

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

JULIA MARCELINO SOAVE

***Bacillus* spp. e a promoção de crescimento vegetal: um enfoque na
solubilização e mineralização de fosfato durante interação com
cana-de-açúcar**

Piracicaba

2023

JULIA MARCELINO SOAVE

***Bacillus* spp. e a promoção de crescimento vegetal: um enfoque na
solubilização e mineralização de fosfato durante interação com
cana-de-açúcar**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dra. Maria Carolina Quecine
Verdi**

Piracicaba

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Soave, Julia Marcelino

Bacillus spp. e a promoção de crescimento vegetal: um enfoque na solubilização e mineralização de fosfato durante interação com cana-de-açúcar / Julia Marcelino Soave; orientadora Maria Carolina Quecine Verdi. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

127 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio 2. Crescimento vegetal 3. Fertilizantes 4. Fósforo 5. Interação planta-bactéria 6. Nutrição vegetal 7. Sustentabilidade
I. Título

CDU 579.852.11 : (581.133.5 + 633.61)

Elaborada por:

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, Regina Célia e Celso por todo amor, dedicação, compreensão e por sempre apoiarem minhas decisões e meus sonhos. Aos meus irmãos Carolina e Caio, por todo carinho. Ao meu namorado Guilherme por todo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências pela possibilidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), a Silvia Mine Yokoyama e a Maria Lorena Sereno por todo apoio e incentivo a realização do curso de Mestrado.

A Professora Maria Carolina Quecine Verdi pela orientação, dedicação à minha formação e principalmente pela amizade, carinho e inspiração como professora e ser humano. É imensurável minha gratidão por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos pela ajuda nos experimentos e pelas trocas de ideias, artigos e conhecimento.

Ao técnico do Laboratório de Genética de Microrganismos Zezo e demais funcionários, pelo convívio e suporte essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do time de Ciências Regulatórias do CTC pelo amor, cuidado e parceria em todos os momentos.

Ao Wladecir por todo aprendizado e amizade. Obrigada por todo incentivo a realização do curso de Mestrado e todas as experiências proporcionadas promovendo meu crescimento profissional e pessoal.

A minha família pelo apoio e cuidado. Obrigada por sempre incentivarem meu crescimento profissional.

Aos meus pais Regina Célia e Celso pelo amor e dedicação de sempre. Vocês são meus maiores exemplos de vida, são minha alegria e base. Meu amor por vocês não consegue ser traduzido em palavras. Levo vocês em tudo que faço.

Ao meu namorado Guilherme por todo amor, apoio e cuidado. Obrigada por ter feito parte desse momento tão importante da minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

SOAVE, J. M. ***Bacillus* spp. e a promoção de crescimento vegetal**: um enfoque na solubilização e mineralização de fosfato durante interação com cana-de-açúcar. 2023. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidamente promotoras do crescimento vegetal, atuando no biocontrole de patógenos, produção de fitormônios e na aquisição de nutrientes essenciais para as plantas, como o fósforo (P). A cana-de-açúcar está entre as principais culturas produzidas no Brasil, apesar de sua relevância econômica ainda há grandes variações na produtividade dos canaviais. A utilização de bioinsumos na cultura tem aumentado progressivamente, no entanto, é notório a carência de inoculantes eficazes, sendo necessário o melhor entendimento da interação entre os microrganismos e a cultura. Assim, presente trabalho selecionou linhagens de *Bacillus* spp. promotores do crescimento vegetal por meio de diferentes bioensaios, com enfoque na seleção de linhagens elites para o uso do P. Além disso, buscou-se o maior entendimento dos mecanismos de mineralização e solubilização de fosfato, investigando bases genéticas por trás da interação bactéria-planta. Para tanto, 38 linhagens foram submetidas á ensaios *in vitro* de solubilização e mineralização de fosfato, sendo selecionadas 5 potenciais linhagens: *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *Bacillus licheniformis* MGB2281, *Bacillus altitudinis* MGB293, *Bacillus toyonensis* MGB227 e *Bacillus altitudinis* MGB25 para os verificar-se o efeito na promoção de crescimento de cana-de-açúcar quando aplicadas individualmente ou em consórcio. Inicialmente, utilizando-se solo rico em P, observou-se um efeito positivo da inoculação na atividade enzimática de fitase e fosfatase, refletindo em teores de P disponível no solo superiores em todos os tratamentos inoculados com as linhagens de *Bacillus* spp. selecionadas. Apesar destes resultados promissores, não foi possível observar o efeito de promoção de crescimento entre os tratamentos, sugerindo a sensibilidade dos mecanismos de solubilização e mineralização a altas concentrações de P disponível. Posteriormente, realizou-se o ensaio com solo pobre em P, combinando inoculação de plantas de cana-de-açúcar com a linhagem *B. licheniformis* MGB2281 e o consórcio bacteriano de *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 a adubação com fosfato natural reativo de Bayovar em três doses: 0, 90 kg/ha e 180 kg/ha de P₂O₅. Observou-se que a inoculação com a linhagem MGB2281 promoveu o crescimento de plantas aos 30 dias após o plantio, com maiores médias para altura de planta e massa seca de parte aérea. A dose de 90 kg/ha associada a inoculação com a linhagem MGB2281 e o consórcio bacteriano MGB293 + MGB227 MGB25, contribuiu para uma maior atividade da enzima fosfatase alcalina em relação ao controle sem inoculação, corroborando com os resultados encontrados nos ensaio *in vitro*. Por fim, o o *draft* genômico da linhagem *B. licheniformis* MGB2281 foi obtido e revelou um amplo repertório de genes relacionados com a disponibilização de P para planta e vias de promoção de crescimento vegetal, como a biossíntese de AIA, fixação biológica do nitrogênio (FBN), produção de sideróforos entre outros, sugerindo seu grande potencial como promotor de crescimento vegetal. Certamente, os resultados apresentados no presente trabalho, são de suma importância para a elucidação da interação nutriente-bactéria-planta contribuindo diretamente para o desenvolvimento de novos bioinsumos e o uso mais eficiente de fertilizantes, fomentando práticas agrícolas mais sustentáveis.

Palavras-chaves: *Bacillus* spp. Cana-de-açúcar. Promoção de crescimento. Fósforo

ABSTRACT

SOAVE, J. M. **Bacillus spp. as plant growth promoters**: a focus on phosphate solubilization and mineralization during interaction with sugarcane. 2023. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piraciaba, 2023.

Bacillus spp. are known plant growth promoters, acting in the biocontrol of pathogens, production of phytohormones and in the acquisition of essential nutrients for plants, such as phosphorus (P). Sugarcane is one of the main crops produced in Brazil. Despite its economic relevance, large variations in the productivity of sugarcane fields have been reported. The use of bioinoculants in culture has progressively increased, however, there is a lack of effective inoculants, requiring a better understanding of the interaction among microorganisms and culture. The present work selected strains of *Bacillus* spp. plant growth promoters through different bioassays, focusing on the selection of elite strains for the use of P. In addition, the mechanisms of phosphate mineralization and solubilization were investigated. Thus, 38 strains were evaluated *in vitro* to phosphate solubilization and mineralization. Five potential strains were selected: *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *Bacillus. licheniformis* MGB2281, *Bacillus altitudinis* MGB293, *Bacillus toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25 for the verify the effect in promoting sugarcane growth when applied individually or in consortium. Initially, using soil rich in P, a positive effect of inoculation on the enzymatic activity of phytase and phosphatase was observed, reflecting in higher levels of available P in the soil in all treatments inoculated with *Bacillus* spp. selected. Despite these promising results, it was not possible to observe the effect of promoting growth between treatments, suggesting the sensitivity of the solubilization and mineralization mechanisms to high concentrations of available P. Subsequently, the test was carried out with soil poor in P, combining inoculation of sugarcane plants with the strain *B. licheniformis* MGB2281 and the bacterial consortium of *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 a fertilization with reactive natural phosphate from Bayovar at three doses: 0, 90 kg/ha and 180 kg/ha of P₂O₅. It was observed that inoculation with the MGB2281 strain promoted plant growth 30 days after planting, with higher averages for plant height and shoot dry mass. The dose of 90 kg/ha associated with inoculation with the MGB2281 and the bacterial consortium MGB293 + MGB227 MGB25, contributed to a greater activity of the enzyme alkaline phosphatase in relation to the control without inoculation, corroborating the results found in the *in vitro* assays. Finally, the genomic draft of the *B. licheniformis* MGB2281 was assembled and revealed a wide repertoire of genes related to the availability of P to the plant and plant growth promotion pathways, such as AIA biosynthesis, biological nitrogen fixation (BNF), production of siderophores among others, suggesting its great potential as a plant growth promoter. Certainly, the results presented in the present work are important for the elucidation of the nutrient-bacteria-plant interaction, directly contributing to the development of new bioinputs and the more efficient use of fertilizers, promoting more sustainable agricultural practices.

Keywords: *Bacillus*. Sugarcane. Growth promotion. Phosphorus.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1.1. Cana-de-açúcar: aspectos históricos e econômicos.....	16
1.1.2. Fósforo: importância para plantas e dinâmica no solo.....	18
1.1.3. Bioestimulantes	20
1.1.4. O gênero <i>Bacillus</i>	22
1.1.5. Microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fosfatos	23
1.1.6. Mecanismos de solubilização e mineralização de fosfatos	24
1.1.7. Genes e vias de regulação dos mecanismos de solubilização e mineralização de fosfato: O Sistema dois componentes PhoR-PhoP e o <i>RegulonPho</i>	26
1.1.8. Genes e vias específicas de solubilização e mineralização de P	28
Referências	30
2. SELEÇÃO DE BACILLUS SPP. PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE DOS MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DE FOSFATO	38
2.1. Introdução	40
2.2. Materiais e Métodos	41
2.2.1. Seleção e caracterização das linhagens <i>Bacillus</i> spp. quanto à capacidade de solubilizar e mineralizar fosfato	41
2.2.1.1. Material Biológico	42
2.2.1.2. Bioensaio de solubilização de fosfato inorgânico	43
2.2.1.3. Bioensaios de mineralização de fosfato orgânico.....	43
2.2.1.3.1. Atividade enzimática das fitases.....	43
2.2.1.3.2. Atividade enzimática da fosfatase	44
2.2.1.4. Identificação taxonômica pelo gene 16S rRNA das linhagens de <i>Bacillus</i> selecionadas	45
2.2.1.5. Antibiose	46
2.2.1.6. Bioensaios com consórcios bacterianos	46
2.2.1.7. Bioensaio com diferentes concentrações de P solúvel	47
2.2.2. Efeito das linhagens de <i>Bacillus</i> selecionadas na promoção de crescimento de cana-de-açúcar	47
2.2.2.1. Material vegetal	48
2.2.2.2. Ensaio em casa-de-vegetação	48
2.2.2.3. Promoção de crescimento de plantas	50
2.2.2.4. Atividade enzimática do solo	50

