



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



SOFIA PEDROSA ASSUNÇÃO

**Avaliação do potencial de promoção de crescimento vegetal de bactérias tolerantes à
Arsênio em sementes de Feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, FABACEAE)**

Ouro Preto - MG

Setembro de 2025

Sofia Pedrosa Assunção

**Avaliação do potencial de promoção de crescimento vegetal de bactérias tolerantes à
Arsênio em sementes de Feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, FABACEAE)**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciência
Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como
pré-requisito para a obtenção do título de bacharela em
Ciências Biológicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Camila Carrião M. Garcia

Coorientadora: M. Lorrana Cachuite M. Rocha

Ouro Preto - MG

2025



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Sofia Pedrosa Assunção

Avaliação do Potencial de Promoção de Crescimento Vegetal de Bactérias Tolerantes à Arsênio em Sementes de Feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, FABACEAE)

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel

Aprovada em 03 de setembro de 2025

Membros da banca

Profa. Dra. Camila Carrião Machado Garcia - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Ms. Lorrana Cachuite Mandes Rocha - Co orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa. Dra. Jéssica Pereira de Matos, Instituto Federal Farroupilha
Ms. Glória Braga Faria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

Camila Carrião Machado Garcia, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 14/10/2025



Documento assinado eletronicamente por **Camila Carrião Machado Garcia, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/10/2025, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0996650** e o código CRC **447B7877**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.013419/2025-85

SEI nº 0996650

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar ao longo desta jornada universitária.

Aos meus pais, que me apoiaram e me incentivaram a não desistir dos meus sonhos, sem o amor e confiança deles nada disso seria possível.

Agradeço ao Pedro por todo o suporte e amor desde o início, às minhas amigas, Giovana, Laura, Ludmila e Mariana, que sempre estiveram ao meu lado em momentos difíceis e reflexivos, minha sincera gratidão, vocês fizeram esta jornada se tornar mais leve com o apoio, companheirismo e alegria. Sou extremamente grata a todos aqueles que fizeram parte desta trajetória do começo ao fim, seja a com ajuda na mudança, das caronas de Itabirito a Ouro preto às Segundas-feira ou simplesmente por perguntarem se eu estava bem e como ia o andar da faculdade.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Camila Carrião pela oportunidade de estar em seu laboratório e me permitir fazer ciência, e me encontrar. À Lorrana por toda a empatia, paciência, e ajuda ao longo deste tempo.

Ao LabDNA por me proporcionar trocas de experiências, vivências e conhecimento. Além de entender que, não é possível fazer ciência ou despertar a curiosidade para isso, sozinha, um ambiente leve, acolhedor e às vezes caótico torna isso muito mais fácil e interessante.

Agradeço à UFOP, à CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento e pela realização deste projeto, além de todos os professores que se dispuseram a compartilhar seu conhecimento ao longo destes anos.

RESUMO

O Arsênio (As) é um elemento químico classificado como um semimetal, é encontrado em diferentes estados de oxidação e podendo formar compostos orgânicos ou inorgânicos. Tal elemento pode ser encontrado em grandes concentrações em rochas em algumas regiões do mundo e pode ser liberado para o solo e para a água através do intemperismo natural ou de ações antrópicas. Os humanos podem se intoxicar, especialmente ao consumir água e alimentos contaminados, por este semimetal. O contato crônico ou o consumo de arsênio pode levar ao surgimento de lesões dérmicas, distúrbios gástricos e até desenvolvimento de câncer. O arsênio afeta também as plantas e, de modo geral, o semimetal pode comprometer o desenvolvimento das raízes, prejudicando a absorção de nutrientes essenciais, como ferro (Fe), fósforo (P) e nitrogênio (N), além da água. Consequentemente, a taxa fotossintética e o crescimento das partes aéreas são prejudicados. As bactérias conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) podem se associar a vegetais ajudando na promoção de crescimento vegetal, detoxificando o semimetal do ambiente ou da planta contaminada. Tais bactérias contam com inúmeros mecanismos de tolerância e resistência para lidar com os efeitos tóxicos do arsênio em seu próprio metabolismo. O **objetivo** deste trabalho é avaliar o potencial de promoção de crescimento vegetal na presença de arsênio de 10 isolados bacterianos altamente tolerantes ao arsênio em sementes de *Phaseolus vulgaris* com potencial de se tornarem agentes de remediação de solos contaminados, além de possivelmente atuarem como promotoras de crescimento vegetal possibilitando o cultivo sustentável e seguro de alimentos em solos contaminados. **Metodologia:** Foram avaliados 10 isolados bacterianos com características distintas com alta tolerância a diferentes espécies químicas de arsênio. Estes foram submetidos a ensaios coloração de Gram, de potencial antagonista, produção de enzimas hidrolíticas, de crescimento em diferentes faixas de salinidade, produção de HCN e fixação de nitrogênio, produção de hormônios vegetais (AIA) e ensaios com as sementes de *P. vulgaris* com doses estabelecidas de Hidrogenoarsenato de sódio e Metarsetato de sódio com e sem o consórcio bacteriano. **Resultados:** Os isolados do estudo não apresentaram halo de inibição no ensaio de potencial antagonista possibilitando o uso de um consórcio bacteriano em experimentos futuros, 5 isolados bacterianos obtiveram um resultado positivo para a produção de amilase e obtiveram um bom crescimento em todos os níveis de salinidade. Apesar de não conseguirem produzir AIA, nitrogênio, HCN, algumas enzimas hidrolíticas e não apresentarem resultados significativos nas sementes, os isolados ainda podem ser bons PGPB em solos contaminados com arsênio devido a sua alta tolerância a espécies químicas deste semimetal.

Palavras-chave: Arsênio, Promoção de Crescimento Vegetal, PGPB Biorremediação, Biotecnologia.

ABSTRACT

Arsenic (As) is a chemical element classified as a metalloid, found in different oxidation states and capable of forming organic or inorganic compounds. It can occur in high concentrations in rocks in certain regions of the world and may be released into soil and water through natural weathering or anthropogenic activities. Humans can become intoxicated, especially through the consumption of contaminated water and food. Chronic exposure or ingestion of arsenic may lead to skin lesions, gastrointestinal disorders, and even cancer development. Arsenic also affects plants, generally impairing root development and consequently reducing the uptake of essential nutrients such as iron (Fe), phosphorus (P), and nitrogen (N), as well as water. As a result, photosynthetic rates and aerial growth are negatively impacted. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) can associate with plants, enhancing growth and detoxifying the metalloid from the environment or the contaminated host. These bacteria possess multiple tolerance and resistance mechanisms to cope with the toxic effects of arsenic in their own metabolism. The **objective** of this study was to evaluate the plant growth-promoting potential of 10 highly arsenic-tolerant bacterial isolates in *Phaseolus vulgaris* seeds, aiming at their possible use as bioremediation agents in contaminated soils and as plant growth promoters to enable safe and sustainable food production. **Methodology:** Ten bacterial isolates with distinct characteristics and high tolerance to different arsenic species were assessed. They were tested for Gram and endospore staining, antagonistic potential, production of hydrolytic enzymes, growth under different salinity levels, HCN production and nitrogen fixation, phytohormone (IAA) production, and seed assays with *P. vulgaris* exposed to sodium hydrogen arsenate and sodium metarsenite, with and without bacterial consortium. **Results:** The isolates showed no inhibition halo in the antagonistic assay, allowing the potential use of a bacterial consortium in future experiments. They did not produce hydrolytic enzymes such as cellulase, pectinase, or protease, nor HCN, nitrogen fixation, or IAA. However, five isolates tested positive for amylase production and showed good growth under all salinity levels. Despite the lack of IAA, nitrogen fixation, HCN, and certain hydrolytic enzymes, as well as the absence of significant results in seed experiments, the isolates may still be considered promising PGPB candidates for use in arsenic-contaminated soils due to their high tolerance to this metalloid.

Keywords: Arsenic, Plant Growth Promotion, PGPB Bioremediation, Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos causados pelo arsênio em plantas.....	19
Figura 2: Processos de fitorremediação de plantas com o semimetal.	21
Figura 3: Interação bactéria-arsênio.	26
Figura 4: Visão geral dos mecanismos de controle de especificidade de hospedeiros em interações parasitárias (A), mutualistas (B) e cooperativas (C).	28
Figura 5: Imagem ilustrativa e descritiva do <i>Phaseolus vulgaris</i> descrita por Van Houtte, L.B., Flore des serres et des jardin de l'Europe (1845-1880) Fl. Serres. Fonte. Imagem retirada de http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=51628 , acessado em 03/12/2012 , acesso em 11/12/2024.	34
Figura 6: Representação de fases do desenvolvimento (semente, germinação e plântula) de uma semente de <i>Phaseolus vulgaris</i>	35
Figura 7: Etapas da fase vegetativa.	35
Figura 8: Etapas da fase reprodutiva.	36
Figura 9: Esquema do protocolo da coloração de Gram. fonte: autoral	38
Figura 10: Esquema de experimento da enzima hidrolítica amilase.	40
Figura 11: Esquema de experimento da enzima hidrolítica celulase.	41
Figura 12: Esquema das etapas de esterilização das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	44
Figura 13: Esquema de experimentação das doses inibitórias máximas na germinação de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	45
Figura 14: Análise do crescimento do isolado 7ASA5 no tapete bacteriano (Controle) em 48 horas, tendo resultado negativo, ou seja, ausência do halo de inibição. Fonte: autoral	48
Figura 15: Gráfico da produção da enzima hidrolítica amilase.	50
Figura 16: Placas petri com meio diferencial para produção de amilase após 48 h de incubação.	50
Figura 17: Comparação entre o controle (1) e o isolado 30ASC 12 (2), tendo um resultado negativo para a produção de ácido cianídrico, devido a não transformação da coloração do papel filtro de amarelo para marrom.	51
Figura 18: Eppendorfs com meio diferencial para fixação de Nitrogênio após 48 h de incubação.....	52
Figura 19: Resultados do teste de concentrações inibitórias mínimas e máximas de Hidrogenarsenato de sódio.	53
Figura 20: Resultados do teste de concentrações inibitórias mínimas e máximas de Metarsenito de sódio.	53
figura 21: Desenvolvimento das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas em meio de cultura com diversas concentrações de Hidroarsenato de sódio.....	53
Figura 22: Desenvolvimento das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas em meio de cultura com diversas concentrações de Metarsenito de sódio.....	54

Figura 23: Desenvolvimento das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas em meio de cultura com diversas concentrações de Hidroarsenato de sódio	58
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Processos que conferem resistência ao arsênio.....	23
Quadro 2: Lista dos isolados bacterianos utilizados no estudo.	37
Quadro 3: Resultado da coloração de Gram e morfologia.....	46
Quadro 4: Resultados após a medição da OD dos isolados bacterianos.....	47
Quadro 5: Resultado das placas do ensaio de potencial antagonista.....	48
Quadro 6: Resultado da produção da enzima hidrolítica amilase.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC deaminase: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminase

Ag: Símbolo do elemento químico Prata

AIA: ácido indol acético

As₂O₃: Trióxido de Arsênio

As³⁺: Arsenito

As⁵⁺: Arsenato

As: Símbolo do elemento químico Arsênio.

AsB: Arsenobetaína

AsC: Arsenocolina

ATP: adenosina trifosfato

CAT: catalase

Cu: Símbolo do elemento químico Cobre

DMA: ácido dimetilarsínico

DNA: ácido desoxirribonucleico

ERs; Espécies reativas

Fe: Símbolo do elemento químico Ferro

FeAsS: arsenopirita

FeS₂: arsenato pirita

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HCN: ácido cianídrico

HCN; cianeto de hidrogênio

iAs : Arsênio inorgânico

ISR: resistência sistêmica induzida

KGDH: α-cetoglutarato desidrogenase

LB : luria bertani

MG: Minas Gerais

MMA: ácido monometilarsônico

N: elemento químico Nitrogênio

NH₃: amônia

O₂⁻ : ânion radical superóxido

OD:OD: do inglês Optical Density - Densidade óptica

OH: radical hidroxila

OMS: Organização mundial da saúde

P; elemento químico Fósforo

Pb: Símbolo do elemento químico Chumbo

PCs: fitoquelatinas

PDH: piruvato desidrogenase

PGPB: Plant Growth Promotion Bacteria

QS: Quorum sensing

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SAR: resistência sistêmica adquirida

SOD: superóxido dismutase

Ti: Símbolo do elemento químico Titânio

TMA : trimetilarsina

USEPA

VOCs: compostos orgânicos voláteis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 O ARSÊNIO	12
2.2 EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO E SEUS EFEITOS NO METABOLISMO	13
2.3 ARSÊNIO EM ALIMENTOS, PLANTAS E SUA RESISTÊNCIA	16
2.4 MECANISMOS BACTERIANOS DE RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA À ARSÊNIO ..	21
2.5 RELAÇÃO PLANTAS-MICRORGANISMOS	26
2.6 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (PGPB)	29
2.7 <i>Phaseolus vulgaris</i>	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. METODOLOGIA	37
4.1 ISOLADOS BACTERIANOS	37
4.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	37
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE PAREDE CELULAR	38
4.4 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES FAIXAS DE SALINIDADE	38
4.5 ENSAIO DE POTENCIAL ANTAGONISTA	39
4.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: AMILASE, CELULASE, PECTINASE E PROTEASE	39
4.6.2 Celulase	40
4.6.3 Pectinase	41
4.6.4 Protease	41
4.7 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CIANÍDRICO	42
4.8 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	42
4.9 PRODUÇÃO DE HORMÔNIOS VEGETAIS: ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)	42
4.10 ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	43
4.11 DOSES INIBITÓRIAS MÁXIMAS DE ARSÊNIO NAS TAXAS DE GERMINAÇÃO EM MEIO DE CULTURA VEGETAL	44

4.12 TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES COM E SEM ARSÊNIO E NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS EM MEIO DE CULTURA VEGETAL	45
5. RESULTADOS	46
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DE PAREDE CELULAR	46
5.2 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES FAIXAS DE SALINIDADE	46
5.3 ENSAIO DE POTENCIAL ANTAGONISTA	47
5.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	49
5.4.1 Amilase	49
5.4.2 Celulase	50
5.4.3 Pectinase	51
5.4.4 Protease	51
5.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CIANÍDRICO	51
5.6 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	52
5.7 PRODUÇÃO DE HORMÔNIOS VEGETAIS	52
5.8 CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DE ARSÊNIO NAS TAXAS DE GERMINAÇÃO EM MEIO DE CULTURA VEGETAL	53
5.9 TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES COM E SEM ARSÊNIO E NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS EM MEIO DE CULTURA VEGETAL	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	63
8.REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

O Arsênio (As) é um elemento químico pertencente ao grupo 15 da tabela periódica e de número atômico 33. Por possuir propriedades metálicas e não metálicas, o arsênio é classificado como semimetal (Nurchi Vm et al., 2020). Tal elemento é encontrado em diversos locais, como em águas e solos. No meio ambiente pode estar associado a centenas de minerais, sendo a arsenopirita (FeAsS) o mineral de arsênio mais comum (Borba & Figueiredo, 2004). Este semimetal pode ser liberado no ambiente através de processos naturais como a volatilização, atividade vulcânica e intemperismo natural, bem como de forma antrópica em processos de mineração e outras atividades exploratórias (Nurchi Vm et al., 2020).

Este semimetal pode ser encontrado em vários estados de oxidação formando compostos orgânicos como o ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC), ou compostos inorgânicos formados por íons arsenato (As^{5+}) e arsenito (As^{3+}) (Nurchi Vm et al., 2020). Além disso, a toxicidade das diversas espécies e compostos de arsênio, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), decresce na seguinte ordem: As^{3+} inorgânico, As^{5+} inorgânico, As^{3+} orgânico, As^{5+} orgânico, sendo que em termos de intensidade, o As^{3+} inorgânico é considerados 60 vezes mais tóxico que o As^{5+} inorgânico (Mabuchi et al., 1979).

Os efeitos tóxicos do Arsênio em seres humanos podem variar de acordo com o tempo de exposição e a dose exposta, sendo que na exposição aguda, sintomas como diarreia intensa e vômitos podem surgir (Mazumder et al., 1990). Já em relação à exposição crônica, ou seja, com um período maior de contato com menores concentrações, os sintomas podem variar de acordo com o estado nutricional e de saúde dos indivíduos afetados, sendo possível observar cânceres de pele, cânceres de pulmão e doenças cardiovasculares (Chiou et al., 1995).

O arsênio pode induzir modificações que perturbam a homeostase celular, como por exemplo a inibição de cerca de 200 enzimas, sendo algumas essenciais para o metabolismo energético e produção de ATP (Shen et al., 2013). No geral, o arsênio na forma de arsênio pentavalente (As^{5+}), consegue entrar nas células por canais de fosfato, afetando o transporte (Shen et al., 2013; Teixeira & Ciminelli 2005; Cutter & Cutter, 2006) e pode substituir o grupo fosfato em várias biomoléculas, prejudicando especialmente a glicólise. Já o arsênio trivalente (As^{3+}) pode inibir enzimas-chave na produção de ATP, como o complexo piruvato

desidrogenase (PDH) e o complexo α -cetoglutarato desidrogenase (KGDH) no ciclo de Krebs, pode, também, interagir com grupos sulfidril de enzimas, inibindo sua atividade e afetando enzimas antioxidantes e comprometendo processos como a conversão de piruvato em acetil-CoA.

Além disso, o arsênio induz a formação de espécies reativas (ERs) de oxigênio e nitrogênio, gerando danos em biomoléculas, incluindo o DNA (Tam et al., 2020b). Ele pode inibir proteínas de reparo de DNA, levando ao acúmulo de danos e comprometendo a integridade do material genético (Tam et al., 2020b). Essa toxicidade pode afetar tanto o reparo direto quanto indireto do DNA, agravando os efeitos deletérios (Schaumlöffel; Gebel, 1998).

Em plantas, de modo geral, o arsênio pode comprometer o desenvolvimento das raízes, prejudicando a absorção de nutrientes essenciais, como ferro (Fe), fósforo (P) e nitrogênio (N), além da água (Imran Khan.,et al, 2021). Consequentemente, a taxa fotossintética e o crescimento das partes aéreas são afetadas negativamente. A absorção de As nas plantas depende da espécie vegetal e de sua afinidade com o elemento (Preetha, J. S. Y. et al. 2023). As formas inorgânicas de arsenito e arsenato, que entram nas células vegetais, perturbam o metabolismo vegetal e podem induzir a formação de espécies reativas (ERs), como o ânion radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Nurchi VM et al., 2020).

O Arsênio também pode afetar o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos devido aos mesmos mecanismos de toxicidade descritos anteriormente. Entretanto, certos microrganismos, como algumas bactérias, possuem mecanismos de resistência que permitem sua sobrevivência em ambientes contaminados por arsênio, sem prejudicar seu metabolismo (Liao et al., 2011) . Algumas delas possuem a capacidade de biotransformar espécies químicas mais tóxicas em espécies químicas menos tóxicas, através de reações de oxidação, redução e/ou metilação (Debiec-Andrzejewska et al., 2020). Além disso, algumas bactérias conseguem fazer com que o arsênio se torne menos disponível no ambiente através de processos de bioacumulação, adsorção, biomineralização ou até volatilização (Ayangbenro & Babalola, 2017).

Existem bactérias que ao se associarem às plantas conseguem beneficiar o desenvolvimento vegetal. Tais bactérias são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB - do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*) (Glick 2012).

As PGPB geralmente influenciam o crescimento das plantas através de mecanismos diretos e indiretos (Patten & Glick, 1996). Os mecanismos diretos estão relacionados ao aumento da disponibilidade de nutrientes e à produção de hormônios vegetais (Patten & Glick, 1996). O aumento da disponibilidade de nutrientes no solo pode ocorrer através de vários processos, como fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes minerais e mineralização de compostos orgânicos (Fiodor, Angelika et al .2023). Por outro lado, os mecanismos indiretos do PGPB incluem a inibição de vários patógenos, através da produção de vários metabólitos, como compostos orgânicos voláteis (VOCs), enzimas hidrolíticas, cianeto de hidrogênio (HCN) e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminase (ACC desaminase) (Fiodor, Angelika et al., 2023).

Nas últimas décadas houve um aumento de estudos referentes ao cultivo e ingestão de alimentos contaminados por arsênio e suas consequências à saúde. (Yan, A., Wang, Y., Tan, S. et al 2020; Md. Shiblur Rahaman et al., 2021; Lim et al., 2015) Esse cenário de contaminação resulta não apenas no prejuízo ao desenvolvimento das plantas presentes em diversas áreas, mas também na possibilidade de bioacumulação desse semimetal, intoxicando indivíduos que consomem os alimentos contaminados (Sayan Bhattacharya, Prabhakar Sharma, et al 2021).

Atualmente, não existe um tratamento específico para a remediação de solos contaminados por Arsênio. Portanto, a busca por cepas bacterianas capazes de detoxificar o elemento e promover o crescimento das plantas é de extrema importância.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O ARSÊNIO

O arsênio possui seu nome derivado do termo latino “*arsenium*”, com seu símbolo indicado como “As”, sendo classificado como semimetal (Souza, 2018). Tal elemento pode ser encontrado em sua forma inorgânica, quando associado a outros elementos como oxigênio, cloro e enxofre (Anderson C. D. et al 1991). Por outro lado, o arsênio em sua forma orgânico é combinado com carbono e hidrogênio, podendo estar presente em alimentos, como peixe e mariscos, entretanto, apresenta menor toxicidade do que os compostos inorgânicos de arsênio (ATSDR, 2007; IARC, 2012). As formas orgânicas do arsênio são geralmente menos prejudiciais do que as inorgânicas (Anderson C. D. et al 1991).

Este semimetal é amplamente distribuído no planeta, é considerado o 47º elemento mais abundante na crosta terrestre (0,0006% e concentração média de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) com elevada capacidade de se associar a outros elementos (Rosa, 2011; Santos, 2016; Souza, 2018). A liberação deste elemento ocorre naturalmente por meio da dissipação, principalmente no ar, na água e no solo, devido à atividade vulcânica e à lixiviação de arsênio do solo para as águas subterrâneas, processo proveniente da erosão e do intemperismo natural (Rahaman MS. et al., 2021). Já na forma antrópica é possível citar os processos de mineração, metalurgia, fundição e petróleo (Wang et al., 2011, Song et al., 2006, Kalderis et al., 2008; Souza et al., 2022).

O arsênio possui diversos estados naturais de oxidação (3^- , 0, 3^+ e 5^+), podendo formar compostos orgânicos como o ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC), e compostos inorgânicos como o arsenato (As^{5+}), arsenito (As^{3+}), arsina (As^{-3}), além do arsênio elementar (Nurchi Vm et al., 2020). Sua ocorrência dependerá de alguns fatores, como pH, e o potencial redox (Eh) (Masscheleyn, Delaune & Patrick 1991).

