação inicial (N1), associando-se a maior vigor/crescimento inicial; entretanto, o efeito não se manteve em N2, e observou-se redução significativa do comprimento total de N1 para N2 em RRZB2. Assim, RRZB2 deve ser interpretada como candidata promissora para promoção de crescimento inicial, mas com resposta estágio-dependente, o que precisa ser considerado em validações posteriores.

Recomenda-se a identificação molecular das cepas prioritárias e a realização de ensaios funcionais para elucidar mecanismos associados a PGPR, como fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de nutrientes e produção/modulação de fitohormônios, além de testes de desempenho sob condições controladas e em viveiro/casa de vegetação. De modo geral, a rizosfera da mangabeira mostrou-se uma fonte promissora de isolados com potencial para desenvolvimento de bioinsumos, destacando-se RRZB2 como PGPR, com a ressalva de que sua resposta deve ser avaliada em diferentes momentos do desenvolvimento e condições de cultivo.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABOU JAOUDÉ, R. *et al.* Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria synthetic consortium on growth, yield, and metabolic profile of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown under suboptimal nutrient regime. *Horticulturae*, v. 11, n. 1, art. 64, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae11010064>.
- ADJEI, M. O. *et al.* The mechanisms of *Bacillus subtilis* as a plant-beneficial microorganism. *Microorganisms*, v. 13, n. 2, art. 255, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020255>.
- ALVES, T. S. *et al.* Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejos. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 33, p. 341-347, 2011.
- AVIZ, R. O. *et al.* Eficiência de fixação de N por rizobactérias nativas do semiárido. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 12, n. 10, p. 81-92, 2021.
- BACKER, R. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, art. 1473, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>.
- BARBOSA, J.; OLIVEIRA, J.; BARBOSA, J.; MARTINS FLHO, A.; MEDEIROS, E.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência de esterco bovino e microrganismo promotores de crescimento na cultura da Alface (*Lactuca sativa*L.), no município de Garanhuns, PE. *Cadernos de Agroecologia, Porto Alegre*, v.13, n.1, p.1-7, 2018.
- BORAH, P.; GOGOI, N.; ASAD, S. A. *et al.* Uma visão sobre a mitigação de estresses mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 42, p. 3229-3256, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-023-10979-2>.
- BUZINARO, T. N.; BARBOSA, J. C.; NAHAS, E. Atividade microbiana no solo em pomar de laranja em resposta ao cultivo de adubo verde. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 31, n. 2, p. 438-444, 2009.
- CARDARELLI, M. *et al.* Seed treatments with microorganisms can have a biostimulant effect by influencing plant growth and health. *Microorganisms*, v. 10, n. 3, art. 520, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030520>.
- CARVALHO FILHO, J. L. S. de; GOMES, L. A. A.;MALUF, W. R. Tolerância ao florescimento precoce e características comerciais de progênies F4 de alface do cruzamento Regina 71 x Salinas 88. *Acta ScientiarumAgronomy, Maringá*, v.31, n.1, p.37-42, 2009. DOI: 10.4025/actasciagron.v31i1.6607
- COSTA, R. *et al.* Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 56, p. 236-249, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00044.x>.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1995.

ETESAMI, H. The dual nature of plant growth-promoting bacteria. *Rhizosphere*, v. 27, art. 100688, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2025.100688>.

FAOSTAT. *FAOSTAT*. Roma: FAO, 2025. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>. Acesso em: 21 ago. 2025.

FERREIRA, A. *et al.* Primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma agropecuária sustentável. In: EMBRAPA. *Microbiologia de solos em modelos de restauração ecológica: biodiversidade e potencial biotecnológico*. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 23-45.

GANGA, R. M. D. *et al.* Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 101-113, 2010.

GRAM, H. C. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, v. 2, p. 185-189, 1884.

GROVER, M. *et al.* PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, art. 623536, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.623536>.

HANCOCK, J. F. *Evolução das plantas e a origem das espécies cultivadas*. Wallingford: CABI, 2012.