2.2.2.5.	Fosfatase ácida e alcalina	50
2.2.2.6.	Fitase	51
2.2.2.7.	Teores de P no solo e material vegetal.....	51
2.2.2.8.	Análise Estatística	52
2.3.	Resultados	52
2.3.1.	Seleção e caracterização das linhagens quanto à capacidade de mineralizar e solubilizar fosfato	52
2.3.1.1.	Antibiose entre as linhagens selecionadas.....	55
2.3.1.2.	Efeito do consórcio das linhagens selecionadas na mineralização e solubilização de fosfato	56
2.3.1.2.1.	Solubilização do fosfato inorgânico	56
2.3.1.2.2.	Mineralização de fosfato orgânico.....	57
2.3.1.3.	Efeito do P solúvel na solubilização de fosfato	60
2.3.2.	Efeito das linhagens de <i>Bacillus</i> spp. selecionadas na promoção de crescimento de cana-de-açúcar e na dinâmica do P	61
2.3.2.1.	Promoção de crescimento de plantas	61
2.3.2.2.	Atividade enzimática do solo.....	63
2.3.2.3.	Teores de P no solo e material vegetal.....	65
2.4.	Discussão	67
3.	EFEITO DE <i>BACILLUS</i> SPP. NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR ASSOCIADO A DIFERENTES DOSES DE ADUBAÇÃO FOSFATADA	74
3.1.	Introdução.....	76
3.2.	Material e Métodos	78
3.2.1.	Material Biológico	78
3.2.2.	Material Vegetal.....	78
3.2.3.	Área experimental e preparo do solo	79
3.2.4.	Tratamentos.....	80
3.2.5.	Plantio e inoculação de cana-de-açúcar	81
3.2.6.	Promoção de crescimento de plantas	81
3.2.7.	Atividade enzimática do solo.....	82
3.2.7.1.	Fosfatases ácidas e alcalinas.....	82
3.2.7.2.	Fitase	82
3.2.8.	Teores de P no solo e material vegetal.....	83
3.2.8.1.	Frações de P no solo	83
3.2.8.2.	Análise nutricional do material vegetal	83
3.2.9.	Análise estatística dos dados	84

3.3. Resultados	84
3.3.1. Promoção do crescimento de plantas.....	84
3.3.2. Atividade enzimática do solo	86
3.3.3. Teores de P no solo e no material vegetal.....	90
3.4. Discussão	92
4. DRAFT GENÔMICO DE <i>Bacillus licheniformis</i> MGB2281 E IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL 99	
4.1. Introdução	101
4.2. Material e Métodos.....	102
4.2.1. Linhagem bacteriana.....	102
4.2.2. Extração de DNA	102
4.2.3. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma.....	102
4.2.4. Busca de genes relacionados a promoção de crescimento vegetal.....	103
4.3. Resultados	103
4.3.1. Características gerais do genoma de <i>B. licheniformis</i> MGB2281	103
4.3.2. Genes de em <i>B. licheniformis</i> MGB2281 relacionados a promoção de crescimento vegetal.....	106
4.4. Discussão	108
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (complexo *Saccharum*) é uma das principais culturas produzidas no Brasil, sendo cultivada em todo o território brasileiro (COMPANHIA NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO - CONAB, 2023). A fim de atender demandas nacionais e internacionais há uma busca constante pelo aumento de produtividade nos canaviais. Isso tem causado impactos tanto econômicos quanto ambientais, pois a produtividade agrícola ainda depende da utilização de insumos, como herbicidas, inseticidas e fertilizantes minerais, principalmente os fosfatados.

Convencionou-se a aplicação de altas doses de fertilizantes fosfatados no campo, devido a complexa dinâmica do fósforo (P) no solo, cerca de 80% do total de P aplicado via fertilizantes minerais é imobilizado ou adsorvido nos minerais de argila, tornando-se indisponível para as plantas (Holford, 1997). O uso de fontes menos solúveis, como o fosfato natural reativo (e.g. Bayovar e Marrocos) e a utilização de microrganismos solubilizadores e mineralizadores de P, vem sendo amplamente estudadas e têm se mostrado alternativas promissoras para o uso mais eficiente do nutriente (Soares et al., 2021; Rosa et al., 2020; Soltangheisi et al., 2019; Gumiere et al., 2019).

Os microrganismos solubilizadores e mineralizadores de P, estão presentes na rizosfera e participam ativamente no ciclo do P atuando como auxiliares das plantas na obtenção do nutriente. Dentre os mecanismos envolvidos na disponibilização de P para as plantas, os microrganismos atuam na conversão das formas orgânicas (Po) em inorgânicas, por meio da secreção de enzimas específicas como as fitases e as fosfatases (mineralização), e das formas inorgânicas e insolúveis (Pi) para solúveis, por meio da secreção de ácidos orgânicos (solubilização) (Rawat et al., 2020). Estima-se que dentre estes microrganismos pelo menos 50% sejam bactérias (Chen, 2006), os gêneros *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp. e *Bacillus* spp. estão entre os mais promissores (Rodríguez; Fraga, 1999; Babalola; Glick, 2012). Diferentes espécies de *Bacillus* têm sido relatadas como agentes de solubilização e mineralização de P, dentre estas destacam-se: *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (Zeng, 2018; Heilmann; Magert; Gassen, 1988; Hyun et al., 2016; Pongtharangkul et al., 2015). Em 2019, foi lançado o primeiro bioestimulante nacional composto por bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de P, o BiomaPhos® desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo. O produto tem apresentado resultados promissores para as culturas de milho, soja e cana-de-açúcar e apresenta em sua composição o *B. subtilis* (CNPMS B119) e *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) (CNPMS B2084).

A ativação dos mecanismos de solubilização e mineralização de P é controlada por sistemas complexos de regulação que envolvem transdução de sinais e expressão de genes específicos. O uso de ferramentas moleculares como o sequenciamento genômico, possibilitou a identificação de alguns destes genes e vias, sendo fundamentais para a elucidação da interação nutriente-bactéria-plantas. Apesar da relevância de analisar tais mecanismos sob uma perspectiva genômica, a maioria dos estudos têm se concentrado apenas no isolamento, identificação (gene 16S rRNA) e verificação da solubilização e/ou mineralização através de técnicas bioquímicas (Santos-Torres, 2021).

Diante do exposto, a hipótese inicial da presente dissertação considerou a capacidade das linhagens de *Bacillus* spp. atuarem como promotoras do crescimento vegetal por meio da disponibilização de P. Além de investigar o efeito sinérgico da formação de consórcios bacterianos na solubilização e mineralização de P, o funcionamento desses mecanismos e a base genética por trás de cada um.

O objetivo principal foi investigar a nível molecular o papel de linhagens *Bacillus* spp. como promotoras de crescimento vegetal por meio de diferentes mecanismos, com enfoque na otimização do uso de P. Assim, o presente projeto foi dividido em 3 capítulos com os objetivos: i) selecionar e identificar potenciais linhagens de *Bacillus* spp. capazes de solubilizar e mineralizar fosfato *in vitro* e verificar o efeito da inoculação dessas bactérias isoladas e/ou formando consórcios na promoção de crescimento da cana-de-açúcar em casa-de-vegetação em solo rico em P, ii) verificar o efeito na promoção de crescimento da cana-de-açúcar por meio da associação entre a inoculação com bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato e diferentes doses P_2O_5 utilizando como fonte de P o fosfato natural reativo de Bayovar em casa-de-vegetação utilizando um solo pobre em P e finalmente iii) realizar a análise genômica de uma linhagem elite de *Bacillus* selecionada, com foco nos genes e vias envolvidas na promoção do crescimento de plantas, principalmente os relacionados ao ciclo de P.

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. Cana-de-açúcar: aspectos históricos e econômicos

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea, pertencente à família Poaceae e gênero *Saccharum*. Esse gênero tradicionalmente compreende seis espécies: *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi* e *S. sinense*, compondo o “complexo

Saccharum” (OECD, 2016), sendo que a cana-de-açúcar cultivada comercialmente corresponde a um híbrido multiespecífico, denominado *Saccharum* sp.

Acredita-se que o centro de origem de cana-de-açúcar seja em Nova Guiné, no Pacífico (Aitken; Jackson; McIntyre, 2006), e que, seguindo as rotas de migração, chegou ao Sudeste Asiático e Índia, hibridizando-se com outras espécies. A hibridização interespecífica ao longo do tempo aumentou o alcance geográfico de produção de cana-de-açúcar (Berville et al., 2005), permitindo seu cultivo em mais de 110 países em todos os continentes do mundo (ISO, 2019).

A história da cana-de-açúcar no Brasil iniciou-se no século XVI, no período colonial (Rodrigues; Ross, 2020). Por ser uma gramínea tropical, adaptou-se extremamente bem às condições edafoclimáticas do país, o que tem lhe assegurado o título de maior produtor mundial de cana-de-açúcar nos últimos anos, com uma produção estimada de 757.116.855 toneladas no ano de 2020 (FAO, 2020). Atualmente, a cana-de-açúcar é cultivada em todo território brasileiro, com principal área de produção na região sudeste. Na safra 22/23, a área cultivada totalizou 8.288,9 mil hectares, sendo o estado de São Paulo responsável por aproximadamente 50 % da área colhida (CONAB, 2023).

A cana-de-açúcar pode ser definida como uma cultura de alto aproveitamento. É a principal matéria-prima na produção do açúcar e etanol. Os subprodutos da indústria sucroenergética, como o bagaço, vinhaça e torta de filtro, também podem ser utilizados para diferentes propósitos: na composição de ração animal, para a geração de energia, para produção de bioplástico, biocombustíveis e fertilizantes. Assim, obtém-se produtos de grande importância socioeconômica do começo ao fim da cadeia produtiva (Bordonal et al., 2018).

Apesar do potencial de produção e da relevância econômica da indústria sucroenergética para o país, o setor ainda carece de tecnologias que proporcionem o aumento da produtividade e a diminuição do custo de produção. Quando comparado com outras monoculturas (e.g.; soja, milho, café), o custo de produção de cana-de-açúcar é considerado alto. O custo de formação de um canavial na região Centro-Sul tem variado de R\$ 8.758,00 a R\$ 12.905,00 por hectare (Instituto Pecege - PECEGE, 2020).

Os insumos representam um dos principais fatores responsáveis pelo acréscimo no custo de produção, representando aproximadamente 35% dos custos operacionais totais. Dentre esses, os fertilizantes recebem destaque, uma vez que cerca de 40% das reservas destinadas aos insumos são direcionadas aos fertilizantes, representando uma parcela significativa no caixa do produtor (PECEGE, 2020).

Com isso, há grande necessidade de uso mais eficiente dos fertilizantes por meio de alternativas que considerem o comportamento dos nutrientes na relação solo-planta, principalmente quanto ao P, que é o elemento químico que apresenta o menor teor de aproveitamento pelas plantas dentre os macronutrientes por possuir uma dinâmica complexa no solo (Pavinato et al., 2020).

1.1.2. Fósforo: importância para plantas e dinâmica no solo

O fósforo (P) é um dos macronutrientes limitante para o desenvolvimento das plantas, influenciando diretamente a produtividade dos sistemas agrícolas (Holford, 1997). Além de compor algumas estruturas celulares, desempenha um papel importante em diversos processos metabólicos e vitais para as plantas como na divisão celular, geração de energia, biossíntese de macromoléculas, manutenção da integridade da membrana, transdução de sinais, fotossíntese e respiração celular (Rawat et al., 2020). Também está envolvido nos processos de germinação, emissão de raízes e na iniciação da fase reprodutiva das plantas, desde a formação das flores ao desenvolvimento de sementes e maturação dos frutos (Krishnaraj; Dahale, 2014).

Para a cultura da cana-de-açúcar, o P é essencial para a obtenção de produtividade final e rendimento de açúcar, influenciando diretamente no crescimento de raízes e número de perfilhos (Santos et al., 2009). Além dos benefícios fenotípicos e estruturais para a planta, o P também é importante para as características tecnológicas, qualidade e processamento da cana-de-açúcar, influenciando a porcentagem aparente de sacarose e pureza do caldo (Simões Neto et al., 2009), uma vez que a sacarose é um dissacarídeo formado pela união de glucose-1-fostato e frutose (Alexander, 1973). Também é fundamental para a etapa de clarificação durante a produção de açúcar, tornando desnecessária a adição de fosfatos solúveis, o que por sua vez proporciona um bioprocessamento mais eficiente e com custo operacional menor. Caldos com baixo teor de P são de difícil floculação, prejudicando o processo de eliminação das impurezas e gerando açúcar de pior qualidade, conseqüentemente com menor valor econômico agregado (Mahadevaiah et al., 2007).

