

Valorização de resíduos vegetais no contexto da economia circular:

Endófitos de *Cannabis sativa* L. com aplicação
bioestimulante em *Solanum lycopersicum* L.

Dissertação

Curso de Mestrado em Agricultura Sustentável

INÊS MARCELINO RODRIGUES

Orientadores: José Telo da Gama; Cristina Azevedo; Sandra Correia

Elvas, 2025

INÊS MARCELINO RODRIGUES

Valorização de resíduos vegetais no contexto da economia circular: endófitos de *Cannabis sativa* com aplicação bioestimulante em *Solanum lycopersicum* L.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em AGRICULTURA SUSTENTÁVEL conferido pelo Instituto Politécnico de Portalegre.

Orientador: José Telo da Gama, Cristina Azevedo, Sandra Correia

Arguente principal: Tiago Amaro

Arguente: Ana Cordeiro

Presidente do Júri: Carolina Bailão

Classificação: 16 valores

Escola Superior de Biociências de Elvas

2025

Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi possível graças ao contributo, apoio e dedicação de diversas pessoas e instituições, a quem manifesto desde já o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, o meu mais sincero obrigado ao Professor José Gama, orientador deste projeto, pelo incentivo constante, pelo voto de confiança e pela disponibilidade demonstrada ao longo de todas as fases deste percurso. A sua orientação foi fundamental em todo o desenvolvimento do estudo.

Um agradecimento especial à Dr.^a Cristina Azevedo, que me guiou na instalação do projeto, e me introduziu a um universo científico até então desconhecido. A sua intervenção foi decisiva para a realização do trabalho nos laboratórios do InnovPlantProtect. À Dr.^a Sandra Correia pela oportunidade de integrar projetos de investigação tão interessantes quanto este. À Tatiana Gil e Sandra Caeiro, o meu agradecimento pela disponibilidade, partilha de conhecimento e companheirismo, que tanto contrinuíram para enriquecer este percurso.

Por último, e com igual importância, agradeço aos meus: à minha família, que está sempre presente e apoia incondicionalmente a minha contínua exploração de novos caminhos; aos amigos, pelas palavras de motivação e pelos momentos de descontração que ajudaram a equilibrar os desafios deste percurso.

Num tempo em que o individualismo é celebrado como expressão de força e independência, importa recordar que é na teia das ligações que estabelecemos, qual micélio que sustenta o bosque, que encontramos solo fértil para evoluir.

Resumo

A presente dissertação teve como objetivo a valorização de resíduos vegetais da indústria de *Cannabis* medicinal, identificando bactérias endófitas com potencial bioestimulante em *Solanum lycopersicum* L. Foram isoladas doze bactérias a partir de resíduos de *Cannabis sativa* L. e avaliadas quanto à produção de biofilme, síntese de auxinas e fixação de azoto. Destacaram-se os seguintes gêneros: B4 (*Pseudomonas* sp.), B8 (*Stenotrophomonas* sp.) e B16 (*Bacillus* sp.). O isolado B16 evidenciou maior produção de biofilme e auxinas, enquanto B8 se destacou na fixação de azoto. Nos ensaios em estufa o isolado B4 revelou melhor desempenho na promoção do crescimento de tomateiros, ao contrário do isolado B8, associado a uma menor produção de frutos. O isolado B4 apresentou melhor desempenho global, constituindo o isolado mais promissor. Conclui-se assim que os resíduos de *Cannabis sativa* são fonte viável de microrganismos endófitos com aplicação bioestimulante, podendo contribuir para práticas agrícolas mais sustentáveis.

Palavras-chave: biotecnologia; microbioma vegetal; *Solanum lycopersicum* L.; bactérias PGP

Abstract

This dissertation aimed to valorise plant residues from the medicinal *Cannabis* industry by identifying endophytic bacteria with biostimulant potential in *Solanum lycopersicum* L. Twelve bacterial isolates were obtained from *Cannabis sativa* L. residues and evaluated for their ability to produce biofilm, synthesize auxins, and fix nitrogen. The following genera stood out: B4 (*Pseudomonas* sp.), B8 (*Stenotrophomonas* sp.), and B16 (*Bacillus* sp.). Isolate B16 exhibited the highest biofilm formation and auxin synthesis, while B8 showed the greatest nitrogen-fixing capacity. Greenhouse trials revealed that isolate B4 promoted the growth of tomato plants, in contrast to isolate B8, which produced a lower fruit production. Isolate B4 displayed the most promising overall performance. It is concluded that *Cannabis sativa* residues are viable sources of endophytic microorganisms with biostimulant application, contributing to more sustainable agricultural practices.

Keywords: biotechnology; plant microbiome; *Solanum lycopersicum* L.; PGP bacteria

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

AIA – Ácido indol-3-acético

ACC desaminase – l-aminociclopropano-l-carboxilato

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

BLASTn – National Library of Medicine

BTB - Bromothymol Blue (Brotimol azul)

CFU – Colony Forming Unity (Unidades formadoras de colónias)

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

GBP – GreenBe Pharma

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

InPP – InnovPlantProtect

LB – Luria Bertani Broth

OD – Optical density (Densidade ótica)

ODS – Objetivos do desenvolvimento sustentável

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PGP – Plant growth promoter (Promotor de crescimento vegetal)

pH – Potencial de hidrogénio

RGGR – Regime Geral de Gestão de Resíduos

RPM – Rotações por minuto

rRNA – Ribosomal Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico ribossómico)

RSI – Resistência sistémica adquirida

SPAD – Soil plant analysis development

THC – Tetrahydrocannabinol

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	iv
Índice Geral.....	vi
Índice de Quadros.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Equações.....	xi
1. Introdução e Objetivos.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos.....	2
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Economia circular e valorização de resíduos vegetais.....	3
2.2 Resíduos de <i>Cannabis sativa</i> – caracterização e potencial de valorização.....	3
2.3 Microbioma com potencial bioestimulante.....	4
2.3.1. <i>Bacillus sp.</i>	6
2.3.2. <i>Pseudomonas sp.</i>	7
2.3.3. <i>Stenotrophomonas sp.</i>	8
2.4 Bactérias endófitas de <i>Cannabis sativa</i>	8
2.5 Bioestimulação de <i>Solanum lycopersicum</i> L. Por bactérias PGP.....	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Material.....	11
3.1.1. Material vegetal.....	11
3.1.2. Material microbiológico.....	11
3.1.3. Reagentes.....	12
3.2. Métodos.....	12

3.2.1. Isolados de bactérias endófitas de <i>Cannabis sativa</i>	13
3.2.2. Caracterização do potencial bioestimulante de bactérias endófitas isoladas de <i>Cannabis sativa</i> através de métodos bioquímicos.....	13
3.2.3. Caracterização das espécies bacterianas.....	15
3.2.4. Determinação da curva de crescimento e quantificação de CFUs	16
3.2.5. Screening em planta de bactérias isoladas de <i>C. sativa</i> para avaliação do potencial bioestimulante	17
3.2.6. Análise estatística	19
4. Resultados e Discussão	20
4.1 Identificação das espécies bacterianas	20
4.2. Caracterização do potencial bioestimulante de bactérias endófitas isoladas de <i>Cannabis sativa</i> através de métodos bioquímicos.....	21
4.2.1. Produção de biofilme	21
4.2.2. Produção de auxinas	25
4.2.3. Fixação de azoto	28
4.3 Determinação das curvas de crescimento e quantificação de CFUs para os isolados B4 e B16	32
4.4. Rastreamento da capacidade bioestimulante das bactérias seleccionadas em tomate.....	35
6. Conclusões.....	48
7. Bibliografia	50

Índice de Quadros

Quadro 1 - Isolados e genótipo de <i>C. sativa</i> correspondente.....	12
Quadro 2 – Testes estatísticos biofilme.....	24
Quadro 3 – Testes estatísticos auxinas.....	27
Quadro 4 – Testes estatísticos fixação de azoto.....	30
Quadro 5 - Valores de desempenho para os testes bioquímicos.....	31
Quadro 6 - CFUs.....	35
Quadro 7 – Testes estatísticos altura.....	37
Quadro 8 – Testes estatísticos do comprimento da raíz.....	38
Quadro 9 – Testes estatísticos peso seco da parte aérea.....	38
Quadro 10 – Testes estatísticos do peso seco da raíz	39
Quadro 11 – Valores de desempenho fase vegetativa.....	40
Quadro 12 – Testes estatísticos da altura.....	40
Quadro 13 – Testes estatísticos do peso fresco parte aérea.....	41
Quadro 14 – Testes estatísticos do número de entrenós.....	42
Quadro 15 – Testes estatísticos do número de frutos por planta.....	43
Quadro 16 – Testes estatísticos do peso de frutos por planta.....	44
Quadro 17 – Valores de desempenho fase produção.....	45

Índice de Figuras

Figura 1 - Mecanismos de acção de bactérias PGP	5
Figura 2 – Endófitos de <i>Cannabis sativa</i>	9
Figura 3 – Extração de bactérias endófitas de <i>Cannabis sativa</i>	13
Figura 4 – Escala temporal dos ensaios em planta	18
Figura 5 – Gel de eletroforese de agarose da amplificação da região 16S	20
Figura 6 - Colónias puras de bactérias endófitas de <i>C. sativa</i>	21
Figura 7 - Valores OD550 nm na produção de biofilme (boxplot).....	22
Figura 8 – Valores OD550nm na produção de biofilme (barras)	23
Figura 9 – Quantificação auxinas (boxplot).....	25
Figura 10 – Quantificação auxinas (barras)	26
Figura 11 – Quantificação atividade fixação de azoto (boxplot)	28
Figura 12 – Quantificação atividade fixação azoto (barras)	29
Figura 13 - Curva de crescimento da bactéria B4.....	32
Figura 14 - Curva de crescimento da bactéria B16.....	33
Figura 15 – Colónias puras dos isolados B4 e B16, CFUs.....	34
Figura 16 – Diferenças entre tratamentos no comprimento da parte aérea e raiz - vegetativo.....	35
Figura 17 – Quantificação da altura (cm) entre os isolados – vegetativo.....	37
Figura 18 – Quantificação do tamanho da raiz (cm) entre os isolados – vegetativo	38
Figura 19 – Quantificação do peso seco da parte aérea (mg) entre os isolados – vegetativo	39
Figura 20 – Quantificação do peso seco da raiz (mg) entre os isolados – vegetativo ...	39
Figura 21 - Quantificação da altura (cm) entre os isolados - produção	41
Figura 22 – Quantificação do peso fresco da parte aérea (g) entre os isolados – produção	42

Figura 23 – Quantificação do número de entrenós entre os isolados – produção.....	42
Figura 24 – Quantificação do número de frutos por planta entre os isolados – produção	43
Figura 25 – Quantificação do peso dos frutos por planta entre os isolados – produção	44
Figura 26 - Número de flores abertas ensaio I	46
Figura 27 - Número de flores abertas ensaio 2	46
Figura 28 - Número de flores abertas ensaio 3	47

Índice de Equações

Equação I: Lei de diluição	16
Equação II: Cálculo de densidade microbiana	17

I. Introdução e Objetivos

I.1. Introdução

A valorização de resíduos provenientes dos sistemas agrícolas constitui, na atualidade, uma prioridade face à necessidade de mitigar os impactos ambientais associados. A cultura de *Cannabis sativa* L. para fins medicinais tem vindo a ocupar um lugar de destaque a nível global, pelas suas múltiplas aplicações terapêuticas e recreativas, capaz de gerar um impacto económico relevante. Em Portugal, o setor encontra-se em plena expansão (Janeiro, 2023; Santos, 2022). Não obstante, a produção industrial de elevada qualidade exige um investimento considerável em recursos, e acarreta desafios significativos ao nível da gestão sustentável dos resíduos gerados.

A Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), e a Agência Portuguesa do Ambiente (APA) emitiram uma nota técnica conjunta que estabelece diretrizes para a gestão dos resíduos provenientes da indústria da *Cannabis* medicinal. As opções preferenciais incluem a compostagem, a digestão anaeróbia e a valorização agrícola direta (APA, 2022).

Os resíduos vegetais de *Cannabis sativa* L. são fonte de recursos biológicos, nomeadamente microrganismos endófitos com potencial biotecnológico. Neste contexto, considera-se o papel das comunidades microbianas associadas às plantas, que desempenham funções essenciais no crescimento e resiliência vegetal. Estas comunidades benéficas de fungos e bactérias habitam a superfície e o interior dos tecidos e órgãos, facilitam a absorção de nutrientes minerais, induzem resistência contra patógenos e ajudam na modulação de metabolitos secundários (Taghinasab & Jabaji, 2020).

Este estudo foi realizado em parceria com o projeto ValorCannBio do InnovPlantProtect (InPP), que tem como objetivo explorar o reaproveitamento dos resíduos provenientes de *Cannabis* medicinal para avaliar o seu potencial biocida/biofungicida, e assim apresentar soluções integradas para pragas do olival português.

Pretendeu-se assim, avaliar o potencial bioestimulante das bactérias endófitas provenientes desses extratos através da realização de testes padronizados de avaliação desse mesmo potencial - produção de auxinas, biofilme e fixação de azoto - seguidos de

ensaios *in planta* (*Solanum lycopersicum* L.) para assim compreender a influência no desenvolvimento geral da mesma.

O estudo realizado por Taghinasab & Jabaji (2020) sugere que o genótipo do hospedeiro influencia a composição e a função dos grupos microbianos da endosfera, o que, por sua vez, afeta a resposta da planta ao stress ambiental. Com base neste pressuposto utilizaram-se bactérias endófitas provenientes de três genótipos diferentes de *C. sativa*.

1.2. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo investigar se bactérias endófitas isoladas de resíduos vegetais de *Cannabis sativa* apresentavam potencial bioestimulante que pudessem ser aplicadas ao crescimento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Partindo da hipótese de que os resíduos de *C. sativa*, frequentemente subvalorizados ou descartados, são fonte de microrganismos benéficos que podem ser reutilizados enquanto recurso biotecnológico, pretendeu-se explorar este potencial, colocando as seguintes questões:

- I. Que bactérias endófitas benéficas albergam estes resíduos e que potencial exercem sobre o crescimento vegetal?
- II. Podem caracterizar-se funcionalmente essas bactérias em ensaios *in vitro*, para avaliação da produção de auxinas, capacidade de fixação de azoto e formação de biofilme?
- III. Será possível aplicar os isolados mais promissores em plantas de tomate e observar os efeitos ao nível do desenvolvimento morfológico e da fisiologia vegetal?

Para responder a estas hipóteses, foram realizados ensaios laboratoriais de caracterização das bactérias endófitas isoladas, seguidos de testes *in planta*, em condições controladas, com o objetivo de validar a sua ação bioestimulante. Com esta abordagem, pretendeu-se contribuir para o avanço do conhecimento na área da valorização de resíduos agroindustriais através da sua aplicação enquanto agentes bioestimulantes, promovendo estratégias mais sustentáveis para a indústria da *Cannabis* medicinal.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Economia circular e valorização de resíduos vegetais

A agricultura representa um dos principais motores do desenvolvimento económico, mas a sua evolução industrial tem provocado impactos ambientais significativos, colocando em questão a resiliência do planeta. O recurso a agroquímicos potencia a produtividade agrícola, por forma a alimentar a crescente população mundial. Estas práticas agronómicas, além de dispendiosas, conduzem à degradação de terras agrícolas, contaminação de águas subterrâneas e eutrofização de águas superficiais (Pérez-Rodriguez et al. 2020).

A transição dos sistemas de produção intensivos está prevista na Agenda 2030, e nos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), entre os quais “Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável”. Com base neste compromisso, mais de 30 países passaram a implementar políticas públicas orientadas para a gestão integrada dos recursos e de forma a reduzir ou substituir recursos não renováveis.

Uma agricultura mais resiliente deve incorporar princípios circulares em todas as fases do seu ciclo, desde a produção inicial até ao consumo final e, por fim, à gestão eficiente e adequada dos resíduos. Neste contexto, a economia circular propõe um modelo de gestão que privilegia a re-integração dos resíduos nos processos produtivos, evitando a perda de valor e prolongando a vida útil dos mesmos (Duque-Acevedo et al. 2020).

2.2. Resíduos de *Cannabis sativa* - caracterização e potencial de valorização

O setor da *Cannabis* medicinal e recreativa aumentou a sua popularidade tanto na academia quanto na indústria, devido a mudanças na legislação relativa à substância controlada - o THC, ou Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Robertson et al., 2023). De acordo com dados do INFARMED, em 2025 Portugal torna-se o maior exportador europeu de inflorescências de *Cannabis* (Ramos, 2024). À medida que o cultivo aumenta, os resíduos associados também aumentam, e a gestão destes revela-se desafiante por conta das

restrições legislativas que requerem rastreabilidade rigorosa para evitar desvios do circuito legal (APA, 2021)

Segundo a APA, os resíduos resultantes desta indústria são classificados como resíduos vegetais não perigosos, enquadrando-se no Regime Geral de Gestão de Resíduos (RGGR). Nos termos definidos pelo RGGR, cabe ao produtor garantir a gestão adequada destes resíduos, obedecendo à hierarquia de tratamento que favorece a valorização em detrimento da eliminação. Entre as opções de tratamento estão a compostagem, digestão anaeróbia, valorização agrícola direta, deposição em aterro e incineração. As três primeiras são as mais recomendadas, sobretudo se realizadas no local e por operadores autorizados (APA, 2021).

Estudos têm sido feitos no desenvolvimento de novos tratamentos de resíduos associados à indústria da *Cannabis*; no estudo de Robertson *et al.* (2023) compararam-se os sistemas de gestão verificando-se que, "grande parte da biomassa vegetal residual é gerada durante o período de cultivo, diferindo de acordo com o método de cultivo utilizado - hidroponia, orgânico ou um híbrido entre os dois". A biomassa residual consiste em flores, folhas, caules e raízes, que pode ser transformada através das quatro vias já mencionadas, ou através da valorização dos compostos bioativos (canabinóides, terpenos, flavonoides, etc.) que têm aplicações nos sectores biotecnológico e farmacêutico, por exemplo, no controlo de pragas e doenças (MacWilliams *et al.* 2023) ou na ação terapêutica no tratamento de células cancerígenas (Melosini, 2019).

Ao considerar ainda mais o microbioma vegetal associado, encontram-se bactérias endófitas que atuam na promoção do crescimento vegetal, através da capacidade de síntese de fitohormonas, solubilização de nutrientes e modulação da fisiologia da planta hospedeira (Taghinasab & Jabaji, 2020; Lyu *et al.*, 2023).

Estas bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPs) poderiam servir na redução da dependência de fertilizantes químicos sintéticos, e contribuir para práticas agrícolas mais integradas (Pérez-Rodriguez *et al.* 2020).

2.3. Microbioma com potencial bioestimulante

Os microrganismos benéficos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar sintomas de doença, desempenham um papel fundamental no crescimento vegetal. O uso de isolados bacterianos nativos das plantas hospedeiras maximiza as propriedades

benéficas pela complementaridade que possuem, para além de facilitar a adaptação e o sucesso das mesmas (Pérez-Rodríguez et al. 2020).