Em ambientes aquáticos, o arsenato se faz mais presente em regiões aeróbicas do que em ambientes anaeróbicos. Isto ocorre porque uma vez em contato com o oxigênio atmosférico o arsenito, forma trivalente, é oxidado a arsenato (Abedin; Feldmann; Meharg, 2002; Xia *et al.*, 2017). Além disso, a toxicidade das diversas espécies e compostos de arsênio, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), decresce na seguinte ordem apresentada: As^{3+} inorgânico, As^{5+} inorgânico, As^{3+} orgânico, As^{5+} orgânico, sendo que em termos de intensidade, o As^{3+} inorgânico é considerado 60 vezes mais tóxico que o As^{5+} inorgânico (Mabuchi et al., 1979), e sua toxicidade é mediada de acordo com seu estado de oxidação.

2.2 EXPOSIÇÃO AO ARSÊNIO E SEUS EFEITOS NO METABOLISMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a principal forma de exposição humana ao arsênio ocorre por meio da ingestão de alimentos e água contaminados. Além disso, compostos de arsênio (As) e de arsênio inorgânico (iAs) são classificados como carcinógenos do Grupo 1, conforme a Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos (LINACH, 2013). Esses compostos também ocupam a primeira posição entre as substâncias de ocorrência natural com risco significativo à saúde humana, segundo a lista de substâncias prioritárias da ATSDR, dos Estados Unidos (ATSDR, 2005).

Com a possibilidade iminente de intoxicação por ingestão de águas contaminadas por Arsênio, desde 2001, a OMS e a US EPA consideram a concentração máxima de As em águas potáveis ou destinadas ao consumo até cerca de 10µg/L e em solos para plantio 40 mg/kg (OMS,2012; WHO,2001). No entanto, algumas regiões do planeta normalmente apresentam águas com concentrações muito acima da mencionada anteriormente. Medições realizadas em águas subterrâneas nas regiões de Ouro Preto e Mariana demonstraram uma concentração de arsênio total chegando à 2980µg/L (Borba; Figueiredo; Cavalcanti, 2004).

Paracatu é uma cidade localizada em Minas Gerais, com cerca de 85.000 habitantes, conhecida por ser a maior mina de ouro a céu aberto. Possui atividades de mineração de ouro que se iniciaram em 1976-1977, e estima-se que as operações de mineração processem cerca de 55 milhões de toneladas por ano ,entre 2014 a 2018 (Möller JC et al., 2001). Os depósitos de minério de ouro apresentam baixo teor de Au, podendo variar de 0,4 a 0,6 g Au t⁻¹. Entretanto, apresentaram níveis muito altos de arsênio, acima de 4.000 ppm, e a intensidade de extração neste local contribui para a liberação de As no meio ambiente, colocando a população em risco potencial de exposição (Lima Ca et al., 2014).

O estudo interdisciplinar “Avaliação da Contaminação Ambiental por Arsênio e Estudo Epidemiológico da Exposição Ambiental Associada em Populações Humanas de Paracatu-MG”, realizado pelo Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CETEM), em colaboração com outras instituições, no ano de 2016, relata a incidência de arsênio e seus efeitos em Paracatu-MG. Tal estudo analisou a presença do semimetal nas águas de abastecimento doméstico de consumo humano na área urbana, águas superficiais, águas subterrâneas, sedimentos de fundo e solos, nas três sub-bacias hidrográficas do Rio Paracatu. Os resultados mostraram que a exposição humana ao arsênio é maior em bairros próximos à mineração de ouro em comparação com aqueles mais afastados. Isso está de acordo com os dados ambientais que indicam a presença de arsênio em material particulado na atmosfera. Além disso, os níveis de arsênio encontrados na urina da população amostrada apresentaram uma ampla variação, sugerindo que a exposição da população ao arsênio é de baixa a média.

A exposição ao arsênio pode resultar no surgimento de diversos sinais clínicos, que dependem da concentração, da duração e da via de exposição, além de fatores como idade, sexo, hábitos familiares e estado de saúde do indivíduo exposto (USEPA, 2000; ATSDR, 2007). Na exposição aguda é possível o surgimento de sintomatologias clínicas como dores abdominais, vômitos, diarreia, vermelhidão na pele, dor muscular e fraqueza. Já em casos de

exposição crônica, os sinais clínicos podem desencadear diversos problemas, incluindo lesões dérmicas, câncer de bexiga e pulmão, além de doença vascular periférica (HONG et al., 2014). A dose letal de ingestão de trióxido de arsênio para seres humanos é de 70 a 180 mg/kg ou cerca de 600 microgramas por kg/dia de massa corporal (ATSDR, 2005).

Em nível molecular a exposição ao arsênio e seus derivados pode causar um distúrbio em sistemas biológicos, como a inibição de cerca de 200 enzimas envolvidas no metabolismo energético e na produção de ATP, pela substituição dos grupos fosfatos, que são importantes e necessários para a produção de ATP e piruvato durante a glicólise, por arsenato (Shen et al., 2013). Em uma etapa intermediária entre a glicólise e o ciclo de Krebs, o As^{3+} inibe o complexo piruvato desidrogenase (PDH) e o complexo α -cetoglutarato desidrogenase (KGDH) (Bergquist et al., 2009), além de inibir e interromper o metabolismo da glicose. O As^{3+} , especialmente na forma de trióxido de arsênio (As_2O_3), pode reagir com grupos sulfidríla de enzimas (Teixeira & Ciminelli, 2005), inibindo sua atividade e afetando diretamente as enzimas antioxidantes, como as glutatônicas e também de outras enzimas como a piruvato desidrogenase, responsável pela conversão do piruvato em acetil-CoA (Miller et al., 2002). Em relação ao As^{5+} , ele pode entrar nas células pelos canais transportadores de fosfato (PO_4^-) e, em altas concentrações, pode inibir o transporte de fosfato (Cutter & Cutter, 2006).

O arsênio pode atuar como um co-carcinógeno. Um dos mecanismos mais importantes da co-carcinogênese do arsênio é a inibição do reparo do DNA (Hartwig A, et al., 2020). A presença deste semimetal pode alterar ou inibir a atividade de proteínas de reparo do DNA por meio da ligação direta a domínios de dedo de zinco, que são estruturas proteicas importantes compostas por um íon de zinco e uma combinação de quatro resíduos de cisteína e/ou histidina (Tam Lm et al., 2020).

Os danos acumulados no DNA pela inibição do reparo do DNA pelo arsênio podem resultar na geração de quebras de fita dupla. quando encontrados pela forquilha de replicação do DNA (Ying S, et al., 2009; Alexander; Orr-Weaver, 2016). Quebras de fita dupla do DNA são uma causa comum de rearranjos cromossômicos e também podem ocorrer por meio de reparo inadequado do DNA, podendo levar a vários tipos de mutações no genoma, aumentando o risco de desenvolver câncer (Hartwig A. et al., 2020)

A exposição ao arsênio induz o estresse oxidativo e formação de RS (Reactive species), que levam à formação de danos ao DNA e alteram o reparo do mesmo (Valko et al., 2016). O mal funcionamento das vias antioxidantes, resultante da disfunção mitocondrial, e da inibição de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatônica (GSH) e glutatônica peroxidase

(GPx) também, podem ser citadas como uma das principais fontes de estresse oxidativo por arsênio (NDrobna Z, et al 2009; Cavar S et al 2010; Samuel S et al., 2009). Além de afetar diretamente a função da enzima antioxidante, o arsênio pode alterar a síntese de antioxidantes, incluindo glutatona (Thompson JA et al 2009) e superóxido dismutase 1(SOD)(Yin Y, Meng et al., 2019).

A presença do arsênio, principalmente o arsênio trivalente, incluindo o arsenito inorgânico e suas formas metabólicas metiladas, podem levar a inibição o reparo do DNA ao elevar os níveis de ROS(Reactive Oxygen Species) e ERN(Reactive Nitrogen Species), que perturbam diretamente a maquinaria de reparo do DNA, e modificam os resíduos de cisteína em proteínas (Tam et al., 2020b). A desregulação da sinalização de resposta a danos no DNA, mediada pelo arsênio por meio da ubiquitinação e SUMOilação de proteínas, também compromete o reparo do DNA (Tam et al., 2020b). Os danos induzidos por mecanismos de oxidação causados pelo arsênio podem ocorrer de diferentes formas, incluindo disfunção mitocondrial, desequilíbrio antioxidante e ativação da NADPH oxidase e óxido nítrico sintase (Cooper KL, et al., 2009).

2.3 ARSÊNIO EM ALIMENTOS, PLANTAS E SUA RESISTÊNCIA

Algumas regiões do planeta possuem o arsênio em sua composição natural. No Brasil, tais regiões são também, importantes reservas de minérios de interesse econômico como, Al, Au, Fe e Manganês (Mn) (Teixeira et al., 2020), como é o caso do Quadrilátero ferrífero (QF), região que possui 7200 km², e abrange cidades como Ouro Preto, Mariana, Itabirito, Nova Lima, Barão de Cocais e parte da capital mineira, Belo Horizonte (Jacobi, 2007).

A contaminação das águas subterrâneas representa uma das principais ameaças de exposição humana ao arsênio inorgânico, principalmente em cidades como Nova Lima (MG), Santa Bárbara (MG) e Ouro Preto (MG), pertencentes ao Quadrilátero ferrífero (QF), que possuem um solo que excede os valores de referência de arsênio, visto que há grandes atividades antrópicas que intensificam a liberação no meio ambiente, como a própria mineração (Da Silva, 2017). Com o risco iminente à população local e pela composição natural das rochas nesta localidade, diversos trabalhos foram realizados para avaliar os níveis de As em que a população está exposta.

Como citado anteriormente, Borba e colaboradores (2002) evidenciaram níveis acima do permitido pela legislação em águas subterrâneas em minas antigas entre as cidades de Ouro Preto e Mariana, chegando a 2980µg/L de arsênio total. Além disso, Gonçalves e

colaboradores (2007), evidenciaram concentrações de 9-224µg/L de arsenato em fontes públicas utilizadas por moradores para hidratação na cidade de Ouro Preto, ultrapassando os limites impostos. Já nos municípios de Nova Lima, Mariana e Santa Bárbara, Abreu e seus colaboradores (2014) encontraram altos níveis de arsênio total amostrados nos solos, estimado entre 53-960 mg/kg.

Há uma crescente preocupação em países como a China (Zeng et al., 2019), Taiwan (Chiou et al., 2001) e Brasil (Mello et al., 2006), pela utilização destas águas e solos contaminados para a agricultura, no cultivo de arroz e diversos alimentos (Argos et al., 2012). O consumo destes alimentos contaminados pode gerar um impacto significativo na exposição diária (dose letal média do arsênio é de 0,06 g/kg), principalmente no processo de biomagnificação, processo pelo qual há um acúmulo e transferência de arsênio ao longo da cadeia alimentar, semelhante ao processo que ocorre com o mercúrio e o chumbo (Andrade; Rocha, 2016). É por isso que a contaminação do solo com este semimetal é preocupante, já que é possível observar os efeitos deletérios sobre a saúde humana, além dos prejuízos causados à biota do solo (Almeida et al., 2018).

No Brasil, alimentos básicos, como o arroz e feijão recebem destaque por serem os principais alimentos a contribuírem para a ingestão total de arsênio, correspondendo a 67-90% do total, sendo 46-79% proveniente do arroz e o restante, cerca de 11-23% do feijão (Ciminelli et al., 2017). Na América Latina e em países do sudeste da África esses alimentos fazem parte da base da alimentação populacional, dando ênfase principalmente ao feijão, como uma fonte potencial de exposição ao arsênio (Ciminelli et al., 2017).

A presença de As em plantas pode levar ao comprometimento em seu desenvolvimento e causar efeitos deletérios em vários processos metabólicos, incluindo a fotossíntese, absorção de nutrientes, respiração, reprodução e crescimento (Imran Khan., et al, 2021). Além disso, é possível observar a interrupção do estado hídrico da planta, a interação com os grupos funcionais de enzimas e a substituição de íons essenciais do trifosfato de adenosina (ATP) em plantas que crescem em solos contaminados com As (Gunes A et al ., 2010; Khalid S. et al., 2017).

O acúmulo de arsênio é capaz de interferir na biossíntese de clorofila através da indução de deficiência de ferro (Fe) ou da inibição de algumas etapas importantes do processo (Schoefs & Bertrand 2005). Além disso, a eficiência fotoquímica e a dissipação de calor também são afetadas, já que há mudanças relacionadas às trocas gasosas e na emissão de fluorescência (Prado & Casali 2006; Rahman et al. 2007).

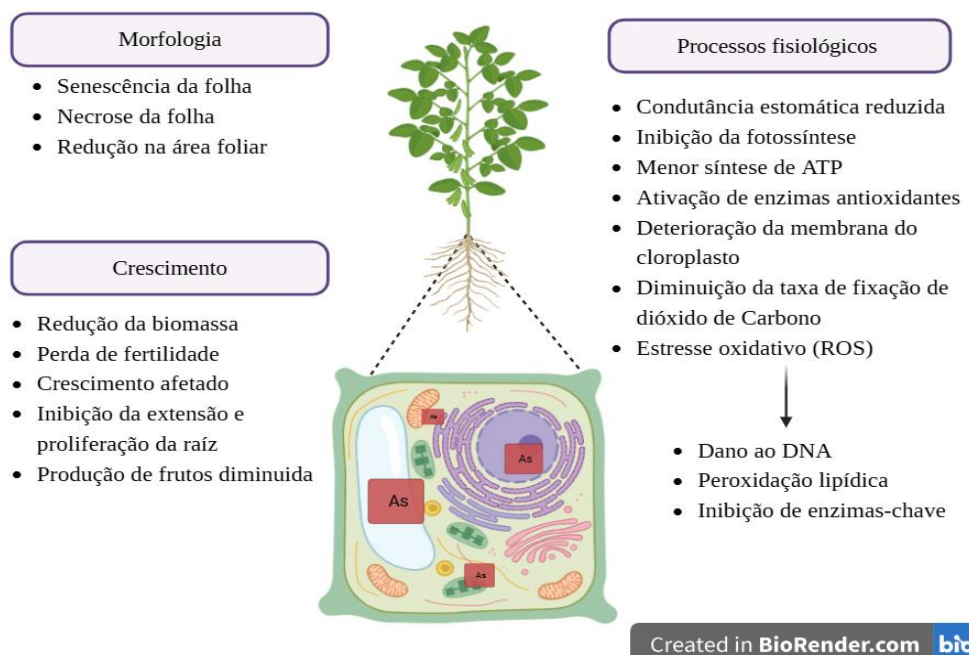
No trabalho proposto por Malik e seus colaboradores (2011) foi possível observar uma queda notável nos níveis de alguns aminoácidos importantes, como Lisina (Lys), Metionina (Met), Prolina (Pro), Treonina (Thr), Triptofano (Trp) e Valina (Val), em mudas de *Cicer arietinum L.* estressadas com As. Além disso, o semimetal causou murcha, enrolamento e necrose das lâminas foliares (Finnegan PM, et al., 2012), menor produção de frutos e reduções na área foliar e na taxa fotossintética.

Os efeitos tóxicos do arsênio no processo fotossintético podem ocorrer nas etapas fotoquímicas ou nas etapas bioquímicas ou em ambas (Abedin & Meharg 2002; Rahman e Naidu 2009). O arsênio causa lesões na membrana do cloroplasto e desorganiza as funções do processo fotossintético fundamental, a taxa de fixação de dióxido de carbono e a funcionalidade do PS-II (Fotossistema II) também reduzem consideravelmente (Stoeva N., et al 2003).

A produção de ROS pelo estresse do arsênio leva a danos negativos e intensos às plantas, visto que há danos em macromoléculas importantes, além de alterar o sistema antioxidante (Figura 1) (Chandrakar et al., 2016). Alguns estudos demonstraram que a produção aumentada de ROS em plantas ocorre por meio do vazamento de elétrons durante a redução de As^{5+} em As^{3+} , além da inibição de enzimas-chave que são vias importantes para a geração de ROS em plantas. A resistência das plantas se deve ao seu próprio sistema de defesa, ou seja, utiliza-se o próprio metabolismo para conter os danos e impactos causados pelo agente tóxico, neste caso o Arsênio (Alsahli et al., 2020). Uma das principais estratégias utilizadas pelas plantas para conter os possíveis estragos em seu metabolismo seria primeiramente, a redução de As^{5+} para As^{3+} , visto que o As^{3+} se liga somente às fitoquelatinas (PCs), e que posteriormente é sequestrado pelo vacúolo (Li et al., 2016) (Figura 2).

A síntese de proteínas de ligação metálica também é utilizada, já que podem eliminar o agente tóxico através de compartimentação e efluxo, por diferentes transportadores, como os transportadores de fosfato e de glicerol (Begum et al., 2016), a utilização do sistema antioxidante é uma maneira de proteger e garantir uma menor produção de ROSs em seu metabolismo (Armendariz et al., 2016).

Figura 1: Efeitos causados pelo arsênio em plantas. Os processos fisiológicos, como a inibição da fotossíntese, a síntese de ATP são negativamente afetados pela presença do arsênio em plantas, junto a isso, a morfologia e crescimento das folhas e das raízes são, também, impactadas; As= Arsênio; Fonte: Autoral.



As plantas absorvem os metais pesados, principalmente, através da raiz (Ondrasek et al., 2016), utilizando diversos mecanismos moleculares para lidar com diversos contaminantes (Yan et al., 2020), sendo um deles a detoxificação, processo pelo qual as plantas transformam o arsênio em uma espécie menos tóxica para seu metabolismo. Em especial, algumas plantas têm a capacidade de atuar como hiperacumuladoras de arsênio, ou seja, conseguem absorver e acumular grandes quantidades deste semimetal, tal capacidade pode ser potencializada pela modificação genética, como a superexpressão de genes envolvidos na fitorremediação, que regulam a absorção, transporte e metabolismo do arsênio (Doty et al., 2008). A absorção de As nas plantas depende da espécie vegetal e de sua afinidade com o semimetal. As formas inorgânicas de arsenito e arsenato que entram nas células vegetais interrompem seu metabolismo normal ao gerar ROS, como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em resposta ao processo de desintoxicação do As como citado em tópicos anteriores (Abbas et al., 2018).

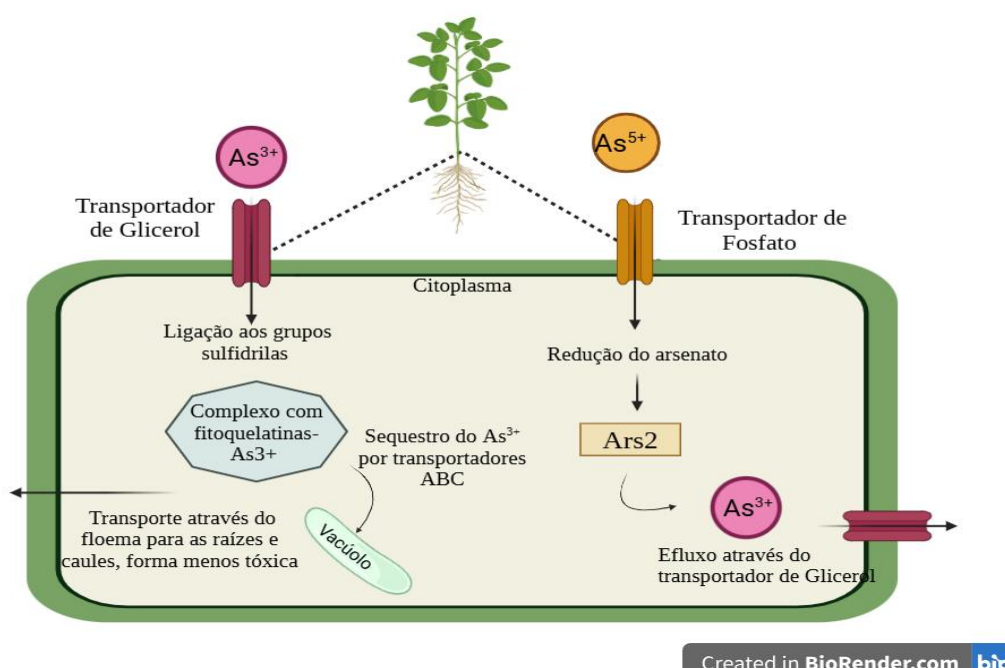
Além das formas inorgânicas, o solo, também, pode conter formas de arsênio metiladas, como o ácido monometilarsínico (MMA) e o ácido dimetilarsínico (DMA), que também são absorvidos pelas raízes (Ondrasek et al., 2016). Uma vez dentro da planta, o As é transportado por toda a planta através do xilema, sendo o As^{5+} o mais acumulado nesse processo (Ondrasek et al., 2016). O As^{3+} é transportado através do canal de aquaporina via

proteínas intrínsecas semelhantes à nodulina 26 nas células da raiz, que são codificadas por genes da planta (Zhao et al., 2008).

O arsenito possui a capacidade de romper a membrana da célula vegetal e se ligar a grupos sulfidríla de proteínas, que leva à morte celular. Durante a detoxificação do arsenito, a ligação do arsenito a grupos sulfidríla ricos em peptídeos forma um complexo com fitoquelatinas (As-PC). Com isso, o As pode ser sequestrado por transportadores ABC presentes nos vacúolos celulares e transportado através do floema para as raízes e caules, tornando-o uma forma menos tóxica (Martínez-Castillo et al., 2022).

O arsenato, por sua vez, é análogo ao fosfato, que é transportado pelos transportadores de fosfato nas células vegetais. Em seguida, há a redução a arsenito pelo redutase ARS2 no compartimento intracelular. Uma vez formado, o arsenito é detoxificado pela formação de um complexo com peptídeos ricos em tiol ou sendo exudado para fora da célula por meio de transportadores de glicerol (figura 2) (Martínez-Castillo et al., 2022).

Figura 2: Processos de fitorremediação de plantas com o semimetal. Durante a desintoxicação do arsenito, a ligação do arsenito a grupos sulfidríla ricos em peptídeos forma um complexo com fitoquelatinas (As-PC). Com isso, o As pode ser sequestrado pelos transportadores ABC nos vacúolos celulares e ser transportado pelo floema até as raízes e caules, tornando-o menos tóxico. Já o arsenato, que é análogo do fosfato, é reduzido a arsenito (As^{3+}) pela As redutase ARS2 no compartimento intracelular. O Arsenito reduzido é desintoxicado pela formação de um complexo com peptídeos ricos em tiol ou sendo transportado e efluído para fora da célula por meio de transportadores de glicerol. Adaptado de: Preetha JSY, Arun M, Vidya N, Kowsalya K, Halka J, Ondrasek G. Biotechnology Advances in Bioremediation of Arsenic: A Review. *Molecules*. 2023 Feb 3;28(3):1474. doi: 10.3390/molecules28031474.