As plantas absorvem o P do solo por meio de duas formas principais, como H_2PO_4^- (ortofosfato biácido), um ânion monovalente, ou como HPO_4^{2-} (ortofosfato monoácido), um ânion bivalente. Essas duas formas solúveis de P estão disponíveis naturalmente na solução do solo. A solução do solo é a fração que possui a menor concentração de P. Isso ocorre devido às propriedades intrínsecas do solo e à alta reatividade de P, que tende à imobilização, precipitação ou complexação, fixando-se nas frações sólidas do solo, denominadas como fração de P na

forma lábil e fração de P na forma não lábil. O P lábil está fracamente ligado aos minerais do solo e à matéria orgânica, sendo considerado a fração mais disponível para as plantas. O P não lábil está fortemente adsorvido ou precipitado em compostos insolúveis. A concentração de P na camada superficial do solo geralmente é de 50 a 3.000 mg.kg⁻¹ de solo, mas apenas 0,1% do P total está disponível para absorção pelas plantas (Rawat et al., 2020).

A dinâmica do P na solução do solo consiste em manter o equilíbrio químico entre a fração de P lábil e a solução do solo. Ao absorverem o P da solução, as raízes geram um desequilíbrio, com queda na concentração de P na solução do solo, sinalizando a necessidade de reabastecimento a partir da reserva de P lábil disponível no solo (Holford, 1997). A disponibilidade de P solúvel depende diretamente das propriedades físicas e químicas do solo, como o teor de argila, matéria orgânica, pH, concentrações de ferro (Fe), alumínio (Al) e cálcio (Ca) e força iônica. Além das propriedades do solo, há reações que controlam as quantidades de P na solução do solo, como a dissolução/precipitação de minerais carreadores de P, adsorção do fosfato nas superfícies do solo e a hidrólise da matéria orgânica (Holford, 1997; Malavolta, 2006).

O uso não criterioso de fertilizantes fosfatados e a falta de manejo correto do solo vêm alimentando reservatórios de P imobilizado nos solos (Richardson e Simpson, 2011). Segundo Pavinato et al. (2020), o Brasil acumulou durante 50 anos em seus reservatórios aproximadamente 33,4 Tg de P, que estão distribuídos de maneira bastante uniforme por todas as áreas de cultivo do país. Em valor monetário, isso representa uma estimativa de US\$ 22 bilhões acumulados em áreas de cultivo, considerando o preço internacional da rocha fosfática de US\$ 86 t⁻¹. Os maiores reservatórios de P nos solos do Brasil estão predominantemente nos estados de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e norte do Paraná (PR), bem como em algumas áreas nos estados do Espírito Santo (ES) e Goiás (GO).

Nesse cenário, há uma demanda urgente por estratégias alternativas, visando economia e sustentabilidade para o uso eficiente do P, explorando o potencial das reservas formadas nas áreas de produção agrícola. Pavinato et al. (2020) apresentaram diversas estratégias de manejo com este objetivo, incluindo a realização de calagem visando o aumento do pH do solo, a rotação de culturas e o uso de consórcios e culturas de cobertura. Além dessas, outras práticas que vem sendo amplamente estudadas são o uso de fontes menos solúveis de P, como o fosfato natural reativo (e.g. Bayovar e Marrocos) e fontes orgânicas como a torta de filtro, assim como a utilização de bioestimulantes compostos por microrganismos solubilizadores e mineralizadores de P (Soares et al., 2021; Rosa et al., 2020; Soltangheisi et al., 2019; Gumiere et al., 2019).

1.1.3. Bioestimulantes

Bioestimulantes vegetais são produtos compostos por substância(s) e/ou microrganismo(s) cuja função é estimular processos naturais benéficos as plantas como: a captação e o uso de nutrientes, a tolerância à estresses abióticos, a humificação e/ou a degradação de compostos orgânicos no solo. Proporcionando uma melhora no desenvolvimento e qualidade das culturas, sendo a sua utilização considerada uma prática sustentável na produção de alimentos (Ricci et al., 2019).

Estimulada pela conscientização do impacto negativo na saúde ambiental e humana causado pela agricultura convencional, há uma grande tendência mundial à adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis (Ramakrishna; Yadav; Li, 2019). Nesse contexto, o uso de bioestimulantes têm se destacado. O mercado global de bioestimulantes atingiu um valor de US\$ 2,38 bilhões em 2021, e, espera-se que até 2027 atinja US\$ 4,55 bilhões, exibindo uma taxa de crescimento anual de 11,48% durante o período de 2022 a 2027 (IMARC Group, 2022). O mercado europeu de bioestimulantes representa cerca de metade do mercado global, com estimativas do valor de US\$ 1,5-2 bilhões em 2022 (European Biostimulants Industry Council - EBIC, 2022). Os fatores que impulsionam esse crescimento contínuo são múltiplos, como o desenvolvimento de produtos direcionados à necessidades agrônômicas específicas, atraindo assim mais produtores; necessidade de promover o uso mais eficiente de produtos químicos sintéticos e fertilizantes minerais, devido à volatilidade dos preços; a frequência crescente de condições ambientais adversas para o crescimento e a produtividade das culturas, além de demandas dos consumidores por produtos alimentares saudáveis, com menores impactos ambientais (Rouphael; Colla, 2018; EBIC, 2022).

Os bioestimulantes bacterianos são compostos por bactérias capazes de promover o crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos, atuam diretamente no desenvolvimento da planta, facilitando a aquisição de nutrientes, através da fixação do nitrogênio, solubilização e mineralização de fosfatos e do sequestro de ferro por sideróforos bacterianos, e/ou, pela produção e modulação de fitormônios indutores de crescimento, como o ácido indol acético (AIA) e a enzima ACC deminase, responsável por reduzir a produção de etileno em situações de estresse vegetal. Os mecanismos indiretos, são mecanismos de biocontrole, atuando na proteção das plantas contra a ação de patógenos, reduzindo os efeitos inibitórios no desenvolvimento vegetal, através da competição por nutrientes, exclusão de nicho, resistência sistêmica induzida e produção de metabólitos

antifúngicos, conforme ilustrado na Figura 1 (Batista et al., 2018; Olanrewaju; Glick; Babalola, 2017; Ahemad; Kibret, 2014; Quecine et al., 2012).

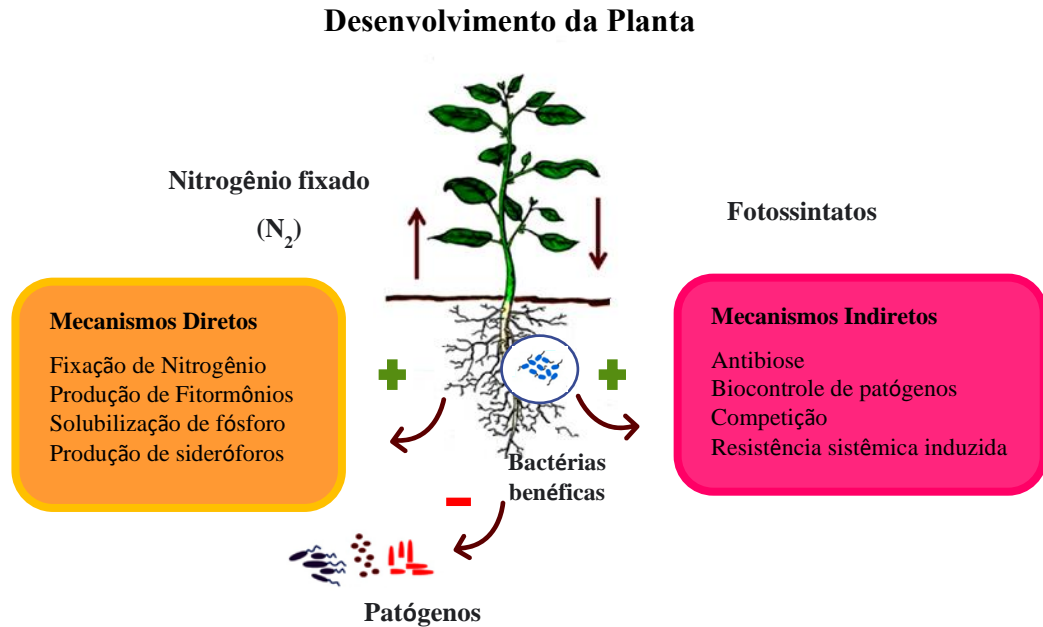


Figura 1. Mecanismos diretos e indiretos de bactérias promotoras de crescimento. Fonte: Adaptado de Chandran et al., 2021.

Muitas empresas têm buscado o desenvolvimento de produtos compostos por uma única bactéria capaz de realizar diferentes mecanismos ou por um consórcio de bactérias, com o objetivo de complementação ou de potencialização de ações específicas para a promoção do crescimento vegetal. Atualmente, dentre os mecanismos de promoção que tem se destacado, estão os de mineralização e solubilização de fosfato no solo.

Apesar do mercado crescente e promissor, ainda existem algumas preocupações associadas à produção, manutenção e disseminação dos bioestimulantes microbianos (Bharti; Suryavanshi, 2021). Alguns dos desafios encontrados são: (a) a seleção e cultivo em escala industrial de linhagens potenciais, que além de possuírem características de interesse, precisam ser cultivadas em grande escala sem sofrer contaminação ou perda de viabilidade ao longo do processo; (b) o desenvolvimento de formulações, que devem assegurar a qualidade e uma maior vida útil do produto e (c) a consistência de resultados em condições de campo, etapa que desperta muitos questionamentos sobre a real eficácia desse tipo de produto, uma vez que a linhagem escolhida deve resistir as diversas condições ambientais e à competição da população

microbiana nativa de diferentes solos (Bharti; Suryavanshi, 2021; Dasgupta et al., 2021; Maan; Garcha, 2021).

1.1.4. O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus*, pertence ao filo Bacillota, à família Bacillaceae e é heterogêneo, tanto geneticamente quanto fenotipicamente, apresentando diferentes tipos de sistema respiratório (aeróbias ou anaeróbias facultativas), metabolismo de açúcares, composição da parede celular, entre outras características (Bernardo, 2020).

São bactérias Gram-positivas, com forma de bastonete e fácil capacidade de esporulação. Seus esporos recebem o nome de endósporos, estruturas altamente estáveis, capazes de manterem-se viáveis mesmo em condições extremas, como na ausência de nutrientes e em ambientes desfavoráveis (Bahadir; Liaqat; Eltem, 2018).

Apresentam diversas habilidades fisiológicas, podendo ser considerados em alguns casos microrganismos extremófilos. Os *Bacillus* podem possuir características de resistência, havendo linhagens intolerantes a ambientes salinos e linhagens halofílicas, também podem variar entre psicrófilos a termofílicos e de acidofílicos para alcalifílicos (Bernardo, 2020). Essas habilidades, somadas a capacidade de produzir metabólitos com efeitos antagônicos para outros microrganismos possibilitam a sobrevivência dos *Bacillus* em diferentes tipos de ambientes, como no solo, onde geralmente são encontrados (Amin et al., 2015).

Devida a sua versatilidade, os *Bacillus* têm se mostrado um grupo de microrganismos de grande importância para a agricultura, atuando na prevenção e controle de doenças causadas por patógenos, e como promotores do crescimento vegetal, através da produção de fitormônios indutores de crescimento (AIA e a ACC deminase) e como um facilitador na aquisição de nutrientes essenciais para a sobrevivência e produtividade das culturas (Oliveira et al., 2020).