As bactérias PGP influenciam o desenvolvimento da planta através de mecanismos diretos e indiretos que incluem a fixação biológica de azoto, a solubilização de nutrientes (como fósforo e potássio), a produção de fitohormonas (como auxinas, citocininas e giberelinas), ou a secreção de sideróforos e compostos voláteis (Figura 1).

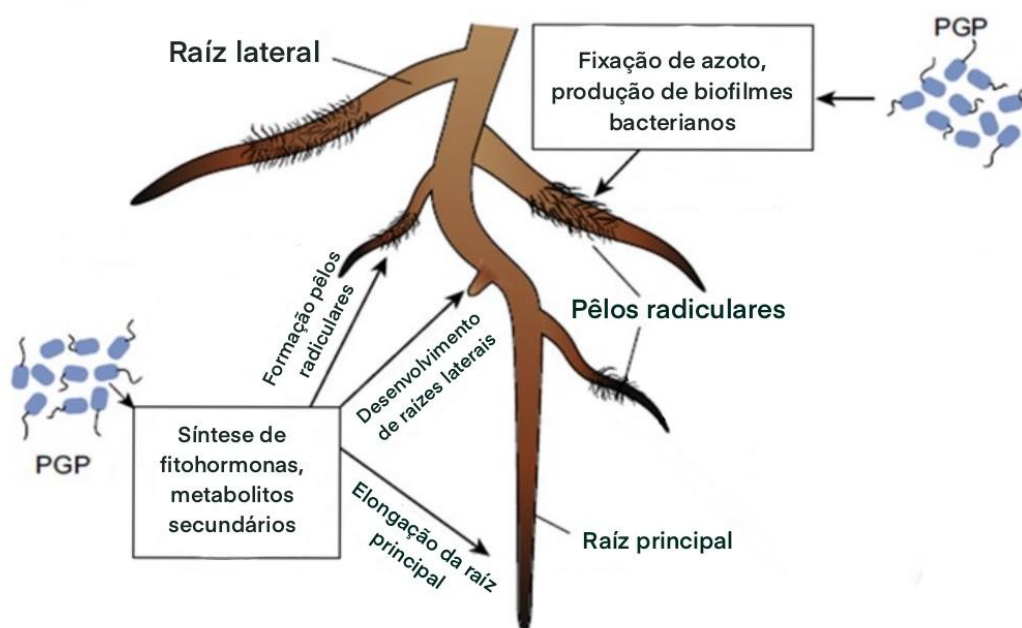


Figura 1 - Mecanismos de acção de bactérias PGP, adaptado de Hasan et al (2024)

Estes mecanismos não só promovem o crescimento, como aumentam a tolerância das plantas a condições de stress (seca, salinidade ou temperaturas extremas) ao regularem vias hormonais e reforçarem sistemas antioxidantes. A eficácia dos inoculantes PGP depende da capacidade de colonização da rizosfera, sendo que esta é determinada por fatores como a motilidade, formação de biofilme e adaptação às condições edáficas. (Backer et al., 2018).

De acordo com Bhattacharyya (2023) a formação de biofilmes bacterianos na rizosfera é um componente essencial das interações planta-microrganismo. Os biofilmes são agregados multicelulares protegidos por uma matriz complexa de polissacáridos extracelulares, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, que proporcionam uma barreira

física e química contra condições adversas. Esta matriz facilita a estabilização e adesão das bactérias às raízes, promovendo a formação de microcolônias.

A produção de metabolitos promotores de crescimento (como auxinas, sideróforos, enzimas solubilizadoras de fosfato e fixação de azoto) é amplificada. Os biofilmes também permitem uma modulação dinâmica da comunicação celular, coordenando respostas coletivas à disponibilidade de nutrientes e ao ambiente edáfico (Bhattacharyya et al. 2023).

Auxinas são fitohormonas sintetizadas por bactérias endófitas, como o ácido indol-3-acético (AIA), que desempenha um papel central na modulação do crescimento vegetal e nas interações planta-microrganismo. A produção de AIA por bactérias altera a arquitetura radicular, aumentando o número de raízes laterais e pêlos absorventes, que por sua vez potencia a eficiência de absorção de água e nutrientes (Etesami & Glick, 2024).

No contexto da comunicação planta-microrganismo, o AIA influencia o equilíbrio hormonal ao contribuir para uma utilização mais eficiente de nutrientes. A síntese desta hormona pelas bactérias é regulada por redes genéticas sensíveis a condições ambientais, respondendo a estímulos como a presença de triptofano na rizosfera (Etesami & Glick, 2024).

A fixação de azoto é o mecanismo através do qual as bactérias convertem o azoto atmosférico (N_2) em amónia (NH_3), pela enzima nitrogenase, tornando-o disponível (Hasan et al., 2024). Este processo diminui as perdas de N por lixiviação e a emissão de gases de efeito estufa (nitritos, N_2O) (Paungfoo-Lonhienne et al., 2019).

2.3.1. *Bacillus* sp.

As bactérias pertencentes a este género formam esporos resistentes, que lhes conferem elevada capacidade de sobrevivência em formulações comerciais e em condições adversas do solo. Entre os principais mecanismos PGP que desempenham destacam-se a produção de fitohormonas (AIA), fixação de azoto, solubilização de fósforo, e a produção de sideróforos. As espécies de *Bacillus* sintetizam ainda metabolitos secundários com atividade antimicrobiana, que ajudam no controlo biológico e participam na indução da resistência sistémica da planta (RSI) (Poveda & González-Andrés, 2021).

A produção de biofilmes robustos confere forte capacidade de colonização da rizosfera, facilitando a absorção de nutrientes e o crescimento radicular (Poveda & González-Andrés, 2021).

Vários estudos foram feitos em diferentes espécies de *Bacillus*, tendo sido documentada a atividade PGP nas diferentes estirpes:

- Cultura de tomate (*Bacillus subtilis* FZB24); aumento do crescimento e da tolerância ao stress salino (Idris et al., 2007)
- Cultura de pepino (*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9); melhoria do crescimento da planta e proteção contra *Fusarium oxysporum* (Shao et al., 2015)
- Cultura de alface e tomate (*Bacillus velezensis* FZB42); estimulação do crescimento e ativação de RSI (Meng et al., 2016)

2.3.2. *Pseudomonas* sp.

Certas estirpes de *Pseudomonas* induzem as plantas a expressar mais rapidamente e intensamente as suas defesas bioquímicas, contribuindo para o controlo biológico de patógenos no cultivo da *Cannabis sativa*. A atividade antagonista tem sido demonstrada contra fungos patogénicos, como *Botrytis*, *Fusarium* e *Sclerotinia*. Também exercem ação protetora contra insectos, nemátodes e plantas invasoras (Balthazar et al., 2022).

As bactérias pertencentes a este género produzem auxinas, especialmente AIA, que influenciam a arquitetura radicular, promovendo a formação de raízes laterais e adventícias. Estirpes como *P. putida* GR12-2 demonstraram aumentar significativamente o desenvolvimento radicular em *Brassica napus* em comparação com mutantes deficientes em AIA. Algumas *Pseudomonas* sintetizam citocininas, como *P. stutzeri* MTP40 e *P. putida* MTP50, que estimulam o alongamento de raízes e a formação de nódulos, e atuam como agentes de biocontrolo contra patógenos como *P. syringae*. *Pseudomonas* também produzem ácido abscísico (ABA), como observado em *P. putida* MTCC5279, aumentando a tolerância a salinidade e seca pela regulação de características fisiológicas e genes de resposta a stress. Um dos mecanismos mais relevantes é a produção da enzima ACC desaminase (l-aminociclopropano-l-carboxilato), presente em estirpes como *P. stutzeri* A1501 e *P. brassicacearum* 3Re2-7, que degrada o precursor do etileno (ACC desaminase), reduzindo os níveis desta hormona associada à inibição do crescimento vegetal sob condições adversas (Singh et al., 2022).

A estirpe *Pseudomonas indoloxydans* F3-47 revelou capacidade de produção de AIA, com efeitos diretos na elongação da raiz e parte aérea de plantas de milho. Adicionalmente, foi capaz de solubilizar fosfato tricálcico, disponibilizando fósforo em solos pobres, uma característica típica das espécies *Pseudomonas* e *Bacillus*. A produção de amónia pela estirpe indica participação no ciclo do azoto e potencial fertilizante. A produção de cianeto de hidrogénio (HCN) reforça o potencial biocontrolador desta estirpe. Ensaaios em milho demonstraram aumentos significativos no comprimento da raiz e da parte aérea (20–44%), bem como nos parâmetros de rendimento - comprimento da espiga e número de filas por espiga (Josephine & Thomas, 2021).

2.3.3. *Stenotrophomonas* sp.

Num estudo realizado por Zhao et al. (2024) procedeu-se a uma análise comparativa de 213 genomas de *Stenotrophomonas*, que revelou a adaptabilidade ambiental deste género. Algumas destas estirpes dispõem de genes associados à motilidade e formação de biofilme que promovem adesão eficaz e colonização estável das raízes. Foram também identificados diversos genes ligados à promoção direta do crescimento (biossíntese de auxinas (AIA) e citocininas; solubilização de fósforo) melhorando a disponibilidade de nutrientes essenciais. Verificou-se ainda que o género *Stenotrophomonas* possui genes que produzem quitinases, proteases, lipases e metabólitos antimicrobianos, que reforçam a sua ação no biocontrolo.

2.4. Bactérias endófitas de *Cannabis sativa*

Em *Cannabis sativa* L., foram identificadas bactérias endófitas pertencentes aos filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, com géneros como *Bacillus* e *Pseudomonas*, que demonstraram ter potencial bioestimulante (Taghinasab & Jabaji, 2020).

A colonização inicia-se, geralmente, na rizosfera mas pode ocorrer por transmissão vertical (via sementes) ou horizontal (a partir do solo). Esta colonização é influenciada por exsudados radiculares, e a sua distribuição na planta é assimétrica: apresenta maior diversidade microbiana nas raízes, tendência que decresce em direção aos órgãos aéreos (Figura 2) (Kumari et al. 2023).

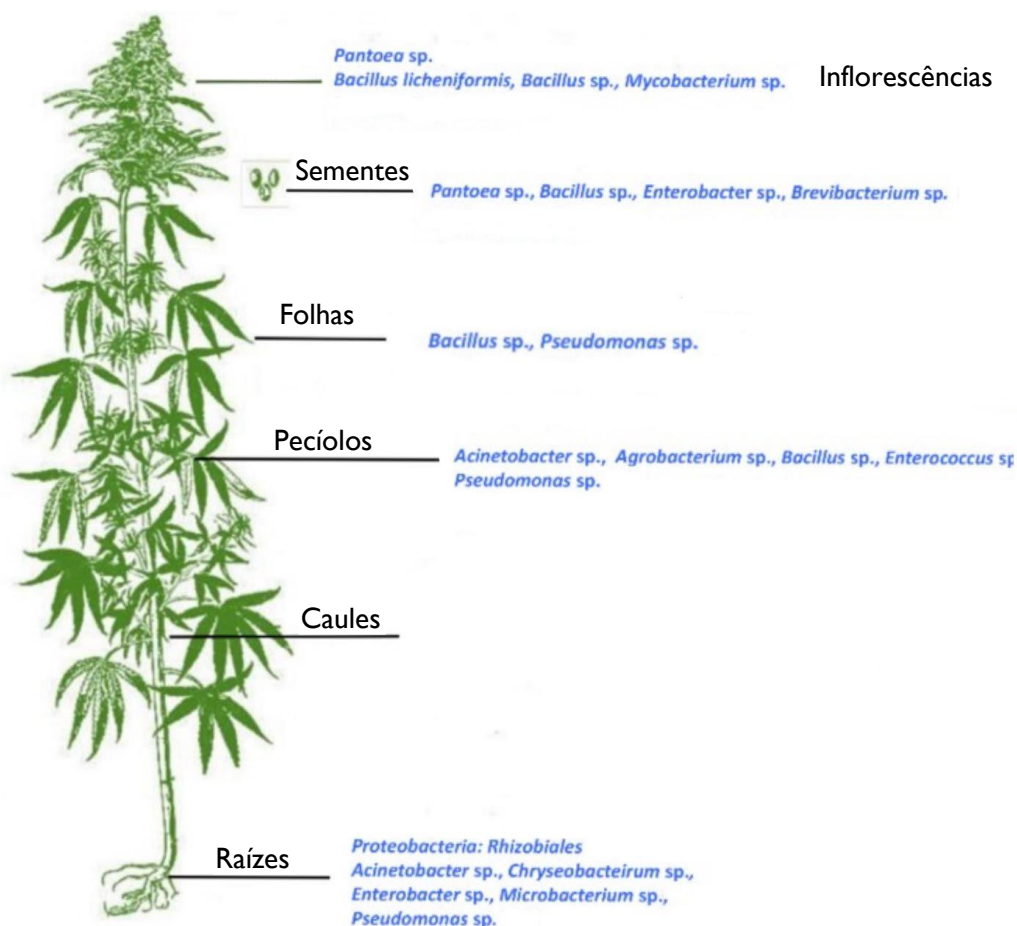


Figura 2 – Endófitos de *Cannabis sativa* consoante região na planta; adaptado de Taghinasab & Jabaji (2020).

Funcionalmente, estas bactérias podem contribuir para o crescimento vegetal através da produção de fitohormonas (como auxinas mas também giberelinas), fixação de azoto, e produção de sideróforos que aumentam a disponibilidade de ferro. Podem igualmente induzir RSI na planta e/ou desempenhar funções de controlo de patógenos, por meio de antibiose e competição. Estudos realizados em *C. sativa*, demonstraram que estirpes do género *Sphingomonas*, modulam o perfil de metabolitos secundários, a estirpe *B. velezensis* S141 comprovou a modulação de vias hormonais ao reduzir o efeito negativo da deficiência em AIA e citocininas (Aunkam et al. 2024), e estirpes do género *Pseudomonas* tiveram efeitos positivos na indução de tolerância ao stress biótico e abiótico (Gabrielle et al., 2022) reforçando as funções PGP (Taghinasab & Jabaji, 2020).

2.5. Bioestimulação de *Solanum lycopersicum* L. por bactérias PGP (*Pseudomonas* e *Bacillus*)

O uso de bioestimulantes em agricultura pode melhorar a absorção de nutrientes por via radicular e modular a resposta fisiológica das plantas a fatores externos. Bactérias PGP têm emergido como alternativas sustentáveis; entre os géneros mais estudados, *Pseudomonas* e *Bacillus* destacam-se pela sua versatilidade e eficácia na promoção do crescimento de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Adedayo et al. 2022).

Num estudo realizado por Cochard et al. (2022), foram isolados microrganismos endófitos, por fungos e bactérias, de raízes de plantas de tomate em diferentes sistemas de cultivo (estufa, biológico e convencional). Treze isolados bacterianos pertencentes a nove espécies potenciais de PGP foram aplicados a plântulas de tomate estabelecidas em substrato estéril. Estas bactérias demonstraram a capacidade de produzir AIA e de solubilizar fosfato. De entre todos os géneros testados, os que demonstraram ser mais interessantes na promoção do crescimento vegetativo e radicular foram *Pseudomonas* (produção de auxinas e outras hormonas de crescimento) e *Bacillus* (solubilização de fosfatos e produção de compostos antimicrobianos).

A inoculação com estes dois géneros tem demonstrado efeitos sinérgicos positivos no desenvolvimento do tomateiro - aumento significativo na biomassa das plantas e melhoria na eficiência de absorção de nutrientes essenciais, especialmente quando aplicada durante fases críticas do desenvolvimento vegetativo.

Com base no estudo de Qiao (2017), que avaliou a colonização radicular pela estirpe *Bacillus subtilis* PTS-394 e os efeitos no crescimento do tomateiro, compreende-se o destaque da dinâmica temporal de colonização. Observaram que, após a inoculação, o número de CFUs na superfície radicular sofreu uma redução acentuada nas primeiras 48 horas, passando de 2×10^6 para $3,7 \times 10^5$ CFU/g de raiz, mas a partir do terceiro dia verificaram uma recuperação progressiva da população bacteriana, atingindo $1,7 \times 10^6$ CFU/g ao 9.º dia. A formação de biofilme e microcolónias na rizosfera foi visível ao sétimo dia, consolidando-se como um ponto-chave para a eficácia da colonização e subsequente promoção do crescimento vegetal.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Material vegetal

Para isolar as bactérias endófitas de resíduos de *Cannabis sativa*, foi extraída seiva de folhas, caules e raízes de três genótipos distintos cedidos pela empresa GreenBePharma (GBP).

Apesar das bactérias terem sido isoladas de *Cannabis sativa*, optou-se por testar o efeito destas bactérias em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Esta decisão deveu-se à impossibilidade de crescer plantas de *C. sativa* nas estufas do InPP e pelo facto da cultura do tomate vir a beneficiar do desenvolvimento de novos bioestimulantes. A variedade de tomate utilizada foi a cherry. As sementes foram germinadas e mantidas em substrato comercial Siro Germinação Bio, composto por turfa, húmus e fibra de coco com adubo orgânico.

3.1.2. Material microbiológico

Meios de cultura para crescimento de bactérias

Para o cultivo das bactérias utilizadas nos diferentes ensaios, foi utilizado meio de cultura Lysogeny ou Luria Bertani Broth (LB) (Liofilchem S.r.l.), na forma líquida e sólida. O meio líquido foi preparado com 20 g/L de LB em água destilada e esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Para o meio sólido, foi adicionado agar bacteriológico (VWR Chemicals) (15 g/L) à mesma formulação, seguido de procedimento idêntico de esterilização.

Para avaliação da produção de auxinas, utilizou-se meio LB suplementado com L-triptofano (Scharlau) (0,5 g/L), previamente autoclavado durante 15 minutos a 121°C.

Para a análise da atividade de fixação de azoto, foi preparado meio Jensen que contém as seguintes quantidades por L: sacarose (Duchefa Biochemie) (20 g), K₂HPO₄ (Honeywell) (1 g), MgSO₄ (Scharlau) (0,5 g), NaCl (BioChem Chemopharma) (0,5 g), Fe₂SO₄ (Alfa Aesar) (0,1 g), NaMoO₄ (Roth) (0,005 g) e CaCO₃ (Honeywell) (2 g), ajustado a pH 7,2. Para indicação visual, foi adicionado bromotimol azul (BTB) (BDH Chemicals Lda) – dissolvido em etanol (Honeywell) a 70%.

Bactérias

Em colaboração com o projeto ValorCannBio, foram isoladas doze bactérias endófitas de três genótipos diferentes de *Cannabis sativa* (Quadro 1).

Quadro 1 – Isolados e genótipo de *C. sativa* correspondente (codificados com códigos internos por questões de confidencialidade)

Sigla do isolado	Genótipo de <i>Cannabis sativa</i> correspondente
B1-B5	CT10E
B7-B9	CB03
B14-B17	CZK

3.1.3. Reagentes

De acordo com os protocolos otimizados para a execução dos ensaios bioquímicos de avaliação do potencial bioestimulante, foram preparados os seguintes reagentes:

Solução de Salkowski (Ambrosini & Passaglia, 2017), utilizada na quantificação de auxinas, foi preparada em duas fases: Solução 1 - dissolver 8,125 g de FeCl_3 (VWR Quemicals) em 100 mL de água destilada; Solução 2 - obtida pela adição de 24,5 mL de H_2SO_4 (Saptec Química SA) a igual volume de água Milli-Q (Merck IQ7003) (24,5 mL). Para a solução final, 1 mL da Solução 1 foi adicionado a 49 mL da Solução 2, sob agitação controlada.