2.4 MECANISMOS BACTERIANOS DE RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA À ARSÊNIO

Os microrganismos podem ser considerados resistentes e tolerantes a certas perturbações ocasionadas pela contaminação de metais pesados. Os microrganismos podem ser tolerantes ou resistentes aos metais pesados sendo a tolerância a capacidade de um organismos conviver com a toxicidade de um elemento com base em seu metabolismo intrínseco (Gadd, 1992). Já a resistência é a habilidade de um organismo em sobreviver a determinada perturbação usando de mecanismos induzidos diretamente pelo distúrbio em questão (Gadd, 1992).

Essa capacidade adaptativa torna alguns microrganismos especialmente úteis em processos de biorremediação. Bactérias biorremediadoras possuem a capacidade de degradar poluentes do solo, como herbicidas, pesticidas, compostos orgânicos perigosos, e metais

pesados, permitindo que as plantas se estabeleçam em um local contaminado (Pérez-Montaña et al., 2014; Liu et al., 2017).

Como citado anteriormente, o arsênio é considerado um elemento prejudicial à saúde ambiental e humana. Assim, a presença deste semimetal associado a alguns tipos de minerais como realgar (As_4S_4), arsenopirita (FeAsS) e arsenato pirita (FeS_2), pode ser liberado no ambiente pelas águas, solos e sedimentos por oxidação de sulfetos e imobilização por adsorção em óxidos ou hidróxidos de ferro (Borba & Figueiredo, 2008).

A contaminação por metais pesados em solos pode fazer com que haja mudanças na microbiota local, visto que existe um aumento na demanda de energia devido ao estresse induzido pelo semimetal (Xu et al., 2019). Atualmente, são descritos na literatura diversos processos que conferem resistência de microrganismos aos metais pesados, como demonstrado no quadro 1.

Quadro 1: Processos que conferem resistência ao arsênio.

Processos de resistência	Objetivo	Referência
Adsorção do metal na parede celular	Impedir a entrada do semimetal na célula	Wang & Zhao, 2009
Exclusão	Indução de modificações químicas alternadas em porinas na membrana, fazendo com que a captura de determinado metal seja diminuída	Rouch et al., 1995
Bombas de efluxo	Aumentar a capacidade da bactéria em expulsar o metal pesado	Sato & Kaoboyashi, 1998
Volatilização	A bactéria possui a capacidade de transformar o semimetal pesado em produto volátil	Bruins et al, 2000
Bioacumulação	Acúmulo de arsênio no interior celular	Bruins et al, 2000
Redução	Reduzir uma forma tóxica para uma menos tóxica e prejudicial	Páez-Espino et al., 2009; Andres & Bertin, 2016
Expressão do operon ars e aio	Integra mecanismos internos (ars) e externos (aio), aumentando a tolerância e a capacidade de modificação ambiental.	Andres & Bertin, 2016; Zhang et al., 2017

Tais mecanismos também podem tornar o arsênio menos biodisponível para outros seres-vivos que vivem próximos ou em associação com essas bactérias (Silver & Phung, 1996; Keim, 2011; Lee et al, 2015; Verma & Kuila, 2019). Esse feito abre a possibilidade de utilizar bactérias resistentes ao arsênio em processos de biorremediação, explorando o metabolismo

dessas bactérias, fornecendo uma alternativa mais sustentável para a descontaminação de ambientes ricos neste semimetal.

As bactérias possuem a capacidade de biotransformar o arsênio, alterando a forma química desse composto por meio de processos biológicos e, assim, detoxificando o ambiente contaminado em que se encontram (Ji et al., 1992). Tais microrganismos possuem um operon completo, como retratado na figura 4, sendo o principal e mais comum o operon *Ars*, com vários genes que codificam proteínas dedicadas a lidar e tolerar a toxicidade do arsênio (Carlin, et al., 1995). Este operon pode ser encontrado tanto no DNA cromossômico quanto em plasmídeos, evidenciando sua versatilidade (Wu et al., 1993; Oremland et al., 2003). Os genes centrais do operon *Ars* codificam as seguintes proteínas:

- a) *ArsR*: Um repressor transcricional que regula a expressão dos genes do operon em resposta à presença de arsênio.
- b) *ArsB*: Proteína que possui característica de uma bomba de efluxo de arsenito, que é responsável por exsudar esse composto tóxico da célula.
- c) *ArsC*: Proteína que possui característica similar de uma arsenato redutase, que converte arsenato em arsenito.
- d) *ArsD*: Proteína que atua como uma chaperona de arsenito transferindo o arsenito de complexos ligados à glutatona para a subunidade *ArsA* do complexo *ArsAB* e o ativa (Yang *et al.*, 2010).

A expressão dos operons *Ars* é regulada em resposta à presença de arsênio. O conjunto de genes *arsRBC* e *arsRDABC*, confere resistência dos procariotos ao arsênio, sendo *arsRDABC* associado com maiores concentrações deste metal pesado (Rosen, 2002). O arsenito presente é bombeado para fora da célula através da proteína transportadora transmembrana *arsB*. Alguns organismos possuem o gene *arsA* acoplado a *arsB*, formando o complexo *ArsAB*. O gene *arsA* codifica uma ATPase que se associa à proteína transportadora *arsB*, transformando o sistema em uma bomba de efluxo ativa. Enquanto o *ArsB* isolado funciona apenas como um antiporte dependente do gradiente de prótons, o complexo *ArsAB* utiliza a energia proveniente da hidrólise de ATP para expulsar arsenito (As^{3+}) contra fortes gradientes de concentração. Essa característica confere uma resistência muito maior ao arsenito, permitindo que os organismos sobrevivam em ambientes com elevadas concentrações desse semimetal. (Rosen, 2002).

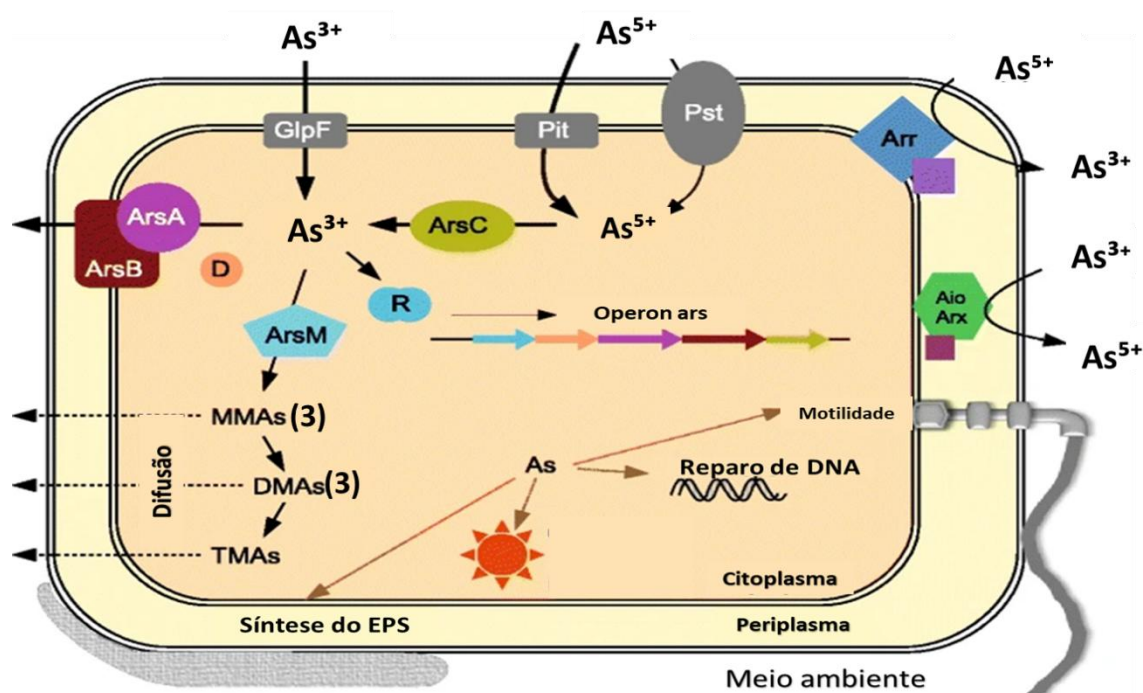
Em alguns microrganismos, a proteína Acr3p pode substituir o *arsB* como a principal via de extrusão do arsenito, podendo ser acoplado ao ArsA na ausência do *arsB* (Achour *et al.*, 2007; Castillo e Saier, 2010). Já o *arsC*, codifica uma arsenato redutase, responsável pela conversão do arsenato em arsenito e, o *arsD*, codifica para uma chaperona que transfere arsenito ligados a glutathione para a subunidade do complexo de *arsAB*, ativando-o (Yang *et al.*, 2010).

Algumas bactérias são capazes de biotransformar o arsênio, utilizando o processo de metilação como um mecanismo de detoxificação, convertendo as espécies inorgânicas tóxicas, como o As^{5+} e o As^{3+} , em formas orgânicas menos tóxicas e mais voláteis, como a mono-, di- e trimetilarsina (Qin *et al.*, 2006). O aumento da volatilidade do arsênio metilado pode compensar o aumento da toxicidade de alguns intermediários e isso se deve aos genes *arsM* e *arsR* que estão envolvidos nesse processo (Qin *et al.*, 2006). Essa reação parte, inicialmente, do arsenito, seguindo uma série de metilações oxidativas mediadas por S-adenosilmetionina metiltransferase e etapas redutoras com glutathione e outros compostos contendo tiol, resultando na produção final de TMAs (trimetilarsina) (Cullen e Bentley, 2005).

A oxidação do arsênio também é considerada um mecanismo de detoxificação, e algumas bactérias são capazes de realizar esse processo pela presença dos genes *aioAB* que codificam uma arsenito oxidase (Lett *et al.*, 2012). A regulação desse processo se dá pela presença das proteínas AioS e AioR e pelo fator sigma RpoN (Kang *et al.*, 2012). Além disso, AioX, uma proteína periplasmática, aparenta ser essencial para a regulação positiva da expressão de *aioAB* na presença de arsenito (Liu *et al.*, 2012). É possível observar dois sistemas de redução de arsenito em procariotos, um codificado pelo gene *arsC* (descrito anteriormente) e, outro que é associado à arsenato redutase respiratória, codificada pelos genes *arrA* e *arrB* (Macy *et al.*, 2000).

Durante esses processos de biotransformação de arsênio, as bactérias bioacumulam o metal até sua liberação (Dhankhar e Hooda, 2011). Algumas bactérias também podem adsorver esse semimetal, que se liga na sua membrana ou em sua parede celular. Neste processo, o semimetal adere a moléculas de superfície como o lipopolissacarídeo de membrana (LPS) (Gerbino *et al.*, 2015).

Figura 3: Interação bactéria-arsênio. O As é absorvido através de transportadores de glicerol ou fosfato. O arsenato é reduzido a arsenito que pode então ser extrudido da célula por ArsAB ou metilado por ArsM, formando intermediários metilados: arsenito monometílico (MMAs), dimetil arsenito (DMA) ou em trimetil arsina (TMA). A presença do semimetalo controla a expressão de Ars. O arsênio presente fora do citoplasma pode ser utilizado para ganho de energia através da oxidação de arsenito ou respiração anaeróbica pela redução de arsenato. Adaptado de: Kruger, et al Bacterial metabolism of environmental arsenic— mechanisms and biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol (2013) 97: 3827. doi:10.1007/s00253-013-4838-5



2.5 RELAÇÃO PLANTAS-MICRORGANISMOS

As práticas agrícolas convencionais frequentemente utilizam insumos químicos, como fertilizantes químicos, pesticidas, fungicidas e herbicidas, que permitem a proteção de plantas cultivadas contra patógenos e garantem melhor rendimento (Skamnioti e Ridout, 2005). Porém, a utilização intensa destes produtos químicos agrícolas gera danos ao meio ambiente e causam poluição dos solos, da atmosfera e das águas (Egamberdieva D., Ahmad P., et al 2018). Diante disso, o uso de microrganismos como uma alternativa biotecnológica para otimizar a produtividade vegetal de forma sustentável está sendo implementado, mitigando a utilização e dependência desses produtos químicos e promovendo uma maior segurança alimentar (Chouan et al., 2021; Hesham et al. 2021).

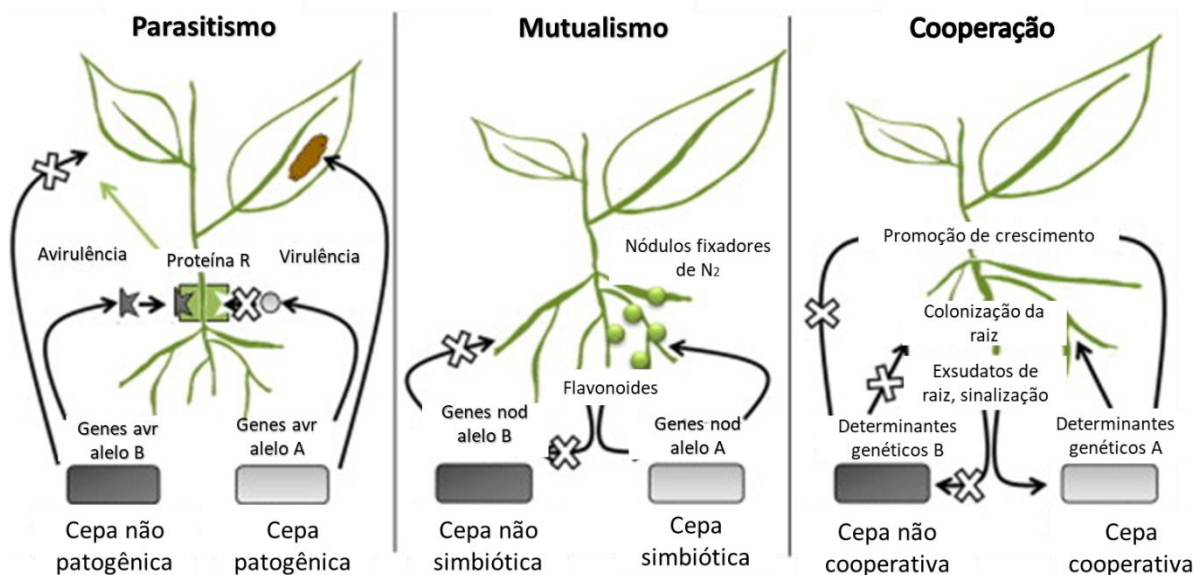
A sobrevivência das plantas e dos microrganismos é profundamente impactada pelas estratégias de adaptação e pela especificidade dos hospedeiros (Kirzinger & Stavrínides, 2012). Essa dinâmica torna a interação entre eles um conceito essencial para entender os processos de coevolução e as complexas relações que se estabelecem (Kirzinger & Stavrínides, 2012). As relações entre plantas-microrganismos podem ser parasitárias, mutualistas ou cooperativas, sendo o hospedeiro o ditador do controle de especificidade da relação (Bouwmeester et al.2007; Couillerot et al. 2009).

Em relação às estratégias parasitárias, as diferenças entre genótipo bacteriano e da planta determinam se a interação será virulenta ou não (Skamnioti e Ridout, 2005). No caso de microrganismos patogênicos, o processo inclui o reconhecimento, por parte da planta, de produtos de virulência emitidos pelos patógenos, por meio de proteínas de resistência. Esse reconhecimento pode levar, posteriormente, à manifestação de patogenicidade (Skamnioti & Ridout, 2005).

Já no mutualismo, como no exemplo a simbiose entre leguminosas e rizóbios a interação é definida em nível molecular, através de especificidade desencadeada por sinalização (Combes-Meyte et al 2012). As interações de cooperação, basicamente, correspondem a capacidade da bactéria de colonizar e estimular o crescimento vegetal através de mecanismos de reconhecimento da planta (Combes-Meynete et al., 2012). A figura 4, adaptada do artigo de Combes-Meynete e colaboradores (2012) , ilustra de forma esquemática as relações citadas. Vale ressaltar que nas relações mutualísticas e cooperativas há uma comunicação planta-microrganismo através da rizodeposição, ou seja, compostos são liberados pela raiz que fazem a orientação e deslocamento dos microrganismos, onde há a convergência genética entre ambos, levando ao aperfeiçoamento do perfil de diferenciação da microbiota, seja ela endófito ou rizosférico (Bulgarelli, D. 2013). As células presentes na rizosfera conseguem secretar diversos compostos, como, íons de ácidos orgânicos, íons inorgânicos, fitormônios, vitaminas, aminoácidos, purinas entre outros (Dakora, F.D. e Phillips, D.A.2002). Os exsudatos da raiz desempenham um importante papel na mediação das interações planta-microrganismos (Bais et al., 2006).

A quimiotaxia bacteriana é uma característica importante para a colonização da raiz e para a seleção de microrganismos orientada pela planta (de Weert et al., 2002; Hartmann et al., 2009). Ela pode estar relacionada com a adaptação nutricional, já que os exsudatos podem ser utilizados como fontes de carbono pelas bactérias em processos metabólicos (Combes-Meyte et al., 2012).

Figura 4: Visão geral dos mecanismos de controle de especificidade de hospedeiros em interações parasitárias (A), mutualistas (B) e cooperativas (C). Adaptado de: Combes-Meynet et al. 2012.



Alguns metabólitos existentes nas plantas possuem a capacidade de modular a ação dos microrganismos, como os fitormônios (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno), que têm uma função reguladora nas interações planta-microrganismo (Farah Ahmad). Eles podem reforçar a defesa contra patógenos ou facilitar a simbiose com microrganismos benéficos, além de influenciar a resposta das plantas a patógenos e microrganismos benéficos, regulando a defesa das plantas, promovendo a resistência ou, em alguns casos, facilitando a simbiose com microrganismos benéficos (Jones; Dangl., 2006).

As plantas detectam microrganismos por meio de receptores de reconhecimento de padrões que se ligam a padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), desencadeando uma defesa basal suficiente para interromper o crescimento da maioria dos microrganismos patogênicos. A maioria das bactérias e fungos não patogênicos associados às plantas produzem seus próprios MAMPs, o que levanta a questão de como os microrganismos benéficos e as plantas conseguem evitar a eliminação dos microrganismos por meio de uma resposta imunológica (Böhm H et al., 2014).

A capacidade das plantas de discriminar microrganismos patogênicos dos benéficos, é um fator determinante nas interações. Esse equilíbrio complexo não apenas influencia a saúde vegetal, mas também impacta a nutrição das plantas, destacando a importância dos microrganismos no manejo sustentável da agricultura (Hacquard S, et al., 2015).

2.6 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (PGPB)

Os microrganismos presentes na biota do solo desempenham um papel importante nos ecossistemas, já que contribuem para a ciclagem de nutrientes, a formação da estrutura do solo e o crescimento das plantas (Alkorta et al., 2017; Hagemann et al., 2017). A utilização de algumas cepas bacterianas tem sido investigada por seu potencial em aumentar o crescimento das plantas, melhorar a qualidade do solo e controlar a poluição e contaminação do solo por metais pesados e outros componentes químicos (Liu J et al., 2016). Entre essas bactérias, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (Plant Growth Promoting Bacteria- PGPB) ganham destaque por possuírem a capacidade de promover o desenvolvimento saudável das plantas, além de aumentar a resistência ao estresse ambiental submetidas (Xiao et al., 2022). Tais bactérias podem ser classificadas de acordo com as suas atividades benéficas para as plantas, como biofertilizantes, biocontroladoras ou biorremediadoras (Combes-Meynet et al., 2012).

As bactérias classificadas como biofertilizantes aumentam o crescimento das plantas diretamente, fornecendo nutrientes e fitormônios (Combes-Meynet et al., 2012). As biocontroladoras possuem a capacidade de proteger as plantas de patógenos por meio da produção de compostos, incluindo antimicrobianos, ou estimular a resistência das plantas (Combes-Meynet et al., 2012). Já as biorremediadoras detoxificam componentes tóxicos do ambiente, o que possibilita o crescimento das plantas (Liu et al., 2016).

Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem ser endofíticas e, em especial, derivadas de rizosfera que são capazes de colonizar as raízes das plantas, sob certas condições edáficas (Caporaso et al., 2010). O estabelecimento da simbiose associativa entre bactérias e plantas hospedeiras se dá em três passos: bactérias do solo se associam na rizosfera, se fixam à superfície radicular e, por fim, tornam a simbiose associativa efetiva (Combes-Meynet et al., 2012). Uma vez atraídas para o rizoplane, estas bactérias se estabelecem e aderem ao sistema radicular exercendo suas propriedades benéficas. A colonização das raízes é um processo competitivo, que, como já mencionado no tópico 2.5, é afetada por características tanto das bactérias como das plantas hospedeiras (Kloepper, 1996).

As bactérias uma vez estabelecidas no sistema vegetal da planta possuem a capacidade de influenciar no crescimento destas por meio de mecanismos moleculares diretos ou indiretos. São classificados como mecanismos diretos: o aumento da absorção de nutrientes vegetais, a fixação de nitrogênio, que é crucial para síntese de biomoléculas como as proteínas.

A fixação biológica de nitrogênio, realizado por PGPB, é o processo que converte o N₂ em amônia (NH₃), sendo realizado por microrganismos diazotróficos, predominantemente bactérias (Newton, 2000; Franche et al., 2009). Este processo é essencial para tornar o nitrogênio atmosférico utilizável pelas plantas e outros organismos, sendo um tema de grande relevância na compreensão dos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio (Mylona, Pawlowski & Bisseling, 1995).

A solubilização de fosfato, que tem o fósforo como o elemento mais importante para os vegetais depois do nitrogênio, isso se deve pelo fato de possuir um papel fundamental em praticamente todos os processos metabólicos das plantas como fotossíntese, transferência de energia, transdução de sinal, biossíntese de macromoléculas e respiração (Khan et al., 2010). Embora seja abundante no solo, ele se encontra indisponível para a absorção das plantas em suas formas orgânica e inorgânica, pois ocorrem principalmente insolúveis (Sharma et al., 2013).

Algumas PGPB do gênero *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* são capazes de disponibilizar o fosfato por meio de sua solubilização no solo, dois mecanismos principais são fundamentais a esta solubilização são a redução do pH do solo, mediado pela secreção de ácidos orgânicos, e a mineralização em fosfato orgânico por fosfatases ácidas e fitases (Richardson et al., 2009). A quantidade de fósforo solúvel liberado depende dos tipos de ácidos orgânicos produzidos pelas PGPB. Os ácidos alifáticos, como o ácido glucônico ou 2-cetoglucônico, são mais eficientes na solubilização de fosfato (Ahmed & Shahab, 2011), já na mineralização/solubilização a produção de ácidos orgânicos (tais como acético, succínico, cítrico e glucônico) ou fosfatases, é mais eficientes na liberação de ortofosfato de fósforos inorgânicos e orgânicos (Bulgarelli, 2013). Estratégias para melhorar a disponibilidade e absorção de fósforo podem contribuir significativamente para o crescimento das plantas, porque menos de 5% do teor de fósforo de solos é biodisponível para as plantas (Bulgarelli, 2013).