Atualmente existem diversos produtos comerciais a base de *Bacillus* spp., por exemplo: Kodiak® (*B. subtilis* GB03), Rhizovital® (*B. amyloliquefaciens* FZB42), Ballad® (*B. pumilus* QST2808), Subtilex® (*B. subtilis* MBI 600) e outros (Bettiol et al., 2012). Em 2019, foi lançado o primeiro bioestimulante nacional composto por bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de P, o BiomaPhos® que foi desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo. O produto tem em sua composição duas linhagens de *Bacillus*, o *B. subtilis* (CNPMS B119) e *B. megaterium* (CNPMS B2084) e é recomendado para as culturas de milho e soja. Os resultados são promissores, em ensaios de campo realizados com as duas culturas nas principais regiões produtoras do Brasil (BA, MT, MS, GO, MG, PR, SC e RS) a aplicação do produto resultou em um ganho médio de

produção de 8,6% na cultura do milho e de 6,3% na cultura da soja (Oliveira et al., 2020). As linhagens de *Bacillus* (CNPMS B119 e CNPMS B2084) foram testadas para a cultura da cana-de-açúcar e os resultados apresentados também foram positivos. Em ensaio de campo a aplicação do bioestimulante associada a doses variáveis de adubação fosfatada, resultou no aumento significativo dos parâmetros de TCH (Toneladas de Cana por Hectare) e TAH (Toneladas de Açúcar por Hectare) com 50% da dose recomendada de adubação (Cançado et al., 2021).

1.1.5. Microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fosfatos

Os microrganismos representam aproximadamente de 60% a 80% da fração viva da matéria orgânica do solo (Mendes; Reis Junior, 2003). Participam ativamente nos processos de formação e estruturação do solo, biorremediação de poluentes e metais pesados, formação da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. Além disso, alguns grupos são capazes de estabelecer relações simbióticas (*e.g.*, interações entre plantas, bactérias e fungos micorrízicos), realizando processos de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e proporcionando melhores condições de absorção de nutrientes pelas raízes.

Microrganismos presentes na rizosfera participam ativamente no ciclo do fósforo (P) auxiliando as plantas na obtenção do nutriente através de diferentes formas como: as associações simbióticas mutualísticas com fungos micorrízicos, resultando na extensão do sistema radicular; a produção de fitohormônios, estimulando o crescimento de raízes laterais e pêlos radiculares e através dos mecanismos de mineralização e solubilização de P (Mendes; Reis Junior, 2003). Esses mecanismos específicos convertem as formas orgânicas de P (Po) em inorgânicas (mineralização) e as formas inorgânicas e insolúveis de P (Pi) para solúveis (solubilização), tornando o P presente no solo disponível para as plantas (Rawat et al., 2020). Tais microrganismos são denominados de solubilizadores de fosfato e mineralizadores de fosfato e correspondem à três grupos distintos: bactérias, fungos e actinomicetos (Krishnaraj; Dahale, 2014). Estima-se que dentre os microrganismos capazes de solubilizar e mineralizar fosfato, 50% sejam bactérias (Chen, 2006). Os gêneros *Pseudomonas.*, *Agrobacterium.* e *Bacillus* estão entre os mais promissores (Rodríguez; Fraga, 1999; Babalola; Glick, 2012).

1.1.6. Mecanismos de solubilização e mineralização de fosfatos em bactérias

As bactérias apresentam mecanismos que promovem a disponibilização de fósforo (P) a partir das diferentes formas presentes no solo, o P inorgânico (Pi) e o P orgânico (Po) (Figura 2). Os mecanismos envolvidos na liberação a partir de uma fonte inorgânica, recebem o nome de solubilizadores. Dentre os mecanismos destinados à solubilização do Pi (e.g. Fe-P, Al-P e Ca-P) estão a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos, produção de exopolissacarídeo e de sideróforos. Os mecanismos envolvidos na liberação de P a partir de uma fonte orgânica recebem o nome de mineralizadores e dentre eles estão a produção das enzimas fosfatases, fitases, fosfonatases e C-P liases (Rawat et al., 2020; Behera, 2013).

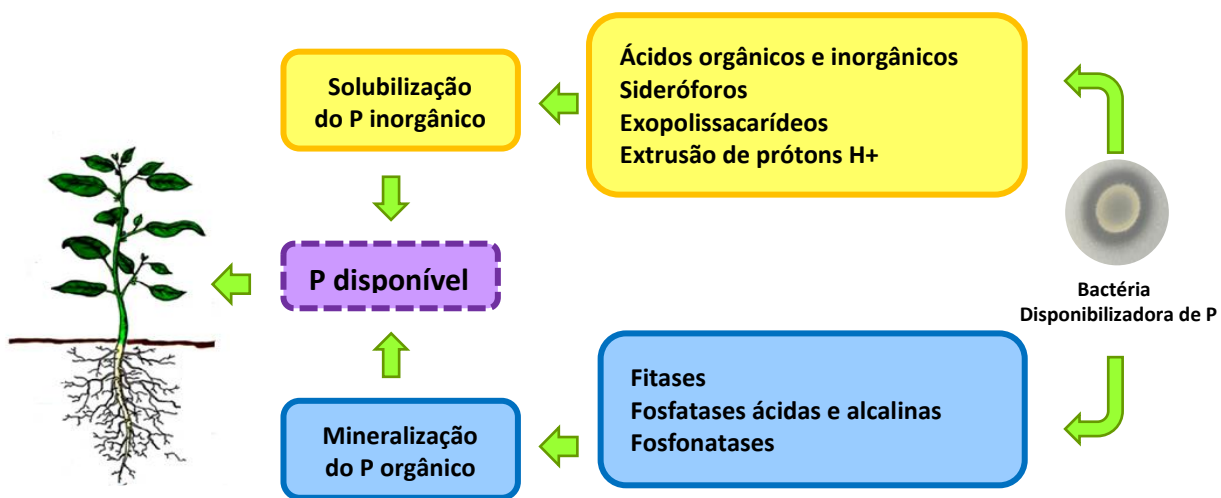


Figura 2. Mecanismos de solubilização e mineralização do fósforo. Fonte: Adaptado de Rawat et al., 2020.

O principal e mais eficiente mecanismo de solubilização de Pi é a liberação de ácidos orgânicos, metabólitos das atividades vitais dos microrganismos. Dentre as principais vias metabólicas relacionadas à liberação de ácidos orgânicos estão a fermentação, respiração e a oxidação de moléculas orgânicas, como a glicose (Rawat et al., 2020). As formas pelas quais os ácidos orgânicos conseguem solubilizar o Pi envolvem a quelação de cátions ligados ao P, redução do pH e complexação com íons metálicos (Fe e Al) ligados ao P (Kishore; Pindi; Reddy, 2015). Os tipos e as quantidades de ácidos orgânicos produzidos variam de acordo com o microrganismo. A quantidade de P liberado também dependerá do tipo e força iônica do ácido. Entre os ácidos comumente produzidos estão o ácido cítrico, ácido glucônico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fórmico, ácido acético e láctico (Krishnara; Dahale, 2014; Gyaneshwar et al., 2002; Santos-Torres et al., 2021).

O ácido 2-ceto glucônico e o ácido glucônico são os principais ácidos secretados por microrganismos solubilizadores de P (Duebel; Gransee; Merbach, 2000), sendo predominantes em bactérias Gram-negativas. Esses ácidos são liberados por meio da via de oxidação direta da glicose. A via se inicia com a oxidação de glicose a ácido glucônico pela enzima glicose desidrogenase e é finalizada com a oxidação do ácido glucônico à ácido 2-ceto glucônico (Goldstein, 1995).

Entre os outros mecanismos de solubilização, estão também a produção de ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido carbônico. Estes ácidos solubilizam via acidificação do meio e a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), subproduto metabólico da decomposição da matéria orgânica por bactérias acidofílicas e oxidantes de enxofre. Ao reagir, com o fosfato férrico ($FePO_4$) forma o sulfato ferroso ($FeSO_4$) liberando o P para solução do solo (Florentino et al., 2016).

A produção de exopolissacarídeos e de sideróforos também estão envolvidos no processo de solubilização de P (Sutherland, 2001; Collavino et al., 2010). Ambos atuam como complexantes de íons metálicos, quebrando as ligações de elementos metálicos com o P, tornando o dessa forma disponível. Os exopolissacarídeos complexam íons metálicos em geral (Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} e K^+) e os sideróforos tem afinidades apenas com os íons férricos (Birch; Bachofen, 1990; Ochoa-Loza; Artiola; Maier, 2001).

Outro mecanismo conhecido é a extrusão de prótons H^+ , resultante da síntese de aminoácidos nas células. O amônio (NH_4^+) é assimilado pelos microrganismos para a síntese de aminoácidos e no interior celular é convertido em amônia (NH_3), liberando prótons H^+ . O excesso de H^+ gerado é liberado no citoplasma da célula, acidificando o meio extracelular solubilizando P (Gaind, 2016; Parks et al., 1990).

A mineralização de Po por microrganismos ocorre por meio da produção de enzimas específicas, as fosfatases, fitases, fosfonatases e C-P liases (Rawat et al., 2020; Behera, 2013). As enzimas fosfatases também são conhecidas como fosfomonoesterases, que são catalizadoras da desfosforilação de fosfoésteres ou ligações fosfoanidrido na matéria orgânica, sendo capazes de hidrolisar cerca de 90% do Po total no solo, tornando-o disponível para as plantas (Jarosch et al., 2015). Essas enzimas são categorizadas com base no pH ótimo em: fosfatases ácidas (pH <6) e alcalinas (pH > 7) (Nannipieri et al., 2011). Singh e Banik (2019) concluíram que a presença de fosfatases alcalinas produzidas por *B. licheniformis* MTCC 2312 no solo melhoraram o teor de P percentual na raiz e no caule de milho em 2,35 e 1,76 vezes, respectivamente.

A enzima fitase é uma das fosfatases responsáveis pela hidrólise sequencial do fitato em uma série de derivados de fosfato de mioinositol e fosfato inorgânico (Singh; Reddy, 2011). O fitato é o principal componente das formas orgânicas de P no solo (Rodríguez et al., 2006). No entanto, a capacidade das plantas de obterem P diretamente do fitato é muito limitada, sendo essencial a ação das fitases no solo. A inoculação com bactérias produtoras de fitase em plantações de cereais resultou em maior absorção de P sem o uso de fertilizantes (Martinez et al., 2015). Em estudo sobre a produção de fitases com linhagens elite de *Pseudomonas corrugata* SP77 e *Serratia liquefaciens* LR88, Zineb et al. (2020) verificou que ambas apresentaram atividade da enzima fitase de até 23,02 e 24,84 U mL⁻¹, respectivamente, com eficiência de mineralização de P melhorada de até 714,96 e 306,74 µgmL⁻¹, respectivamente.

As fosfonatases e carbono-fósforo (C-P) liases representam uma classe de enzimas que catalisam a clivagem da ligação C-P dos organofosforados, melhorando a disponibilidade de P para as plantas (Rodríguez et al., 2006). Contudo, não há evidências muito significativas de mineralização do Po por meio de liases, dada a sua baixa atividade em decorrência da baixa disponibilidade de substratos no solo (Selvapandiyan; Bhatnagar, 1994). A atividade da C-P liase é relatada em bactérias mineralizadoras de fosfato, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Rhizobium* e *Burkholderia* (Teng et al., 2019; Vazquez et al., 2000), e em fungos endofíticos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Piriformospora* e *Curvularia* (Mehta et al., 2019).

A ativação dos mecanismos mencionados acima é controlada por sistemas complexos de regulação que envolvem transdução de sinais e expressão de genes específicos. Nesse sentido, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos moleculares por trás das vias de solubilização e mineralização de fosfato.