A solução crystal violet (Filloux & Ramos, 2014) a 0,5% (p/v), utilizada para avaliação da formação de biofilme, foi preparada pela dissolução de 50 mg de methylviolet (Merck) em 2,5 mL de metanol (Honeywell) (CH_3OH), completou-se o volume com 7,5 mL de água Milli-Q (Merck IQ7003). A solução de ácido acético glacial a 30% (p/v) foi obtida pela adição de 3 mL de ácido acético glacial (VWR Quemicals) (CH_3COOH) a 7 mL de água Milli-Q, seguida de homogeneização.

3.2. Métodos

O estudo foi estruturado em duas fases experimentais: (i) avaliação *in vitro* do potencial bioestimulante de bactérias endófitas isoladas de *Cannabis sativa* e (ii) ensaio para seleção das bactérias com maior eficácia em planta. As experiências foram conduzidas nos laboratórios e estufas do InnovPlantProtect (InPP).

3.2.1. Isolados de bactérias endófitas de *Cannabis sativa*

A seiva de folhas, caules e raízes de plantas dos 3 genótipos de *Cannabis sativa* (CT10E, CBO3 e CZK) foi extraída com recurso a uma câmara de pressão Scholander (PMS Instruments), nas instalações da GBP. A seiva foi mantida a 4°C até ao seu processamento. No laboratório do InPP, 100 µl de seiva de cada amostra foram plaqueadas em meio de cultura LB sólido e incubadas a 30°C durante 24-48 horas, até ao aparecimento de colónias. Colónias de bactérias com morfologia distintas foram repicadas em meio LB sólido até se obter uma cultura pura. O processo de extração está esquematizado na Figura 3.

Foram feitos stocks de glicerol (Labchem) - para cada bactéria, repicou-se uma colónia isolada em 5 mL de meio LB líquido, e incubou-se (PHCBI Frilabo) a 30°C sob agitação por 24 horas. Após a incubação, 500 µL dessa cultura foi misturada com 500 µL de uma solução de 50% glicerol estéril (v/v) e congelado a -80°C.

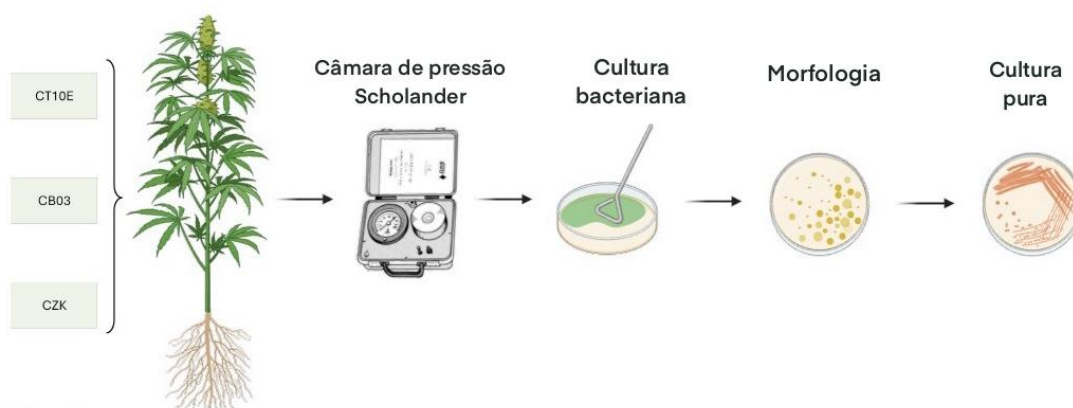


Figura 3 – Extração de bactérias endófitas de *Cannabis sativa*, adaptado de projeto ValorCannBio - *Cannabis* endophyte bacteria, the bacterial library

3.2.2. Caracterização do potencial bioestimulante de bactérias endófitas isoladas de *Cannabis sativa* através de métodos bioquímicos

Numa câmara de fluxo (LABOGENE Scanlaf Mars) pipetou-se 1 mL de LB num tubo eppendorf, com o auxílio de um palito, retirou-se um scoop de cada cultura pura de bactéria que foi inoculado no meio de cultura LB seguido de incubação durante 16 horas a 28 °C, sob agitação. A densidade ótica da cultura (OD_{600}) foi medida num

espectrofotômetro (MultiSkan Sky Thermo Scientific). Para isso, em câmara de fluxo foi pipetado 200 µL de cada pré-inóculo para um poço de placa de 96 poços (VWR) e absorbância medida.

De modo a obter-se a mesma concentração de $OD_{600} = 0.1$ para cada bactéria, as culturas foram diluídas aplicando-se a equação de Lei de Diluição:

$$ci \times vi = cf \times vf \quad vi \times OD_{600} \text{ nm} = 200 \mu\text{L} \times 0,1 \quad vi = 20 / OD$$

em que:

ci- representa a concentração inicial,

vi- representa o volume inicial (valor pretendido);

cf- representa a concentração final ($OD_{600}=0.1$) e

vf- representa o volume final (200 µL).

Produção de biofilme

De acordo com o método seguido por Coffey e Anderson do capítulo 48, (Filloux & Ramos, 2014), as bactérias foram inoculadas numa placa de 96 poços (VWR) (meio LB 200 µL + volume calculado/bactéria) com três repetições técnicas cada, e incubadas a 28°C durante 24 horas sob agitação (150 rpm). Terminado o período descartou-se o conteúdo líquido dos poços e colorou-se com 200 µL da solução crystal violet (Alfa Aesar) 0,2% durante 10 minutos. De seguida removeu-se o excesso de crystal violet com recurso a lavagens com água e deixou-se secar por 24 horas. Após a secagem da placa, adicionou-se 200µL da solução de ácido acético glacial (VWR Quemicals) (30%) e deixou-se incubar por 10 minutos para solubilizar as estruturas. Por fim leu-se a absorbância no espectrofotômetro (MultiSkan Sky Thermo Scientific) para uma OD de 550nm.

Produção de auxinas

De acordo com o método descrito por Ambrosini & Passaglia (2017), pipetou-se 200 µL do meio de cultura LB+Triptofano (Scharlau) (0,5 g/L) numa placa de 96 poços (VWR) e adicionou-se o volume calculado para cada bactéria e incubou-se por 48 horas a 28°C sob agitação (150 rpm). Findo este período centrifugou-se (Avanti J15-R, Beckman Coulter) a 3800 rpm durante 50 minutos e retirou-se 100 µL do sobrenadante para uma nova placa ao qual se adicionaram 100 µL do reagente Salkowski (0,5 M de

FeCl₃ e 35% HClO₄). Após 30 minutos de incubação no escuro, leu-se a absorbância no espectrofotômetro (MultiSkan Sky Thermo Scientific) para uma OD de 530 nm. Os valores obtidos foram posteriormente tratados de acordo com a curva de calibração de valores equivalentes de AIA.

Fixação de azoto

A atividade de fixação de azoto foi medida seguindo as indicações de Sulistiyani e Meliah, com base no indicador BTB (100 mg/L). Neste ensaio quantificou-se o crescimento de bactérias em meio Jensen líquido contendo BTB, que incubou em agitação (150 rpm), a 28°C, durante 3 dias. Após este período mediu-se a absorbância para uma OD de 640nm. Os valores foram posteriormente tratados com respeito à curva de calibração, sendo esta preparada com NH₃⁺ (BIOCHEM Chemopharma).

3.2.3. Caracterização das espécies bacterianas

Para a caracterização molecular dos isolados bacterianos, foi seguido o método descrito por Niza Costa et al. (2023). Foi realizada a extração do DNA genômico através do método heat shock (Dashti et al., 2009): um scoop de bactéria foi homogeneizado com 50 µL de água Milli-Q (Merck IQ7003) seguido de aquecimento a 95°C durante 10 minutos no termobloco (BioSan), e posterior centrifugação (Sigma-Sartorius) a 9000 rpm, durante 5 minutos. Por fim recuperou-se 50 µL do sobrenadante e foi avaliada a concentração e a qualidade do DNA no espectrofotômetro (MultiSkan Sky Thermo Scientific).

Foram utilizados os primers universais 27F (AGAGTTTGATC(A:C)TGGCTCAG) (Stabvida) e 1492R (TACGG(C:T)TACCTTGTTACGACTT) (Stabvida), com uma concentração final de 10 mM, conforme descrito por Jensen et al. (2002).

A amplificação da região 16S rRNA foi efetuada por PCR, por ser uma região genética presente em todas as bactérias; o volume das reações de amplificação foi de 30 µl, sendo 15 µl de master mix (Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix, NZYtech), 1,5 µl de DNA bacteriano, 0,6 µl de cada primer (Stabvida) e 12,3 µl de água Milli-Q (Merck IQ7003). Prosseguiu-se a amplificação num termociclador (BioRad C1000 Touch) com a seguinte configuração: fase inicial de desnaturação a 95°C (5 min); seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C (30 seg), temperatura a 52°C (30 seg) e elongação a 72°C (30 seg); a fase final de 5 minutos a 72°C; a amplificação das bandas foi avaliada através

de gel de agarose (VWR) a 1% em tampão 1x TAE (v/v), e 0,004% (v/v) de GreenSafe Premium (NZYTech). Os poços foram carregados com 5 µl de cada produto de amplificação e um marcador Ladder III (NZYTech). A voltagem da eletroforese foi de 120 V durante 30 minutos. Passado este tempo o gel foi observado e fotografado num transiluminador (UV, VWR). A amplificação foi feita para todos os doze isolados bem como para um controlo negativo com água Milli-Q.

O produto da amplificação foi armazenado a -20 °C, em tampão de extração (água Milli-Q (Merck IQ7003), purificado usando o kit NZYGelPure (NZYTech) e enviado para sequenciação através do método de Sanger (Stabvida). Estes resultados foram sujeitos a um alinhamento local com recurso à ferramenta BLAST do NCBI. Por motivos de confidencialidade, a identificação taxonómica das bactérias é revelada até ao género.

3.2.4. Determinação da curva de crescimento e quantificação de CFUs

Para determinar a curva de crescimento das bactérias B4 e B16, foram preparados os pré-inóculos, com 1 mL de meio LB e um scoop de colónia bacteriana (réplicas técnicas: B4-1, B4-2; B16-1, B16-2), incubados durante 24 horas a 28 °C sob agitação.

Aplicou-se a equação X para ajustar a densidade ótica para valores iniciais de 0,1 e 0,2. Com base na absorvância lida foi calculado o volume a inocular em cada poço, através da Equação 1 da Lei de diluição:

$$\text{Equação 1 – Lei da diluição: } ci \times vi = cf \times vf$$

Foram distribuídas quatro réplicas técnicas de cada condição em placas de 96 poços (VWR), posteriormente levadas a incubar no leitor de placas (Biotek Synergy HI) sob controlo de temperatura (28 °C) e agitação orbital. As leituras de OD_{600 nm} foram registadas automaticamente a cada 2 horas durante 45 horas. Este protocolo seguiu metodologias aplicadas em estudos microbiológicos com leitura automatizada de crescimento em placas de 96 poços (VWR) (Rogers et al. 2022).

Para contabilizar os CFUs fez-se o pré-inóculo da bactéria B16 em meio LB no dia anterior ao ensaio, (tempo de crescimento ≈ 30 horas até atingir OD ≈ 1). Preparou-se meio de cultura LB sólido, e um frasco de vidro com 100 mL de água destilada estéril para efetuar as diluições, material que foi esterilizado por autoclavagem (121 °C, 20

minutos). Após arrefecimento, as placas de Petri de 55 mm (VWR) foram vertidas em câmara de fluxo laminar e armazenadas no frigorífico até utilização.

No dia do ensaio, foi feito o pré-inóculo da bactéria B4 (tempo de crescimento ≈ 4 horas até atingir $OD \approx 1$). Leu-se a absorvância de ambas as culturas e calculou-se o volume necessário para obter uma OD de 0,1, com base na Equação 1.

Diluições seriadas decimais (1:10) foram realizadas a partir destes tubos, com 3 réplicas técnicas. A cada passo, 100 μ L da suspensão anterior foi transferida para o tubo seguinte, com agitação prévia, obtendo assim diluições de 10^{-1} a 10^{-7} .

As diluições de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} seguiram para plaqueamento - em câmara de fluxo laminar, 50 μ L de cada diluição foram pipetados em placas de Petri e homogeneizados com bolas de vidro estéreis por agitação manual. As placas foram incubadas a 28 °C durante 42 horas. Terminado o período de incubação, fez-se contagem manual das colónias desenvolvidas nas placas, e calculou-se os CFUs pela equação de cálculo de densidade microbiana:

Equação 2 – Equação de cálculo de densidade microbiana:

$$\text{CFU/kg} = (\text{número de colónias} * \text{fator de diluição}) / \text{massa de substrato Kg}$$

Foram contabilizadas colónias de 2 diluições para cada bactéria (10^{-4} e 10^{-5}). Calculou-se o valor de CFU/mL aplicado no substrato, sabendo que foram aplicados 10mL de solução bacteriana em 0,4 Kg de substrato.

Esta abordagem permite estimar a densidade de células, seguindo recomendações de Frost *et al.* (2016).

3.2.5. *Screening* em planta de bactérias isoladas de *C. sativa* para avaliação do potencial bioestimulante

O potencial bioestimulante de bactérias dos géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, isoladas previamente de *C. sativa*, foi avaliada na fase de *screening* em plantas de tomate.

O ensaio foi conduzido em quatro tabuleiros de sementeira (T-C, T-B4, T-B8 e T-B16), cada um com 20 alvéolos. Este ensaio teve três repetições técnicas, espaçadas no tempo.

A germinação (Dia 0) foi realizada em caixas de Petri com papel de filtro (Filter-Lab) humedecido com 4 mL de água destilada, sobre o qual foram colocadas 10 a 12 sementes. As caixas foram mantidas em incubadora estática (PHCBI) a 24 °C, durante 4 dias. Após este período, as plântulas foram transplantadas para os alvéolos com substrato comercial Siro Germinação Bio (Figura 4).

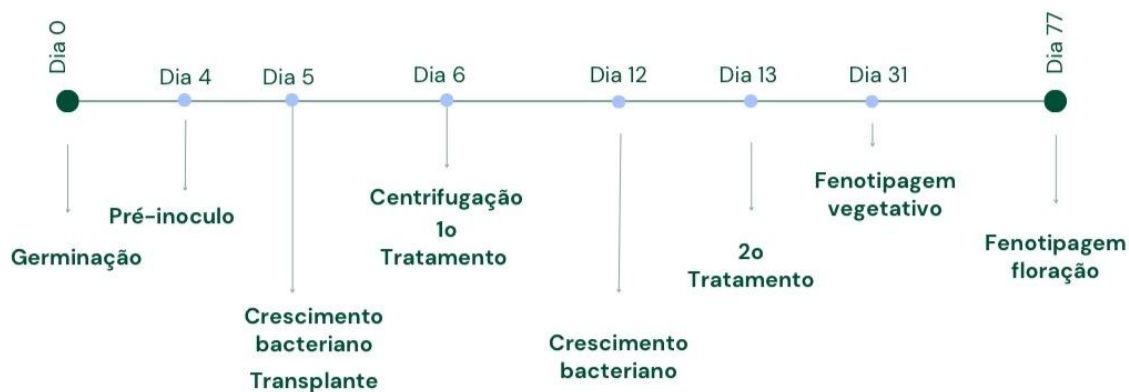


Figura 4 – Escala temporal dos ensaios em planta

O pré-inóculo de cada bactéria foi preparado em câmara de fluxo laminar, *scoop* de cultura pura foi transferido para tubos Falcon que continham 5 mL de meio de cultura LB, levados posteriormente a incubar (PHCBI) a 28 °C durante 24 horas sob agitação (150 rpm). No dia seguinte, 10 mL de pré-inóculo foram inoculados em 300 mL de meio LB e novamente incubados (LABWIT ZWYR D2402) sob as mesmas condições. Após 24 horas de crescimento, a densidade celular foi avaliada por espectrofotometria (MultiScan Sky Thermo Scientific) a 600 nm (OD_{600}). As culturas foram centrifugadas (Avanti J15-R) a 4000 G durante 10 minutos, a 15 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensão em 250 mL de água da torneira.

O tratamento consistiu na aplicação uniforme em alvéolo de 10 mL da respectiva suspensão bacteriana (volume considerado para que haja distribuição homogênea, sem perdas por lixiviação), realizaram-se duas aplicações: a primeira aos 2 dias após transplante e a segunda aos 8 dias. Ao final da quarta semana, foram fenotipadas dez plantas por tabuleiro e analisados os seguintes parâmetros: comprimento da parte aérea e radicular, peso seco da parte aérea e radicular (deixadas a secar por 24 horas em estufa de secagem (Memmert)).

As restantes dez plantas de cada tratamento foram transplantadas para vasos de 3 L e mantidas até à fase de floração. Ao final de três semanas completas na fase de floração,

foram quantificados: número total de flores, data da primeira floração, altura da planta, peso fresco da parte aérea, número de entrenós, número total de frutos e peso de frutos por planta.

3.2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote de software SPSS Statistics v.29 da IBM. Foram utilizadas provas de normalidade (Shapiro e Wilk, 1965; Razali e Wah, 2011), inspeção de assimetria, curtose e erros padrão (Cramer, 2003; Cramer e Howitt, 2004; Doane e Seward, 2011), inspeção visual de histogramas, diagramas QQ normais e diagramas de caixa para avaliar a distribuição normal dos dados. Foram realizadas provas de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias (Nordstokke e Zumbo, 2010; Nordstokke et al., 2011) e avaliar a homocedasticidade/heterocedasticidade dos dados, de modo a determinar se poderiam ser comparados nas suas respectivas categorias.

Realizou-se uma ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey para todos os dados com distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Nos casos em que existia apenas homogeneidade de variâncias na maioria dos grupos, foi utilizada uma ANOVA unidirecional de Brown-Forsythe (para tamanhos de amostra iguais entre grupos) ou o teste de Welch (para tamanhos de grupo distintos), ambos seguidos de teste post-hoc de Games-Howell.

Os dados sem distribuição normal e sem homogeneidade de variâncias foram transformados utilizando os métodos Tukey's Ladder of Powers (Tukey, 1977), Box-Cox (Box & Cox, 1981) ou Two-Step (Templeton, 2011), ou, alternativamente, analisados diretamente através de Mean Rank (MR), recorrendo ao teste U de Mann-Whitney (U) ou ao teste H de Kruskal-Wallis (X^2). Em ambos casos foi aplicado um procedimento de bootstrap com 1000 subamostras para comparação das médias – média bootstrap (BM).