Além disso, a produção de sideróforos se destaca o pelo papel no metabolismo do ferro (Fe), um elemento que desempenha um papel importante como um micronutriente essencial, tanto para as plantas quanto para as bactérias, visto que está presente em vários processos biológicos vitais (Kobayashi, 2012). Suas funções incluem contribuir para a fotossíntese, a respiração celular, a biossíntese de clorofila e desempenhar um papel significativo na fixação biológica de nitrogênio (Kobayashi, 2012). Os microrganismos desenvolveram estratégias ativas para superar a limitação nutricional de podendo contornar

essa limitação utilizando agentes quelantes, os sideróforos (Dixon & Kahn, 2004). Tais substâncias são capazes de se ligar ao ferro presente no ambiente, e formar complexos solúveis que as bactérias podem absorver, permitindo-lhes atender às suas necessidades nutricionais de ferro escasso (Neilands, 1995). Esse mecanismo representa uma adaptação eficaz que muitos microrganismos desenvolveram para garantir a obtenção de ferro em ambientes onde esse micronutriente é escasso (Neilands, 1995). A excreção de sideróforos por bactérias pode estimular o crescimento das plantas, melhorando a nutrição diretamente ou inibindo fitopatógenos indiretamente ao sequestrar ferro do ambiente (Kramer, Özkaya & Kümmerli, 2020).

O último mecanismo direto destaca-se a produção de hormônios vegetais como auxinas, giberelinas e citocininas, que são uma família de moléculas que estão envolvidas em no crescimento e desenvolvimento de plantas, sendo a molécula mais importante o ácido indol acético (AIA), cujo o principal precursor para sua biossíntese é o triptofano (Vernoux e Robert, 2016). As auxinas possuem a capacidade de estimular o crescimento de caule e raiz através do alongamento celular, sendo também responsáveis pela iniciação de raízes laterais (Teale et al., 2008). Apesar de ser um hormônio produzido pelas próprias plantas, muitas bactérias associadas ao solo e plantas apresentam vias metabólicas de biossíntese desse hormônio, que uma vez secretado ao meio desencadeia os mesmos mecanismos moleculares do fitormônio (Spaepen et al., 2009; Vessey 2003).

Por outro lado, os mecanismos indiretos são: a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR) que são respostas fisiológicas das plantas ativadas por moléculas específicas produzidas por microrganismos. A SAR é desencadeada por bactérias patogênicas por meio da liberação de ácido salicílico (Fu & Dong, 2013). Em contrapartida, as bactérias não patogênicas desempenham um papel essencial na ativação da ISR, pois sensibilizam e ativam as respostas de defesa da planta contra uma ampla variedade de patógenos, utilizando a sinalização mediada por etileno e ácido jasmônico (Pérez-Montaña et al., 2013). A ISR é um mecanismo pelo qual as PGPBs aumentam a resistência das plantas ao modular suas propriedades físicas e bioquímicas (Pieterse et al., 2002). Essa interação apresenta uma especificidade bem definida (Pérez-Montaña et al., 2014), sendo as PGPBs reconhecidas como promotoras indiretas do crescimento vegetal.

A interferência no sistema do *quorum sensing*, em que muitas bactérias controlam a densidade da sua população por meio da comunicação por moléculas diversas e consequente indução do processo de migração chamado *quorum sensing* (QS). Muitas plantas são capazes

de produzir moléculas que interferem nos sistemas de QS das bactérias. Uma vez que detectam um patógeno, inibem o fenômeno a fim de impedir que essas bactérias se agreguem e cheguem até a planta para causar a doença (Pérez-Montañó et al., 2014).

O antagonismo, em que diversos microrganismos podem sintetizar uma vasta gama de compostos com atividade antimicrobiana como os antibióticos, toxinas e compostos tensoativos ou a produção de enzimas de degradação da parede extracelular do patógeno como quitinases, proteases. Estes compostos podem ser oriundos de metabolismo secundário, ou caracterizar-se como moléculas proteicas/peptídeos derivados ou não de síntese ribossômica (Bulgarelli, 2013). Essas PGPBs atuam na saudabilidade da planta e dessa forma, contribuem para seu crescimento.

Além disso, a produção de ácido cianídrico (HCN) desencadeia uma possível ação antagonica a patógenos. Insetos e outros herbívoros, ao entrarem em contato com o tecido vegetal durante a herbivoria, fazem com que glicosídeos cianogênicos entrem em contato com enzimas hidrolíticas do citoplasma das células, permitindo que as mesmas produzam ácido cianídrico. Fisiologicamente, o HCN inibe a cadeia respiratória ao se ligar com o Fe^{3+} da citocromo-oxidase na mitocôndria (Srinivasan et al., 2012). Algumas bactérias apresentam capacidade de produzir esse ácido e, em associação benéfica com as plantas, estabelecem uma relação de proteção contra fitopatógenos.

As bactérias biofertilizantes são consideradas promotoras diretas de crescimento vegetal enquanto as biocontroladoras e as biorremediadoras são promotoras indiretas, uma vez que não fornece nenhum composto utilizado diretamente no crescimento, mas interferem na saúde da planta (Bulgarelli, 2013).

2.7 *Phaseolus vulgaris*

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L., é um vegetal pertencente ao gênero *Phaseolus* (Alvarado-Ramos et al. 2024). Conquist (1988) descreve como pertencente à subclasse Rosidae, ordem Fabales e família Fabaceae. Dentro de tal gênero é possível observar diversos tipos de feijão, embora o feijão tenha sido classificado em mais de 50 espécies diferentes (Delgado- Salinas et al., 1999). O feijão- comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das leguminosas mais consumidas no mundo (Schoonhove & Voysest, 1991) e constitui um dos principais ingredientes da dieta da população brasileira, por ser uma ótima fonte de proteína e minerais (Padder et al., 2017). Além de seu papel essencial na alimentação e nutrição de diversos

indivíduos, essa espécie também possui grande relevância em estudos científicos e testes em laboratórios.

O relatório divulgado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 2003) indica que esta planta está de acordo com as diretrizes estabelecidas, pois é considerada uma espécie vegetal modelo para testes com substâncias químicas, o que a torna a escolha para este trabalho. Cada semente e plântula possui suas especificidades, mas a presença desta espécie na alimentação da população brasileira fez com que ela se tornasse prioridade em relação às outras espécies descritas.

Silva (1999), baseado em vários autores, descreveu-se as características morfológicas desta espécie (Figura 5): o sistema radicular apresenta uma raiz principal da qual se desenvolvem raízes secundárias e terciárias. O caule é herbáceo, formado por uma sucessão de nós e entrenós, onde estão inseridos, no primeiro nó, os cotilédones; no segundo, as folhas primárias; e, a partir do terceiro, as folhas trifolioladas ou definitivas. Pode apresentar pilosidade e pigmentação com o crescimento determinado e indeterminado.

As folhas são simples e opostas. Já as flores dispõem-se em inflorescências racemosas, axilares e terminais, formadas por: pedúnculo, ráquis, brácteas e botões florais em complexos axilares. As flores, possuem forma papilionácea e simetria bilateral, possuem cálice gamossépalo campanulado, duas bractéolas na base, corola dialipétala com cinco pétalas (sendo uma maior e externa), estames diadelfos (nove soldados e um livre) e gineceu com ovário súpero, unicarpelar e pluriovulado, estilete encurvado e estigma lateral.

O fruto é um legume deiscente, cuja forma pode ser reta, arqueada ou recurvada com o ápice abrupto ou afilado. A cor é característica da cultivar, podendo estar uniformemente distribuída ou não, e variar de acordo com o grau de maturação verde, verde com estrias vermelhas ou violetas, vermelha, roxa, amarela, amarela com estrias vermelhas ou roxas, e até marrom.

Figura 5: Imagem ilustrativa e descritiva do *Phaseolus vulgaris* descrita por Van Houtte, L.B., *Flore des serres et des jardin de l'Europe* (1845-1880) Fl. Serres.

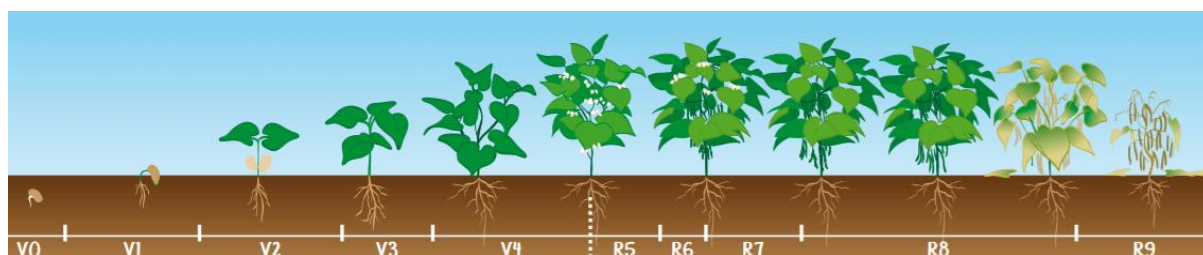


Fonte. Imagem retirada de http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=51628, acesso em 11/12/2024.

A semente é constituída de tegumento, hilo, micrópila e rafe e, internamente, de um embrião formado pela plúmula, duas folhas primárias, hipocótilo, dois cotilédones e radícula. Pode ter várias formas: arredondada, elíptica, reniforme ou oblonga, tamanhos que variam de muito pequenas (< 20g) a grandes (> 40g/100 sementes).

Apresenta ampla variabilidade de cores, variando entre preto, bege, roxo, róseo, vermelho, marrom, amarelo, e o branco. O tegumento pode ter uma cor uniforme (cor primária), ou duas cores, uma primária e uma cor secundária, expressa em forma de estrias, manchas ou pontuações. A superfície pode ser brilhosa, ter brilho intermediário ou opaca, sem brilho (EMBRAPA 2003).

Figura 6: Representação de fases do desenvolvimento (semente, germinação e plântula) de uma semente de *Phaseolus vulgaris*. As fases indicadas de V0 a V4 caracterizam as fases vegetativas, já as fases de R5 a R9 indicam as fases reprodutivas.

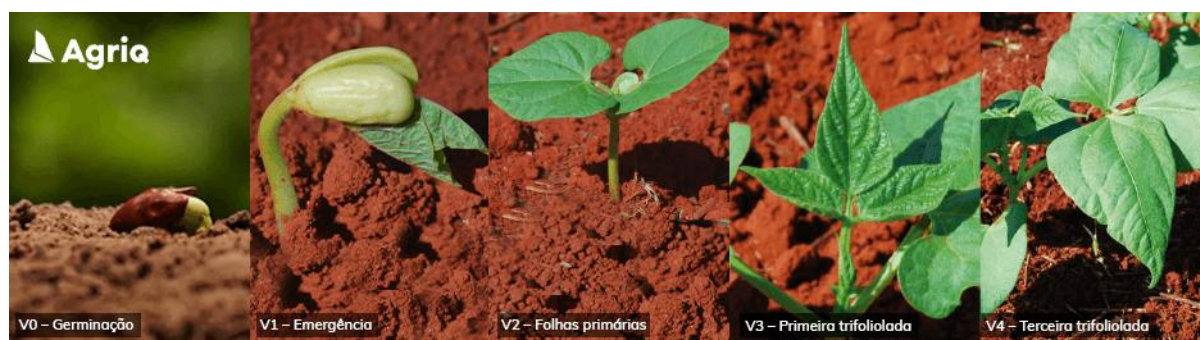


Fonte: Embrapa (2003).

O ciclo de desenvolvimento da planta do *P.vulgaris* consiste em duas fases: a fase vegetativa e a fase reprodutiva, como indicado na imagem, divulgada pela EMBRAPA (Figura 7). As fases vegetativas vão de V0 a V4 e englobam características como a germinação e emergência das sementes, surgimento das folhas primárias e aparecimento da primeira e terceira folha trifoliada (Figura 8).

Ademais, as fases reprodutivas apresentam características como a pré-floração, formação e enchimento das vagens e a maturação da plântula em si (Figura 9). O feijão comum se desenvolve em altitudes que variam entre 50 a 3000 metros, além de suportar ambientes extremos. A temperatura ideal para seu desenvolvimento varia entre 14 a 26°C, e precipitações anuais entre 400 e 1600 mm. De modo geral, o pH do solo deve estar próximo de 5 ou levemente ácido (Wortmann et al.,1998; Debouk,1999).

Figura 7: Etapas da fase vegetativa. V0: Germinação, V1: Emergência, V2: Surgimento das folhas primárias, V3: surgimento das primeiras folhas trifoliadas, V4: surgimento das terceiras folhas trifoliadas.



Fotos: Sebastião Araújo | Embrapa

Fonte: Embrapa (2003) e <https://agriq.com.br/fatores-desenvolvimento-feijao/>

Figura 8: Etapas da fase reprodutiva. R5: pré-floração, R6: floração, R7: formação das vagens, R8: Enchimento das vagens, R9: Maturação.



Fotos: Sebastião Araújo | Embrapa

Fonte: Embrapa e <https://agriq.com.br/fatores-desenvolvimento-feijao/>

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de promoção de crescimento vegetal de bactérias tolerantes à arsênio em sementes de *Phaseolus vulgaris*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfologia dos isolados bacterianos;
- Avaliar o crescimento dos isolados tolerantes ao arsênio em meios com diferentes níveis de salinidade;
- Avaliar o potencial antagonista dos isolados bacterianos tolerantes a arsênio;
- Avaliar a produção de enzimas hidrolíticas dos isolados tolerantes a arsênio em meios de culturas diferenciais;
- Avaliar a fixação de Nitrogênio, a produção de ácido cianídrico e de hormônios vegetais pelos isolados bacterianos tolerantes ao arsênio;
- Avaliar as doses inibitórias mínimas de As nas taxas de germinação de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), em meio de cultura vegetal;
- Avaliar a taxa de germinação de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), em meio de cultura vegetal com e sem As e na presença e ausência dos isolados bacterianos.

4.METODOLOGIA

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Para a realização do presente trabalho, dez isolados bacterianos que possuem características distintas e variados níveis de tolerância a diferentes espécies químicas de arsênio foram utilizados. Os isolados foram obtidos durante o mestrado da corientadora do projeto (Rocha, 2021) a partir de amostras de solo contaminado por hidrogenoarsenato de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / Sigma Aldrich) (Qing Xia et al., 2016). Os isolados foram devidamente caracterizados e nomeados conforme o Quadro 2.

Quadro 2: Lista dos isolados bacterianos utilizados no estudo.

Isolados bacterianos
1. 3 ASA 11
2. 3 ASB 4a
3. 3 ASB 4b
4. 7 CoB 4b
5. 7 ASA 5
6. 30 ASC 12
7. 60 ASC 2
8. 90 ASC1a
9. 90 ASC 1b
10. 115 ASA 3

Fonte: Rocha,2021

4.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

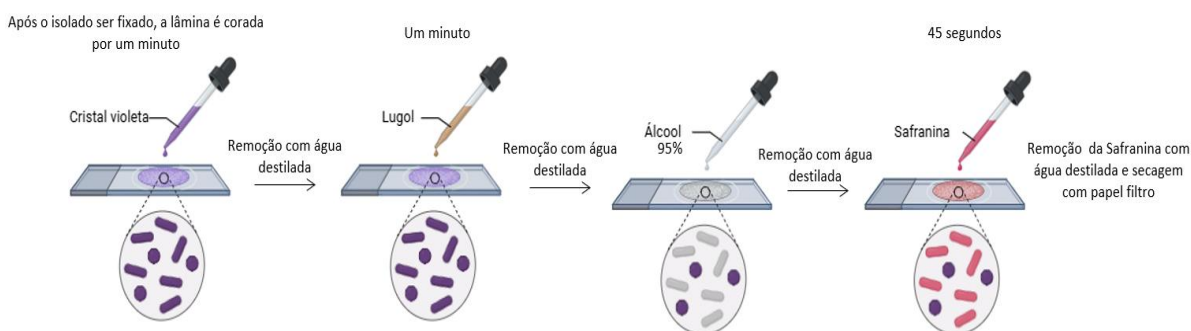
A partir da matriz original dos isolados, foi realizado um repique em um microtubo contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) caldo (meio de cultura bacteriológico não-seletivo). Os isolados selecionados foram incubados por 48 horas, em incubadora tipo BOD, com a temperatura de 28°C. Em seguida, foram adicionados ao microtubo, glicerol, em uma concentração final de 15%, sendo posteriormente armazenadas a uma temperatura de -20°C.

Ao início de cada experimento as amostras são retiradas do freezer para a realização de um novo repique.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE PAREDE CELULAR

Para a observação da morfologia e tipo de parede celular dos isolados bacterianos foi realizada a metodologia de coloração de Gram. Realizou-se o esfregaço bacteriano sobre uma lâmina histológica e o esfregaço foi fixado com calor. Em seguida, cobriu-se com cristal violeta por um minuto e a lâmina lavada sob água corrente como mostrado na Figura 9. Logo após isso, aplicou-se uma solução de lugol, também por um minuto, seguida de uma nova lavagem com água corrente. Posteriormente, realizou-se a etapa de descoloração, aplicando-se etanol absoluto por 30 segundos, seguida de lavagem. O esfregaço foi então coberto com safranina, que atua como contracorante, por 30 segundos. Após esse tempo, a lâmina foi novamente lavada com água corrente. Para a secagem, utilizou-se papel filtro, pressionando-o cuidadosamente sobre a lâmina, sem esfregar, para evitar a remoção da amostra. Por fim, aplicou-se uma gota de óleo de imersão sobre a preparação, que foi examinada ao microscópio óptico utilizando a objetiva de imersão (100x).

Figura 9: Esquema do protocolo da coloração de Gram. fonte: autoral



4.4 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES FAIXAS DE SALINIDADE

Para avaliar a capacidade de crescimento dos isolados tolerantes à arsênio em diferentes faixas de salinidade foi preparado o meio Luria-Bertani (LB) caldo, modificado com as seguintes concentrações de NaCl: 8g/L, 10g/L, 12g/L, 14g/L e 16g/L. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C, sendo posteriormente transferidos para microtubos (eppendorfs) de 2 mL. Cada isolado utilizado no presente trabalho foi adicionado

ao respectivo microtubo com o auxílio da alça bacteriológica, a qual foi mergulhada na solução contendo cada isolado, separadamente, e adicionada ao LB estéril em diferentes concentrações de sal de cada microtubo identificado para cada isolado. Os microtubos foram incubados a 28°C por 48 horas. Após incubação, o conteúdo dos microtubos foi transferidos para a placa de 96 poços para a realização da leitura da absorbância a 600 nm, visando avaliar o crescimento dos isolados sob diferentes faixas de salinidade. Os resultados foram analisados por meio da comparação do branco (LB) com as demais concentrações e isolados.

4.5 ENSAIO DE POTENCIAL ANTAGONISTA

O ensaio de potencial antagonista tem como objetivo avaliar se as bactérias podem ou não interferir no crescimento de outras. Para realização do ensaio, placas petri de 150 mm x 90 mm, autoclavadas, foram divididas em cinco secções (quatro secções referente a cada um dos isolados e um controle). Inoculou-se 200 µL de solução do repique, anteriormente descrito, correspondente ao isolado que será analisado no tapete bacteriológico. Com o auxílio de uma alça de Drigalski o repique de um dos isolados foi espalhado por toda a placa a fim de formar um tapete. Em seguida, discos de papel filtro, autoclavados, foram mergulhados nas soluções contendo os outros quatro isolados bacterianos e adicionados em suas respectivas secções na placa Petri. O papel filtro permite que determinada quantidade de isolados bacterianos seja absorvida. O experimento foi realizado em duplicata e após o plaqueamento as placas foram incubadas por 48h em incubadora tipo BOD a 28°C e então o crescimento foi avaliado.

A formação de um halo de inibição, indicando um resultado positivo, é observado quando uma bactéria secreta uma substância que se difunde no meio de cultura e impede o crescimento de outras colônias no raio em torno da que produziu o composto. Para resultado negativo, não há a formação de um halo de inibição, ou seja, os isolados bacterianos não interferem no crescimento dos demais.

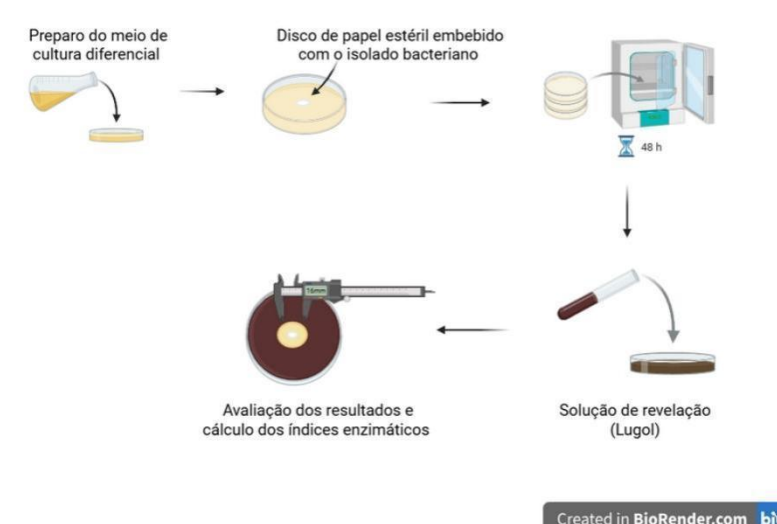
4.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS: AMILASE, CELULASE, PECTINASE E PROTEASE

4.6.1 Amilase

Para o ensaio de avaliação da produção de amilase pelos isolados tolerantes a arsênio foi utilizado o meio de cultura diferencial compostos por 1g/L de peptona, 5 g/L de levedura, 10 g/L de NaCl, 2 g/L de amido solúvel e 20g/L de ágar, solubilizado em água destilada e pH

ajustado para 6. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120°C. O meio estéril foi vertido em placas Petri 35 mm. Discos de papel foram mergulhados em um microtubo contendo cada um dos isolados, os quais foram inseridos em sua respectiva seção na placa de Petri. As placas utilizadas foram incubadas em uma estufa tipo BOD, a 28°C por 48 horas. Para que o resultado fosse avaliado, foi necessário a utilização de uma solução de revelação do ensaio. Após o período de incubação, a solução composta por Lugol, foi adicionada até que toda a placa estivesse coberta, com tempo de ação de 5 minutos. O resultado positivo para produção de amilase foi observado pela formação de um halo transparente ao redor da colônia após revelação com o lugol.

Figura 10: Esquema de experimento da enzima hidrolítica amilase.