1.1.7. Genes e vias de regulação dos mecanismos de solubilização e mineralização de fosfato: O Sistema dois componentes PhoR-PhoP e o *RegulonPho*

Para os microrganismos, a obtenção de P é também um desafio, principalmente para os que habitam o solo, pois trata-se de ambiente com condições nutricionais extremamente variáveis, além da presença de um grande número de diferentes espécies, desencadeando competição por nutrientes. Além disso, a maior concentração de P encontra-se na forma insolúvel no solo, não estando prontamente disponível para absorção pelos organismos (Devine, 2018). No entanto, uma das características mais importantes dos microrganismos é a alta capacidade de se adaptarem às condições não favoráveis do ambiente. Essa particularidade

resultou no desenvolvimento de diversos mecanismos de percepção da presença e obtenção de nutrientes, garantindo o suprimento adequado para sua sobrevivência. Nas bactérias, esses mecanismos são controlados por um sistema de transdução de sinais, que recebem o nome de sistema de dois componentes (Beneit, 2015).

O sistema de dois componentes é um dos meios mais comuns pelos quais as bactérias percebem, respondem e se adaptam às mudanças no ambiente intra ou extracelular. Funciona como um mediador de resposta a diferentes estímulos e sinais como, por exemplo, a presença ou a ausência de P no meio (Laub; Goulian, 2007). A maioria das espécies bacterianas apresenta diversos tipos de sistemas de dois componentes, que atuam como reguladores do metabolismo, da motilidade e de alguns processos específicos, como a virulência (Gao; Stock, 2009). São assim denominados porque compreendem dois componentes (proteínas), uma histidina quinase que é o receptor de sinal específico e um regulador de resposta. Ao detectar um sinal, a histidina quinase o encaminha ao regulador de resposta, que é responsável por desencadear uma resposta celular. A transdução de sinal envolve reação de fosfotransferência, em que a histidina quinase se autofosforila, liberando um grupo fosforil de alta energia que é transferido para o regulador de resposta (Capra; Laub, 2012). No caso da regulação e homeostase do P, as proteínas que integram o sistema de dois componentes possuem diferentes nomes de acordo com o tipo de bactéria, PhoR – PhoB para *E. coli* (Tommassen et al., 1982), PnpR – PnpS para *Streptococcus pneumoniae* (Novak et al., 1999) e PhoR – PhoP para *Bacillus subtilis* (Hulett et al., 1994). Em *Bacillus*, o PhoR é a histidina quinase e sua atividade é responsiva à disponibilidade de fosfato no meio. Como está localizada no periplasma (parte interna da célula), realiza a detecção de P com o auxílio de transportadores específicos de fosfato (Pit e Pst) e através do domínio Per-Arnt-Sim (PAS), um sensor molecular, que atua como uma ponte de ligação entre PhoR e a membrana citoplasmática (Stock; Ninfa; Stock, 1989; Devine, 2018). Ao detectar a falta de fosfato, imediatamente PhoR se autofosforila e fosforila a proteína PhoP (regulador de resposta), o sinal é transmitido e o *regulon* Pho é ativado.

O *regulon* de fosfato (Pho) é um mecanismo regulatório bacteriano de fosfato inorgânico (Pi), caracterizado pela primeira vez em *E. coli* e, posteriormente, em muitas outras espécies bacterianas (Wanner; Chang, 1987). Quando PhoP (regulador de resposta) é fosforilado, torna-se capaz de ligar-se à sequências específicas de DNA e ativar ou reprimir a transcrição de genes que compõem o *regulon* Pho. Essas sequências específicas são denominadas boxes Pho (Stock; Ninfa; Stock, 1989; Blanco et al., 2002).

A ativação de genes pelo *regulon* Pho está relacionada à ativação direta ou indireta de uma série de mecanismos voltados para a obtenção de P pela bactéria. Estes mecanismos

envolvem a produção de enzimas extracelulares (fosfatases e fitases), capazes de obter Pi a partir de fosfatos orgânicos, transportadores específicos de Pi, enzimas envolvidas no armazenamento do nutriente, além de outros mecanismos conhecidos (Beneit, 2015).

1.1.8. Genes e vias específicas de solubilização e mineralização de P

A evolução das técnicas de sequenciamento e das ferramentas de bioinformática, tem permitido a elucidação dos mecanismos associados à solubilização e a mineralização de P. A partir de técnicas de sequenciamento genômico, tornou-se possível a caracterização estrutural e funcional dos microrganismos, permitindo a comparação entre genomas e a identificação de genes específicos e vias relacionadas ao ciclo do P nas bactérias (Krishnaraj; Dahale, 2014).

O principal mecanismo de solubilização de Pi é por meio da produção de ácidos orgânicos. O ácido glucônico é um dos mais conhecido (Duebel; Gransee; Merbach, 2000), produzido pela via de oxidação direta da glicose a ácido glucônico (*gad*) pela enzima glicose desidrogenase. Essa enzima é codificada pelo gene *gcd*, e possui como cofator a pirroloquinolina quinona (PQQ), uma molécula redox codificada pelo operon *pqq*, que consiste nos genes centrais *pqq A, B, C, D, E e F* (Wan et al., 2020).

Os genes relacionados à via de produção de ácido glutâmico foram identificados na anotação de diferentes genomas bacterianos. Os genes *gcdA e gcdB* da enzima glicose desidrogenase foram encontrados em diferentes espécies de *Bacillus* como *B.cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis e B. amyloliquefaciens* (Zeng, 2018; Heilmann; Magert; Gassen, 1988; Hyun et al., 2016; Pongtharangkul et al., 2015).

Em outras espécies de bactérias, além do gene da enzima glicose desidrogenase foi identificado o gene *pqq* do cofator pirroloquinolina quinona. A análise do genoma da *Cronobacter muytjensii* JZ38 revelou a presença dos genes *pqqB, pqqC, pqqD, pqqE e pqqF*, não encontrando apenas o *ppqA* (Eida et al, 2020). O gene também pôde ser encontrado na anotação dos genomas de *Rhizobium sp. e Herbaspirillum sp.* indicando que as linhagens testadas possuíam potencial para solubilização de P (Santos-Torres et al., 2021).

Os mesmos autores identificaram genes envolvidos na produção de outros tipos de ácidos orgânicos, como os genes *aoxA e oahA*, constituintes das vias *arsenito oxidase e oxaloacetase*, respectivamente, responsáveis pela produção de ácido oxálico, também foram encontrados os genes *ldh, ald2 e fdh*, constituintes das vias dependentes da L-lactato desidrogenase, aldeído desidrogenase e formato desidrogenases, responsáveis pela produção dos ácidos láctico, acético e fórmico, respectivamente. Batista et al. (2016) também identificou

o gene *ldh* relacionado a produção de ácido láctico e os genes *idh* e *sdh*, codificadores das enzimas isocitrato desidrogenase e succinato desidrogenase participantes do ciclo do ácido cítrico no genoma do *B. thuringiensis*. RZ2MS9.

Os mecanismos responsáveis pela mineralização de Po no solo possuem sua base genética bem conhecida. Estudos demonstram que a produção de enzimas como as fosfatases, fitases e as fosfonatases se inicia por meio da transmissão de sinais pelo sistema de dois componentes PhoR – PhoP ao *regulon* Pho.

O *regulon* Pho é um mecanismo regulatório bacteriano que controla a homeostase de fósforo com base na ativação ou repressão de vários genes (Luz et al., 2012). Dentre os genes constituintes estão os responsáveis pelo início do processo com a ativação do *regulon* Pho em resposta à privação de P: *phoU*, *phoR* e *phoB* (Lamarche et al., 2008), os envolvidos com a produção da fosfatase ácida: *olpA*, *acpA*, *phoC*, *napA*, *napD* e *napE* (Zhu et al., 2019; Thaller et al., 1994; Reilly et al., 1996; Deng, et al., 1998, 2001); fosfatase alcalina: *phoD*, *phoA*, *phoX*, (Huang et al., 2009; Santos-Torres et al., 2021), e das fitases, fosfonatases e CP liases, *appA*, *phnX* e *phnJ*, respectivamente (Santos-Torres et al., 2021; Rodríguez et al., 2006; Alori; Glick; Babalola, 2017).

Diferentes espécies de *Bacillus* apresentaram genes relacionados à mineralização do P no seu genoma. Os genes participantes da via de produção da enzima fosfatase alcalina *phoD* e *phoA*, foram identificados nos genomas de *B. megaterium* STB1 e *B. velezensis* K1 (Nascimento et al., 2020; Nanjani et al., 2022). Além desses também foram identificados os genes *phoP*, *phoH* e *phoR* em *B. subtilis* e *B. velezensis* (Olanrewaju, et al., 2021).

Outros genes envolvidos no ciclo do P nas bactérias são os dos transportadores específicos de fósforo (Pit e Pst) componentes do sistema PhoR – PhoP. Os genes *pst* em *E. coli* formam um operon organizado na ordem *pstS*, *pstC*, *pstA* e *pstB* (Zeng, 2018), o operon *pstSCAB*. Assim como outros genes componentes do sistema PhoR – PhoP, os genes do operon *pstSCAB* foram anotados nos genomas de *B. cereus* e *B. megaterium* STB1 (Nascimento et al., 2020; Zeng, 2018).

Apesar dos avanços na utilização de ferramentas moleculares, a grande maioria dos estudos com bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de fósforo, têm se concentrado apenas no isolamento, identificação (gene 16S rRNA) e verificação da solubilização e/ou mineralização através de técnicas bioquímicas. Poucos estudos analisaram tais características sob uma perspectiva genômica (Santos-Torres, 2021). A abordagem molecular contribui com o desenvolvimento de estratégias mais assertivas e biotecnológicas no processo de produção de novos bioestimulantes por meio da otimização da prospecção de novas linhagens potenciais,

validação de resultados obtidos em bioensaios e principalmente, a elucidação dos sistemas de regulação das vias e genes de interesse, sendo extremamente necessários estudos que sigam nessa direção.

Referências

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.

AITKEN, K.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE, C.L. Quantitative trait loci identified for sugar related traits in a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar x *Saccharum officinarum* population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 7, p. 306-317, 2006.

ALEXANDER, A. G. **Sugarcane physiology**. Amsterdam: Elsevier, 1973.

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial Phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**. v.8, art. 971, 2017.

AMIN, M. et al. Isolation and identification of bacillus species from soil and evaluation of their antibacterial properties. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, n. 1, art. 23233. 2015.

BABALOLA, O. O.; GLICK, B. R. The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. v. 10, p. 540–549, 2012.

BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 183-196, 2018.

BATISTA, B. D. et al. Draft genome sequence of multitrait plant growth-promoting *Bacillus* sp. Strain RZ2MS9. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, art. e01402-16, 2016.

BATISTA, B. D. et al. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33-42, 2018.

BEHERA, B. C. et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.3, p. 97–110, 2013.

BENEIT, F. S. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, art. 402, 2015.

BERNARDO, S. P. C. **Análise genômica e potencial antimicrobiano do *Bacillus* Sp. Smia-2**. 2020. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes, 2020.

BERVILLE, A. Issues of ferality or potential for ferality in oats, olives, the Vigna group, ryegrass species, safflower and sugarcane. In: GRESSEL, J. **Crop Ferality and Volunteerism**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 231-255, cap. 15.

BETTIOL, W et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2012. (Documentos; 88).

BHARTI, N.; SURYAVANSHI, M. Quality control and regulations of biofertilizers: current scenario and future prospects. In: RAKSHIT A. et al. (eds.). **Biofertilizers**. Amsterdam: Elsevier, 2021. p. 133–141

BIRCH, L.; BACHOFEN, R. Complexing agents from microorganisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 46, p. 827–834, 1990.