A formação de grupos homogêneos foi realizada com base nos resultados das comparações múltiplas, agrupando tratamentos cujas médias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas e separando aqueles que diferiram significativamente, conforme os procedimentos descritos por Steel et al. (1997). Todos os resultados apresentaram um intervalo de confiança (IC) mínimo de 95% e todas as hipóteses nulas (H_0) foram rejeitadas para $p < 0,050$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação das espécies bacterianas

A confirmação da amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), onde foi observada uma banda única no isolado B14 com um tamanho esperado de cerca de 1500 pares de bases (pb), de acordo com o marcador de peso molecular utilizado (Ladder III (NZYTech) (Figura 5). O controlo negativo, contendo apenas água, não apresentou qualquer banda, validando a ausência de contaminação.

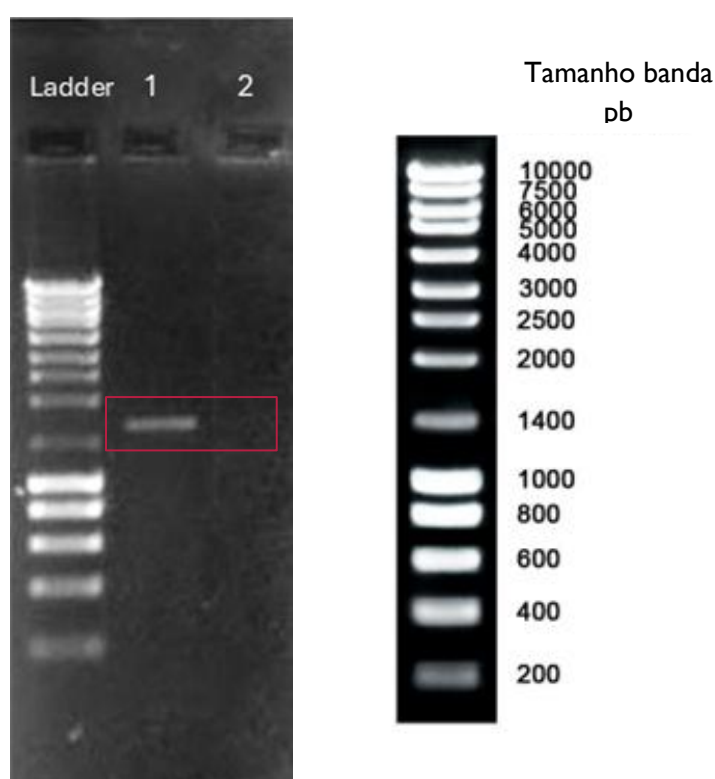


Figura 5 – Imagem do gel de eletroforese de agarose a 1% (p/v) da amplificação da região 16S, onde se pode identificar uma banda única de dimensão aproximada 1500 pares de base; Legenda: Ladder – Marcador Ladder III (NZYTech); 1 – Isolado B14; 2 – Controlo negativo (água)

Os resultados da sequenciação foram comparados com sequências depositadas na base de dados NCBI através de alinhamento local (BLASTn), permitindo a sua identificação. A Figura 6 mostra colónias puras dos isolados estudados e respetiva classificação taxonómica.

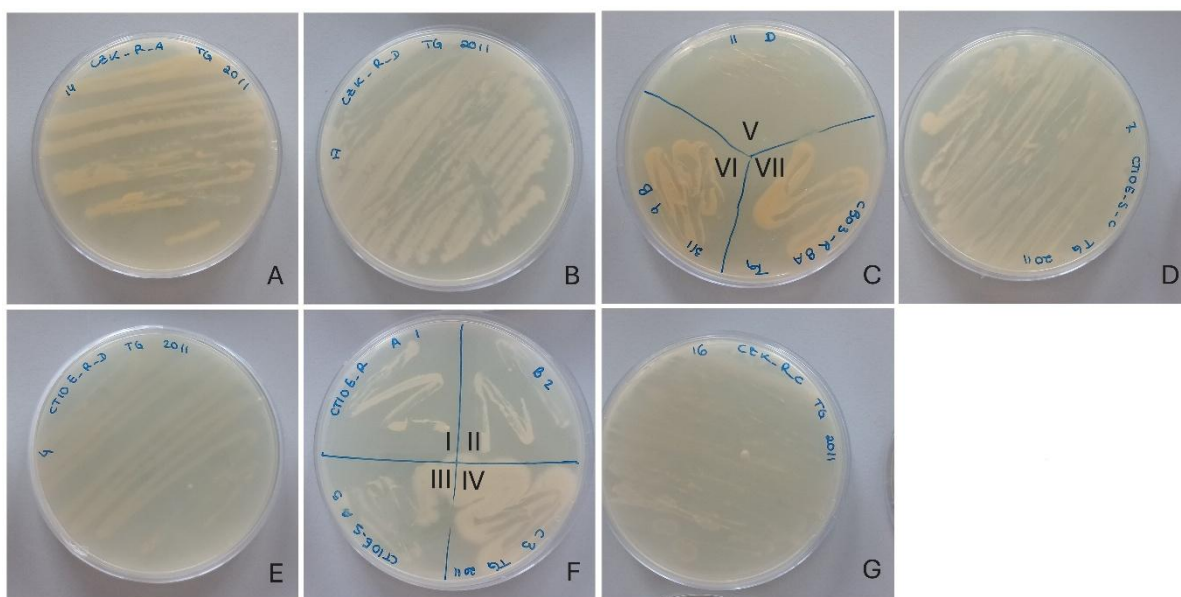


Figura 6 - Colônias puras de bactérias endófitas de *C. sativa*, realizadas por sementeira em ansa e respetiva identificação taxonómica (A - B14 *Xanthomonas* sp.; B - B17 *Bacillus* sp.; C – (VI) B9 *Stenotrophomonas* sp., (VII) B8 *Stenotrophomonas* sp.; D - B7 *Bacillus* sp.; E - B4 *Pseudomonas* sp.; F – (I) B1 *Staphylococcus* sp., (II) B2 *Staphylococcus* sp., (IV) B3 *Bacillus* sp., (III) B5 *Acinetobacter* sp.; G - B16 *Bacillus* sp.)

4.2. Caracterização do potencial bioestimulante de bactérias endófitas isoladas de *Cannabis sativa* através de métodos bioquímicos

Em parceria com o projeto ValorCannbio a decorrer no InPP, foram isoladas doze bactérias endófitas de *Cannabis sativa*. Para caracterizar o potencial bioestimulante destas bactérias, procedeu-se a um *screening* inicial *in vitro* através da avaliação de três testes padronizados: produção de biofilme, produção de auxinas e capacidade de fixação de azoto. A avaliação foi feita aos doze isolados bacterianos (B1-B5, B5, B7-B9, B14-B17) que demonstraram crescimento adequado nas condições definidas. Para cada um dos testes foram preconizadas três réplicas biológicas, cada uma com três réplicas técnicas, para tratamento estatístico.

4.2.1. Produção de biofilme

A Figura 7 mostra elevada capacidade de formação de biofilme para o isolado B16, com uma média de OD550 nm $1,65 \pm 0,684$, superior a todos os outros. Os isolados B17,

B4, B5 e B1, apresentaram médias que variaram entre os 0,554 e 0,326, representando taxas de produção razoáveis.

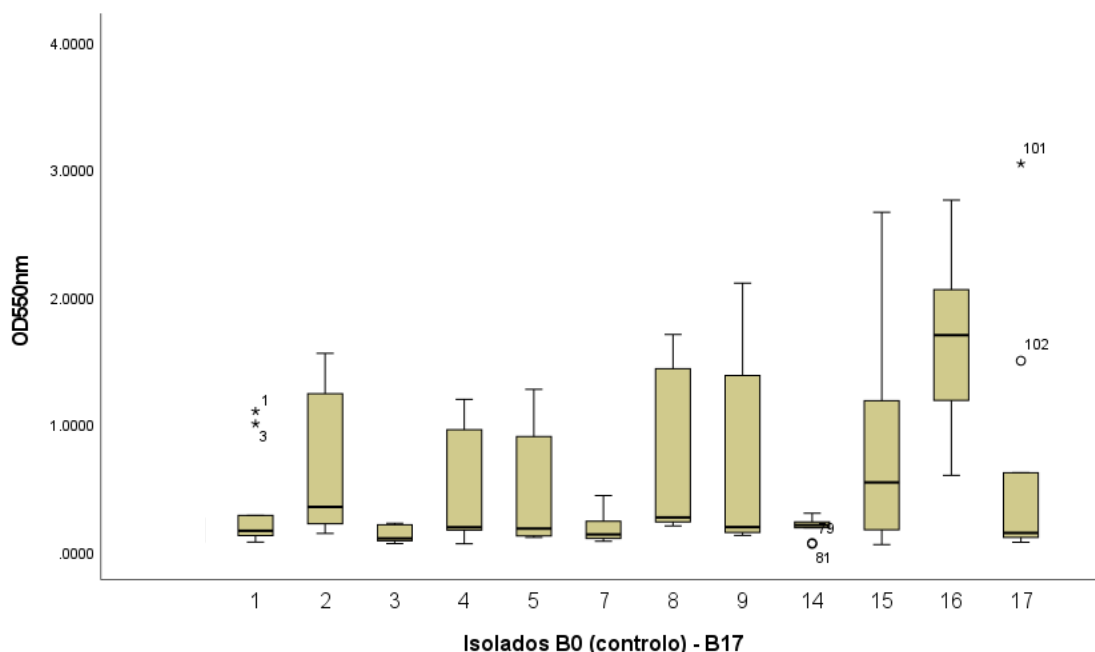


Figura 7 - Valores OD550 nm na produção de biofilme dos 12 isolados; a caixa representa o intervalo interquartil, as faixas inferiores e superiores correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha horizontal a negrito no interior da caixa representa a mediana; os bigodes representam a variação de dados e têm como comprimento máximo 1,5 vezes o comprimento interquartil; os pontos individuais representam os “outliers” e são pontos que distam da mediana mais de 1,5 vezes o intervalo interquartil; o representa outliers moderados; * representa outliers extremos

A avaliação estatística dos dados revelou diferenças significativas entre os isolados B2, B8 e B16 (Quadro 2). O isolado B16 apresentou ainda diferenças entre os isolados B1, B3 e B4, mostrando-se o melhor candidato. O isolado 1 exibe dois outliers extremos, indicando alta variabilidade experimental, possivelmente devido a erro técnico relativo aos valores de OD de cada isolado. O isolado 17 tem um valor extremo muito elevado (ponto 101) e um valor moderadamente elevado (102), indicando forte resposta em pelo menos uma réplica. De forma a se conseguir avaliar a consistência entre réplicas, apresentam-se os dados na figura 8 com a média e desvio padrão correspondentes, verificando que o erro associado é grande.

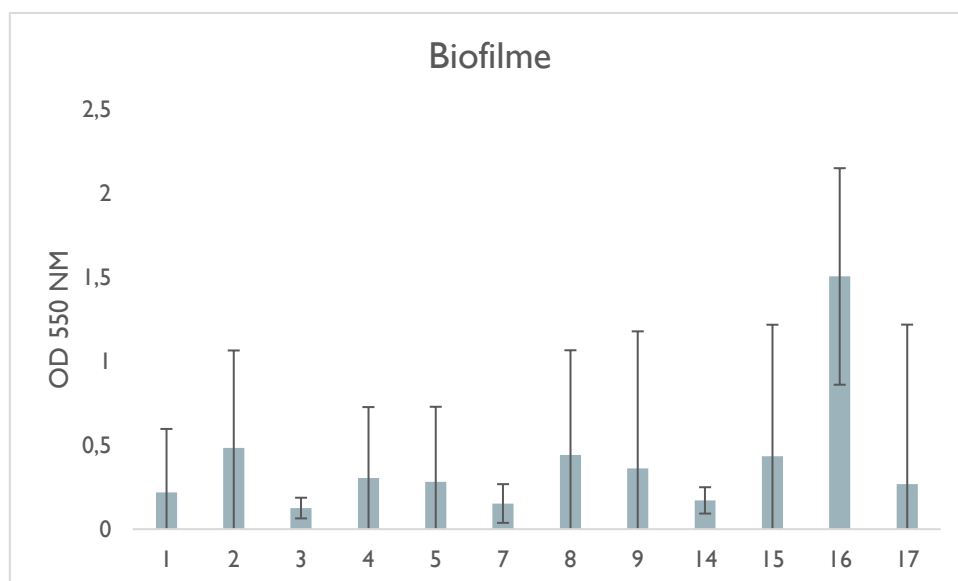


Figura 8 – Valores de produção de biofilme para uma OD 550nm com respectivo desvio padrão

A formação de biofilme pelo isolado B16, está de acordo com a literatura sobre o tema no que se refere à capacidade do género *Bacillus* formar biofilmes robustos e funcionalmente relevantes (Liu et al., 2022), revelando capacidade de colonização e persistência na rizosfera.

Quadro 2 – Testes estatísticos biofilme

Teste F(12,103)=4,583		p														
	BioF_média	Dp	0	1	2	3	4	5	7	8	9	14	15	16	17	
0	.135	.096		.935	.045	1.00	.699	.694	.998	.032	.165	.988	.251	.000	.984	
1	.326	.402	.935		.815	.995	1.00	1.00	1.00	.747	.978	1.00	.994	.005	1.00	
2	.716	.616	.045	.815		.143	.975	.976	.437	1.00	1.00	.620	1.00	.562	.716	
3	.140	.065	1.00	.995	.143		.924	.921	1.00	.108	.395	1.00	.528	.000	1.00	
4	.469	.448	.699	1.00	.975	.924		1.00	.998	.953	1.00	1.00	1.00	.025	1.00	
5	.433	.474	.694	1.00	.976	.921	1.00		.998	.955	1.00	1.00	1.00	.026	1.00	
7	.173	.122	.998	1.00	.437	1.00	.998	.998		.362	.780	1.00	.879	.001	1.00	
8	.646	.662	.032	.747	1.00	.108	.953	.955	.362		1.00	.538	1.00	.644	.640	
9	.682	.867	.165	.978	1.00	.395	1.00	1.00	.780	1.00		.906	1.00	.244	.945	
14	.196	.083	.988	1.00	.620	1.00	1.00	1.00	1.00	.538	.906		.960	.002	1.00	
15	.726	.832	.251	.994	1.00	.528	1.00	1.00	.879	1.00	1.00	.960		.160	.979	
16	1.65	.684	.000	.005	.562	.000	.025	.026	.001	.644	.244	.002	.160		.004	
17	.554	1.01	.984	1.00	.716	1.00	1.00	1.00	1.00	.640	.945	1.00	.979	.004		

4.2.2. Produção de auxinas

A análise da produção de auxinas também evidenciou diferenças entre os isolados. O isolado B16 apresentou elevada capacidade de produção de auxinas, com um valor de 18,6 µg/mL de equivalente de AIA, seguido do isolado B4 com 14,5 µg/mL..

Após tratamento dos dados verificou-se que a diferença era significativa entre os isolados B3-B4, B7-B9 e B16-B17 (Quadro 3). O isolado B16 detém a maioria dos valores próximos de 1,9 o que mostra a sua aptidão para formar auxinas.

Os casos extremos dos isolados 1, 2, 3 e 4 (casos extremos 2, 10, 25, 28, 29), poderão indicar novamente erros experimentais. O isolado B16 tem valores discrepantes acima e abaixo da mediana (valores 98 e 99), sugerindo essa variabilidade.

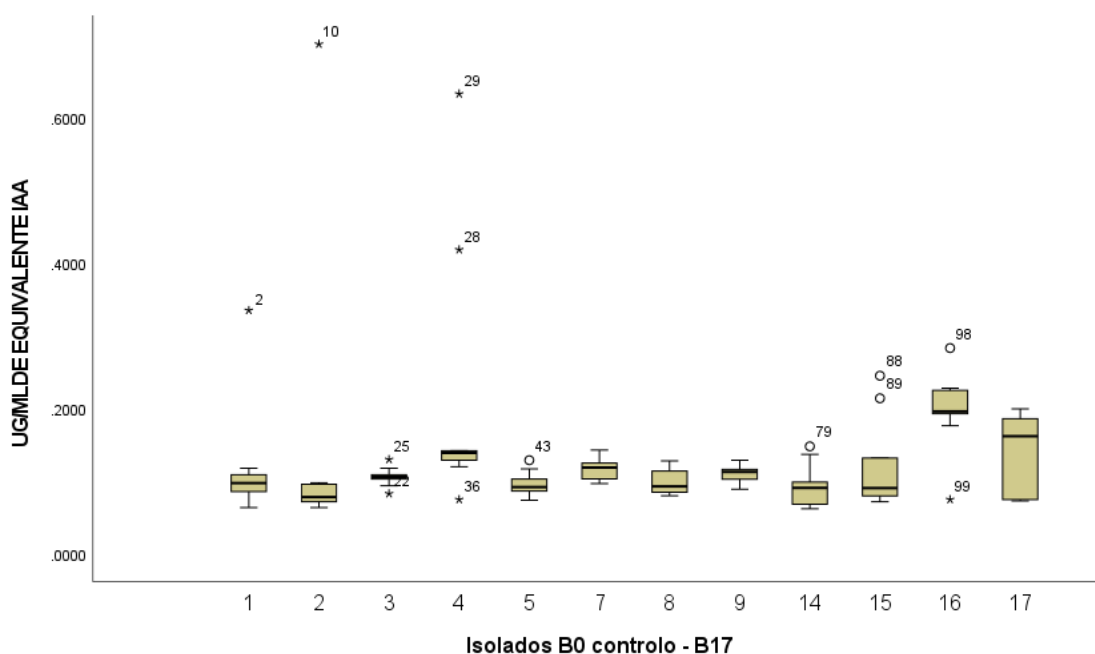


Figura 9 - Quantificação da produção de auxinas dos 12 isolados, ; a caixa representa o intervalo interquartil, as faixas inferiores e superiores correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha horizontal a negrito no interior da caixa representa a mediana; os bigodes representam a variação de dados e têm como comprimento máximo 1,5 vezes o comprimento interquartil; os pontos individuais representam os “outliers” e são pontos que distam da mediana mais de 1,5 vezes o intervalo interquartil; o representa outliers moderados; * representa outliers extremos.

Para verificar o respetivo desvio-padrão do experimento estão representados os valores médios da produção de auxinas na figura 9, que demonstra não haver grande variabilidade entre as réplicas.