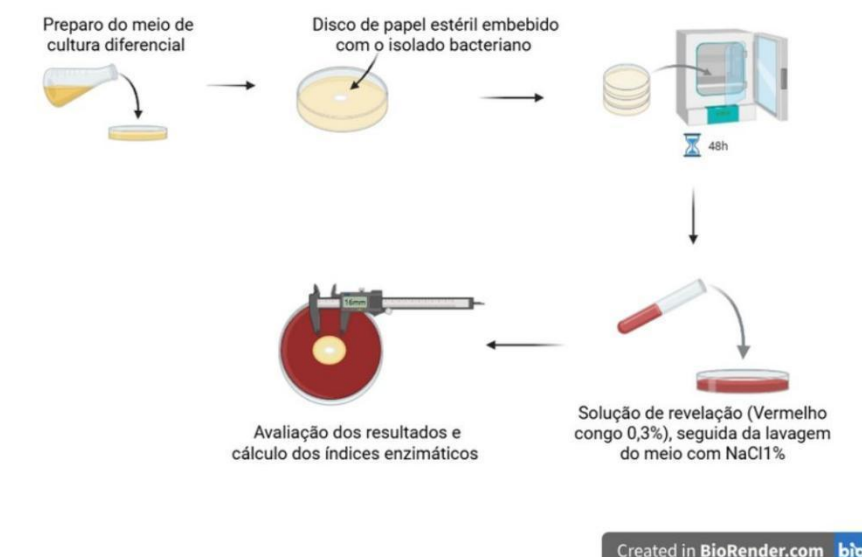


4.6.2 Celulase

Para o ensaio de avaliação da produção de Celulase pelos isolados tolerantes a arsênio foi utilizado o meio de cultura diferencial composto por 10 g/L de peptona, 5g/L de levedura, 10 g/L de NaCl, 20 g/L de ágar, 1 g/L de carboximetil e 0,3g/L de celobiose solubilizado em água destilada. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C. Discos de papel foram mergulhados em um microtubo contendo cada um dos isolados, os quais foram inseridos em sua respectiva seção na placa de Petri. As placas foram incubadas em uma estufa tipo BOD, a 28°C por 48 horas. Para que o resultado fosse avaliado, foi necessária a utilização de uma solução de revelação do respectivo ensaio, composta por vermelho congo 0,3%, por 10 minutos, sendo utilizado até que toda a superfície da placa estivesse completamente coberta. Em seguida, foi realizada a lavagem do meio com uma solução de NaCl 1%. O resultado

positivo para a produção de celulase foi observada pela presença de um halo transparente em torno da colônia.

Figura 11: Esquema de experimento da enzima hidrolítica celulase.



4.6.3 Pectinase

Para o ensaio de avaliação da produção de pectinase pelos isolados tolerantes a arsênio foi utilizado o meio de cultura diferencial composto por 10 g/L de peptona, 5 g/L de levedura, 10 g/L de NaCl e 20 g/L de ágar, e 10 g/L de Pectina, solubilizado em água destilada e pH ajustado para 5. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 15 minutos à 120°C. Foram mergulhados discos de papel em um microtubo contendo cada um dos isolados e estes foram inseridos em sua respectiva seção na placa de petri. As placas foram incubadas em uma estufa tipo BOD, à 28°C por 48 horas. Para que o resultado seja avaliado, é necessário a utilização de uma solução de revelação do respectivo ensaio, composta por uma solução de de CTAB 1%, até que toda a placa esteja coberta, por 5 minutos. O resultado positivo para produção de pectinase é observado pela presença de um halo mais claro no entorno da colônia quando comparado ao meio em volta.

4.6.4 Protease

Para o ensaio de avaliação da produção de pectinase pelos isolados tolerantes ao arsênio foi utilizado o meio de cultura diferencial composto por 10 g/L de peptona, 5 g/L de levedura, 10 g/L de NaCl e 20 g/L de ágar, e 20g/L de caseína, 6 g/L de peptona, 3g/L de

extrato de levedura, e 10 g/L de glicose, solubilizado em água destilada. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120°C. Discos de papel foram mergulhados em um microtubo contendo cada um dos isolados, os quais foram inseridos em sua respectiva seção na placa de Petri. As placas foram incubadas em uma estufa tipo BOD, a 28°C por 48 horas.

4.7 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CIANÍDRICO

Para a realização do ensaio de produção de ácido cianídrico (HCN) foi utilizado um método adaptado de Bakker e Schippers (1987). O meio de cultura foi composto por LB sólido enriquecido com 4,4 g/L de glicina e 0,081 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os isolados tolerantes ao arsênio foram inoculados em placas petri médias e incubados na estufa tipo BOD à 28°C. Na parte superior das placas, foram adicionados discos de papel filtro embebidos com uma solução de ácido pírico 5% e Na_2CO_3 2%, reforçados com um papel filme plástico para evitar dissipação do gás. A mudança de cor do papel filtro de amarelo para marrom indicava a produção de HCN.

4.8 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Para a realização do ensaio de avaliação de fixação de nitrogênio pelos isolados tolerantes ao arsênio foi utilizado o meio de cultura diferencial composto por 5g/L de manitol, 5 g/L de sacarose, 0,4g/L de KH_2PO_4 , 0,2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L de CaCl_2 , 0,002g/L de NaMO , 0,01 g/L FeCl_3 , 0,075 g/L de azul de bromotimol e 2,3 g/L de ágar, com pH ajustado para 5,7. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C e então distribuído em tubos de ensaio. Com auxílio de uma alça bacteriológica, foram inoculados os 10 isolados em seus respectivos tubos de ensaio e em seguida foram incubados em estufa tipo BOD, a 28°C por 48 horas. O resultado positivo para a capacidade de fixar nitrogênio foi observada pela mudança de coloração do meio, de amarelo para esverdeado.

4.9 PRODUÇÃO DE HORMÔNIOS VEGETAIS: ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

Para a realização do ensaio de produção de AIA pelos isolados tolerantes a arsênio foi utilizado o método colorimétrico adaptado de Bric et al.(1991), composto por meio Luria-Bertani (LB) caldo acrescido de 1,021g/L de L-triptofano, precursor do AIA. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C e então distribuído em microtubos de 2 ml. Em seguida, foram inoculados os 10 isolados em seus respectivos microtubos, e os

mesmos foram incubados em uma estufa tipo BOD, a 28°C por 48 horas. Para avaliar os resultados, os isolados foram transferidos para uma placa de 96 poços, adicionado 100 uL de solução de Salkowski e incubado por 2 horas. Tal solução é formada pela diluição de 2 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5M por litro de H_2SO_4 . Ao final do tempo de incubação foi realizada a análise em espectrofotometria, sob um comprimento de onda de 590 nm comparado-se os resultados com o branco. O resultado positivo para a capacidade de produção de AIA foi observado pela mudança de coloração do meio de amarela (solução de Salkowski) para vermelha, além do aumento da maior absorbância.

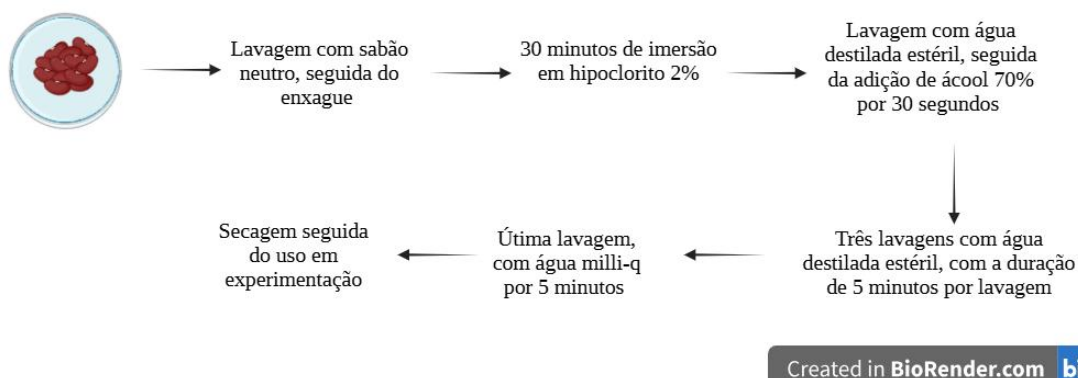
4.10 ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris*

As sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) utilizadas em ensaios de crescimento vegetal, passaram por um processo de esterilização, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados e evitar a ocorrência de algum tipo de contaminação. Para tanto, foram realizadas algumas etapas para a conclusão da esterilização.

A princípio, as sementes de *Phaseolus vulgaris* foram lavadas com detergente neutro em água corrente, e posteriormente com água destilada até a completa remoção do detergente. Em seguida, as sementes foram levadas ao fluxo laminar, para que o restante do processo fosse realizado em ambiente estéril. Utilizou-se solução de hipoclorito a 2% (100 mL, quantidade suficiente para que todas as sementes ficassem submersas), por um período de 30 minutos (Figura 12). Logo após, as sementes foram lavadas com água destilada estéril, e foram adicionadas em uma solução de álcool 70% por 30 segundos. Ao passar esse tempo, foram realizada três lavagens com água destilada estéril, com a duração de 5 minutos cada, sendo a água utilizada descartada ao final de cada lavagem.

As sementes ficaram submersas em água destilada estéril durante 15 minutos. Por fim, foi realizada uma última lavagem com água Milli-q estéril por 5 minutos. Ao final, a água foi retirada e as sementes permaneceram sob o fluxo laminar até a secagem completa para posterior utilização nos ensaios específicos.

Figura 12: Esquema das etapas de esterilização das sementes de *Phaseolus vulgaris*.



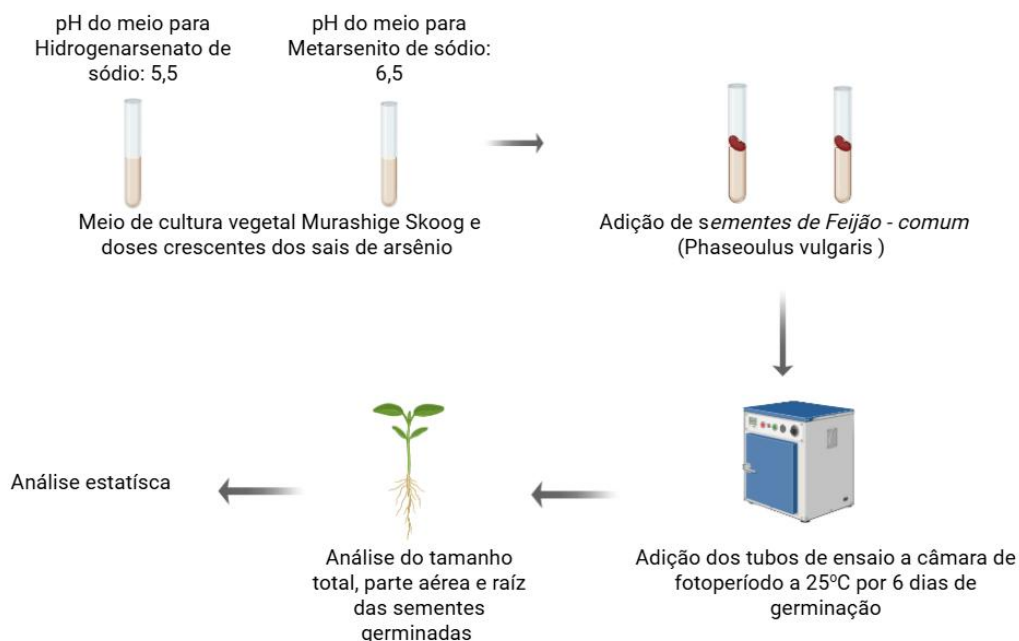
4.11 DOSES INIBITÓRIAS MÁXIMAS DE ARSÊNIO NAS TAXAS DE GERMINAÇÃO EM MEIO DE CULTURA VEGETAL

Para verificar até qual concentração de arsênio as sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) iniciam a germinação e em qual concentração ocorre a inibição da germinação foi necessária a realização de dosagens inibitórias mínimas e máximas de arsênio em meio de cultura vegetal.

As sementes estéreis (protocolo descrito na seção 4.4) de *Phaseolus vulgaris* foram semeadas em tubos de ensaio, contendo meio de cultura para tecidos vegetais Murashige e Skoog, sem arsênio, acrescido de doses crescentes de hidrogenarsenato de sódio (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M) e também, de doses crescentes de metarsenito de sódio (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 7 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M,). Para a utilização do meio de cultura neste ensaio, foi necessário a aferição do pH de cada meio no pHmetro, sendo ajustado o pH conforme a necessidade. Para o meio a ser utilizado com a solução de hidrogenarsenato de sódio o pH foi ajustado para 5,5; já para a utilização do meio para a solução de metarsenito de sódio o pH foi ajustado para 6,5 (Figura 13).

O ensaio foi realizado em duplicata, e foi semeada uma semente por tubo de ensaio. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16h a 25°C, por seis dias. Ao final dos seis dias, foi realizado o registro fotográfico das sementes germinadas e em seguida, o comprimento total das sementes, dos folíolos, e da radícula foi medido com o auxílio de parquímetro e analisada por análise de variância.

Figura 13: Esquema de experimentação das doses inibitórias máximas na germinação de sementes de *Phaseolus vulgaris*



Created in BioRender.com bio

4.12 TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES COM E SEM ARSÊNIO E NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS EM MEIO DE CULTURA VEGETAL

Para avaliar se os isolados tolerantes ao arsênio influenciam a germinação de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) na presença de arsênio, as sementes foram semeadas em meio de cultura para tecidos vegetais Murashige e Skoog sem arsênio, acrescido de hidrogenarsenato de sódio (5 μ M, 25 μ M e 50 μ M) ou acrescido de metarsenito de sódio (1 μ M, 10 μ M e 20 μ M). Em cada tubo de ensaio, foi adicionada uma semente de feijão-comum e 10 mL de meio de cultura com a respectiva dose de arsênio. Uma parte das sementes será tratada com um consórcio bacteriano contendo os 5 isolados tolerantes ao arsênio, sendo eles 3ASB 4b, 60ASC 2, 90 ASC 1a, 90 asc 1b e 115 ASA 3, enquanto o outro grupo permaneceu sem tratamento. Em seguida, os tubos contendo as sementes foram incubados em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16h a 25 °C por seis dias. O experimento foi feito em triplicata e após obtenção dos resultados, os dados foram submetidos à análise estatística.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DE PAREDE CELULAR

Os dez isolados foram submetidos à coloração de Gram, por meio da qual foi possível caracterizar morfolologicamente cada isolado bacteriano. As morfologias encontradas foram, em sua grande maioria, bacilos, sendo possível observar um isolado com morfologia de cocos. Dos dez isolados estudados, três foram classificados como bactérias Gram negativas, por apresentarem uma coloração rosa. Já o restante, foram classificados como Gram positivos, por apresentarem coloração roxa.

Quadro 3: Resultado da coloração de Gram e morfologia.

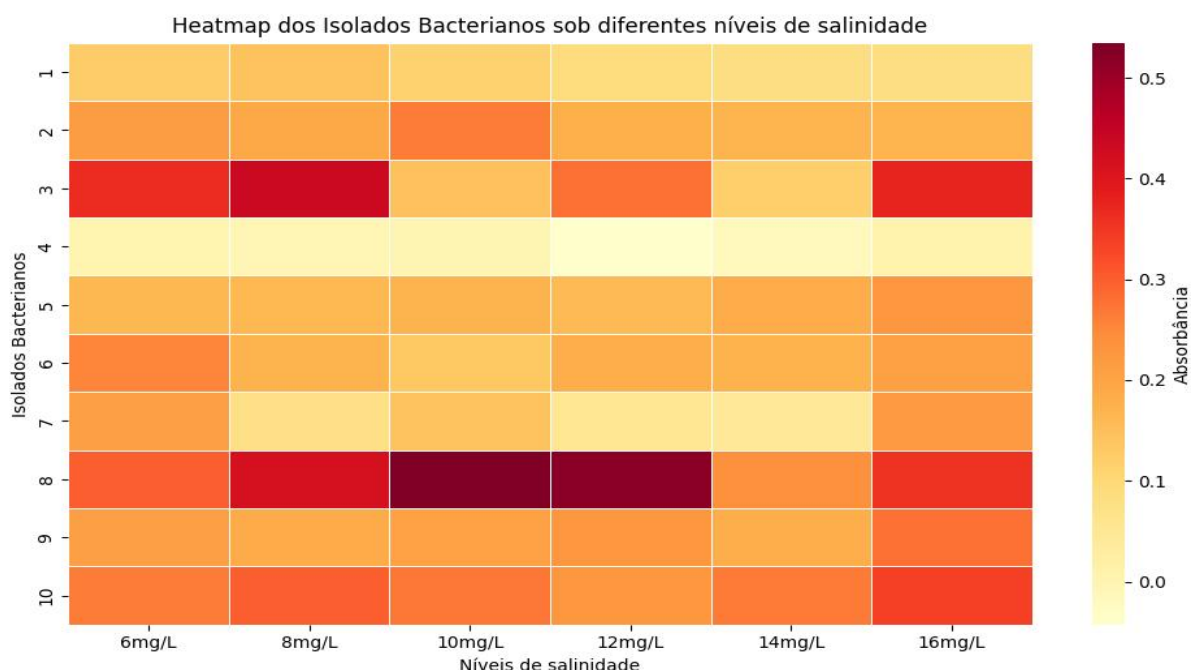
Isolado	Coloração de Gram/ morfologia
3ASA11	Bacilos gram positivos
3 ASB 4a	Bacilos gram positivos
3ASB 4b	Bacilos gram negativo
7 CoB 4b	Bacilos gram negativo
7ASA 5	Bacilos gram negativo
30 ASC 12	Bacilos gram positivos
60 ASC 2	Cocos gram negativo
90 ASC 1a	Bacilos gram negativo
90 ASC 1b	Bacilos gram negativo
115 ASA 3	Bacilos gram negativo

5.2 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES FAIXAS DE SALINIDADE

Após a inoculação dos isolados bacterianos em meio Luria-Bertania com diferentes concentrações de NaCl e incubação por 48h a 28°C, foi realizada, em espectrofotômetro a medição da absorbância a 600 nm e posteriormente foi gerado um heatmap dos resultados. Foi possível observar que o isolado bacterianos 4 (7 CoB 4b), em todas as concentrações não apresentou um bom crescimento quando comparado aos demais, visto que seu valor de absorbância se encontra negativo em algumas concentrações como de 8g/L, 10g/L e 12g/L. Por

outro lado, ao analisar os isolados 3 (3 ASB 4b), 8 (90ASC 1a), 9(90 ASC 1b) e 10(115 ASA 3) verificou-se um crescimento positivo em todas as contrações testadas, com valores de absorbância superiores aos demais isolados, como demonstrado no Quadro 4. O restante dos isolados 1, 2, 5, 6 e 7 apresentaram crescimento relativamente constante em todas as concentrações de NaCl avaliadas.

Quadro 4: Resultados após a medição da OD dos isolados bacterianos. As cores indicam diferentes resultados sendo que, quanto mais vermelho maior o número de bactérias presentes e quanto menor a saturação ou menos vermelho a cor se encontra menor o número de bactérias presentes. Isolado 1= 3ASA11; Isolado 2= 3ASB 4a; Isolado 3= 3ASB 4b; Isolado 4= 7CoB 4b; Isolado 5= 7ASA 5; Isolado 6= 30ASC 12; Isolad 7= 60ASC 2; Isolado 8=- 90ASC 1a; Isolado 9= 90 ASC 1b; Isolado 10= 115 ASA 3. Fonte: Python



5.3 ENSAIO DE POTENCIAL ANTAGONISTA

O ensaio de potencial antagonista tem como objetivo avaliar se os isolados bacterianos independem ou interferem no crescimento dos demais, com isso, após a realização da metodologia descrita no tópico anterior, não foi possível observar nenhum halo de inibição em nenhuma das placas, ou seja 100% dos resultado foram negativos. Isso nos mostra que dentro deste grupo, um isolado não inibe o crescimento do outro, permitindo trabalhar com eles na forma de um consórcio. (Quadro 5 e Figura 14).

Quadro 5: Resultado das placas do ensaio de potencial antagonista. Para resultado positivo (Sim), seria possível observar a presença de um halo de inibição ao redor da colônia. Para resultado negativo (Não), nenhum halo é observado. TB= Tapete bacteriológico, 1= 3ASA11; 2= 3ASB 4a; 3= 3ASB 4b; 4= 7CoB 4b; 5= 7ASA 5; 6= 30ASC 12; 7= 60ASC 2; 8= 90ASC 1a; 9= 90 ASC 1b; 10= 115 ASA 3 Fonte: Autoral.

Isolado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	TB	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
2	Não	TB	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
3	Não	Não	TB	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
4	Não	Não	Não	TB	Não	Não	Não	Não	Não	Não
5	Não	Não	Não	Não	TB	Não	Não	Não	Não	Não
6	Não	Não	Não	Não	Não	TB	Não	Não	Não	Não
7	Não	Não	Não	Não	Não	Não	TB	Não	Não	Não
8	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	TB	Não	Não
9	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	TB	Não
10	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	TB

Figura 14: Análise do crescimento do isolado 7ASA5 no tapete bacteriano (Controle) em 48 horas, tendo resultado negativo, ou seja, ausência do halo de inibição. Fonte: autoral



5.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

5.4.1 Amilase

Os dez isolados do presente trabalho foram inoculados em meio diferencial para a produção de amilase. Após o período de incubação de 48 horas, cinco isolados conseguiram degradar o amido presente no meio, como relatado o Quadro 6, ou seja houve a produção da enzima amilase. Além disso, foi calculado o índice enzimático dos isolados, razão do halo de degradação e crescimento da colônia dos isolados que produziram a amilase, sendo o isolado 3ASA11 o que obteve o melhor resultado, 2,12 mm.