BLANCO, A. G. et al. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. **Structure**, v. 10, p. 701–713, 2002.

BORDONAL, R. O. et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, n. 2, art. 13, 2018.

CANÇADO, G.M.A. et al. **Utilização de inoculante líquido solubilizador de fosfato formulado a base dos isolados de *Bacillus megaterium* (b119) e *Bacillus subtilis* (b2084) no plantio da cana-de-açúcar**. Campinas, SP: Embrapa Agricultura Digital, 2021. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 49).

CAPRA, E. J.; LAUB, M. T. Evolution of two-component signal transduction systems. **The Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 325-347, 2012.

CHANDRAN, H.; MEENA, M.; SWAPNIL, P. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as a Green Alternative for Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 13, n. 19, p. 10986, 3 out. 2021.

CHEN, Y. P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33– 41, 2006.

COLLAVINO, M. M. et al. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, p. 727– 738, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Boletim da safra de cana-de-açúcar: 4º Levantamento – Safra 22/23**. abril 2023. Brasília, DF: CONAB, 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: abril 2023.

DASGUPTA, D. et al. Microbial biofertilizers: recent trends and future outlook. In: MANDAL, S.; PASSARI, A. K. (eds.). **Recent advancement in microbial biotechnology: agricultural and industrial approach**. Amsterdam: Elsevier, 2021. p. 1–26.

DENG, S. et al. Cloning and characterization of a second acid phosphatase from *Sinorhizobium meliloti* strain 104A14. **Archives of Microbiology**, v. 176, p. 255–263, 2001

DENG, S. et al. Cloning and characterization of a *Rhizobium meliloti* nonspecific acid phosphatase. **Archives of Microbiology**, v. 170, p. 18–26, 1998.

DEVINE, K. M. Activation of the PhoPR-mediated response to phosphate limitation is regulated by wall teichoic acid metabolism in *Bacillus subtilis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, art. 2678, 2018.

DUEBEL, A.; GRANSEE, A.; MERBACH, W. Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. v. 163, p. 387–392, 2000.

EUROPEAN BIOSTIMULANTS INDUSTRY COUNCIL - EBIC. **Economic overview of the european biostimulants market**. Bruxelles Belgium: EBIC, 2022. Disponível em: <<https://biostimulants.eu/highlights/economic-overview-of-the-european-biostimulants-market/>>. Acesso em: abril 2022.

EIDA, A. A. et al. Genome insights of the plant-growth promoting Bacterium *Cronobacter muytjensii* JZ38 with volatile-mediated antagonistic activity against *Phytophthora infestans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, art. 369, 2020.

FAO. **FAOSTAT. Sugar cane year: 2020**. Rome, 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_exports>. Acesso em: abril 2022.

FLORENTINO, A. P. et al. Ecophysiology and application of acidophilic sulfur-reducing microorganisms. In: RAMPELOTTO, H. (ed.). **Biotechnology of Extremophiles**. Cham: Springer, 2016. p. 141–715.

GAIND, S. Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. **Microbiological Research**, v. 193, p. 94–102, 2016.

GAO, R.; STOCK, A. M. Biological insights from structures of two-component proteins. **The Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 133-154, 2009.

Goldstein, A. H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. **Biological Agriculture & Horticulture**. v. 12, p. 185–193, 1995.

GUMIERE, T. et al. Phosphorus source driving the soil microbial interactions and improving sugarcane development. **Scientific Reports**, v. 9, art. 4400, 2019.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**. v. 245, p. 83–93, 2002.

HEILMANN, H. J.; MAGERT, H. J.; GASSEN, H. G. Identification and isolation of glucose dehydrogenase genes of *Bacillus megaterium* M1286 and their expression in *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v. 174, n. 3, p. 485–490, 1988.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, p. 227-239, 1997.

HUANG, H. et al. Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal content of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1508-1516, 2009.

HULETT, F. M. et al. Sequential action of two-component genetic switches regulates the Pho regulon in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1348–1358, 1994.

HYUN, J. et al. Effects of N-/C-Terminal extra tags on the optimal reaction conditions, activity, and quaternary structure of *Bacillus thuringiensis* glucose 1-Dehydrogenase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1708–1716, 2016.

IMARC Group. **Biostimulants market**: global industry trends, share, size, growth, opportunity and forecast 2022-2027. Brooklyn: IMARC Group, 2022. Disponível em: <<https://www.imarcgroup.com/biostimulants-market>> Acesso em: abril 2022.

INSTITUTO PECEGE - PECEGE. **Overview de custos de produção, 2020**. In: AGRONEGÓCIOS COPERCANA, 16., 2020, Sertãozinho, SP. **Anais [...]**. Piracicaba, 2020. Vídeo. Disponível em: <<https://www.revistacanaiveiros.com.br/overview-de-custos-de-producao>>. Acesso em: abril 2022.

ISO. **The sugar market**. London: ISO, 2019. Disponível em: <<https://www.isosugar.org/sugarsector/sugar#:~:text=Production,80%25%20of%20global%20sugar%20production.>>. Acesso: abril 2022.

JAROSCH, K. A. et al. Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: a comparison of ³¹P NMR spectroscopy and enzyme addition assays. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 91, p. 298–309, 2015.

KISHORE, N.; PINDI, P. K.; REDDY, S. R. Phosphate-solubilizing microorganisms: a critical review. In: BAHADUR, B. et al. (eds.). **Plant biology and biotechnology**. New Delhi: Springer, 2015. p. 307–333.

KRISHNARAJ, P. U.; DAHALE, S. Mineral phosphate solubilization: concepts and prospects in sustainable agriculture. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 2, p. 389–405, 2014.

LAMARCHE, M. G. et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 461–473, 2008.

LAUB, M. T.; GOULIAN, M. Specificity in two-component signal transduction pathways. **The Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 121-145, 2007.

LUZ, D. E. et al. The Pst system of *Streptococcus mutans* is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 172-181, 2012.

MAAN, P. K.; GARCHA, S. Production technology, properties, and quality management. In: RAKSHIT A. et al. (eds.). **Biofertilizers**. Amsterdam: Elsevier, 2021. p. 31–43.

MAHADEVAIAH, M. S. et al. A simple spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juices, water and detergent samples. **E-Journal of Chemistry**, v. 4, p. 467-473, 2007.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Ceres, 2006.

MARTINEZ, O. A. et al. Short-term study shows that phytate-mineralizing rhizobacteria inoculation affects the biomass, phosphorus (P) uptake and rhizosphere properties of cereal plants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, p. 153–166, 2015.

MEHTA, P. et al. Endophytic fungi: role in phosphate solubilization. In: SINGH, B. **Advances in Endophytic Fungal Research**. Cham: Springer, 2019. p.183–209.

MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos Solos: uma análise crítica**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 26 p. (Documentos; 85).

NANJANI, S. et al. Genome analysis uncovers the prolific antagonistic and plant growth-promoting potential of endophyte *Bacillus velezensis* K1. **Gene**, v. 836, art. 186671, 2022.

NANNIPIERI, P. et al. Role of phosphatase enzymes in soil. In: BUNEMANN, E.; OBERSON, A.; FROSSARD, E. (eds.). **Phosphorus in action**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2011. p. 215–243.

NASCIMENTO, F. X. et al. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. **Biotechnology Reports**, v. 25, art. e00406, 2020.

NOVAK, R. et al. Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1126–1133, 1999.

OECD. Sugarcane (*Saccharum* spp.). In: OECD. **Safety assessment of transgenic organisms in the environment**. Paris: OECD, 2016. v. 6, cap. 2, p. 67-124.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 11, art. 197, 2017.

OLANREWAJU, O. S. et al. Genome Mining of Three Plant Growth-Promoting *Bacillus* Species from Maize Rhizosphere. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 12, p. 3949–3969, 16 set. 2021.

OLIVEIRA, C. A. et al. **Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 210).

PARKS, E. J. et al. Characterization of high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron one by a fungus. **Indian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 183–190, 1990.

PAVINATO, P. S. et al. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, art. 15615, 2020.

PONGTHARANGKUL, T. et al. Kinetic properties and stability of glucose dehydrogenase from *Bacillus amyloliquefaciens* SB5 and its potential for cofactor regeneration. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 68, 2015.

QUECINE, M. C. Sugarcane growth promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 21, v.78, p. 7511-7518, 2012.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, L. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10-18, 2019.

RAWAT, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 49-68, 2020.

REILLY, T. J. et al. Characterization and sequencing of a respiratory burst- inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10973-10983, 1996.

RICCI, M. et al. General principles to justify plant biostimulant claims. **Frontiers in Plant Science**, v.10, art. 494, 2019.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989–996, 2011.

RODRIGUES, G. S. S. C.; ROSS, J. L. S. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental**. Uberlândia: EDUFU, 2020.

RODRÍGUEZ, H. et al. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth- promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, p. 15–21, 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Journal Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROSA, P. A. L. et al. Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, art. 00032, 2020.

ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Synergistic biostimulatory action: designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v.9, art. 1655, 2018.

SANTOS, V. R. et al. Crescimento e produtividade agrícola de cana-de-açúcar em diferentes fontes de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, p. 389-396, 2009.

SANTOS-TORRES, M. et al. Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. **Rhizosphere**. v. 17, art. 100290, 2021.

SELVAPANDIYAN, A. BHATNAGAR, R. K. Isolation of a glyfosate-metabolising Pseudomonas: detection, partial, purification and localisation of carbon-phosphorus inverse **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 876-882, 1994.

SIMÕES NETO, D. E. et al. Extração de fósforo em solos cultivados com cana-de-açúcar e suas relações com a capacidade tampão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, p.840-848, 2009.

SINGH, H.; REDDY, M. S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 1, p. 30-34, 2011.

SINGH, P.; BANIK, R. M. Effect of purified alkaline phosphatase from Bacillus licheniformis on growth of Zea mays L. **Plant Science Today**, v. 6, p. 1–9, 2019.

SOARES, A. A. V. L. et al. Phosphorus dynamics in sugarcane fertilized with filter cake and mineral phosphate sources. **Frontiers in Soil Science**, v. 1, art. 719651, 2021.

SOLTANGHEISI, A. et al. Phosphate sources and filter cake amendment affecting sugarcane yield and soil phosphorus fractions. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, art. e0180227, 2019.

STOCK, J. B.; NINFA, A. J.; STOCK, A. M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 53, n. 4, p. 450-490, 1989.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, p. 3–9, 2001.

TENG, Z. et al. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. **Journal of Environmental Management**, v. 231, p. 189–197, 2019.

THALLER, M. C. et al. Characterization and sequence of PhoC, the principal phosphate-irrepressible acid phosphatase of Morganella morganii. **Microbiology**, v. 140, p. 1341–1350, 1994.

TOMMASSEN, J. et al. Regulation of the pho regulon of Escherichia coli K-12. Cloning of the regulatory genes phoB and phoR and identification of their gene products. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, p. 265–274, 1982.

VAZQUEZ, P. et al. Phosphate solubilizing microorganism associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 460–468, 2000.

WAN, W. et al. Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil. **Frontiers in Microbiology**. v.11, art. 752, 2020.

Wanner, B. L.; Chang, B. D. The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5569–5574, 1987.

ZENG, Q. et al. Comparative genomic and functional analyses of four sequenced *Bacillus cereus* genomes reveal conservation of genes relevant to plant-growth-promoting traits. **Scientific Reports**, v. 8, art. 17009, 2018.

ZHU, X. et al. The immobilization effects on Pb, Cd and Cu by the inoculation of organic phosphorus-degrading bacteria (OPDB) with rapeseed dregs in acidic soil. **Geoderma**, v. 350, p. 1–10, 2019.