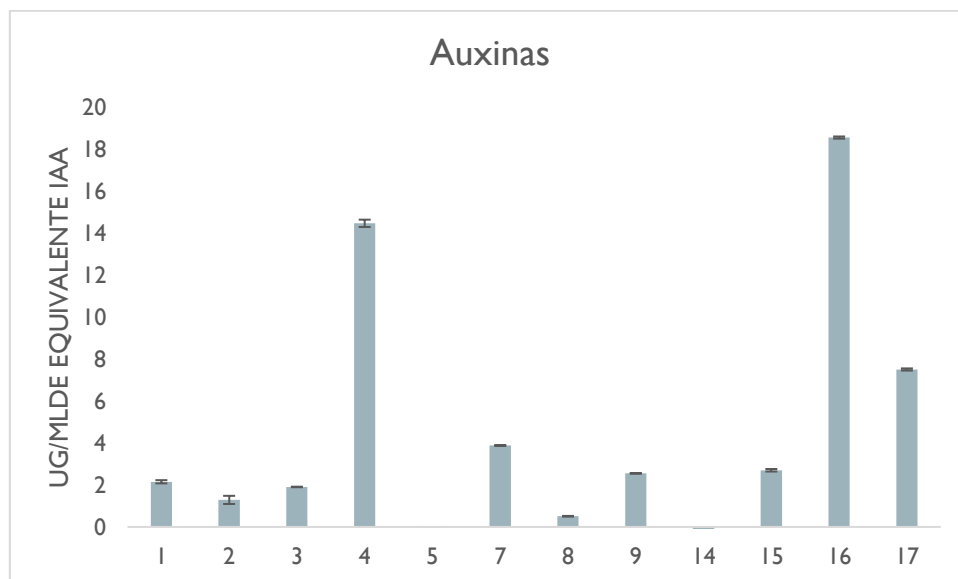


Figura 10 – Valores médios e desvio padrão para a síntese de auxinas dos diferentes isolados

Quadro 3 – Testes estatísticos auxinas

Teste															p
F(12,103)=6,615															
	Aux_média	Dp	0	1	2	3	4	5	7	8	9	14	15	16	17
0	.069	.007		.144	.714	.000	.002	.014	.000	.005	.000	.639	.132	.000	.028
1	.111	.082	.144		.843	1.00	.679	1.00	.975	1.00	1.00	.999	1.00	.270	.996
2	.124	.207	.714	.843		.105	.028	.687	.024	.449	.086	1.00	.784	.003	.274
3	.105	.013	.000	1.00	.105		.607	.931	.954	.991	1.00	.851	1.00	.133	.999
4	.197	.186	.002	.679	.028	.607		.244	.928	.328	.663	.233	.793	1.00	.999
5	.095	.017	.014	1.00	.687	.931	.244		.345	1.00	.878	1.00	1.00	.034	.904
7	.115	.016	.000	.975	.024	.954	.928	.345		.503	.985	.509	.995	.389	1.00
8	.098	.018	.005	1.00	.449	.991	.328	1.00	.503		.975	.994	1.00	.050	.960
9	.108	.014	.000	1.00	.086	1.00	.663	.878	.985	.975		.810	1.00	.158	1.00
14	.092	.030	.639	.999	1.00	.851	.233	1.00	.509	.994	.810		.996	.061	.783
15	.116	.064	.132	1.00	.784	1.00	.793	1.00	.995	1.00	1.00	.996		.381	.999
16	.110	.056	.000	.270	.003	.133	1.00	.034	.389	.050	.158	.061	.381		.909
17	.144	.055	.028	.996	.274	.999	.999	.904	1.00	.960	1.00	.783	.999	.909	

4.2.3. Fixação de azoto

A avaliação da capacidade de fixação de azoto através do ensaio com Bromothymol Blue mostrou que o isolado B8 possui maior atividade de fixação de azoto, com uma média de $2,1 \pm 0,1$ uL/mL, e destacou-se assim dos restantes isolados, seguido do isolado B9 com média $2,0 \pm 0,2$ uL/mL (Figura 11). Verifica-se vários outliers em alguns isolados, nomeadamente B2, B3, B4, B5, B7, B15 e B16 indicando variação significativa entre réplicas desses isolados; os outliers extremos verificados nos isolados B4, B15 e B16 podem, novamente, ser devidos a erros técnicos.

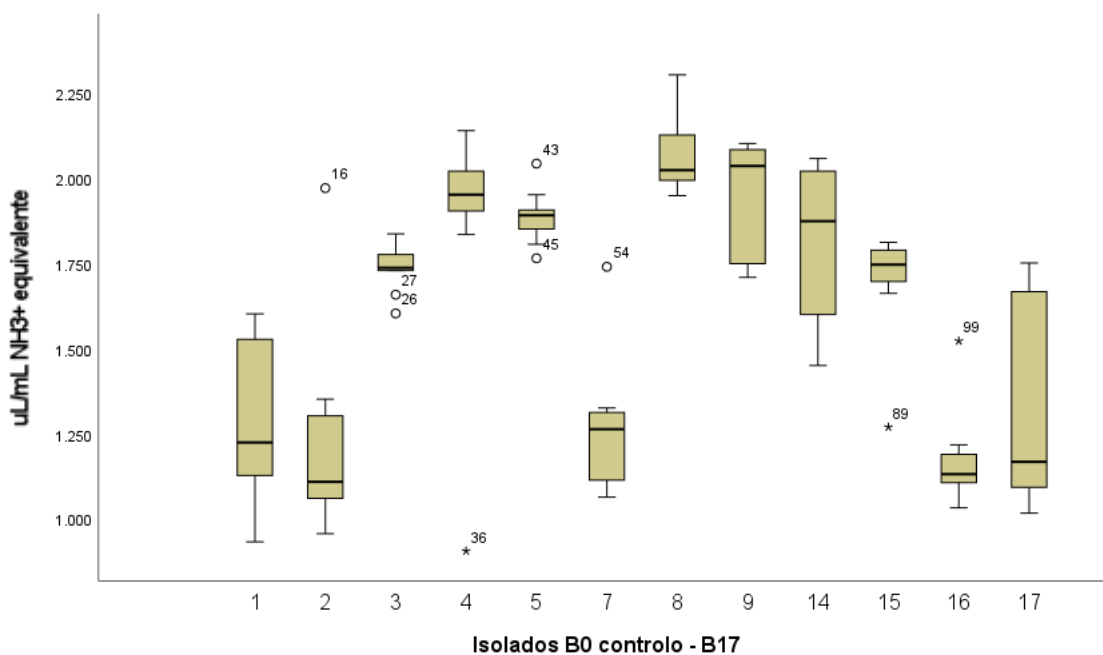


Figura 11 - Quantificação da atividade de fixação de azoto dos 12 isolados; a caixa representa o intervalo interquartil, as faixas inferiores e superiores correspondem ao primeiro e terceiro quartil, respectivamente; a linha horizontal a negrito no interior da caixa representa a mediana; os bigodes representam a variação de dados e têm como comprimento máximo 1,5 vezes o comprimento interquartil; os pontos individuais representam os “outliers” e são pontos que distam da mediana mais de 1,5 vezes o intervalo interquartil; o representa outliers moderados; * representa outliers extremos.

Apresenta-se de seguida o gráfico com as respetivas médias e desvio padrão associado ao teste de atividade de fixação de azoto (figura 12), que demonstra maior variabilidade nos isolados B1, B2, B4 e B17.

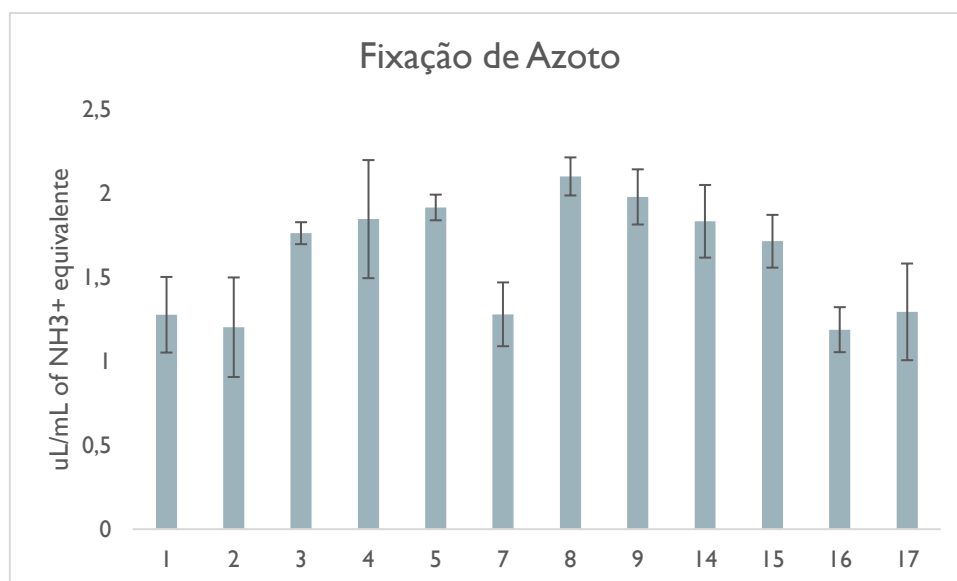


Figura 12 – Valores médios da atividade de fixação de azoto medida pelo equivalente uL/mL de NH₃⁺ e respetivo desvio-padrão

É interessante notar que o isolado B8, apesar da baixa produção de auxinas, compensou com uma elevada capacidade de fixação de azoto, e que o isolado B16, que se destacou na produção de biofilme, apresentou a menor capacidade de fixação de azoto. A complementaridade entre diferentes géneros de bactérias PGP revela-se por consequente vantajosa, quando se combinam bactérias com características bioquímicas contrastantes, tal como ilustrado no artigo de He et al. (2019). Neste estudo, a co-inoculação de estirpes de *Bacillus* spp.—caracterizadas por elevada capacidade de formação de biofilme (com *Pseudomonas*), resultou num aumento significativo da biomassa, rendimento e absorção de nutrientes em tomate (*Solanum lycopersicum*).

O Quadro 4 mostra as diferenças significativas entre o isolado 8 que mostrou maior aptência e os isolados B1-B3, B7 e B15-B17.

Quadro 4 – Testes estatísticos fixação de azoto

Teste		p													
F(12,103)=13,363															
	N_média	Dp	0	1	2	3	4	5	7	8	9	14	15	16	17
0	1.840	.101		.005	.001	.993	.999	1.00	.018	.195	.845	1.00	.982	.001	.006
1	1.276	.239	.005		1.00	.175	.000	.001	1.00	.000	.000	.002	.234	1.00	1.00
2	1.184	.389	.001	1.00		.053	.000	.000	1.00	.000	.000	.000	.077	1.00	1.00
3	1.736	.069	.993	.175	.053		.671	.857	.360	.007	.144	.967	1.00	.063	.188
4	1.902	.373	.999	.000	.000	.671		1.00	.001	.744	.999	1.00	.577	.000	.000
5	1.884	.081	1.00	.001	.000	.857	1.00		.002	.535	.992	1.00	.785	.000	.001
7	1.256	.201	.018	1.00	1.00	.360	.001	.002		.000	.000	.008	.447	1.00	1.00
8	2.063	.120	.195	.000	.000	.007	.744	.535	.000		.996	.314	.005	.000	.000
9	1.958	.174	.845	.000	.000	.144	.999	.992	.000	.996		.939	.104	.000	.000
14	1.824	.229	1.00	.002	.000	.967	1.00	1.00	.008	.314	.939		.936	.000	.003
15	1.712	.166	.982	.234	.077	1.00	.577	.785	.447	.005	.104	.936		.090	.249
16	1.164	.142	.001	1.00	1.00	.063	.000	.000	1.00	.000	.000	.000	.090		1.00
17	1.293	.305	.006	1.00	1.00	.188	.000	.001	1.00	.000	.000	.003	.249	1.00	

No contexto deste estudo, em que o isolado B16 apresenta elevada capacidade de produzir biofilme e o isolado B8 se destaca pela sua aptidão para fixar azoto, a combinação destas duas bactérias poderia sugerir efeitos sinérgicos benéficos para a planta hospedeira.

Com base na análise dos resultados dos testes bioquímicos, foi possível estabelecer uma classificação dos isolados segundo o potencial bioestimulante (Quadro 5). Os isolados B16 e B4 foram os mais promissores, com valores mais elevados na produção de auxinas e formação de biofilme (B16), e relevante capacidade de fixação de azoto (B4). Os isolados B8 e B9 apresentaram-se em segundo lugar, com valores elevados para fixação de azoto (B8 e B9) embora menores em relação à produção de auxinas e biofilme.

Quadro 5 - Valores de desempenho (z-scores) atribuídos aos diferentes isolados conforme performance: valores mais baixos = melhor desempenho, N - atividade de fixação de azoto, BioF - produção de biofilme, Aux - produção de auxinas, SUM – somatório dos valores de desempenho

	N	BioF	Aux	N_score	BioF_score	Aux_score	SUM
1	1,277	0,325	0,111	5	3	2	10
2	1,185	0,716	0,123	5	2	2	9
3	1,737	0,139	0,105	4	5	2	11
4	1,902	0,468	0,197	3	3	1	7
5	1,884	0,433	0,095	3	3	3	9
7	1,257	0,172	0,114	5	4	2	11
8	2,063	0,645	0,098	1	2	3	6
9	1,959	0,682	0,108	2	2	2	6
14	1,824	0,196	0,091	3	4	3	10
15	1,712	0,725	0,116	4	2	2	8
16	1,164	1,646	0,199	5	1	1	7
17	1,294	0,554	0,144	5	2	2	9
0	1,841	0,135	0,069	5	5	4	14

Esta análise quantitativa permitiu identificar os três isolados que prosseguiram para os ensaios *in vivo* de bioestimulação vegetal - B4, B8 e B16.

4.3. Determinação das curvas de crescimento e quantificação de CFUs para isolados B4 e B16

De forma a produzir culturas das bactérias necessárias para os ensaios em planta, foi essencial determinar as curvas de crescimento para os isolados B4 e B8 (o isolado B8 foi selecionado para prosseguir nos ensaios in-planta devido aos seus resultados promissores na atividade de fixação de azoto e ao facto de ser referido na literatura como uma bactéria PGP (Zhao et al., 2024); no entanto, o seu potencial patogénico para humanos (Looney et al., 2009) limita o seu interesse para investigações futuras, tornando-o um candidato pouco viável para aplicações agrícolas seguras). A avaliação da taxa de crescimento demonstrou variabilidade entre elas, estando representado na figura 13 (B4) e na figura 14 (B16). Foram realizados dois ensaios com valores de OD distintos (0,1 e 0,2) contendo cada um duas réplicas biológicas e três réplicas técnicas.

Para o isolado B4 foram necessárias 5 horas para que atingisse uma OD = 1 (densidade ótica ideal para se proceder ao tratamento com solução bacteriana – para uma colonização eficaz).

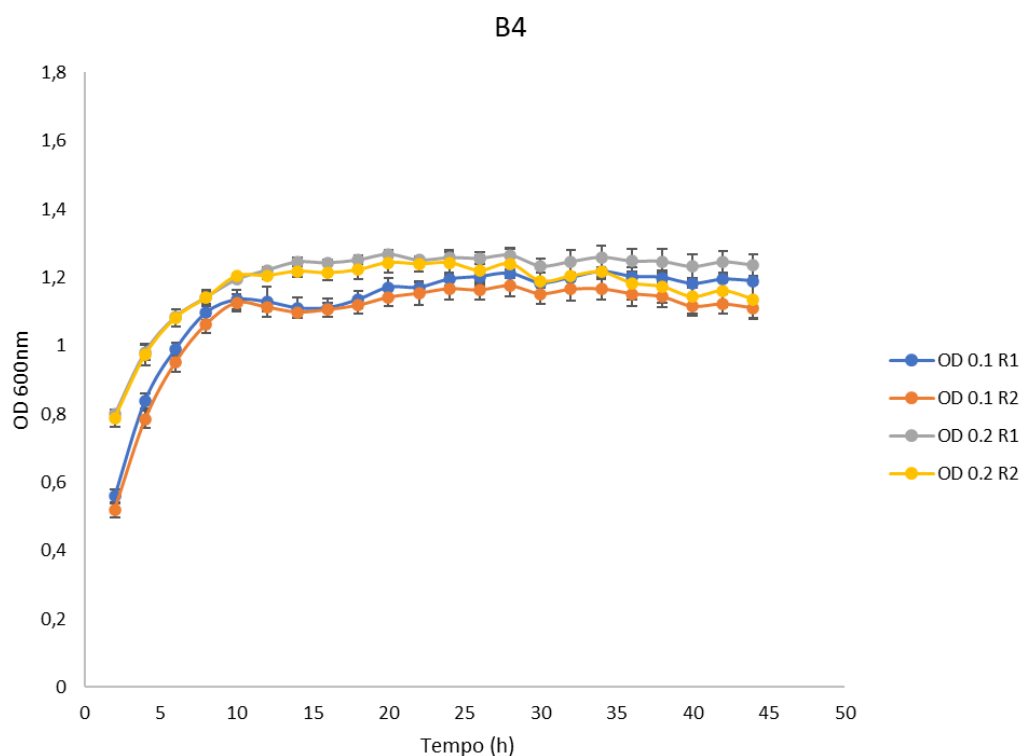


Figura 13 - Curva de crescimento da bactéria B4, com OD[0,1] R1, R2 e OD[0,2] R1 e R2

No caso do isolado B16, observou-se em todas as curvas, uma fase de latência nas primeiras 20 horas, com valores de OD_{600} relativamente estáveis, que indica um período de adaptação ao meio de cultura. A partir das 24 horas, as culturas entraram em fase exponencial de crescimento. A curva OD 0,2 R1 apresentou o crescimento mais rápido e atingiu $OD_{600} \approx 1$ por volta das 32 horas. As restantes curvas, incluindo OD 0,1 R1, OD 0,1 R2 e OD 0,2 R2, atingiram a $OD_{600} = 1$ entre as 36 e 42 horas, evidenciando uma ligeira diferença no ritmo de crescimento em função da concentração inicial do inóculo.

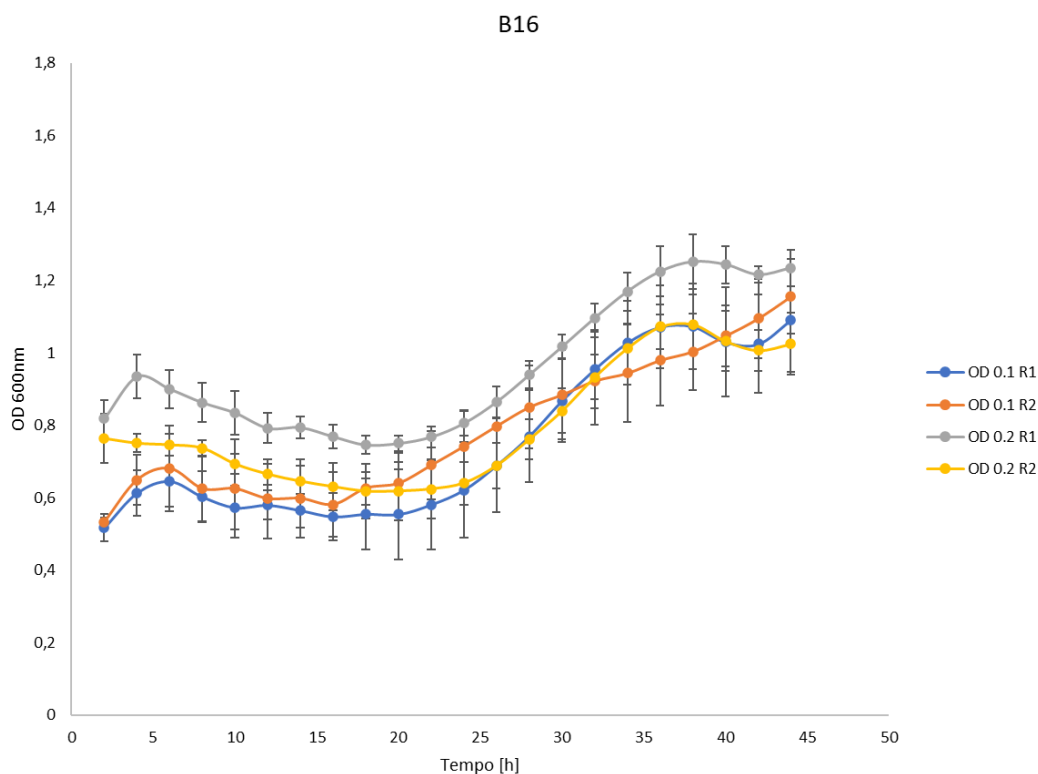


Figura 14 - Curva de crescimento da bactéria B16, com OD[0,1] R1, R2 e OD[0,2] R1 e R2

Na bactéria B4, a velocidade de crescimento foi maior. Observou-se um crescimento exponencial rápido durante as primeiras 6 a 8 horas, com todas as condições a ultrapassar $OD_{600} = 1$ nesse intervalo de tempo. Este comportamento indica fase de latência mais curta e uma melhor adaptação ao meio de cultura. Após atingir $OD_{600} = 1,0$ todas as curvas se mantiveram relativamente estáveis, entre 1,1 e 1,3 nas restantes 35 horas do ensaio. A condição OD 0,2 R1 registou os valores mais elevados de OD_{600} , atingindo um pico ligeiramente superior a 1,3 entre as 20 e as 30 horas, enquanto as

demais condições oscilaram em torno de 1,2. A variação entre réplicas foi baixa, como foi demonstrado pelas barras de erro reduzidas.