Quadro 6: Resultado da produção da enzima hidrolítica amilase

Isolado	Produção de amilase
3ASA11	Positivo
3 ASB 4a	Positivo
3ASB 4b	Negativo
7 CoB 4b	Negativo
7ASA 5	Positivo
30 ASC 12	Positivo
60 ASC 2	Negativo
90 ASC 1a	Negativo
90 ASC 1b	Negativo
115 ASA 3	Positivo

Figura 15: Gráfico da produção da enzima hidrolítica amilase. 1= 3ASA11; 2= 3ASB 4a; 3= 3ASB 4b; 4= 7CoB 4b; 5= 7ASA 5; 6= 30ASC 12; 7= 60ASC 2; 8= 90ASC 1a; 9= 90 ASC 1b; 10= 115 ASA 3

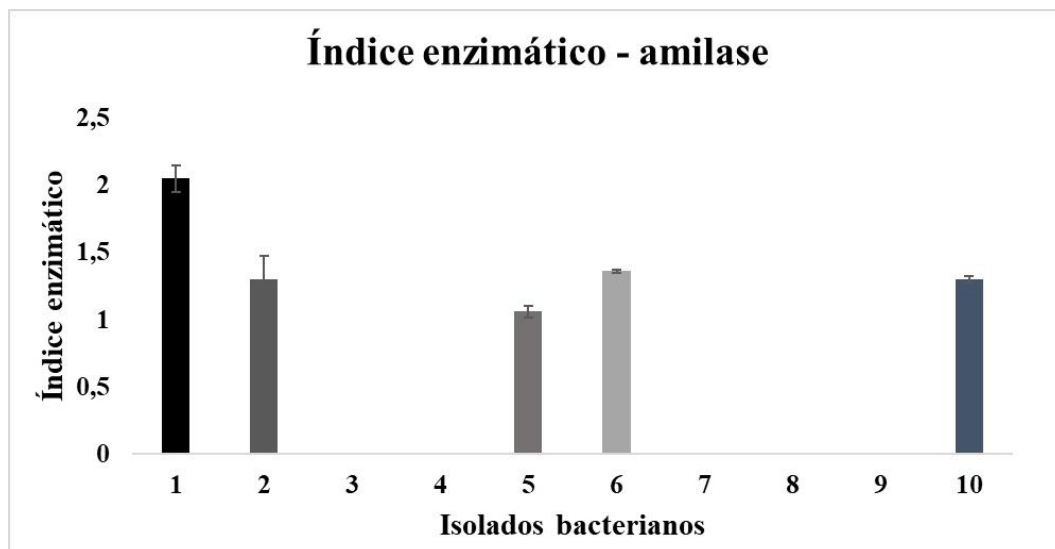
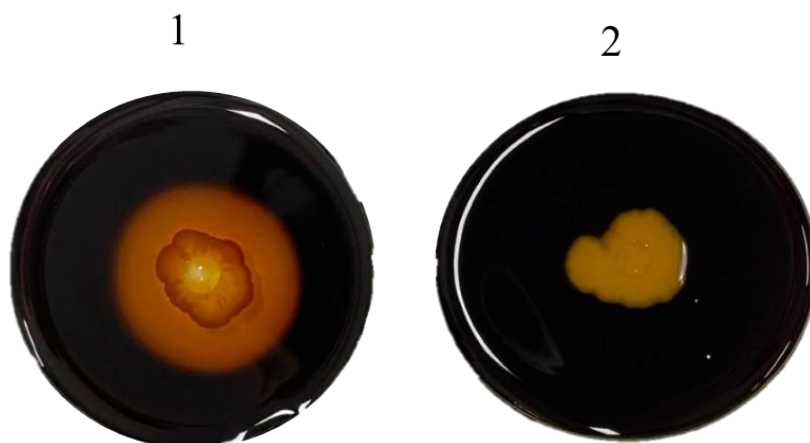


Figura 16: Placas petri com meio diferencial para produção de amilase após 48 h de incubação. 1.Resultado positivo: Presença de um halo de degradação ao redor da colônia, isolado 3ASA11; Resultado negativo: ausência do halo de degradação, isolado 90ASC1b. Fonte: Autoral.



5.4.2 Celulase

Os dez isolados do presente trabalho foram inoculados no meio diferencial para a produção de celulase. Após o período de incubação de 48 horas, nenhum dos isolados conseguiram degradar a celulose presente no meio, ou seja, não houve a produção da enzima celulase.

5.4.3 Pectinase

Os dez isolados do presente trabalho foram inoculados no meio diferencial para a produção de pectinase. Após o período de incubação de 48 horas, nenhum dos isolados conseguiu degradar a pectina presente no meio, ou seja, não houve a produção da enzima pectinase.

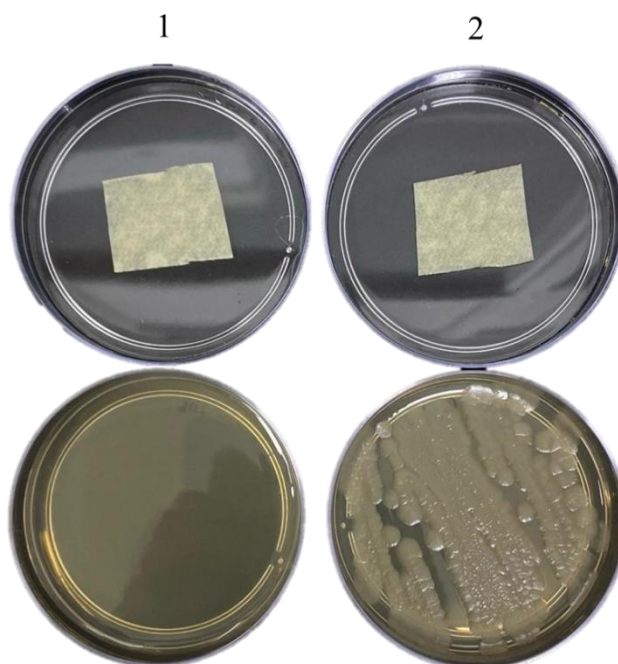
5.4.4 Protease

Os dez isolados do presente trabalho foram inoculados no meio diferencial para a produção de protease. Após o período de incubação de 48 horas, nenhum dos isolados conseguiu degradar os substratos proteicos presentes no meio, ou seja, não houve a produção da enzima protease.

5.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CIANÍDRICO

Após inoculação dos isolados do presente trabalho e incubação dos mesmos por 48h a 28°C, em meio diferencial para a produção de ácido cianídrico, não foi possível observar resultado positivo para nenhum dos isolados bacterianos, visto que, não ocorreu a mudança de cor do papel filtro, de amarelo para marrom, alteração que indicaria resultado positivo. Os resultados deste ensaio podem ser visualizados na Figura 17.

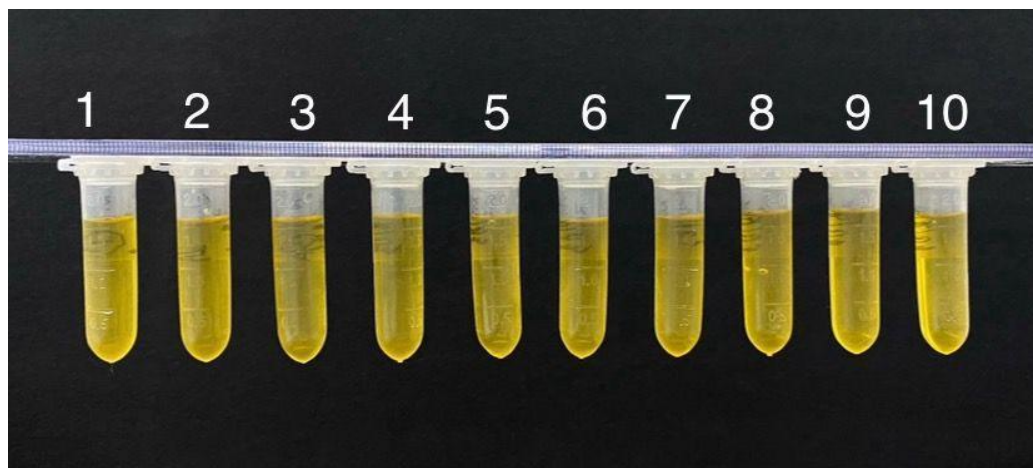
Figura 17: Comparação entre o controle (1) e o isolado 30ASC 12 (2), tendo um resultado negativo para a produção de ácido cianídrico, devido a não transformação da coloração do papel filtro de amarelo para marrom.



5.6 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Após inoculação dos isolados do presente trabalho e incubação dos mesmos por 48h a 28°C, em meio diferencial para a fixação de nitrogênio, não foi possível observar capacidade de fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos, visto que, não ocorreu mudança de cor do meio de cultura de amarelo para azul esverdeado, alteração que indicaria um resultado positivo. Os resultados deste ensaio podem ser visualizados na Figura 18.

Figura 18: Eppendorfs com meio diferencial para fixação de Nitrogênio após 48 h de incubação. 1.Resultado positivo: mudança de cor do meio para azul esverdeado; Resultado negativo: Sem alteração da cor do meio. 1= 3ASA11; 2= 3ASB 4a; 3= 3ASB 4b; 4= 7CoB 4b; 5= 7ASA 5; 6= 30ASC 12; 7= 60ASC 2; 8= 90ASC 1a; 9= 90 ASC 1b; 10= 115 ASA 3 Fonte: Autoral .



5.7 PRODUÇÃO DE HORMÔNIOS VEGETAIS

A reta padrão para a comparação da absorbância colorimétrica da quantidade de AIA produzido pelos isolados bacterianos foi construída com oito concentrações de AIA comercial (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e gerou a equação $y = 0,1363x - 0,1836$, com $R^2 = 0,9881$ em que “y” representa a quantidade de auxina secretada na cultura líquida. O ensaio colorimétrico com a utilização da solução de Salkowski permite identificar e quantificar os isolados capazes de produzir auxinas através da coloração vermelha. Porém, não foi possível identificar a mudança de cor em nenhum dos isolados, indicando resultado negativo para todos os isolados do estudo.

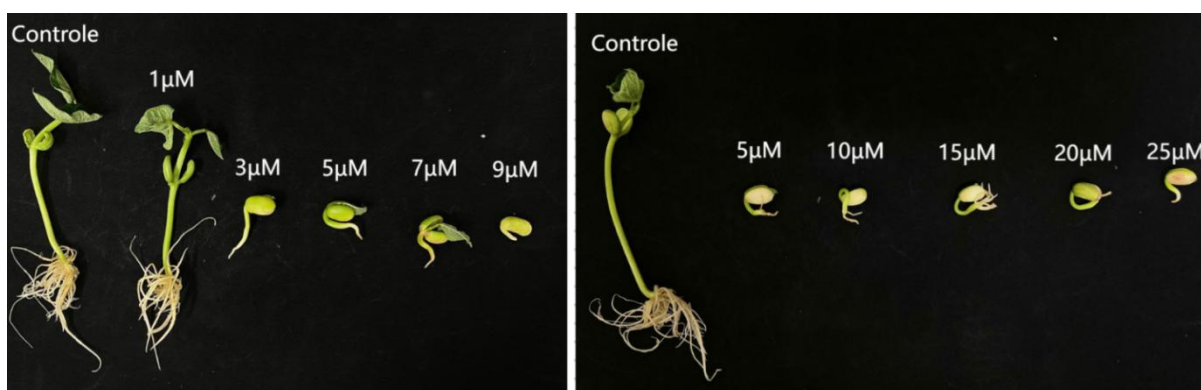
5.8 CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DE ARSÊNIO NAS TAXAS DE GERMINAÇÃO EM MEIO DE CULTURA VEGETAL

Os testes de concentrações inibitórias mínimas e máxima têm como objetivo avaliar a partir de qual concentração de As^{5+} e As^{3+} ocorre a inibição da germinação de *Phaseolus vulgaris*. Após a retirada das sementes no meio de cultura foi realizada a aferição do comprimento total, dos folíolos e da radícula.

Figura 19: Resultados do teste de concentrações inibitórias mínimas e máximas de Hidrogenarsenato de sódio.



Figura 20: Resultados do teste de concentrações inibitórias mínimas e máximas de Metarsenito de sódio.



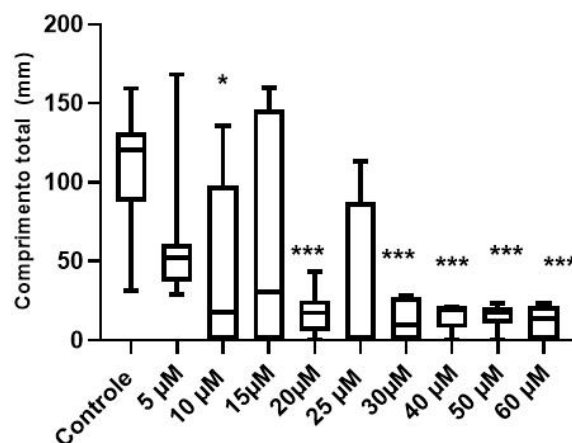
Em As^{5+} , em relação ao comprimento total as doses que apresentaram significância estatística foram, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM, e 60 µM. Em relação aos resultados das radículas, doses de 10µM, 20µM, 25µM, 30µM, 40µM, 50µM e 60µM obtiveram p-valor <0,05; e nos folíolos as doses de 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM e 60µM. A doses que apresentaram inibição do crescimento das sementes foram, em sua maioria, descartadas, somente a dose de 50µM será mantida devido ao seu p-valor 0,0002. As concentrações em

que as sementes apresentaram inibição parcial de crescimento, ou seja, obtiveram desenvolvimento levemente afetada como a concentração de 25µM, foram utilizadas nos experimentos seguintes. Além disso, a dose que de 5µM foi utilizada por apresentar significância estatística, além de apresentar um crescimento normal.

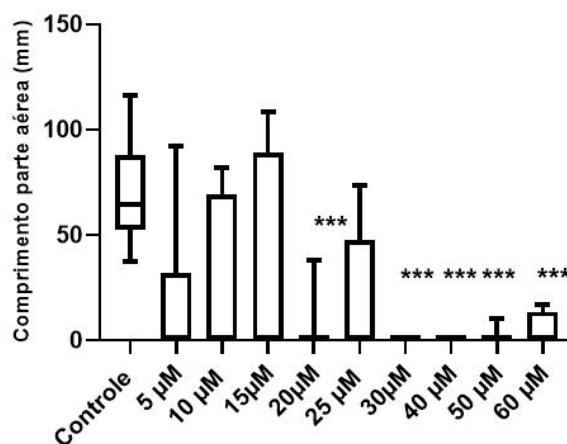
Em As^{3+} , em relação às doses testadas, aquelas que obtiveram um p-valor < 0,05 foram consideradas significativas. No tamanho total, as doses significativas foram, 1µM, 9µM, 10µM, 15µM, 20µM e 25µM, sendo a dose de 1µM menor p-valor (0,0002). Nas radículas, apenas a dose de 25µM apresentou significância estatística; e, nos folíolos as doses de 5µM, 9µM, 20µM e 25µM. Novamente, as doses que apresentaram inibição do crescimento das sementes foram em sua maioria, descartadas, somente a dose de 20µM foi mantida. As concentrações em que as sementes apresentaram inibição parcial de crescimento, como de 25µM, foram utilizadas nos experimentos seguintes. Além disso, a dose que de 1µM foi utilizada por apresentar significância estatística além de apresentar um crescimento normal (Figura 21).

Figura 21: Desenvolvimento das sementes de *Phaseolus vulgaris* inoculadas em meio de cultura com diversas concentrações de Hidroarsenato de sódio; A: Desenvolvimento total, B: Desenvolvimento dos folíolos, C: Desenvolvimento das radículas; p-valor <(*)0,01; (**) 0,001; (***)0,0001; (****)0,00001

A. Desenvolvimento total de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{5+}



B. Desenvolvimento dos folíolos de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{5+}



C. Desenvolvimento da radícula de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{5+}

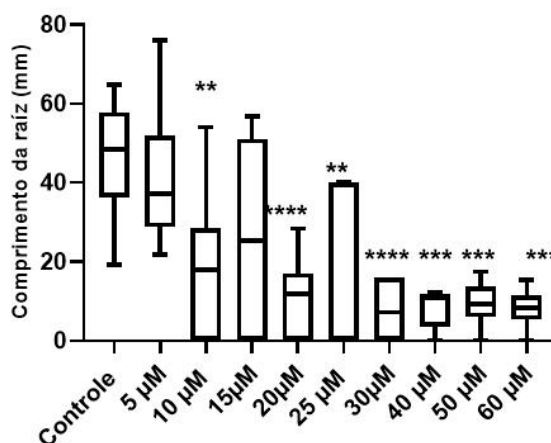
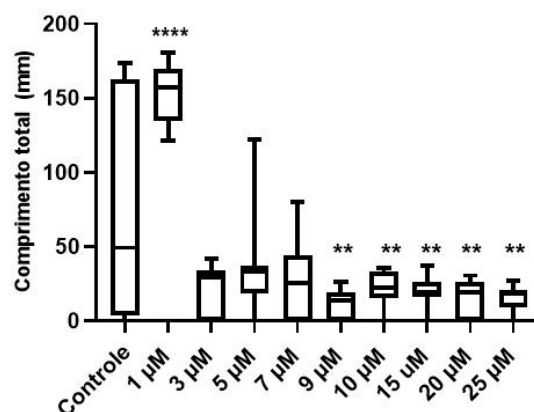
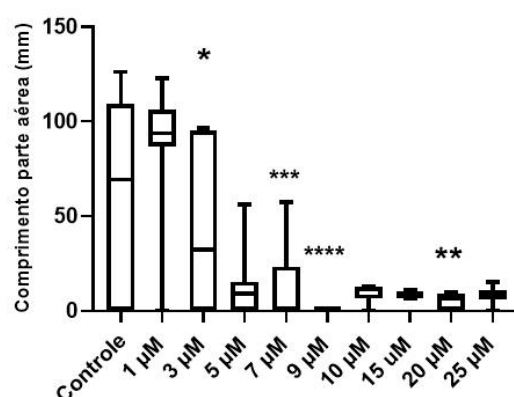


Figura 22: Desenvolvimento das sementes de *Phaseolus vulgaris* inoculadas em meio de cultura com diversas s das concentrações de Metarsenito de sódio; A: Desenvolvimento total, B: Desenvolvimento dos folíolos, C: Desenvolvimento das radículas; p-valor (*) < 0,01; (**) 0,001; (***) 0,0001; (****) 0,00001

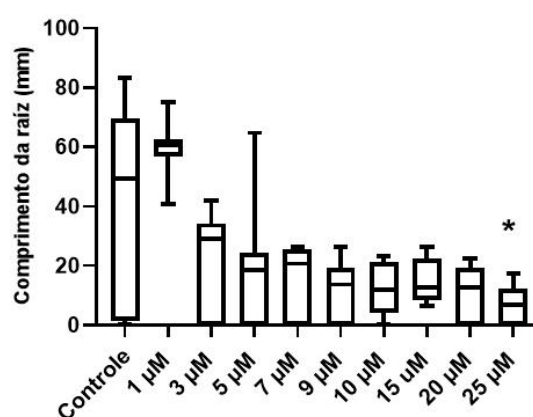
A. Desenvolvimento total de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{3+}



B. Desenvolvimento dos folíolos de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{3+}



C. Desenvolvimento da radícula de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{3+}



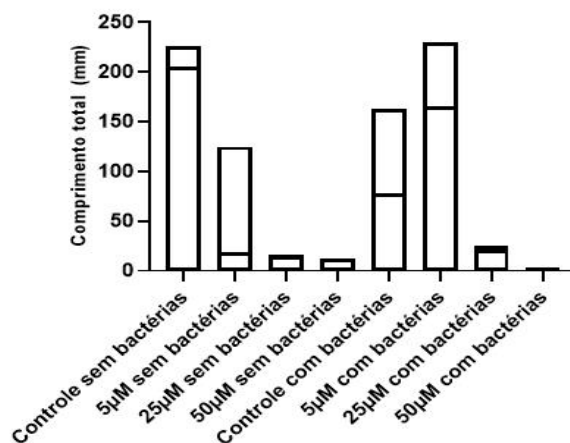
5.9 TAXA DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES COM E SEM ARSÊNIO E NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS EM MEIO DE CULTURA VEGETAL

Os testes de germinação com a presença e ausência de arsênio e do consórcio bacteriano nas sementes de feijão-comum tem como objetivo avaliar se as cepas bacterianas influenciaram no crescimento vegetal na presença de As^{5+} e As^{3+} . Após a retirada das sementes no meio de cultura foi realizada a aferição do tamanho total, folíolos e radícula. A seleção dos isolados para a realização do consórcio foi baseada na alta resistência às formas químicas de arsênio, sendo os isolados 60ASC 2 e o 115 ASA 3 os mais tolerantes, podendo resistir a doses de até 1000mM e os demais isolados resistindo a doses de até 300 mM de As^{5+} e 10mM As^{3+} . Nos ensaios com As^{5+} , sem a presença dos isolados bacterianos, a concentração de 5 μ M promoveu maior crescimento em comparação às demais concentrações. Entretanto, esse crescimento ainda foi inferior em relação ao controle. Com As^{3+} , observou-se comportamento semelhante, em que apenas a menor dose (1 μ M) resultou em maior desenvolvimento em relação às demais concentrações.

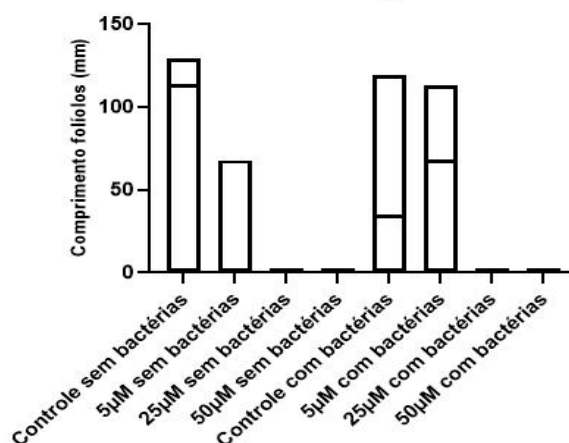
Por outro lado, ao analisar os resultados na presença do consórcio bacteriano, verificou-se que nenhuma das concentrações de As^{3+} apresentou germinação, incluindo o controle. Já na concentração de 5 μ M de As^{5+} o desenvolvimento das sementes apresenta um crescimento superior ao controle. Porém, ao realizar no Graphprism a ANOVA one-way que compara os dados com a presença e ausência consórcio bacteriano, com as devidas doses de As^{3+} e As^{5+} não foi possível obter significância estatística.

Figura 23: Desenvolvimento das sementes de *Phaseolus vulgaris* inoculadas em meio de cultura com diversas concentrações de Hidroarsenato de sódio; A: Desenvolvimento total, B: Desenvolvimento dos folíolos, C: Desenvolvimento das radículas

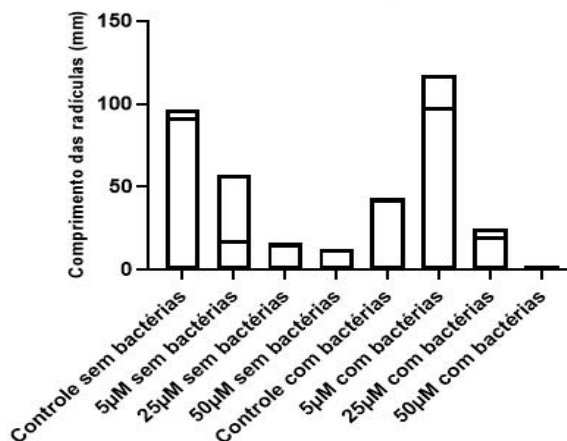
A. Desenvolvimento total de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{5+}



B. Desenvolvimento dos folíolos de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{5+}



C. Desenvolvimento das radículas de *P. vulgaris* em meio de cultura com As^{5+}



6. DISCUSSÃO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de bactérias resistentes ao arsênio na promoção do crescimento vegetal em sementes de feijão-comum. Para isso, foram utilizados isolados bacterianos obtidos por Rocha (2021), dos quais três apresentaram coloração Gram-positiva e o restante, Gram-negativa. De acordo com o estudo mencionado, os isolados apresentaram características com potencial para estimular o crescimento vegetal em ambientes contaminados por arsênio, criando a possibilidade de se obter uma ferramenta biotecnológica para regiões propensas à contaminação por esse semimetal. Logo, torna-se de suma importância aprofundar as pesquisas com o objetivo de resolver essa questão.