ZINEB, B. A. et al. Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. **Geomicrobiology Journal**, v. 37, p. 22–30, 2020.

2. SELEÇÃO DE BACILLUS SPP. PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MEIO DE DOS MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DE FOSFATO

RESUMO

A cana-de-açúcar (complexo *Saccharum*) é uma das principais culturas produzidas no Brasil, apesar de sua relevância a produtividade dos canaviais ainda é muito variável. De forma a atenuar esse efeito, o uso de inoculantes compostos por bactérias promotoras de crescimento vegetal tem crescido progressivamente no setor sucroenergético. *Bacillus* é um gênero de bactérias que tem se destacado como bioestimulante de plantas, a capacidade de esporulação e o fácil cultivo que são atrativos para o desenvolvimento de inoculantes comerciais. Além disso, são multifuncionais, atuando no biocontrole de patógenos, produção de fitormônios e na aquisição de nutrientes essenciais, como o fósforo (P). Essas bactérias são capazes de disponibilizar P imobilizado no solo para as plantas através da solubilização e da mineralização de fosfatos, promovendo um melhor aproveitamento do nutriente. O presente estudo teve por objetivo selecionar linhagens potenciais do gênero *Bacillus* capazes de disponibilizar fósforo e promover o crescimento da cana-de-açúcar por meio de diferentes mecanismos bioquímicos. Para tanto, 39 linhagens foram submetidas aos ensaios *in vitro* de solubilização e mineralização de fosfato. Dentre estas, 13 linhagens foram selecionadas para a realização da identificação taxonômica com base em sequências do gene 16S rRNA e teste de antibiose. Após a seleção, as linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227 e *B. altitudinis* MGB25 foram escolhidas para serem testadas individualmente e em consórcios. Por meio de ensaios *in vitro* verificou-se a capacidade dos consórcios de potencializar ou complementar a solubilização e a mineralização de P, bem como a relação inversamente proporcional entre um gradiente de P solúvel no meio com o índice de solubilização deste elemento pelas linhagens. Em casa de vegetação foi avaliado o efeito da inoculação com as linhagens selecionadas e seus consórcios na promoção de crescimento da cana-de-açúcar. Assim como *in vitro*, no ensaio em casa-de-vegetação observou-se um efeito positivo da inoculação na atividade enzimática no solo. Aos 30 dias após o plantio a atividade de fosfatase ácida de todos os tratamentos inoculados foi maior que a do controle negativo e para a atividade das enzimas fosfatase alcalina e fitase isso ocorreu aos 30 e 120 dias. Isso refletiu nos resultados obtidos na análise de concentração de P disponível no solo, em que todos os tratamentos inoculados apresentaram médias superiores ao controle negativo. Entretanto, não foi possível observar um efeito significativo de promoção de crescimento entre os tratamentos, esse fato pode estar associado a diversos fatores como: competição com a comunidade microbiana nativa; especificidade da associação entre a bactéria-planta e condições nutricionais do solo. Os resultados obtidos indicam que as linhagens selecionadas são potenciais solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato no solo. No entanto, para melhor explorar seu potencial como promotoras de crescimento de cana-de-açúcar novos estudos considerando-se as variáveis mencionadas são necessários para conclusões mais assertivas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; *Bacillus* spp.; Solubilização de fosfato; Mineralização de fosfato; Promoção de crescimento vegetal.

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* complex) is one of the main crops produced in Brazil, despite its relevance, the sugarcane productivity is still very variable. In order to mitigate this effect, the use of inoculants composed by bacteria that promote plant growth has progressively grown in the sugar-energy sector. *Bacillus* are known bacteria that has stood out as a biostimulant for plants, the sporulation capacity and easy cultivation that are attractive for the development of commercial products. In addition, *Bacillus* are multifunctional, acting in the biocontrol of pathogens, production of phytohormones and in the acquisition of essential nutrients, such as phosphorus (P). *Bacillus* are also capable of making immobilized P available in the soil to plants through the solubilization and mineralization of phosphates. This research aimed to select potential *Bacillus* strains capable of promoting sugarcane growth through different mechanisms, focused on P using optimization. Thus, 39 strains were evaluated *in vitro* tests to phosphate solubilization and mineralization. Among those, 13 strains were selected for taxonomic identification based on 16S rRNA gene sequences and antibiosis test among each other. The strains, *Priestia. megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227 e *B. altitudinis* MGB25 were chosen to be evaluated individually and in consortia. By *in vitro* assays, the ability of the consortia related with the synergistic or or complementation of P solubilization and mineralization was verified, as well as the inversely proportional relationship between a soluble P gradient in the medium and the solubilization index of this element by the strains. A trial in a greenhouse was carried out with the aim of evaluating the effect of inoculation with the selected strains and their intercropping in promoting sugarcane growth. As *in vitro*, in the greenhouse assay, a positive effect of inoculation on enzymatic activity in the soil was observed. At 30 days after planting, the acid phosphatase activity of all inoculated treatments was higher than that of the negative control and for the activity of alkaline phosphatase and phytase enzymes, this occurred at 30 and 120 days. This was reflected in the results obtained in the analysis of available P concentration in the soil, in which all inoculated treatments presented higher averages than the negative control. Despite these promising results, it was not possible to observe the significant effect of promoting growth between treatments, this fact may be associated with several factors such as: competition with the native microbial community; specificity of the association between plant bacteria and soil nutritional conditions. The results obtained indicate that the selected strains are potential phosphate solubilizers and mineralizers in the soil. However, to better explore their potential as sugarcane growth promoters, new studies considering the mentioned variables are necessary for more assertive conclusions.

Keywords: Sugarcane; *Bacillus* spp.; Phosphate solubilization; Phosphate mineralization; Plant growth promotion.

2.1. Introdução

Estimulada pela conscientização do impacto negativo causado pela agricultura convencional na saúde ambiental e humana, há uma tendência de adoção de práticas mais sustentáveis pela agricultura mundial (Ramakrishna; Yadav; Li, 2019). Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) vegetal tem se mostrado uma alternativa promissora para a nova agricultura. As BPCPs auxiliam no desenvolvimento e qualidade de seus hospedeiros por meio de mecanismos que estimulam processos naturais de crescimento, beneficiam a captação e o uso de nutrientes, a tolerância a estresses abióticos e o aproveitamento de compostos orgânicos no solo (Ricci et al., 2019). Dentre os principais gêneros empregados na agricultura estão *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Agrobacterium* e *Bacillus* (Mariano et al., 2004).

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias gram-positivas que podem ser encontradas em vários tipos de ambiente, possuem características fisiológicas de interesse biotecnológico e fácil capacidade de esporulação. Tornando-os extremamente importantes para o desenvolvimento de produtos comerciais, uma vez que os esporos são estruturas altamente estáveis, capazes de manterem-se viáveis mesmo em condições extremas, como na ausência de nutrientes e em ambientes desfavoráveis, permitindo uma maior sobrevivência no campo (Bahadir; Liaqat; Eltem, 2018). Além disso, atuam no biocontrole de pragas e doenças, e como promotores do crescimento vegetal, através da produção de fitormônios e aquisição de nutrientes essenciais para as culturas, como o fósforo (P) (Oliveira et al., 2020).

Determinadas linhagens de *Bacillus* spp. são capazes de disponibilizar para as plantas o P imobilizado no solo através dos processos de solubilização e mineralização. Esses mecanismos específicos convertem as formas orgânicas de P (Po) em inorgânicas (mineralização) e as formas inorgânicas e insolúveis de P (Pi) para solúveis (solubilização), tornando o P disponível para as plantas (Rawat et al., 2020). Em 2019, foi lançado o primeiro produto nacional composto por *Bacillus* spp. solubilizadores e mineralizadores de P, o BiomaPhos® que tem apresentado incrementos na produtividade das culturas do milho e da soja (Oliveira et al., 2020).

A cana-de-açúcar (complexo *Saccharum*) é uma das principais culturas produzidas no Brasil, sendo o país o maior produtor no mundo (FAO, 2020). É utilizada para geração de energia limpa e a principal matéria prima do açúcar e do etanol, sendo a base do setor sucroenergético. Apesar do potencial de produção e da relevância econômica da indústria

sucroenergética para o país, percebe-se que ainda há grandes variações na produtividade da cultura, ameaçando o atendimento das demandas nacionais e internacionais por seus produtos e subprodutos. Além disso, a dependência de fertilizantes minerais, principalmente os fosfatados, oneram os custos de produção e causam impactos negativos ao meio ambiente, caminhando ao contrário da tendência mundial.

Os fatores mencionados acima evidenciam a necessidade urgente de novas tecnologias direcionadas a esse setor. Uma das alternativas é a utilização de produtos a base de BPCPs na produção da cana-de-açúcar. Porém nota-se uma carência de inoculantes eficazes e validados para a cultura, abrindo a oportunidade para o desenvolvimento de novos produtos. Dessa forma, o presente capítulo teve por objetivo selecionar e identificar linhagens potenciais de *Bacillus* spp. capazes de solubilizar e mineralizar fosfato *in vitro* e verificar o efeito da inoculação dessas bactérias isoladas e/ou formando consórcios na promoção de crescimento da cana-de-açúcar em casa-de-vegetação.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Seleção e caracterização das linhagens *Bacillus* spp. quanto à capacidade de solubilizar e mineralizar fosfato

Foram realizados três diferentes bioensaios *in vitro* para seleção de linhagens de *Bacillus* com características relevantes para a mineralização e/ou solubilização de fosfato: ensaios semi-quantitativos de solubilização de fosfato de cálcio e de produção da enzima fitase, e o ensaio quantitativo de atividade das enzimas fosfatases. Como controle positivo foi utilizada a linhagem *Pantoea agglomerans* 33.1 (Quecine et al. 2012) e como controle negativo foi aplicada uma alíquota de 10 µL de solução salina 0,9% de NaCl nos ensaios realizados em placa de Petri.

Para obtenção dos inóculos utilizados nos ensaios mencionados acima, as bactérias foram cultivadas *overnight* em 5 mL de meio meio Luria Bertani – LB (10 g/l de Triptona; 5 g/l de Extrato de Levedura; 5 g/l de Cloreto de Sódio e pH final: $7,0 \pm 0,2$), a 28°C, sob agitação constante (150 rpm). Os cultivos bacterianos tiveram as concentrações iniciais ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro para $OD_{600nm} = 0,1$, ou seja, aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL.

2.2.1.1. Material Biológico

As linhagens de *Bacillus* spp. utilizadas no presente estudo pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Professor João Lúcio de Azevedo” (Tabela 2.1). Todas estão estocadas em meio Luria Bertani – LB (10 g/l de Triptona; 5 g/l de Extrato de Levedura; 5 g/l de Cloreto de Sódio e pH final: $7,0 \pm 0,2$) suplementado com glicerol (15%) a -80°C (Sambrook; Russel, 2001). Para a realização dos ensaios, foram utilizadas culturas frescas crescidas em meio LB a 28°C .