O crescimento mais rápido da B4 é particularmente interessante para a aplicação como bioestimulante, uma vez que bactérias de crescimento rápido tendem a estabelecer-se mais eficientemente na rizosfera, competindo em vantagem com microrganismos patogénicos.

Para determinar a relação entre as taxas de crescimento (OD600) e o número de colónias procedeu-se à quantificação CFUs das bactérias 4 e 16 através do método de diluições seriadas e plaqueamento em meio LB (Figura 15).

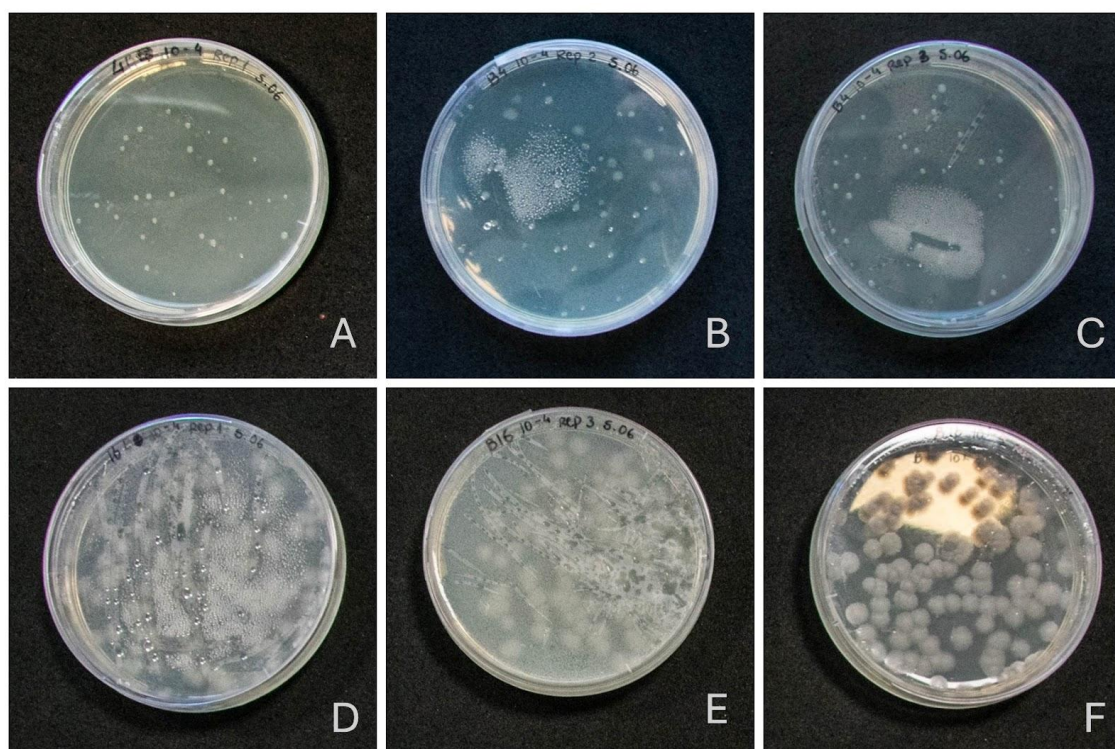


Figura 15 – Colónias puras dos isolados B4 e B16, fator de diluição 10^{-4} (A - B4 rep1; B - B4 rep2; C - B4 rep3; D - B16 rep1; E - B16 rep2; F - B16 rep3)

No ensaio em tomateiros, o tratamento com solução bacteriana foi realizado com volumes fixos de 10 mL por planta. Foram contabilizadas colónias de 2 diluições para cada bactéria (10^{-4} e 10^{-5}). Para uma OD=1 calculou-se os CFUs inoculados no substrato em cada tratamento (Quadro 6).

O facto de as médias do isolado B4 terem ordens de grandeza diferentes pode ser devido a erros de pipetagem ou espalhamento.

Quadro 6 – Quantificação de CFU's presentes em cada tratamento de 10 mL, em 0,4Kg de substrato dos isolados B4 e B16

Irrigação (mL CFU/Kg substrato)		
B4	10 mL	2,07 ^{^9}
B4	10 mL	2,83 ^{^9}
B16	10 mL	5,82 ^{^9}
B16	10 mL	5,50 ^{^9}

4.4. Rastreamento da capacidade bioestimulante das bactérias selecionadas em tomate

Considerando que o dia 0 corresponde ao início da germinação, e que o transplante das plântulas foi efetuado no dia 5, o primeiro tratamento ocorre no dia 6 (dia seguinte ao transplante) e o segundo tratamento ocorre no dia 13. A fenotipagem da fase vegetativa ocorreu no dia 31 e a fenotipagem da fase de floração deu-se no dia 77.

Os tratamentos foram aplicados no dia 1 e no dia 9 após o transplante, o que permite uma comparação pertinente com os dados apresentados por Qiao et al. (2017). Ao aplicar o tratamento no dia 1, as bactérias foram provavelmente expostas a um ambiente ainda instável, sujeito ao stress do transplante e a uma rizosfera em reorganização. Tal como descrito no artigo, este momento inicial pode induzir uma queda na população bacteriana devido à falta de adaptação ou competição com a microbiota residente, sendo expectável que a colonização eficaz só se estabeleça após alguns dias.

O tratamento no dia 9 coincide com o pico de restabelecimento da colonização bacteriana observado por Qiao et al. (2017), o que pode ter conferido às bactérias uma condição rizosférica mais favorável, com raízes fisiologicamente mais estáveis e uma exsudação mais constante, permitindo aderência eficiente, formação precoce de biofilme e colonização duradoura. Esta fase parece ser crítica para que as bactérias expressem as suas funções PGP.

Ao final de quatro semanas de crescimento vegetativo fez-se a fenotipagem em dez plantas, e as restantes dez seguiram para floração, para análise de parâmetros de produção. A figura 16 mostra as diferenças observadas visualmente entre os isolados, nos diferentes ensaios.

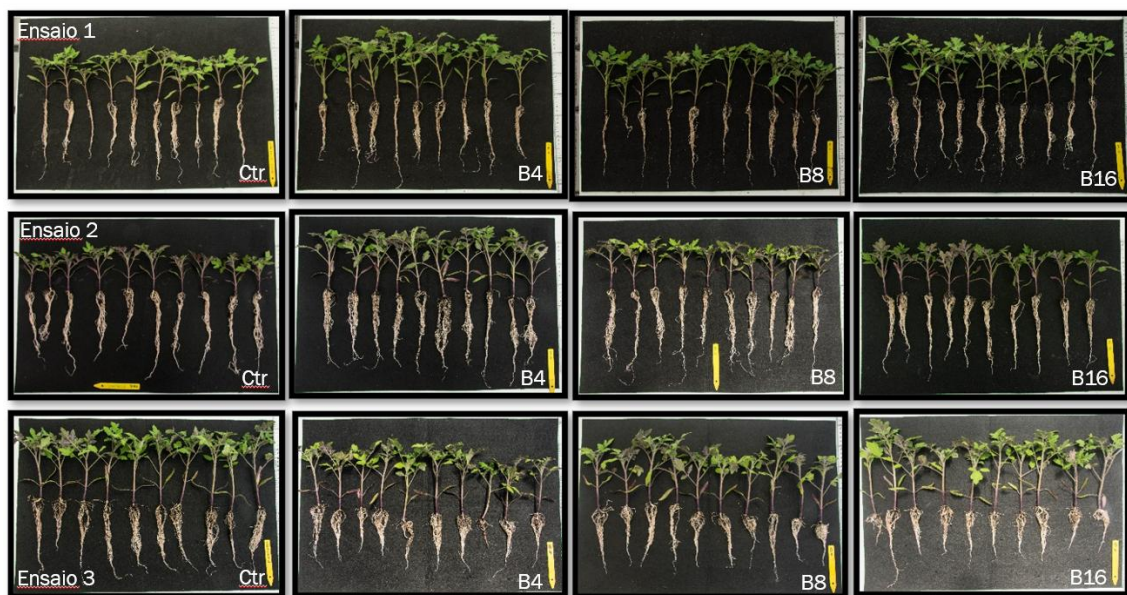


Figura 16 – diferenças entre tratamentos no comprimento da parte aérea e raiz. Da esquerda para a direita: B0 (controlo), B4, B8 e B16; de cima para baixo: ensaio I, II e III

Nos dois primeiros ensaios, o isolado B4 destacou-se em relação ao controlo, promovendo um maior crescimento da parte aérea e das raízes. No entanto, no terceiro ensaio, foi o controlo que apresentou melhor desempenho. Esta inversão de tendência pode estar relacionada com o papel dos bioestimulantes, que tendem a ter um efeito mais pronunciado quando as plantas se encontram sob condições de stress. Nos ensaios I e 2, realizados no início de Abril, as condições ambientais não eram ideais para a germinação e desenvolvimento inicial do tomateiro, o que poderá ter potenciado o efeito positivo dos bioestimulantes. Por outro lado, o ensaio 3 foi iniciado a meio de Maio, altura mais adequada para a cultura do tomate, o que poderá ter reduzido a necessidade de suporte bioestimulante, permitindo ao controlo expressar todo o seu potencial de crescimento em condições não adversas. Esta observação fez-se a partir da interpretação de literatura já existente sobre o tema, como o estudo realizado por Gabrielle et al. (2022) onde conclui que bactérias PGP provocam indução de tolerância ao stress biótico e abiótico, ou no estudo de Cochard et al. (2022) onde demonstraram

aumento da biomassa vegetativa e eficiência nutricional quando microrganismos PGP eram aplicados em fases críticas do desenvolvimento.

De entre os parâmetros analisados na fenotipagem, analisou-se a altura (cm) da parte aérea, onde o isolado B4 apresenta os valores mais elevados ($16,620 \text{ cm} \pm 1,428$) mostrando diferenças significativas em relação ao isolado B8, e apresentando um outlier moderado (Quadro 7, Figura 17).

Quadro 7 – Testes estatísticos altura por Bactéria

teste: F(3,115)=2,994						
	Alt_média	Dp	0	4	8	16
0	14.194	3.738		.069	.976	.811
4	16.620	1.428	.069		.007	.184
8	15.009	2.292	.976	.007		.896
16	15.324	3.029	.811	.184	.896	

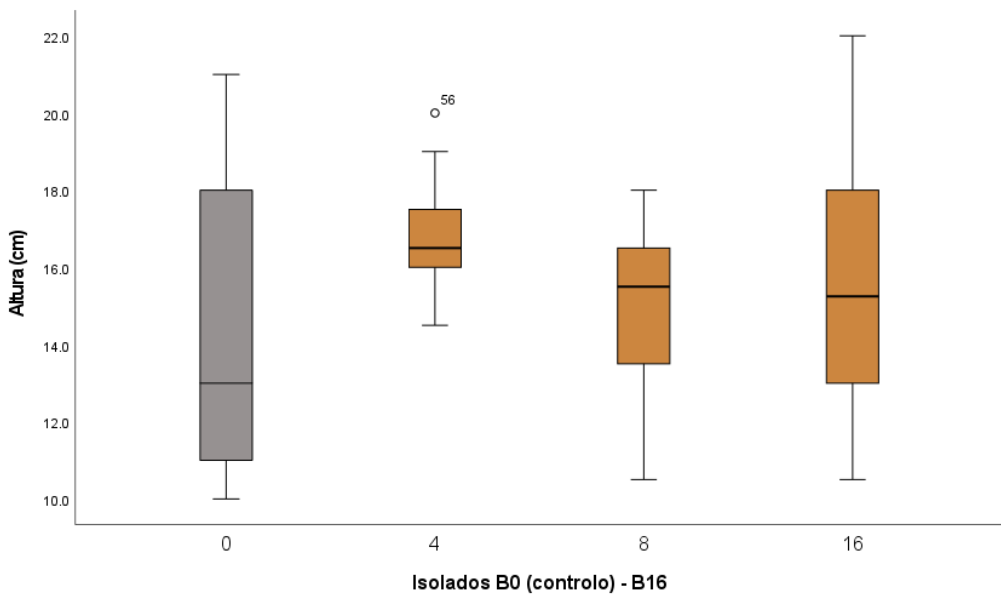


Figura 17 – Quantificação da altura (cm) entre o controle e os isolados B4, B8 e B16

Relativamente ao comprimento da raiz, não se verificaram diferenças entre os tratamentos (Quadro 8, Figura 18).

Quadro 8 – Testes estatísticos do comprimento da raiz por Bactéria
teste: $F(3,116)=2,001$

	Comp_raiz_média	Dp	0	4	8	16	p
0	17.852	2.924		.231	.972	.218	
4	16.037	3.912	.231		.459	1.000	
8	17.269	4.440	.972	.459		.439	
16	15.889	4.500	.218	1.000	.439		

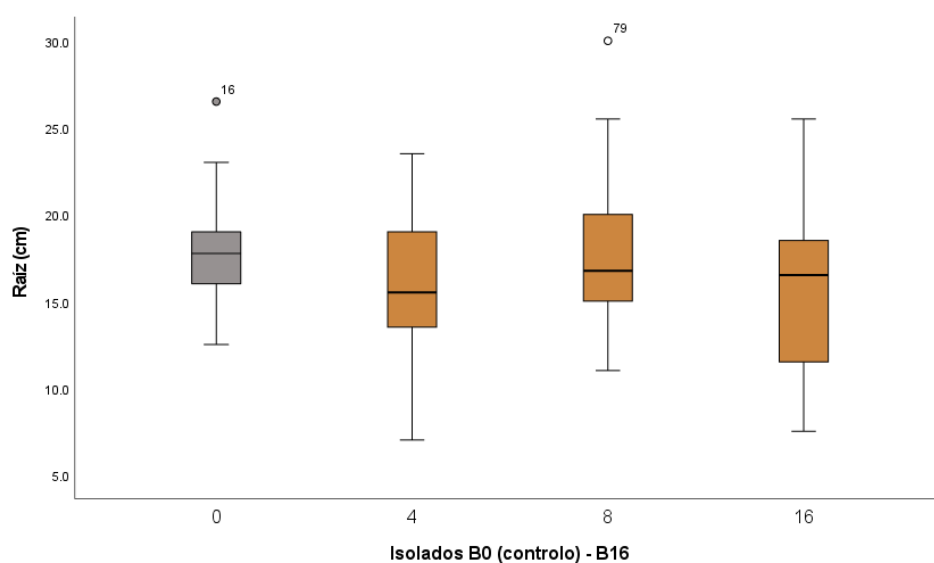


Figura 18 – Quantificação do tamanho da raiz (cm) entre o controle e os isolados B4, B8 e B16.

Na variável peso seco da parte aérea voltou a verificar-se diferenças estatísticas entre o controle e o tratamento com a B4, e entre os tratamentos B4 e B8; o B4 apresenta os valores mais elevados (Quadro 9, Figura 19).

Quadro 9 – Testes estatísticos peso seco da parte aérea por Bactéria

teste: $F(3,115)=4,167$

	PSA_média	Dp	0	4	8	16	p
0	188.717	82.0031		.014	.999	.539	
4	235.943	32.5482	.014		.003	.429	
8	180.550	72.5964	.999	.003		.410	
16	217.815	112.4275	.539	.429	.410		

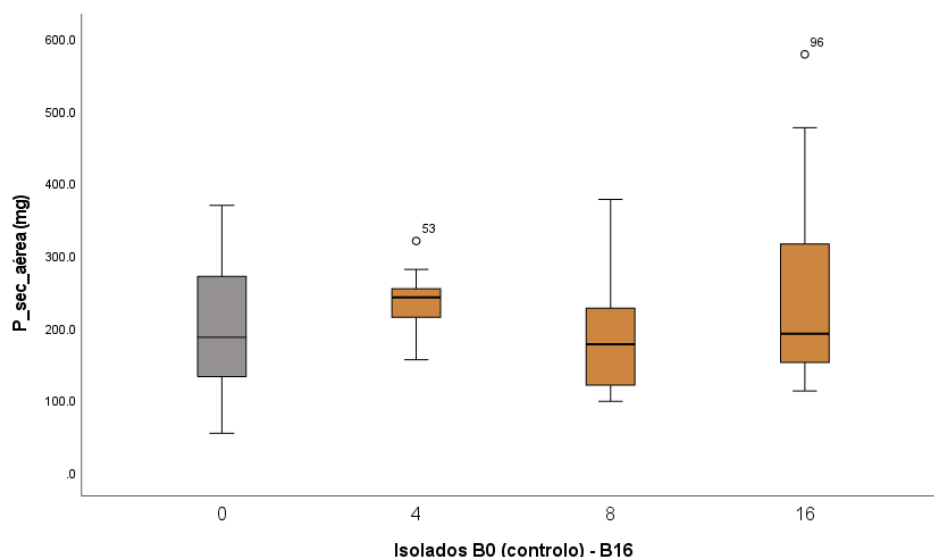


Figura 19 – Quantificação do peso seco da parte aérea (mg) entre o controle e os isolados B4, B8 e B16

Relativamente ao peso seco da raiz, também se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos B4 e B8, e os tratamentos B16 e B4 (Quadro 10), sendo novamente o isolado B4 que apresenta os maiores valores (Figura 20).