A salinidade dos solos afeta muitas vezes a produção da agricultura, através de vários fatores de estresse ambiental, além de diminuir a produtividade e interferir diretamente na saúde e qualidade das plantas (Kumar e Verma, 2018). As PGPBs são capazes de atenuar os efeitos negativos do estresse nas plantas, influenciando no crescimento vegetal, através da regulação de processos fisiológicos e moleculares (Poria, V et al., 2021). Diante disso, ao avaliar o crescimento dos isolados bacterianos resistentes ao Arsênio, em diferentes níveis de salinidade, fez com que uma faixa ideal de desempenho fosse identificada, além de observar a capacidade de sobrevivência em localidades que possuem uma elevada faixa de salinidade, que pode afetar negativamente o crescimento de plantas (Numan et al., 2018). Um estudo relevante nesse contexto é o de Sánchez et al. (2023), que investigou a ação de bactérias halotolerantes em relação ao estresse salino em Tomates. Dentre as cepas testadas, *Peribacillus castrilensis* N3 se destacou por promover melhorias significativas no desenvolvimento do tomateiro, especialmente quando combinada ao exopolissacarídeo, que favoreceu o acúmulo de osmoprotetores (como prolina, GABA e putrescina) e a expressão de genes relacionados à homeostase iônica, resultando em maior biomassa e crescimento vegetal. Esses achados reforçam o papel de PGPBs adaptadas a ambientes extremos como agentes promotores do crescimento vegetal, mesmo sob estresses abióticos. Ademais, no presente trabalho, os isolados 3 ASB 4b, 90 ASC 1a, 90 ASC 1b, 115ASA3 obtiveram um resultado satisfatório em todas as concentrações (Quadro 5), indicando a capacidade de sobreviver e crescer em condições diversas, isto faz com que ganhem destaque para uma promoção de crescimento vegetal em locais com diferentes faixas de salinidade.

Ao realizar o ensaio de potencial antagonista, cujos resultados estão apresentados no quadro 4, observou-se a ausência de halo de inibição nas interações entre os isolados bacterianos e o tapete bacteriológico. Esse resultado demonstra a possibilidade do uso desses

isolados em consórcio, uma vez que, não há inibição de crescimento entre eles. Resultados preliminares divulgados por Rocha (2021) demonstram a resistência desses microrganismos a diferentes formas químicas de arsênio e diferentes concentrações, tais resultados reforçam a existência de diferentes mecanismos de resistência das cepas bacterianas. Dessa forma, ao utilizar um consórcio bacteriano com tais cepas, o potencial de sucesso em futuras aplicações de biorremediação aumenta, especialmente em ambientes com diferentes concentrações e formas químicas de arsênio.

Com base nisso, foram realizados ensaios para avaliar se os isolados resistentes ao semimetal também teriam potencial para promover o crescimento vegetal. A pesquisa desenvolvida por Sritongon et al. (2023) investigou as propriedades de bactérias promotoras de crescimento vegetal, com ênfase na atividade enzimática, principalmente na produção de enzimas hidrolíticas. Tal estudo apresentou e identificou características comuns entre as PGPB e suas enzimas, a partir de isolados obtidos da rizosfera da Alcachofra de Jerusalém. Os microrganismos testados apresentaram produção diversificada de hidrolases, como celulase, protease, fosfatase e urease. Entre tais microrganismos, destaca-se o *Bacillus subtilis* S42, cuja atividade enzimática, afetou diretamente nos parâmetros de desenvolvimento vegetal, assim como na altura da planta, biomassa e crescimento radicular, além de produzir sideróforos, amônia e ácido indolacético (AIA), conforme também relatado por El-Deeb et al. (2019), Liu et al. (2016) e Passari et al. (2016).

No presente trabalho, não foi possível observar a produção das enzimas hidrolíticas, celulase, pectinase e protease, porém ao analisar os resultados de amilase, cinco isolados bacterianos obtiveram resultado positivo, sendo eles 3 ASA 11, 3ASB 4a, 7ASA 5, 30 ASC 12, 115 ASA 3 (Quadro 6), indicando a quebra do amido presente no meio de cultura, em açúcares simples, proporcionando uma fonte de carbono, energia e disponibilizando esses nutrientes ao ambiente (Gupta et al, 2012). Quando comparamos às enzimas hidrolíticas, a produção de HCN está entre os metabólitos voláteis produzidos por algumas PGPBs que podem causar inibição de fitopatógenos, como o caso já descrito em Lanteigne (2011) em que *Pseudomonas* sp. LBUM300 mostrou potencial de controlar lesões induzidas por *Clavibacter michiganensis* em plantas de tomate. Em contrapartida, no presente trabalho, nenhum dos isolados foram capazes de produzir HCN, contudo, a ausência de produção de HCN não exclui o potencial da bactéria como promotora de crescimento vegetal, já que muitas cepas bacterianas atuam por meio de outros mecanismos, como a produção de AIA, sideróforos, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (Glick, 2012; Lugtenberg; Kamilova, 2009).

O nitrogênio é um dos elementos químicos essenciais para o desenvolvimento vegetal, sendo fundamental para o crescimento das plantas além da produção de frutos e sementes (Mahmud et al., 2020). O nitrogênio atmosférico não pode ser absorvido diretamente pelas plantas, porém, algumas bactérias fixadoras, como *Klebsiella*, *Rhodospirillum*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Azospirillum spp.*, *Azoarcus spp.* e *Enterobacter*, são frequentemente utilizadas como biofertilizantes (Nosheen, Ajmal & Song, 2021), atuando tanto em associações simbióticas com as raízes quanto de forma não simbiótica, auxiliando na absorção de nutrientes (Batista et al., 2018). Galindo et al. (2024) demonstraram que consórcios microbianos envolvendo *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*, combinados com diferentes concentrações de nitrogênio, promovem melhorias significativas no crescimento das raízes e da parte aérea, além de aumentar a absorção de CO₂, e a taxa de transpiração. Gasparetto et al. (2023) também observaram que a inoculação desses consórcios nas sementes elevou o rendimento de grãos e o acúmulo de nitrogênio no trigo. Porém, ao se analisar os resultados (figura 20), não foi possível observar a fixação de nitrogênio nos isolados do presente trabalho, visto que a mudança cor do meio de cultura não ocorreu.

As atividades fisiológicas de uma planta são reguladas por um ou mais hormônios vegetais, como a auxina, citocinina, giberelina, ácido abscísico, etileno, ácido salicílico, e ácido jasmônico. O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina mais encontrada nas plantas, e possui características como a regulação do crescimento vegetal, sendo importantes na regulação fisiológica bacteriana, além da adaptação a condições de estresse e na comunicação microrganismo-microrganismo (Teale et al. 2006). Resultados divulgados por Imperlini et al. (2009) revelam que, *Sinorhizobium meliloti* RD64, uma cepa mutante super produtora de AIA apresentou maior viabilidade celular sob condições de estresse, como alta acidez, choque osmótico, radiação UV e variação térmica, em comparação à cepa selvagem. Tais autores observaram que essa cepa foi capaz de produzir, também, níveis mais elevados de lipopolissacarídeo, polissacarídeo extracelular e biofilme, favorecendo a adesão às superfícies das plantas e proteção contra dessecação, compostos antibacterianos e baixas temperaturas.

Em contrapartida, os resultados para a produção de AIA, não obtiveram um resultado positivo. Porém, trabalhos como o de Rothballer et al. (2005), sugerem que a biossíntese de AIA é estimulada quando a bactéria está em contato com uma planta hospedeira, como citado no artigo, a atividade do promotor *ipdC* aumentou quando *Azospirillum brasilense* Sp7 foi associada a raízes de trigo. Outros autores como Brandl e Lindow (1997) e Brandl et al. (2001) revelaram que a expressão de *ipdC* aumentou 32 vezes quando houve contato em folhas de

feijão e tabaco, e 1000 vezes em flores de pera em comparação com a indução em meio de cultura.

Ao realizar o ensaio com as doses inibitórias mínimas e máximas com as sementes de feijão comum, foi possível observar que o arsênio, independentemente de sua forma química, exerce efeitos tóxicos no crescimento das plantas. À medida que as concentrações de As^{5+} e As^{3+} aumentaram, observa-se uma redução no tamanho das sementes germinadas. Além disso, o arsenito promoveu uma maior inibição, até em doses mais baixas, como as doses de $3\mu\text{M}$, quando comparado ao arsenato que apresentaram uma maior inibição a partir de $10\mu\text{M}$. Gusman et al. (2013) avaliaram os efeitos tóxicos de As^{5+} e As^{3+} em plantas de alface (*Lactuca sativa*), e observaram uma redução no crescimento, na taxa de assimilação de CO_2 e nos parâmetros de fluorescência da clorofila. Mesmo que os autores não tenham identificado danos estruturais ao aparato fotossintético, houve um maior comprometimento funcional, especialmente sob exposição do As^{3+} .

A toxicidade das espécies químicas de arsênio trabalhadas apresentam características bioquímicas diferentes, tendo o arsenito mais móvel nos tecidos vegetais, em relação ao arsenato, sendo facilmente absorvido pelas raízes por meio de canais de aquaporinas, e uma vez internalizado esta espécie química se liga fortemente a grupos sulfidril de proteínas, inibindo enzimas-chave e interferindo em processos fisiológicos fundamentais, como a fotossíntese e a respiração celular (Tripathi et al., 2007; Gusman et al., 2013). As doses escolhidas para dar continuidade ao trabalho foram de $5\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$ para As^{5+} e de $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$ para As^{3+} doses estas que nos permitiu identificar diferentes condições de crescimento sendo elas levemente afetadas, intermediárias e inibitórias.

Considerando esses efeitos inibitórios, o próximo ensaio buscou avaliar se o consórcio bacteriano, previamente selecionado por sua resistência ao arsênio, seria capaz de diminuir os impactos, além de favorecer o crescimento das plantas expostas a concentrações de As^{3+} . Os resultados deste trabalho mostram que, na presença do consórcio bacteriano, nenhuma concentração de As^{3+} germinou, incluindo o controle, enquanto a concentração de $5\mu\text{M}$ de As^{5+} se desenvolveu melhor em relação ao controle, porém não se obteve resultados com significância estatística, isto revela que a associação planta- microrganismo pode atenuar parcialmente os efeitos tóxicos do As^{5+} , porém em As^{3+} , por ser mais tóxico não foi possível observar nenhuma diferença. Mukherjee et al. (2018) demonstraram que um consórcio bacteriano endofítico aplicado a *Solanum nigrum* melhorou o crescimento da planta exposta ao arsênio por meio de múltiplos mecanismos, incluindo a melhoria da nutrição, o aumento da

eficiência fotossintética e a regulação do estresse oxidativo. Esses achados reforçam a necessidade de se realizar novas réplicas para que os resultados sejam ainda mais confiáveis, ajudando a reforçar a importância da utilização de consórcios bacterianos na promoção de crescimento vegetal em condições adversas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do ensaio de potencial antagonista demonstraram que todos os isolados bacterianos podem ser utilizados em consórcio, o que possibilita uma maior taxa de sucesso de detoxificação em ambientes com diferentes níveis de contaminação por arsenito ou arsenato. Além disso, os isolados 3 ASB 4b, 90 ASC 1a, 90 ASC 1b, 115ASA3 foram capazes de sobreviver em uma grande faixa de salinidade e os isolados 3 ASA 11, 3ASB 4a, 7ASA 5, 30 ASC 12, 115 ASA 3 foram capazes de produzir amilase.

Apesar de terem sido observados resultados negativos para as demais enzimas hidrolíticas, para a HCN, para a fixação de nitrogênio e para a produção de hormônios vegetais, não se deve descartar o potencial desses microrganismos de serem bons promotores de crescimento vegetal em substrato contaminado com arsênio. Isso porque, ao serem utilizados junto às sementes de *P. vulgaris* apresentaram uma melhora visual nas taxas de germinação e desenvolvimento da plântula, mesmo que não tenha obtido uma significância estatística.

Dessa forma, os achados do presente trabalho reforçam que, mesmo diante de limitações em algumas características associadas à promoção de crescimento vegetal, a resistência a diferentes espécies químicas de arsênio, a tolerância à salinidade e a capacidade de detoxificar esse semimetal demonstradas pelos isolados ainda possuem grande relevância. Com isso, a utilização dessas bactérias em processos futuros de biorremediação mostra-se promissora para mitigar os impactos de ambientes contaminados com arsênio, ampliando o potencial de aplicação dos isolados bacterianos em uma agricultura sustentável.

8. REFERÊNCIAS

- Abbas, G.; Murtaza, B.; Bibi, I.; Shahid, M.; Niazi, N. K.; Khan, M. I.; Amjad, M.; Hussain, M.; Natasha. Absorção de arsênico, toxicidade, desintoxicação e especiação em plantas: fisiológicas, bioquímicas e aspectos moleculares. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15:59. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010059>.
- Abedi, T.; Mojiri, A. Mecanismos de captação e acumulação de arsênico em espécies de arroz. *Plantas*, 2020, 9:129. <https://doi.org/10.3390/plants9020129>.
- ABEDIN, M. J.; CRESSER, M. S.; MEHARG, A. A.; FELDMANN, J.; COTTER-HOWELLS, J. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 5, p. 962–968, 2002
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). *Toxicological Profile for Arsenic*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2007. DOI: 10.15620/cdc:11481
- Ahmed, N.; Shahab, S. Phosphate solubilization: Their mechanism, genetics and application. *The Internet Journal of Microbiology*, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 4408–4412, 2009. Disponível em: <https://www.ispub.com/IJMB/9/1/4408>
- Ajjiah, N.; Fiodor, A.; Pandey, A. K.; Rana, A.; Pranaw, K. Bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB) com capacidade de formação de biofilme: um agente multifacetado para agricultura sustentável. *Diversity*, 2023, 15(1):112. <https://doi.org/10.3390/d15010112>.
- Ajjiah, N.; Fiodor, A.; Pandey, A. K.; Rana, A.; Pranaw, K. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture. *Diversity*, v. 15, art. 112, 2023. DOI: 10.3390/d15010112
- Al-Ani, L. K. T. Trichoderma: papel benéfico na agricultura sustentável pelo manejo de doenças de plantas. In: Egamberdieva, D.; Ahmad, P., eds. *Microbioma vegetal: resposta ao estresse*. Vol. 5. Cingapura: Springer, 2018. p. 105–126.
- Alexander, J. L.; Orr-Weaver, T. L. Replication fork instability and the consequences of fork collisions from rereplication. *Genes & Development*, 2016, 30(20):2241–2252.
- Ali, Hazrat; Khan, Ezzat. What are heavy metals? Long-standing controversy over Ali, W.; Isayenkov, S. V.; Zhao, F. J.; Maathuis, F. J. M. Arsenite transport in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(14). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0021-7>.
- ALMEIDA, D. V. *Qualidade de grãos em feijoeiro-comum: estimativas de parâmetros genéticos, interação com ambientes, eficiência de seleção e correlação entre caracteres*. 2018. 143 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) — Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018

Alvarado-Ramos, Juan; Et Al. Evaluation of antinutritional factors reduction and mineral bioavailability in *Phaseolus vulgaris* L. *Scientific Reports*, v. 14, p. 61475, 2024. DOI: [10.1038/s41598-024-61475-8](https://doi.org/10.1038/s41598-024-61475-8).

Ana, L. A.; Melina, A. T.; Claudia, T.; Herminda, R.; Ana, L. W. O.; Elizabeth, A. Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98:119–127. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.021>.

Anderson, L. C. D.; Bruland, K. W. Biogeochemistry of arsenic in natural waters: the importance of methylated species. *Environmental Science & Technology*, 1991, 25(3). <https://doi.org/10.1021/es00015a007>.

ARMENDÁRIZ, V.; ARMENIA, S.; ATZORI, A. S. Systemic Analysis of Food Supply and Distribution Systems in City-Region Systems—An Examination of FAO’s Policy Guidelines towards Sustainable Agri-Food Systems. *Agriculture*, [S.l.], v. 6, n. 4, p. 65, dez. 2016. Arsenic. Fact Sheet No 372. Geneva: World Health Organization, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>.

Asati, A.; Pichhode, M.; Nikhil, K. Effect of heavy metals on plants: an overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 2016, 5(3):56–66.

Ayangbenro, A. S.; Babalola, O. O. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(1):94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>.

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*, 2006, 57:233–266.

Balakumar, P.; Kaur, J. Arsenic exposure and cardiovascular disorders: an overview. *Cardiovascular Toxicology*, 2009, 9(4). <https://doi.org/10.1007/s12012-009-9050-6>.

Barbieri, P.; Zannelli, T.; Galli, E.; Zanetti, G. Inoculação em trigo com *Azospirillum* brasilense Sp6 e alguns mutantes alterou a fixação de nitrogênio e a produção de ácido indol-3-acético. *FEMS Microbiology Letters*, 1986, 36:87–90.

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. Triagem de rizobactérias multicaracterísticas promotoras do crescimento de plantas de origem tropical e avaliação da capacidade de colonização de milho e soja. *Pesquisa Microbiológica*, 2018, 206:33–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.

Bergquist, E. R.; et al. Inhibition by methylated organo-arsenicals of the respiratory 2-oxo-acid dehydrogenases. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2009, 694(6):973–980. <https://doi.org/10.1016/j.jorgchem.2008.12.028>.

Bhattacharya, S.; Sharma, P.; Mitra, S.; Mallick, I.; Ghosh, A. Arsenic uptake and bioaccumulation in plants: a review on remediation and socio-economic perspective in

Southeast Asia. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 2021, 15:100430. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100430>.

Bhattacharya, S.; Sharma, P.; Mitra, S.; Mallick, I.; Ghosh, A. Arsenic uptake and bioaccumulation in plants: a review on remediation and socio-economic perspective in Southeast Asia. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 2021, 15. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100430>.

Bing, X.; Jiameng, H.; Jiansheng, G.; Xiaoming, L.; Lin, Z.; Jianfei, W.; Cheng, Z. Flooding-induced rhizosphere *Clostridium* assemblage prevents root-to-shoot cadmium translocation in rice by promoting the formation of root apoplastic barriers. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 439:129619. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129619>.

Böhm, H.; Albert, I.; Fan, L.; Reinhard, A.; Nürnberger, T. Complexos de receptores imunes na superfície da célula vegetal. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 20:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.007>.

Borba, R. P.; Figueiredo, B. R.; Cavalcanti, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *REM: Revista Escola de Minas*, 2004, 57(1). <https://doi.org/10.1590/s0370-44672004000100009>.

BORBA, Ricardo Perobelli; FIGUEIREDO, Bernardino Ribeiro de. A influência das condições geoquímicas na oxidação da arsenopirita e na mobilidade do arsênio em ambientes superficiais tropicais. *Revista Brasileira de Geociências*, v. 34, n. 4, p. 489-500, 2004.

Bouwmeester, H. J.; Roux, C.; López-Ráez, J. A.; Bécard, G. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science*, 2007, 12:224–230.

Brandl, M. T.; Lindow, S. E. Sinais ambientais modulam a expressão de um gene biossintético do ácido indol-3-acético em *Erwinia herbicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10:499–505. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.4.499>.

Brandl, M. T.; Quiñones, B.; Lindow, S. E. Transcrição heterogênea de um gene biossintético de ácido indol acético em *Erwinia herbicola* em superfícies de plantas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2001, 98:3454–3459. <https://doi.org/10.1073/pnas.061014498>.

Byers, L. D.; She, H. S.; Alayoff, A. Interaction of phosphate analogues with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 1979, 18:2471–2480.

Caporaso, J. G. Et Al. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, [S.l.], v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.

Carlin, A.; Shi, W.; Dey, S.; Rosen, B. P. The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 981–986, 1995.

Chandrakar, V.; Naithani, S. C.; Keshavkant, S. "Arsenic-induced metabolic disturbances and their mitigation mechanism in crop plants: a review." *Biologia*, vol. 71, pp. 367–377, 2016

Chandrakar, V.; Naithani, S. C.; Keshavkant, S. Arsenic-induced metabolic disturbances and their mitigation mechanisms in crop plants: a review. *Biologia*, 2016, 71:367–377. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0052>.

Chiou, Hung Yi; Hsueh, Yu Mei; Liaw, Kuen Fu; Horng, Shan Far; Chiang, Ming Hsi; Pu, Yeong Shiau; Lin, Johnny Shinn Nan; Huang, Chun Hsiung; Chen, Chien Jen. Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan. *Cancer Research*, v. 55, n. 6, p. 1296–1300, 15 mar. 1995 Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan. *Cancer Research*, v. 55, n. 6, p. 1296–1300, 15 mar. 1995

Rakshit, A.; Meena, V. S. M. P.; Singh, H. B.; Singh, A. K., orgs. *Biofertilizers*. Woodhead Publishing, 2021, p. 221–237.

Ciminelli, Virginia ST *et al.* Dietary arsenic exposure in Brazil: the contribution of community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 3, p. 152163

Cooper, K. L.; Liu, K. J.; Hudson, L. G. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: Contribution of NADPH oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 381–388, 2009

Couillerot, O.; Prigent-Combaret, C.; Caballero-Mellado, J.; Moënné-Loccoz, Y. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48:505–512.

Cutter, G. A.; Cutter, L. S. Biogeochemistry of arsenic and antimony in the North Pacific Ocean. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 2006, 7(5). <https://doi.org/10.1029/2005GC001159>.

Dakora, F. D.; Phillips, D. A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, [S.l.], v. 245, n. 1, p. 35–47, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1020809400075>.

Debiec-Andrzejewska, K.; Krucon, T.; Piatkowska, K.; Drewniak, L. Enhancing the plants growth and arsenic uptake from soil using arsenite-oxidizing bacteria. *Environmental Pollution*, 2020, 264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114692>.

Delgado-Salinas, Alfonso; Et Al. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany*, v. 24, n. 4, p. 438–460, 1999. DOI: [10.2307/2419699](https://doi.org/10.2307/2419699)

Dhankhar, R.; Hooda, A. Fungal biosorption: an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, [S.l.], v. 41, n. 9, p. 755–773, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>

Dixon, Ray; Kahn, Daniel. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Dombrowski, P. M.; Long, W.; Farley, K. J.; Mahony, J. D.; Capitani, J. F.; Di Toro, D. M. Thermodynamic analysis of arsenic methylation. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39:2169–2176.