IQBAL, M. Z.; SINGH, K.; CHANDRA, R. Recent advances of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for eco-restoration of polluted soil. *Cleaner Engineering and Technology*, v. 23, p. 100845, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clet.2023.100845>.

LIMA, J. P. *et al.* Climacteric pattern of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) and its responses to temperature. *Scientia Horticulturae*, v. 59, n. 9, p. 1-5, 2015.

LIPMAN, J. G. *Soil bacteriological studies: further contributions to the physiology and morphology of members of the Azotobacter sp. groups*. New Jersey: New Jersey State Agricultural Experiment Station, 1904. (Report, 25). p. 237-289.

LOPES, L. D.; PEREIRA E SILVA, M. de C.; ANDREOTE, F. D. Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, art. 1341, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01341>.

MACHADO-DE-LIMA, N. M. *et al.* Seed biopriming at different concentrations to assess the performance of maize plants under saline stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 69, n. 1, p. 23-34, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/sjppn.2023.69.1>.

MADIGAN, M. T. *et al.* *Brock biology of microorganisms*. 14. ed. Boston: Pearson, 2015.

MAHMOOD, A. *et al.* Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 92, n. 8, art. fw112, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fw112>.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria: effects on plant growth and soil microbial communities. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 10, n. 3, p. 293-319, 2010.

MEENA, V. S. *et al.* Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review. *Ecological Engineering*, v. 107, p. 8-32, 2017.

MOORE, J. A. M. *et al.* Ecosystem consequences of introducing plant growth promoting rhizobacteria. *New Phytologist*, v. 236, n. 3, p. 1253-1270, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.18472>.

MOREIRA, F. M. de S. *et al.* Visão de bactérias associativas diazotróficas: diversidade, ecologia e potenciais aplicações. *Comunicata Scientiae*, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

NAZIR, N.; KAMILI, A. N.; SHAH, D. Mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth: a review. *International Journal of Management, Technology and Engineering*, v. 8, n. 7, p. 709-721, 2018.

NASCIMENTO, R. S. M.; CARDOSO, J. A.; COCOZZA, F. D. M. Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no oeste da Bahia. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, n. 8, p. 856-860, 2014.

NUNES, Valdinete Vieira; SILVA-MANN, Renata; SOUZA, Juliana Lopes; CALAZANS, Crislaine Costa. Pharmaceutical, food potential, and molecular data of *Hancornia speciosa* Gomes: a systematic review. *Genetic Resources and Crop Evolution*, [S.l.], v. 69, p. 525-543, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01319-w>.

PANDey, A. *et al.* *Bacillus* species: the dominant bacteria of the rhizosphere beneficial to plants and environment. *Microbiological Research*, v. 152, p. 1-20, 1997.

POŠTIĆ, D. *et al.* Germination and the initial seedling growth of lettuce influenced by microbial biostimulants. *Plants*, v. 10, n. 9, art. 1913, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10091913>.

PORTO, E. M. V. *et al.* O capim *Andropogon*. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 43, n. 317, p. 26-36, 2022.

TAVARES, A. T.; VAZ, J. C.; HAESBAERT, F. M.; REYES, I. D. P.; ROSA, P. H. L.; FERREIRA, T. A.; NASCIMENTO, I. R. Adubação NPK como promotor de crescimento em alface. *Agri-Environmental Sciences*, v. 5, n.(s/n), p.1-9, 2019. DOI: 10.36725/agries.v5i0.1215.

SINGH, A. K.; SINGH, M.; SINGH, S. Seed bioprimering with beneficial microbes: a sustainable approach for improving crop productivity. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 35, n. 3, p. 731-742, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9565-0>.

SUÁREZ-ESTRELLA, F. *et al.* Seed priming by application of *Microbacterium* spp. strains enhances germination and early growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, v. 323, art. 112441, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112441>.

SUN, Wenli; SHAHRAJABIAN, Mohamad Hesam; CHENG, Qi. *Nitrogen fixation and diazotrophs – A review*. *Romanian Biotechnological Letters*, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 2834-2845, 2021. DOI: 10.25083/rbl/26.4/2834-2845.