Quadro 10 – Testes estatísticos do peso seco da raiz por Bactéria
teste: $F(3,116)=4,304$

	PSR_média	Dp	p			
			0	4	8	16
0	66.493	28.754		.085	.996	.999
4	83.715	30.400	.085		.023	.027
8	66.481	20.794	.996	.023		1.000
16	66.246	20.655	.999	.027	1.000	

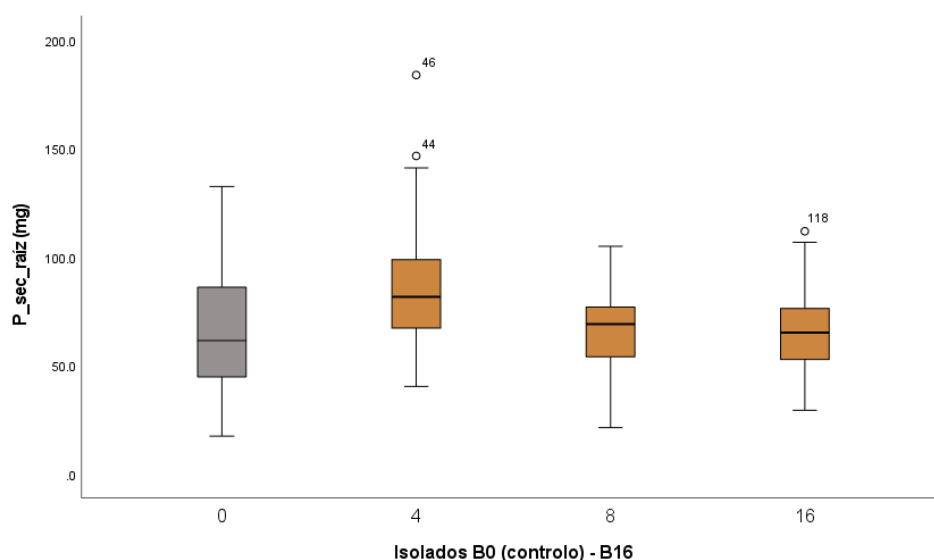


Figura 20 – Quantificação do peso seco da raiz (mg) entre o controlo e os isolados B4, B8 e B16

Através dos resultados obtidos na fenotipagem da fase de produção foi elaborado o Quadro 11 com os valores de desempenho da fase vegetativa, onde se verifica que o isolado B4 apresentou os melhores resultados na promoção de factores de crescimento.

Quadro 11 – Valores de desempenho (z-scores) atribuídos aos diferentes isolados conforme performance: valores mais baixos = melhor desempenho; SUM – somatório dos valores de desempenho da fase vegetativa

Bacteria	Altura (cm)	altura_ scores	Raiz (cm)	raiz_ scores	P_sec_aérea (mg)	PSA_ scores	P_sec_raiz (mg)	PSR_ scores	SUM
0	14,194	2	17,852	1	188,7	2	66,5	1,5	6,5
4	16,62	1	16,037	1	235,9	1	83,7	1	4
8	15,009	2	17,269	1	180,6	2	66,5	1,5	6,5
16	15,324	2	15,889	1	217,8	1,5	66,3	2	6,5

Na fase de floração, foram avaliados parâmetros morfológicos e de produção. Para a variável altura, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Quadro 12, Figura 21).

Quadro 12 – Testes estatísticos altura – produção
teste: **F(3,114)=1,031**

	Alt_média	Dp	0	4	8	16	p
0	87.873	13.448		.454	.565	.438	
4	92.690	11.166	.454		.998	1.000	
8	91.741	12.055	.565	.998		.997	
16	92.907	12.941	.438	1.000	.997		

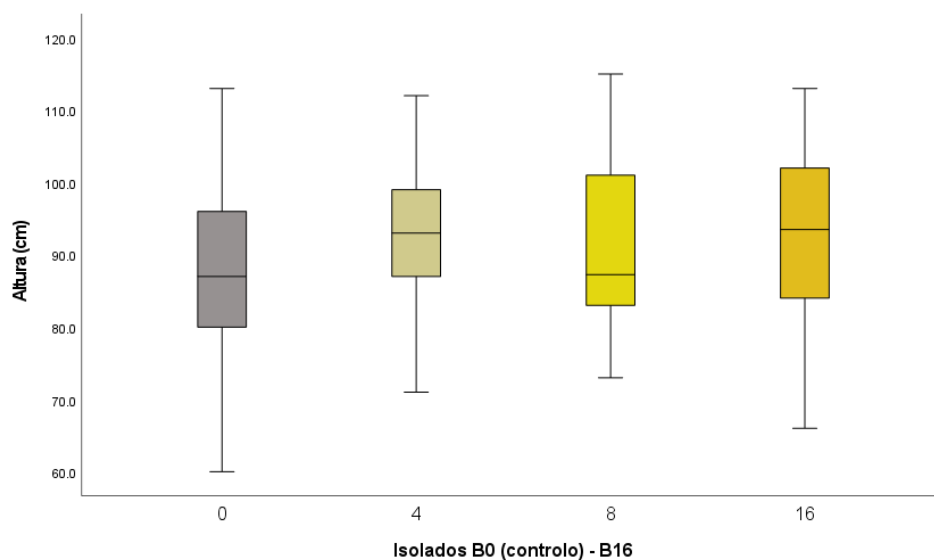


Figura 21 - (Quantificação da altura (cm) entre o controle e os isolados B4, B8 e B16, na fase de produção

A análise do peso fresco da parte aérea revelou igualmente ausência de diferenças significativas entre os tratamentos (Quadro 13) (Figura 22).

Quadro 13 – Testes estatísticos do peso fresco da parte aérea - produção
teste: $F(3,114)=0,837$

	P_fresco_média	Dp	p			
			0	4	8	16
0	164.554	31.113		.445	.914	.666
4	177.115	30.178	.445		.829	.983
8	169.878	28.838	.914	.829		.961
16	172.883	33.560	.666	.983	.961	

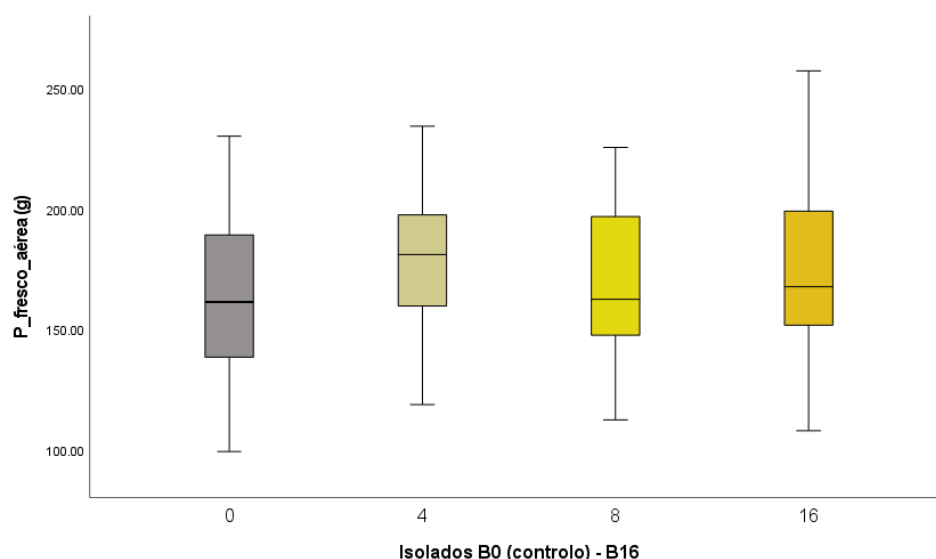


Figura 22 – Quantificação do peso fresco da parte aérea (g) entre o controle e os isolados B4, B8 e B16, na fase de produção

No que se refere ao número de entrenós, também não se registaram diferenças estatisticamente relevantes entre os tratamentos (Quadro 13, Figura 23).

Quadro 14 – Testes estatísticos do número de entrenós - produção

teste: **F(3,114)=0,083**

	Nr_entrenós_média	Dp	0	4	8	16	p
0	4.569	.573		.997	.961	.991	
4	4.590	.560	.997		.991	1.000	
8	4.639	.629	.961	.991		.997	
16	4.607	.561	.991	1.000	.997		

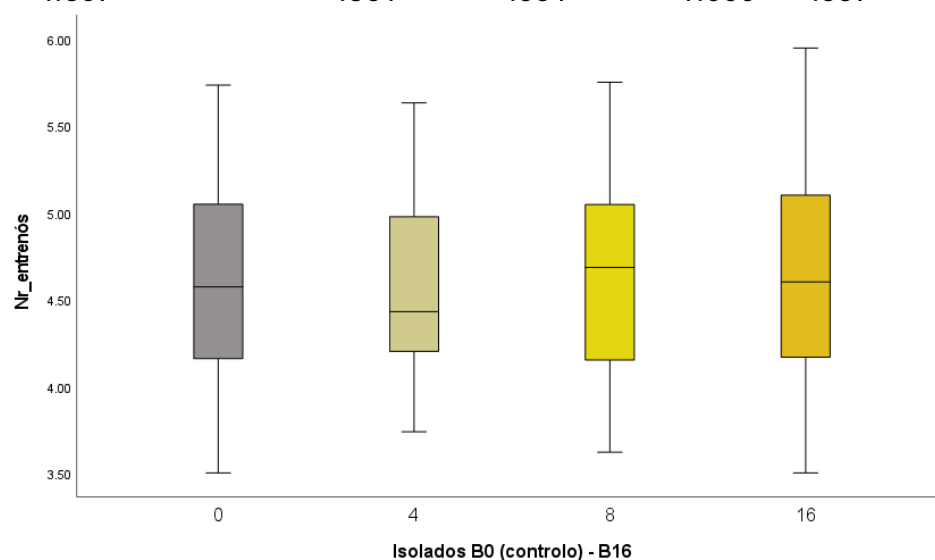


Figura 23 – Quantificação do número de entrenós entre o controlo e os isolados B4, B8 e B16, na fase de produção

A produção foi avaliada com base no número de frutos por planta (Figura 21) e no peso total de frutos por planta (Figura 24).

O número médio de frutos por planta não apresentou variações significativas (Quadro 15).

Quadro 15 – Testes estatísticos do número de frutos por planta - produção

teste: $F(3,114)=1,445$

	Nr_frutos/planta_média	Dp	0	4	8	16	p
0	10.150	4.351		.920	.201	.581	
4	9.440	4.755	.920		.539	.921	
8	7.930	4.283	.201	.539		.891	
16	8.760	3.939	.581	.921	.891		

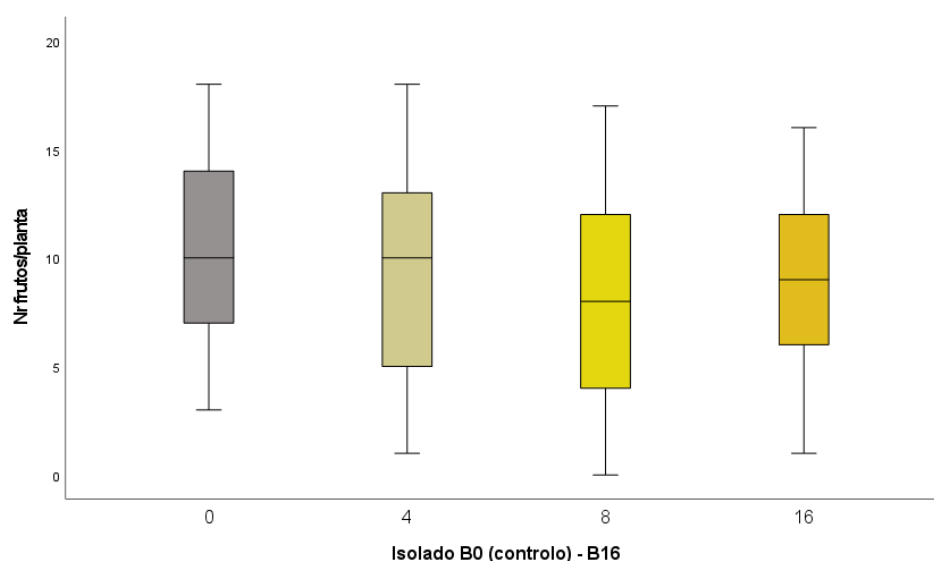


Figura 24 – Quantificação do número de frutos por planta entre o controlo e os isolados B4, B8 e B16 na fase de produção

A análise do peso total de frutos por planta evidenciou uma diferença estatisticamente significativa entre o controlo e a bactéria 8 (Quadro 16).

Quadro 16 – Testes estatísticos do peso de frutos por planta - produção

Teste: F(3,114)=3,694

	P_frutos/planta_média	Dp	0	4	8	16	p
0	12.342	6.09180		.874	.011	.341	
4	11.100	6.61440	.874		.084	.798	
8	7.505	4.79681	.011	.084		.445	
16	9.573	5.55913	.341	.798	.445		

Este resultado indica que, apesar de não afetar o número de frutos, a bactéria 8 tem um impacto negativo na biomassa nos frutos (figura 25).

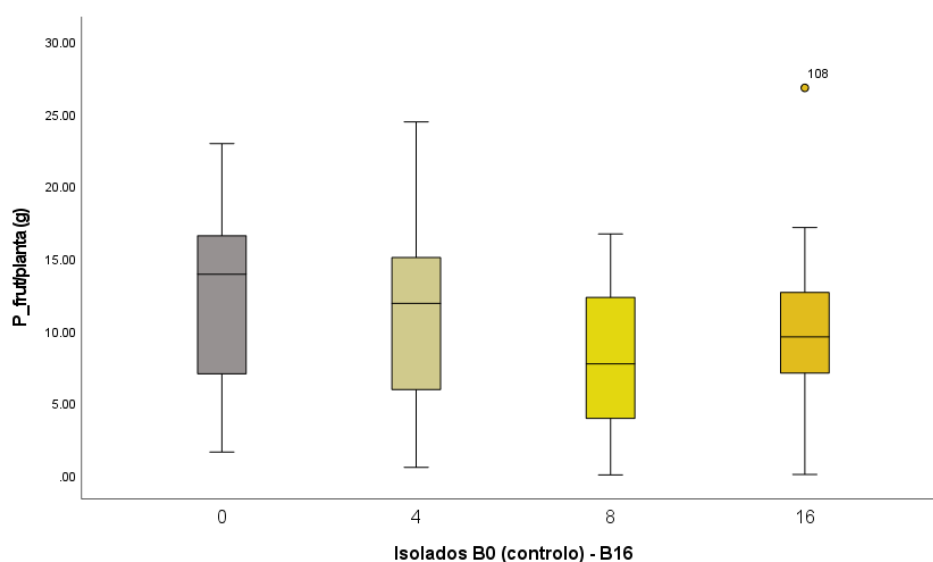


Figura 25 – Quantificação do peso dos frutos por planta entre o controlo e os isolados B4, B8 e B16, na fase de produção

Não se verificou qualquer correlação entre o número médio de entrenós e o peso dos frutos (correlação de 0%), o que sugere que a arquitetura da planta não influencia diretamente a produtividade em termos de peso dos frutos. Observou-se ainda uma correlação moderada ($r = 0,446$) entre o peso dos frutos e a distância média entre nós, e uma correlação moderada ($r = 0,353$) entre o peso dos frutos e o peso fresco da parte aérea. Estes resultados sugerem que plantas mais vigorosas em termos de biomassa aérea tendem a produzir frutos mais pesados, o que está de acordo com a literatura que aponta para uma relação positiva entre a robustez vegetativa e a capacidade produtiva das plantas (Isa et al., 2020).

Os dados obtidos suportam o facto de que a maioria das bactérias testadas não induziu efeitos significativos nos parâmetros avaliados na fase de produção, o que pode ser justificado pelo facto de os tratamentos terem sido aplicados apenas no início do ensaio. A repetição dos tratamentos ao longo do desenvolvimento, reforça a colonização e a atividade das bactérias na rizosfera e tecidos vegetais. (Qiao et al., 2017). Relativamente à produção, não se verificam diferenças entre os tratamentos, à exceção do tratamento da bactéria 8 em relação ao controlo, que apresentou um impacto negativo sobre o peso dos frutos.

O Quadro 17 ilustra os valores de desempenho da fase de produção, onde se verifica que o controlo teve os resultados mais significativos, não estando em concordância com os ensaios anteriores. Este facto pode ser devido a factores espaciais do próprio ensaio em estufa, onde o controlo pode ter ficado numa posição mais favorável em relação à disponibilidade de luz.

Quadro 17 – Valores de desempenho (z-scores) atribuídos aos diferentes isolados conforme performance: valores mais baixos = melhor desempenho; SUM – somatório dos valores de desempenho da fase de produção

Bacteria	Nr frutos/planta	NFP_score	P_frut/planta	PFP_score	SUM
0	10,15	1	12,34	1	2
4	9,44	1	11,1	2	3
8	7,93	1	7,51	2	3
16	8,76	1	9,57	1,5	2,5

Foram ainda contabilizadas o número de flores, ao longo de três semanas a partir do primeiro dia de floração (Figura 26, 27, 28). No primeiro ensaio observou-se uma vantagem do tratamento com B4, com maior número de flores abertas, atingindo um pico no dia 7 com média de 6,6 flores, superior ao controlo e aos restantes tratamentos. A estirpe B16 apresenta igualmente uma resposta positiva, embora ligeiramente inferior à de B4. Já o tratamento com B8 revelou uma resposta mais modesta, com menor número de flores abertas, aproximando-se do comportamento do controlo.

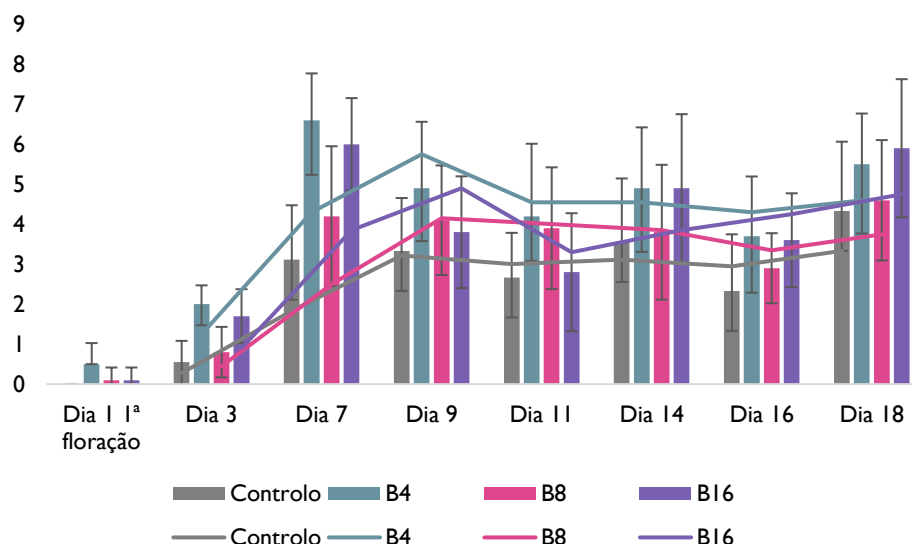


Figura 26 - Número de flores abertas ensaio I

No segundo ensaio, o tratamento com B16 destacou-se ao apresentar o maior número de flores abertas, com o pico máximo no dia 8 (média de 7,5 flores) e novamente no dia 15 (7,6 flores), superando todos os restantes tratamentos, incluindo o controlo.