<https://doi.org/10.1021/es0489691>.

Debouck, David G. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In: SINGH, S. P. (Ed.). *Common bean improvement in the twenty-first century*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 25–52

Doty, S. L. Aprimorando a fitorremediação por meio do uso de transgênicos e endófitos. *New Phytologist*, 2008, 179:318–333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02446.x>.

Drobna, Z.; Styblo, M.; Thomas, D. J. Uma visão geral do metabolismo e toxicidade do arsênio. *Current Protocols in Toxicology*, 2009, 42(1):4.31.1–4.31.6.

El-Deeb, B.; Zaher, H.; Metwally, H. Role of plant growth-promoting rhizobacteria in biotic and abiotic stress tolerance. *Archives of Microbiology*, 2019, 201(4):669–679. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01678-7>.

Farah Ahmad, I.; Ahmad, M. S.; Khan, M. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 2008, 163(2):173–181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>.

Finnegan, P. M.; Chen, W. Toxicidade do arsênio: os efeitos no metabolismo das plantas. *Frontiers in Physiology*, 2012, 3:182. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>.

FU, Zheng-Qing; DONG, Xinnian. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, p. 839–863, 2013. DOI: [10.1146/annurev-arplant-042811-105606](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606).

Gadd, G. M. Microbial control of heavy metal pollution. In: Fry, J. C.; Gadd, G. M.; Herbert, R. A.; Jones, C. W.; Watson-Craik, I. (eds.). *Microbial Control of Pollution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. p. 59–88.

Galindo, F. S.; Pagliari, P. H.; da Silva, E. C.; de Lima, B. H.; Fernandes, G. C.; Thiengo, C. C.; Bernardes, J. V. S.; Jalal, A.; Oliveira, C. E. S.; de Sousa Vilela, L.; Furlani Junior, E.; Nogueira, T. A. R.; do Nascimento, V.; Teixeira Filho, M. C. M.; Lavres, J. Impacto da sustentabilidade do fertilizante nitrogenado na produtividade da cultura do milho: o papel das interações benéficas da inoculação microbiana. *Biologia Vegetal BMC*, 2024, 24(1):1–20. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04971-3>.

Gaspareto, R. N.; Jalal, A.; Ito, W. C. N.; da Oliveira, C. E. S.; de Garcia, C. M. P.; Boleta, E. H. M.; Rosa, P. A. L.; Galindo, F. S.; Buzetti, S.; Ghaley, B. B.; Filho, M. C. M. T. A inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal e doses de nitrogênio melhora a produtividade do trigo e a eficiência do uso do nitrogênio. *Microorganisms*, 2023, 11(4):1046. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041046>.

Gerbino, E. et al. Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by *Lactobacillus kefir*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 1877–1887, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1812-7>

Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.

Gusman, G. S.; Oliveira, J. A.; Farnese, F. S.; Cambraia, J. Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(3):733–742. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1159-8>.

Hacquard, S.; Garrido-Oter, R.; González, A.; Spaepen, S.; Ackermann, G.; Lebeis, S.; McHardy, A. C.; Dangl, J. L.; Knight, R.; Ley, R.; et al. Microbiota e nutrição do hospedeiro nos reinos vegetal e animal. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17:603–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>.

Hartwig, A.; Arand, M.; Epe, B.; Guth, S.; Jahnke, G.; Lampen, A.; et al. Avaliação de risco baseada no modo de ação de carcinógenos genotóxicos. *Archives of Toxicology*, 2020, 94(6):1787–1877.

Hong, Y. S.; Song, K. H.; Chung, J. Y. Health effects of chronic arsenic exposure. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 2014, 47(5). <https://doi.org/10.3961/jpmph.14.035>.

Imperlini, E.; et al. Enhanced stress tolerance in *Sinorhizobium meliloti* RD64 due to increased indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 69(1):60–68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00675.x>.

Imran Khan; Samrah Afzal Awan; Muhammad Rizwan; Shafaqat Ali; Xinquan Zhang; Linkai Huang. Arsenic behavior in soil-plant system and its detoxification mechanisms in plants: a review. *Environmental Pollution*, 2021, 286:117389. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117389>.

Itziar Alkorta; Lur Epelde; Carlos Garbisu. Environmental parameters altered by climate change affect the activity of soil microorganisms involved in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(19):fmx200. <https://doi.org/10.1093/femsle/fmx200>.

JACOBI, Rodrigo. Distribuição e mobilidade do arsênio em área de mineração de ouro desativada em Paracatu (MG). 2007. 155 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/44/44141/tde-01072008-103407/publico/Dissertacao_RJacobi.pdf

Jomova, K.; Jenisova, Z.; Feszterova, M.; Baros, S.; Liska, J.; Hudecova, D.; Rhodes, C. J.; Valko, M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, 2011, 31(2). <https://doi.org/10.1002/jat.1649>.

Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. O sistema imunológico da planta. *Nature*, 2006, 444:323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.

KaiTeng Wang; YuanPing Li; YongChen Wu; ZongQing Qiu; ZhenXi Ding; XingJu Wang; Wei Chen; RenJie Wang; FengFu Fu; Christopher Rensing; GuiDi Yang. Improved grain yield and lowered arsenic accumulation in rice plants by inoculation with arsenite-oxidizing *Achromobacter xylosoxidans* GD03. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020,

206:111229.<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111229>.

Kang, D.-H. et al. Involvement of RpoN in regulating bacterial arsenite oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 3, p. 564–570, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.00238-12>

Khalid, S.; Shahid, M.; Niazi, N. K.; Rafiq, M.; Bakhat, H. F.; Imran, M.; Abbas, T.; Bibi, I.; Dumat, C. Melhorando a limpeza de poluentes ambientais. Comportamento do arsênio no sistema solo-planta: reações biogeoquímicas e influências da especiação química. Berlin: Springer, 2017. p. 97–140.

Kirzinger, M. W. B.; Stavrinides, J. Host specificity determinants as a genetic continuum. *Trends in Microbiology*, 2012, 20:88–93. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.006>.

Kloepper, J. W. et al. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, [S.l.], v. 86, n. 2, p. 221–224, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-86-221>

Koyabashi, M. et al. Oxidation of arsenite by two β -proteobacteria isolated from garden soil. *Microbial Ecology*, [S.l.], v. 64, n. 4, p. 1022–1030, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0036-2>

Kramer, Jos; Özkaya, Özhan; Kümmerli, Rolf. Bacterial siderophores in
Krautler, B. Chemistry of methylcorrinoids related to their roles in bacterial C1 metabolism. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, 7:349–354.

Kumagai, Y.; Pi, J. Molecular basis for arsenic-induced alteration in nitric oxide production and oxidative stress: implication of endothelial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 198(3). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.031>.

Kumar, A.; Verma, J. P. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2018, 25(2):301–311. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>.

Lett, M. et al. Arsenite oxidase gene diversity among Chloroflexi and other bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, [S.l.], v. 82, n. 3, p. 745–755, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article/82/3/745/586384>.

Liao, V. H. C.; Chu, Y. J.; Su, Y. C.; Hsiao, S. Y.; Wei, C. C.; Liu, C. W.; Lia, C. M.; Shen, W. C.; Chang, F. J. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2011, 123(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.12.003>.

Lim, M. P.; McBride, M. B. Arsenic and lead uptake by Brassicas grown on an old orchard site. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 299:656–663. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.082>.

Lima, C. A.; Castilhos, Z. C. Avaliação de risco à saúde humana pela exposição ambiental ao As em Paracatu. In: Litter, M. I.; Nicolli, H. B.; Meichtry, M.; et al., eds. *Um século da descoberta da arsenicose na América Latina (1914–2014)*. Londres: Taylor & Francis Group,

2014,

p.

652–653.

Lin, Y. F.; Yang, J.; Rosen, B. P. ArsD: an As(III) metallochaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2007, 39:453–458. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9113-y>.

LINACH – Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos - ABREA. [s.d.]. Org.br. Recuperado 9 de janeiro de 2024, de <https://www.abrea.org.br/not%C3%ADcias/publica%C3%A7%C3%B5es/120-linach-%E2%80%93-lista-nacional-de-agentes-cancer%C3%ADgenos-para-humanos.html>

Liu, J.; Ma, K.; Ciais, P.; et al. Reducing human nitrogen use for food production. *Scientific Reports*, 2016, 6:30104. <https://doi.org/10.1038/srep30104>.

Liu, X.; et al. Plant growth promoting rhizobacteria: Mechanisms and applications. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(3):495–503. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2022-3>.

Lugtenberg, B.; Kamilova, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63:541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.

Ma, J. F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Xiao, X. Y.; McGrath, S. P.; Zhao, F. J. Transportadores de arsenito no arroz e seu papel na acumulação de arsênico em grãos de arroz. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008, 105(29):9931–9935.

Mabuchi, K.; Lilienfeld, A. M.; Snell, L. M. Lung cancer among pesticide workers exposed to inorganic arsenicals. *Archives of Environmental & Occupational Health*, v. 34, n. 5, p. 312–320, 1979. DOI: 10.1080/00039896.1979.10667423

Macy, J. M. et al. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Archives of Microbiology*, [S.l.], v. 173, n. 1, p. 49–57, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002030050007>

Mahmud, K.; Makaju, S.; Ibrahim, R.; Missaoui, A. Progresso atual na pesquisa sobre fixação de nitrogênio em plantas e microbioma. *Plantas*, 2020, 9(1):97. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>.

Malik, J. A.; Goel, S.; Sandhir, R.; Nayyar, H. Absorção e distribuição de arsênio no grão-de-bico: efeitos no rendimento e na composição das sementes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2011, 42:1728–1738. <https://doi.org/10.1080/00103624.2011.584593>.

Manisha, P.; Satyavir, S. Sindhu. Amelioration of salinity stress and growth stimulation of mustard (*Brassica juncea* L.) by salt-tolerant *Pseudomonas* species. *Applied Soil Ecology*, 2020, 149:103518. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103518>.

Martínez-Castillo, J. I.; Saldaña-Robles, A.; Ozuna, C. Estresse por arsênio em plantas: uma perspectiva metabólica. *Plant Stress*, 2022, 3:100055. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100055>.

- Masscheleyn, P. H.; Delaune, R. D.; Patrick, W. H. Jr. *Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil*. Environmental Science & Technology, Washington, v. 25, n. 8, p. 1414–1418, 1991.
- Masson-Boivin, C.; Giraud, E.; Perret, X.; Batut, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 2009, 17:458–466.
- Maull, E. A.; Ahsan, H.; Edwards, J.; Longnecker, M. P.; Navas-Acien, A.; Pi, J.; Silbergeld, E. K.; Styblo, M.; Tseng, C. H.; Thayer, K. A.; Loomis, D. Evaluation of the association between arsenic and diabetes: a National Toxicology Program workshop review. *Environmental Health Perspectives*, 2012, 120(12). <https://doi.org/10.1289/ehp.1104579>.
- Mazumder, D. N.; Et Al. *Arsenic in drinking water and skin lesions: Dose-response data from West Bengal, India*. *Epidemiology*, v. 14, n. 2, p. 174–182, 2003. DOI: 10.1097/01.EDE.0000043843.24343.9F
- Md. Shiblur Rahaman; Md. Mostafizur Rahman; Nathan Mise; Md. Tajuddin Sikder; Gaku Ichihara; Md. Khabir Uddin; Masaaki Kurasaki; Sahoko Ichihara. Environmental arsenic exposure and its contribution to human diseases, toxicity mechanism and management. *Environmental Pollution*, 2021, 289:117940. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117940>.
- Melo, R.; Dias, L.; Mello, J.; Oliveira, J. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2009, 33. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000200023>.
- Miller, W. H.; et al. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research*, 2002, 62(14):3893–3903.
- Möller, J. C.; Batelochi, M.; Akiti, Y.; Maxwell, S.; Borges, A. L. Geologia e caracterização dos recursos minerais de Morro do Ouro, Paracatu, Minas Gerais. In: Pinto, C. P.; Martins-Neto, M. A., eds. *Bacia do São Francisco: geologia e recursos naturais*. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Geologia, Núcleo de Minas Gerais, 2001, p. 199–234.
- Mylona, Panagiota; Pawlowski, Katharina; Bisseling, Ton. Symbiotic Nature Reviews Microbiology, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.
- Neilands, J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 45, p. 26723–26726, 1995.
- Newton, W. E. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. *J Biol Chem*, nitrogen fixation. The Plant Cell, v. 7, n. 7, p. 869, 1995.
- Nosheen, S.; Ajmal, I.; Song, Y. Micróbios como biofertilizantes, uma abordagem potencial para a produção agrícola sustentável. *Sustentabilidade*, 2021, 13(4):1868. <https://doi.org/10.3390/su13041868>.
- Numan, M.; et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in stress management in plants: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 2018, 152:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.04.005>.
- Nurchi, V. M.; Djordjevic, A. B.; Crisponi, G.; Alexander, J.; Bjørklund, G.; Aaseth, J. Arsenic toxicity: molecular targets and therapeutic agents. *Biomolecules*, 2020, 10(2).

<https://doi.org/10.3390/biom10020235>.

Ondrasek, G.; et al. Zinc and cadmium mapping by NanoSIMS within the root apex after short-term exposure to metal contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171:571–578. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.021>.

Ondrasek, G.; Rengel, Z.; Clode, P. L.; Kilburn, M. R.; Guagliardo, P.; Romic, D. Mapeamento de zinco e cádmio por NanoSIMS no ápice radicular após exposição de curto prazo à contaminação por metais. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171:571–578. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.021>.

Oremland, R. S.; Stolz, J. F. The ecology of arsenic. *Science*, v. 300, n. 5621, p. 939–944, 2003.

Páez-Espino, D.; et al. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, 2009, p. 117–130. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19130261/>.

Pérez-Montaña, Francisco; García-Agustín, Pilar; Cubo, María T.; García-Bejarano, Francisco; Vázquez, María Del Mar; Cubo, Francisco. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, v. 169, n. 1, p. 1–17, jan. 2014. DOI: [10.1016/j.micres.2013.09.011](https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011).

Padder, Bilal A.; Et Al. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: A case study for mapping two independent genes. *Crop Science*, v. 57, n. 1, p. 1–11, 2017. DOI: [10.2135/cropsci2016.04.0271](https://doi.org/10.2135/cropsci2016.04.0271).

Passari, A. K.; et al. Insights into the microbial consortium involved in plant growth promotion and biocontrol: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10):4641–4655. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7356-4>.

Patel, K. S.; Pandey, P. K.; Martín-Ramos, P.; Corns, W. T.; Varol, S.; Bhattacharya, P.; Zhu, Y. A review on arsenic in the environment: bio-accumulation, remediation, and disposal. *RSC Advances*, 2023, 13(22). <https://doi.org/10.1039/d3ra02018e>.

Pieterse, Corné M. J.; Van Wees, Saskia C. M.; Van Der Ent, Sander; Van Loon, L. C. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance. *European Journal of Plant Pathology*, v. 108, n. 7, p. 723–734, 2002. DOI: [10.1023/A:1020608709117](https://doi.org/10.1023/A:1020608709117).

Poria, V.; et al. Plant growth promoting rhizobacteria: role in sustainable agriculture. *Microbiological Research*, 2021, 242:126628. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>.

Preetha, J. S. Y.; et al. Biotechnology advances in bioremediation of arsenic: a review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2023, 28(3):1474.

Rahaman, M. S.; Rahman, M. M.; Mise, N.; Sikder, M. T.; Ichihara, G.; Uddin, M. K.; Kurasaki, M.; Ichihara, S. *Environmental arsenic exposure and its contribution to human diseases, toxicity mechanism and management*. *Environmental Pollution*, v. 289, art. 117940, 2021. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.117940](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117940)

Research On Cancer. Some drinking-water disinfectants and contaminants, rice and beans. *Chemosphere*, v. 168, p. 996-1003, 2017.

Richardson, D. J.; Watson, D. C.; Williams, P. A. Arsenic and microorganisms: genes, molecular aspects, and applications. *Applied and Environmental Microbiology*, [S.l.], v. 75, n. 22, p. 7114–7124, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01765-09>. Acesso em: 21 ago. 2025.

Rosen, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, [S.l.], v. 529, n. 1, p. 86–92, 2002

Rosen, P. Theoretical significance of arsenic as a carcinogen. *Journal of Theoretical Biology*, 1971, 32:425–426. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(71\)90178-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(71)90178-0).

Rothballer, M.; Schmid, M.; Fekete, A.; Hartmann, A. Análise comparativa in situ de fusões do promotor ipdC-gfpmut3 das cepas Sp7 e Sp245 de *Azospirillum* brasileiro. *Environmental Microbiology*, 2005, 7:1839–1846. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00848.x>.

Samuel, S.; Kathirvel, R.; Jayavelu, T.; Chinnakkannu, P. Danos oxidativos de proteínas no cérebro de ratos induzidos por arsênio: influência do ácido DL- α -lipóico. *Toxicology Letters*, 2005, 155(1):27–34.

Sánchez, L.; et al. Microbial interactions promoting plant growth and stress resistance: advances and prospects. *Agronomy*, 2023, 13(1):123. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010123>.

Schaumlöffel, N.; Gebel, T. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. *Mutagenesis*, 1998, 13(3). <https://doi.org/10.1093/mutage/13.3.281>.

Schoonhoven, Aart Van; Voysest, Oswaldo (Eds.). *Common Beans: Research for Crop Improvement*. Wallingford: C.A.B. International; Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1991.

Sharma, P.; Sharma, N.; Sharma, A. Plant Growth Promoting Bacteria: A Gateway to Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, [S.l.], v. 4, p. 1–10, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00074>

Shen, S.; et al. Arsenic binding to proteins. *Chemical Reviews*, 2013, 113(10):7769–7792. <https://doi.org/10.1021/cr300015c>.

Skamnioti, P.; Ridout, C. J. Microbial avirulence determinants: guided missiles or antigenic flak? *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6:551–559.

Souza, I. E. M. De; Santana, G. S.; Munis, D. P.; Carneiro, G. A.; Gonçalves, J. A. C. A contaminação por arsênio nos solos e nas águas subterrâneas no Estado de Minas Gerais, Brasil: fontes, riscos à saúde, estratégias de mitigação. *Research, Society and Development*, 2022, 11(5). <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.26960>.

Souza, J. M. O.; et al. Arsênio e arroz: toxicidade, metabolismo e segurança alimentar. *Química Nova*, 2015, 38(1):118–127.

Spaepen, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*, 2009, 51:283–320.

Srinivasan, R.; Singh, R. P.; Singh, M.; Singh, D. P.; Singh, B. P.; Singh, R. S. Development and evaluation of phosphate-solubilizing microbial inoculants for fodder production in problem soils. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, n. 3, p. 539–549, 2012. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2012.05385.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05385.x).

Sritongon, M.; et al. Characterization of plant growth-promoting traits in bacterial isolates from contaminated soils. *Journal of Applied Microbiology*, 2023. <https://doi.org/10.1111/jam.15800>.

Stoeva, N.; Bineva, T. Alterações oxidativas e fotossíntese em plantas de aveia cultivadas em solo contaminado com As. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 2003, 29:87–95.

Tam, L. M.; Price, N. E.; Wang, Y. Mecanismos moleculares de interrupção induzida por arsênio do reparo de DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 2020, 33:709–726. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00464>.

Teale, W. D.; Paponov, I. A.; Palme, K. Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(11):847–859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>.

Teixeira, M. C.; Ciminelli, V. S. T. Development of a biosorbent for arsenite: structural modeling based on x-ray spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39(3). <https://doi.org/10.1021/es049513m>.

Thompson, J. A.; White, C. C.; Cox, D. P.; Chan, J. Y.; Kavanagh, T. J.; Fausto, N.; et al. Mecanismos distintos independentes de Nrfl/2 mediam a expressão do gene da subunidade da ligase glutamato-cisteína induzida por As³⁺ em hepatócitos murinos. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 46(12):1614–1625.

Toxicological & Environmental Chemistry, v. 100, n. 1, p. 6-19, 2018.

US Environmental Protection Agency (EPA). National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring. *Federal Register*, 2001, 66(14).v. 27, p. 3-8, 2000.

Vernoux, T.; Robert, S. Auxin 2016: a burst of auxin in the warm south of China. *Development*, v. 144, n. 4, p. 533–540, fev. 2017.

Wang, W.; Gao, H.; Jin, S.; Li, R.; Na, G. The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 173. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.113>.

- Weert, M. de et al. Root exudate-mediated chemotaxis of rhizosphere *Pseudomonas* spp. toward roots of tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 117–123, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.2.117>.
- Xu, C.; Zhou, T.; Kuroda, M.; Rosen, B. P. Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 1998, 123:16–23.
- Wortmann, Charles S.; Kirkby, Roger A.; Eledu, Charles A.; Allen, David J. *Atlas of common bean (Phaseolus vulgaris L.) production in Africa*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1998.
- Yan, A.; Wang, Y.; Tan, S. N.; Mohd Yusof, M. L.; Ghosh, S.; Chen, Z. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>.
- Yin, Y.; Meng, F.; Sui, C.; Jiang, Y.; Zhang, L. O arsênio aumenta a morte celular e os danos ao DNA induzidos pela exposição ultravioleta B em células epidérmicas de camundongos por meio da produção de espécies reativas de oxigênio. *Dermatologia Clínica e Experimental*, 2019, 44(5):512–519.
- Ying, S.; Myers, K.; Bottomley, S.; Helleday, T.; Bryant, H. E. BRCA2-dependent homologous recombination is required for repair of arsenite-induced replication lesions in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(15):5105–5113.
- Zeng, Zhenzhong; Ziegler, Alan D.; Searchinger, Timothy D.; LIU, Zhenxue; CHEN, Aihui; JU, Ke; PIAO, Shilong; LI, Zhi-Xin. A reversal in global terrestrial stilling and its implications for wind energy production. *Nature Climate Change*, v. 9, n. 11, p. 979–985, 2019. DOI: 10.1038/s41558-019-0622-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41558-019-0622-6>
- Zhang, M.; Dai, M.; Xia, L.; Song, S. Comparison of Arsenic Adsorption on Goethite and Amorphous Ferric Oxyhydroxide in Water. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 228, n. 427, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3602-3>.
- Zhao, B. Et Al. Tead mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development*, [S.l.], v. 22, n. 14, p. 1962–1971, 2008.
- Zhao, F. J.; Ma, J. F.; Meharg, A. A.; Mcgrath, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 2009, 181(4). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x>.
- Ćavar, S.; Bošnjak, Z.; Klapac, T.; Barišić, K.; Čepelak, I.; Jurasović, J.; et al. Selênio no sangue, atividade da glutathione peroxidase e suplementação antioxidante de indivíduos expostos ao arsênio por meio da água potável. *Toxicologia e Farmacologia Ambiental*, 2010, 29(2):138–143.