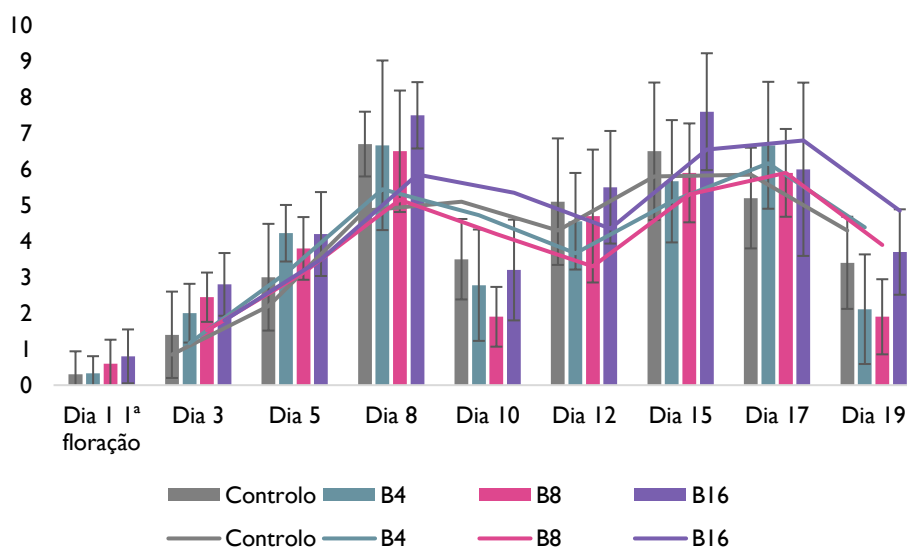


Figura 27 - Número de flores abertas ensaio 2

No terceiro ensaio, o tratamento com B4 voltou a apresentar o desempenho mais robusto, com um pico de 9,9 flores abertas no dia 8 e manutenção de níveis elevados até ao final do período de observação. O tratamento com B16 demonstrou igualmente um impacto positivo, aproximando-se de B4 nos picos. Em contraste, o tratamento com B8 revelou um menor estímulo à floração, com valores consistentemente inferiores aos dos restantes tratamentos.

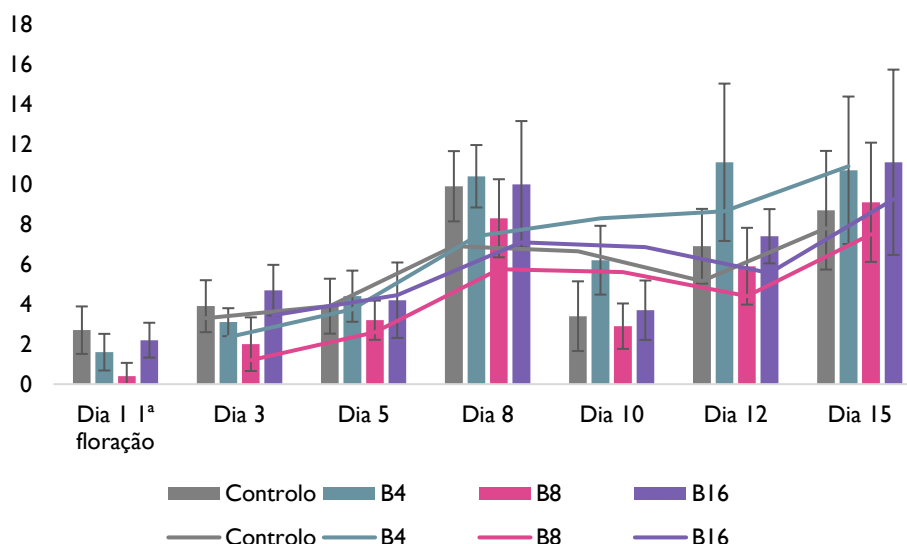


Figura 28 - Número de flores abertas ensaio 3

O número de flores abertas constitui um indicador relevante do estágio reprodutivo da planta; no entanto, o aumento da floração não se traduziu necessariamente num maior número de frutos. Embora os tratamentos com B4 e B16 tenham promovido picos de floração no primeiro e segundo ensaio, e um desempenho robusto de ambos no terceiro ensaio, a tradução desta floração em frutificação pode ter sido limitada por diversos fatores. Estudos relatam que, em tomateiro, a aplicação exógena de auxina (ou mutações que aumentem a sua síntese) provoca *fruit set*, mas não garante o desenvolvimento completo do fruto se as condições nutricionais e a sinalização hormonal não forem equilibradas. Em condições de défice, há aumento da abscisão floral — isto é, retenção de flores abortadas — como observado em situações de stress térmico ou hormonal descompensado. Concretamente, o envolvimento coordenado das vias da auxina e giberelina é essencial: sem polinização adequada e suporte nutricional, as flores iniciadas podem não evoluir para frutos viáveis (De Jong et al., 2009).

6. Conclusões

A presente investigação permitiu explorar o potencial bioestimulante de bactérias endófitas isoladas a partir de resíduos de *Cannabis sativa* L., na promoção do crescimento vegetal de *Solanum lycopersicum* L.. Partindo da hipótese de que resíduos de *C. sativa* podem albergar bactérias PGP, foram isoladas e caracterizadas doze estirpes bacterianas, avaliadas quanto à sua capacidade de produção de biofilme, síntese de auxinas e fixação de azoto.

A seleção dos isolados mais promissores baseou-se num sistema de pontuação que integrou os dados bioquímicos obtidos *in vitro*, destacando-se os isolados B4 (*Pseudomonas* sp.), B8 (*Stenotrophomonas* sp.) e B16 (*Bacillus* sp.). O isolado B16 evidenciou a maior produção de biofilme ($OD_{600} = 2,06$) e também a síntese mais elevada de auxinas ($18,6 \mu\text{g/mL eq. AIA}$), enquanto o isolado B8 se destacou na capacidade de fixação de azoto ($2,1 \mu\text{l/mL eq. NH}_3^+$). Os testes estatísticos revelaram diferenças significativas entre os isolados, validando a seleção dos géneros com maior aptidão para prosseguir nos ensaios em planta.

Nos ensaios conduzidos com tomateiros, os resultados obtidos reforçaram a hipótese de que estas bactérias endófitas possuem potencial bioestimulante. O isolado B4 promoveu significativamente o crescimento vegetativo, aumentando a altura da parte aérea, o peso seco da parte aérea e o peso seco da raiz, quando comparado com os demais tratamentos. Estas diferenças revelaram-se estatisticamente significativas indicando efeito direto da inoculação no desenvolvimento da planta. Por outro lado, embora o isolado B8 tenha evidenciado excelente desempenho na fixação de azoto, associou-se a uma menor produção de frutos por planta, sugerindo que a sua aplicação pode não ser muito interessante.

Durante a fase de produção, as diferenças mais expressivas foram observadas nos parâmetros reprodutivos, com destaque para o número e peso de frutos por planta. O isolado B4 voltou a demonstrar um efeito positivo, embora sem diferenças significativas face ao controlo. O isolado B8, por contraste, revelou uma redução significativa na produção de frutos.

O somatório final dos valores de desempenho dos isolados considerados mais promissores permitiu identificar o isolado B4 como o candidato mais apto à função de bioestimulação vegetal, com o melhor desempenho global nos parâmetros morfológicos da fase vegetativa e reprodutiva, nos bioquímicos e na tendência floral. Estes resultados sustentam a hipótese inicial e demonstram que resíduos vegetais de *Cannabis sativa* constituem uma fonte viável de bactérias PGP com efeitos benéficos sobre o crescimento vegetal.

Contudo este trabalho apresenta algumas limitações metodológicas que devem ser reconhecidas. A ausência de aleatorização na disposição dos tabuleiros durante os ensaios em estufa poderá ter introduzido um viés espacial que afetou a distribuição de luz, humidade ou temperatura, com impacto potencial nos resultados obtidos. O facto das repetições técnicas de cada ensaio terem sido realizadas em momentos distintos, o que pode também ter influenciado os resultados devido a variações temporais não controladas.

Em termos de aplicabilidade futura, embora os resultados obtidos com *Solanum lycopersicum* sejam promissores, seria interessante validar o efeito do isolado B4 diretamente em *Cannabis sativa*, para se perceber se os efeitos bioestimulantes aqui observados se mantêm na planta hospedeira.

Em síntese, os dados obtidos confirmam a presença de bactérias endófitas com potencial bioestimulante em resíduos de *Cannabis sativa*, reforçando a relevância desta planta não apenas do ponto de vista fitoterapêutico, mas também como recurso biotecnológico. Estes resultados abrem perspectivas interessantes para a reutilização de resíduos da indústria de *Cannabis* em estratégias de biopromoção vegetal, contribuindo para a inovação em práticas agrícolas sustentáveis.

7. Bibliografia

- Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2017). Plant Growth–Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and Screening of PGP Activities. *Current Protocols in Plant Biology*, 2(3), 190–209.
- Adedayo, A. A., Babalola, O. O., Prigent-Combaret, C., Cruz, C., Stefan, M., Kutu, F., & Glick, B. R. (2022). The application of plant growth-promoting rhizobacteria in *Solanum lycopersicum* production in the agricultural system: A review. *PeerJ*, 10, e13405.
- Aunkam, P., Sibponkrung, S., Limkul, S., Seabkongseng, T., Mahanil, K., Umnajkitikorn, K., Boonkerd, N., Teaumroong, N., Sato, S., Tittabutr, P., & Boonchuen, P. (2024). *Mechanisms of Cannabis Growth Promotion by Bacillus velezensis*
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*
- Balthazar, C., Joly, D. L., & Fillion, M. (2022). Exploiting Beneficial *Pseudomonas* spp. For *Cannabis* Production. *Frontiers in Microbiology*, 12, 833172.
- Barros, M. V., Salvador, R., De Francisco, A. C., & Piekarski, C. M. (2020). Mapping of research lines on circular economy practices in agriculture: From waste to energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 109958.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17).
- Bhattacharyya, A., Mavrodi, O., Bhowmik, N., Weller, D., Thomashow, L., & Mavrodi, D. (2023). Bacterial biofilms as an essential component of rhizosphere plant-microbe interactions. *Em Methods in Microbiology* (Vol. 53, pp. 3–48). Elsevier.
- Box, G. E. P., & Cox, D. R. (1981). An Analysis of Transformations Revisited, Rebutted. *Wisconsin univ-Madison mathematics research center*, 76(374), 296-311.
- Cabral, E. M., Zhu, X., Garcia-Vaquero, M., Pérez-Vila, S., Tang, J., Gómez-Mascaraque, L. G., Poojary, M. M., Curtin, J., & Tiwari, B. K. (2023). Recovery of Protein from Industrial Hemp Waste (*Cannabis sativa* L.) Using High-Pressure Processing and Ultrasound Technologies. *Foods*, 12(15), 2883.
- Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., & Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from Tomato Roots: Isolation, In Vitro Characterization and In Vivo Evaluation of Treated Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Microorganisms*, 10(4), 765.
- Cramer, D. (2003). Fundamental statistics for social research: Step-by-step calculations and computer techniques using SPSS for Windows. Routledge.

Cramer, D., y Howitt, D. L. (2004). The Sage dictionary of statistics: A practical resource for students in the social sciences. Sage.

Dashti, A.; Jadaon, M.; Abdulsamad, A.; Dashti, H. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Med. J.* 2009, 41, 117–122.

De Jong, M., Mariani, C., & Vriezen, W. H. (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany*, 60(5), 1523–1532.

Doane, D. P., y Seward, L. E. (2011). Measuring skewness: A forgotten statistic? *Journal of Statistics Education*, 19(2).

Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L. J., Plaza-Úbeda, J. A., & Camacho-Ferre, F. (2020). The Management of Agricultural Waste Biomass in the Framework of Circular Economy and Bioeconomy: An Opportunity for Greenhouse Agriculture in Southeast Spain. *Agronomy*, 10(4), 489.

Etesami, H., & Glick, B. R. (2024). Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience. *Microbiological Research*, 281, 127602.

Filloux, A., & Ramos, J.-L. (Eds.). (2014). *Pseudomonas Methods and Protocols* (Vol. 1149). Springer New York.

Frost, H. R., Tsoi, S. K., Baker, C. A., Laho, D., Sanderson-Smith, M. L., Steer, A. C., & Smeesters, P. R. (2016). Validation of an automated colony counting system for group A *Streptococcus*. *BMC Research Notes*, 9(1), 72.

Gabriele, M., Vitali, F., Chelucci, E., & Chiellini, C. (2022). *Characterization of the Cultivable Endophytic Bacterial Community of Seeds and Sprouts of Cannabis sativa L. and Perspectives for the Application as Biostimulants*.

Hasan, A., Tabassum, B., Hashim, M., & Khan, N. (2024). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as a Plant Growth Enhancer for Sustainable Agriculture: A Review. *Bacteria*, 3(2), 59–75.

He, Y., Pantigoso, H.A., Wu, Z., Vivanco, JM. (2019). Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072

Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007) Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant-Microbe* 20:619–626.

Isa et al., 2020. Correlation and Contribution of Some Growth and Yield Components to Fruit Yield of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

- Kumari, P., Deepa, N., Trivedi, P. K., Singh, B. K., Srivastava, V., & Singh, A. (2023). Plants and endophytes interaction: A “secret wedlock” for sustainable biosynthesis of pharmaceutically important secondary metabolites. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 226. [_](#)
- Liu, S., Huang, J., Zhang, C., Wang, L., Fan, C., & Zhong, C. (2022). Probing the growth and mechanical properties of *Bacillus subtilis* biofilms through genetic mutation strategies. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7(3), 965–971. [_](#)
- Looney, W. J., Narita, M., & Mühlemann, K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging opportunist human pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(5), 312–323. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70083-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0)
- Lyu, D., Ruan, E. D., Backer, R., Gagné-Bourque, F., & Smith, D. L. (2025). Changes in morpho-physiological traits and phytochemical composition of *Cannabis sativa* L. treated with microbial biostimulants across different substrates. *Industrial Crops and Products*, 224, 120377.
- Lyu, P., et al. (2023). *Elicitation as a tool to improve the accumulation of secondary metabolites in Cannabis sativa*. *Phytochemistry Reviews*, antecipado via publicação eletrónica.
- MacWilliams, J., Peirce, E., Pitt, W. J., Schreiner, M., Matthews, T., Yao, L., Broeckling, C., & Nachappa, P. (2023). Assessing the adaptive role of cannabidiol (CBD) in *Cannabis sativa* defense against *Cannabis* aphids. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1223894.
- Melosini, M. (2019). Valorisation of *Cannabis sativa* L. residues through supercritical CO₂ extraction with potential therapeutic application for the colon cancer treatment. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
- Meng Q, Jiang H, Hao JJ (2016) Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biol Control* 98:18–26.13 *amyloliquefaciens* SQR9. *Microb Cell Fact* 14:130.
- Moretti, B., et al. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria increase the efficiency of fertilisers while reducing nitrogen loss. *Sci Total Environ*, 705, 135308.
- Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1), 1–8.
- Niza Costa, M., Gil, T., Teixeira, R., Rodrigues Dos Santos, A. S., Rebelo Romão, I., Sequero López, C., & Vilchez, J. I. (2023). Combined Use of a Bacterial Consortium and Early-Colonizing Plants as a Treatment for Soil Recovery after Fire: A Model Based on Los Guájares (Granada, Spain) Wildfire. *Biology*, 12(8), 1093.
- Nordstokke, D. W., y Zumbo, B. D. (2010). A new nonparametric Levene test for equal variances. *Psicologica: International Journal of Methodology and Experimental Psychology*, 31(2), 401–430.

Nordstokke, D. W., Zumbo, B. D., Cairns, S. L., y Saklofske, D. H. (2011). The operating characteristics of the nonparametric Levene test for equal variances with assessment and evaluation data. *Practical Assessment, Research y Evaluation*, 16.

Paungfoo-Lonhienne, C., Redding, M., Pratt, C., & Wang, W. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria increase the efficiency of fertilisers while reducing nitrogen loss. *Journal of Environmental Management*, 233, 337–341.

Pérez-Rodríguez, M. M., Piccoli, P., Anzuay, M. S., Baraldi, R., Neri, L., Taurian, T., Lobato Ureche, M. A., Segura, D. M., & Cohen, A. C. (2020). Native bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. increase tomato seedling growth under a reduced fertilization regime. *Scientific Reports*, 10(1), 15642.

Poveda, J., & González-Andrés, F. (2021). Bacillus as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23), 8629–8645.

Qiao, J., Yu, X., Liang, X., Liu, Y., Borriss, R., & Liu, Y. (2017). Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC Microbiology*, 17(1), 131.

Ramos, L. (2024, December 12). Portugal is the world's second largest exporter of medicinal *Cannabis*, exceeding 20 tonnes in 2024. CannaReporter.<https://www.cannareporter.eu/en/2024/12/12/Portugal-is-the-world%27s-second-largest-exporter-of-medicinal-cannabis%2C-surpassing-20-tons-in-2024/>

Razali, N. M., y Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21–33.

Josephine Cm, R., & Thomas, J. (2021). Rhizosphere competent *Pseudomonas* indoloxydans (F3-47) as a plant growth promoter and enhancer of *Zea mays* L. under greenhouse and field trials. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 15(5), 411–41

Robertson, K. J., Brar, R., Randhawa, P., Stark, C., & Baroutian, S. (2023). Opportunities and challenges in waste management within the medicinal *Cannabis* sector. *Industrial Crops and Products*, 197, 116639.

Rogers, A., Bullard, K., Dod, A., & Wang, Y. (2022). Bacterial Growth Curve Measurements with a Multimode Microplate Reader. *BIO-PROTOCOL*, 12(9).

Santos, M. L., Berlitz, D. L., Wiest, S. L., Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2022). Exploring the impact of formulated bacterial consortia on the growth of *Solanum lycopersicum*; towards sustainable biofertilizer development. *Biologia*, 79(4), 1063-1075.

Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, Ma. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475.

Shao J, Li S, Zhang N, Cui X, Zhou X, Zhang G, Shen Q, Zhang R (2015) Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus* 8644 *Applied Microbiology and Biotechnology* (2021) 105:8629–864

Shapiro, S. S., y Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591.

Singh, P., Singh, R. K., Zhou, Y., Wang, J., Jiang, Y., Shen, N., Wang, Y., Yang, L., & Jiang, M. (2022). Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: A review. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 220–238.

Steel, R. G. D., Torrie, J. H., & Dickey, D. A. (1997). Principles and procedures of statistics: A biometrical approach (3rd ed). McGraw-Hill. ISBN: 978-0-07-061028-6

Sulistiyan, T. R., & Meliah, S. (2017). *Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Endophytic Bacteria Associated with Sweet Sorghum*.

Taghinasab, M., & Jabaji, S. (2020). *Cannabis Microbiome and the Role of Endophytes in Modulating the Production of Secondary Metabolites: An Overview*.

Templeton, G. F. (2011). A two-step approach for transforming continuous variables to normal: Implications and recommendations for IS research. *CAIS*, 28(1), 41–58.

Tukey, John W.: *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley Publishing Company Reading, Mass. — Menlo Park, Cal., London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney 1977, XVI, 688 S. *Biometrical Journal*, 23(4), 413–414.

Zhao, Y., Ding, W.-J., Xu, L., & Sun, J.-Q. (2024). A comprehensive comparative genomic analysis revealed that plant growth promoting traits are ubiquitous in strains of *Stenotrophomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1395477.