Tabela 2.1 Linhagens de *Bacillus* spp. utilizadas no presente estudo

Linhagem	Local de isolamento	Material de isolamento
RZ1MS16	Maués/AM	Rizosfera de guaranazeiro
RZ2MS9	Maués/AM	Rizosfera de guaranazeiro
RZ1MS9	Maués/AM	Rizosfera de guaranazeiro
EpD2-5	Maués/AM	Tecido epifítico de folha de guaranazeiro
MGB3314	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB3324	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB31A	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB233	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2267	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2256	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2289	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2295	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1210	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB289	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1215B	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1338	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2281	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB293	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2254	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB272	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB3GMI	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB3JL	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB263B	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB3328	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB27	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB25	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2276	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2297	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)

(Continuação)

Linagem	Local de isolamento	Material de isolamento
MGB238A	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB2261	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB227	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1337	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1339	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
93(1)	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB252	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1232	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1241 B	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)
MGB1 241 A	Bertioga/SP	Sedimento (Mangue)

2.2.1.2. Bioensaio de solubilização de fosfato inorgânico

O meio de cultura usado para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio pelas linhagens *Bacillus* spp. foi preparado conforme a metodologia descrita por Verma, Landha e Tripathi (2001). Alíquotas de 10 µL da suspensão bacteriana foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido com fosfato insolúvel (10 g.L⁻¹ de glicose; 5 g.L⁻¹ NH₄Cl; 1 g.L⁻¹ de NaCl; 1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,8 g.L⁻¹ de Ca₃HPO₄; 15 g.L⁻¹ de ágar e pH 7,2). As placas foram incubadas por 15 dias em BOD a 28°C. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições, considerando cada linhagem um tratamento distinto.

A taxa de solubilização de fosfato inorgânico foi avaliada no 15º dia de incubação por meio da medição do diâmetro do halo de solubilização ou zona translúcida formada ao redor das colônias bacterianas. O Índice de Solubilização (ISF) foi calculado segundo Berraquero, Baya e Cormenzana (1976), com base na equação: $ISF = D \text{ Halo (cm)} / d \text{ Colônia (cm)}$, onde D e d correspondem aos respectivos diâmetros. A capacidade das bactérias de solubilização de fosfato foi classificada como baixa ($ISF < 2$), média ($2 < ISF < 3$) ou alta ($ISF > 3$) (Silva; Vidor, 2000).

2.2.1.3. Bioensaios de mineralização de fosfato orgânico

2.2.1.3.1. Atividade enzimática das fitases

O meio de cultura usado para avaliar a capacidade de produção da enzima fitase pelas linhagens *Bacillus* spp. foi preparado conforme a metodologia proposta por Santos-Torres et al.

(2021). Alíquotas de 10 μL da suspensão bacteriana foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido com 1 % de ácido fítico (10 g.L^{-1} de glicose; 5 g.L^{-1} $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g.L^{-1} de KCl ; 0,1 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 10 g.L^{-1} de ácido fítico e 15 g.L^{-1} de ágar e pH 7). As placas foram incubadas por 15 dias em BOD a 28°C. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições, considerando cada linhagem um tratamento distinto.

Não foram encontradas na literatura metodologias que propusessem uma avaliação qualitativa para a produção da enzima fitase em placas, como disponível para os ensaios de solubilização de P. Nesse sentido, adotamos a mesma metodologia utilizada para os ensaios de solubilização de P, propondo o Índice de Atividade de Fitase (IAF). A produção da enzima fitase foi mensurada por meio de avaliação no 15º dia de incubação por meio da medição do diâmetro do halo de mineralização ou zona translúcida formada ao redor das colônias bacterianas. Após a coleta dos dados, calculou-se o Índice de Atividade de Fitase (IAF) para cada uma das linhagens da seguinte forma: $\text{IAF} = D \text{ Halo (cm)} / d \text{ Colônia (cm)}$, onde D e d correspondem aos respectivos diâmetros, conforme proposto por Berraquero, Baya e Cormenzana (1976) para os testes de solubilização de P. A capacidade das bactérias de produzir fitase foi classificada como baixa ($\text{IAF} < 2$), média ($2 < \text{IAF} < 3$) ou alta ($\text{IAF} > 3$) em analogia à proposta de Silva e Vidor (2000).

2.2.1.3.2. Atividade enzimática da fosfatase

A atividade enzimática da fosfatase das linhagens de *Bacillus* spp. foi determinada conforme proposto por Stöckmann et al. (2003) com modificações introduzidas por Coradi (2017). Os inóculos bacterianos foram cultivados por 72h em meio LB, a 28°C, sob agitação constante a 150 rpm para obtenção do extrato enzimático.

Alíquotas de 100 μL de extrato enzimático foram adicionadas à 200 μL de solução 5 mM de p-nitrofenyl fosfato (PNF) em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0. Após 30 min de incubação em banho-maria a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 1000 μL de NaOH 1,0M, desenvolvendo coloração amarela proporcional à liberação de p-nitrofenol (PN). O branco das amostras compreende o tempo zero da reação. As absorbâncias foram medidas à 405 nm em espectrofotômetro. O cálculo da atividade enzimática, as absorbâncias foram interpoladas em uma curva padrão construída utilizando as concentrações: 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 2 $\mu\text{g/ml}$ de p-nitrofenol (PN).

2.2.1.4. Identificação taxonômica pelo gene 16S rRNA das linhagens de *Bacillus* selecionadas

As linhagens selecionadas como potenciais solubilizadoras e mineralizadoras de P foram identificadas com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. Para a extração de DNA genômico, as linhagens foram cultivadas *overnight* em 5 mL de meio LB, a 28°C, sob agitação constante a 150 rpm. Os cultivos foram posteriormente centrifugados (1,5 mL) e a extração foi realizada a partir do pellet obtido utilizando o Kit *DNeasy Blood&Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante para bactérias Gram-positivas. As amostras de DNAs extraídas foram analisadas em gel de agarose (1%) e as concentrações determinadas em espectrofotômetro BioDrop μ LITE (Biochrom).

A amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de seqüências de 16S rRNA foi realizada a partir das amostras de DNAs extraídas por meio dos oligonucleotídeos iniciadores de PCR (*primers*) R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Heuer et al., 1997). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μ M de cada primer, 0,05 U/ μ L de Taq DNA polimerase, Tampão 1X PCR, num volume final de 50 μ L. As reações de PCR foram programadas com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 3 min a 94°C; 1 min a 60°C; 1 min a 72°C, e uma extensão final de 7 min a 72°C em termociclador GeneAmp PCR System 970 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA).

O produto das reações foi purificado utilizando o Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, UK), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras purificadas foram quantificadas com Biodrop, analisadas em gel de agarose (1% p/v) e enviadas para o sequenciamento do tipo Sanger (Genetic Analyzer 3500) no Laboratório de Melhoramento de Plantas, sob coordenação do Professor Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, da Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos, do CENA/USP.

As seqüências de 16S rRNA obtidas por sequenciamento foram utilizadas para identificação das linhagens de *Bacillus* spp. selecionadas com base em seqüências previamente disponíveis nos bancos de dados Ribossomal Database Project (RDP - <https://rdp.cme.msu.edu/>), por meio do SeqMatch, NCBI (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), por meio de análise Blastn, e também no EZbioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/?bannerId=7>).

2.2.1.5. Antibiose

O ensaio foi realizado conforme Fávoro, Sebastianes e Araújo (2012), com modificações. As bactérias foram cultivadas *overnight* em 5 mL de meio LB, a 28°C, sob agitação constante a 150 rpm. Os inóculos bacterianos tiveram as concentrações iniciais ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro para $OD_{600nm} = 0,1$, ou seja, aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL.

Para o ensaio de antibiose foram preparadas placas de Petri com meio sólido LB que tiveram toda a superfície inoculada com auxílio de alça de Drigalski pela bactéria desafiada. Após a secagem, alíquotas de 10 μ L da suspensão das bactérias desafiadas foram inoculadas sobre a superfície, sendo uma bactéria desafiada por quadrante das placas. Como controle positivo de inibição bacteriana, em todas as placas foi aplicada uma alíquota de 10 μ L do antibiótico Canamicina (100mg/mL) e, como controle negativo de inibição bacteriana, foi aplicada uma alíquota de 10 μ L de solução salina 0,9% de NaCl.

As placas foram incubadas em BOD por 5 dias a 28°C e a atividade antagonista entre as bactérias desafiadas e desafiadas foi avaliada no 5º dia de incubação pela observação ou não da existência de halo de inibição de crescimento ao redor das colônias formadas pelas bactérias desafiadas. O teste foi realizado em triplicata (três placas de Petri para cada combinação de linhagens) e todas as combinações possíveis entre as linhagens foram avaliadas.

2.2.1.6. Bioensaios com consórcios bacterianos

Os bioensaios de solubilização de fosfato de cálcio e produção das enzimas fitase e fosfatase também foram realizados com os consórcios bacterianos compostos pelas linhagens potenciais selecionadas seguindo a metodologia descrita nos itens 2.2.2.1 e 2.2.2.2, respectivamente. Como controle positivo foi utilizada a linhagem *Pantoea agglomerans* 33.1 (Quecine et al. 2012) e como controle negativo de inibição bacteriana, foi aplicada uma alíquota de 10 μ L de solução salina 0,9% de NaCl nos ensaios realizados em placa de Petri.

Para a realização destes ensaios, as bactérias foram cultivadas *overnight* em 5 mL de meio LB, a 28°C, sob agitação constante (150 rpm). Os inóculos bacterianos tiveram as concentrações iniciais ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro para $OD_{600nm} = 0,1$, ou seja, aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL. Após o ajuste das concentrações, os tratamentos em consórcios foram devidamente estruturados. Primeiramente, calculou-se o volume total necessário de cultivo para cada tratamento. O volume total requerido

foi dividido pela metade (2), no caso do consórcio composto por 2 linhagens bacterianas distintas, ou dividido em 3, no consórcio composto por 3 linhagens, sendo cada parte do volume destinado a uma linhagem.

2.2.1.7. Bioensaio com diferentes concentrações de P solúvel

O meio de cultura usado para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (fonte de fosfato insolúvel) com diferentes concentrações de fosfato dipotássico (fonte de fosfato solúvel), foi preparado conforme a metodologia descrita por Zeng, Wu e Wen (2015). As bactérias foram cultivadas *overnight* em 5 mL de meio LB, a 28°C, sob agitação constante a 150 rpm, para obtenção do inóculo. Os cultivos bacterianos tiveram as concentrações iniciais ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro para $OD_{600nm} = 0,1$, ou seja, aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL.

Alíquotas de 10 µL de cada linhagem foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido SP (10 g.L⁻¹ de glicose, 0,6 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,4 g.L⁻¹ KCl e 5 g.L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂, 15 g.L⁻¹ de ágar e pH 7,2), usando o Ca₃(PO₄)₂ como fonte de fosfato insolúvel e o K₂HPO₄ como fonte de fosfato solúvel. Uma solução-mãe de K₂HPO₄ (100 mmol.L⁻¹) foi utilizada para ajustar as concentrações de fosfato solúvel nos meios. As concentrações de fosfato solúvel utilizadas foram: 0; 0,5; 5 e 10 mmol.L⁻¹. As placas foram incubadas por 15 dias em BOD a 28°C. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições, considerando cada linhagem um tratamento distinto.

A taxa de solubilização foi avaliada no 15º dia de incubação através da medição do diâmetro do halo de solubilização ou zona translúcida formada ao redor das colônias bacterianas. Após a coleta dos dados, calculou-se o Índice de Solubilização (ISF) segundo Berraquero, Baya e Cormenzana (1976) para cada uma das linhagens, com base na equação: $ISF = D \text{ Halo (cm)} / d \text{ Colônia (cm)}$, onde D e d correspondem aos respectivos diâmetros.

2.2.2. Efeito das linhagens de *Bacillus* selecionadas na promoção de crescimento de cana-de-açúcar

O ensaio em casa de vegetação foi realizado com o objetivo de avaliar as linhagens de *Bacillus* spp. selecionadas atuando individualmente ou de forma combinada (consórcio) na promoção de crescimento de cana-de-açúcar e o efeito na dinâmica do P no solo e planta mediante interação com as bactérias nestas condições.

2.2.2.1. Material vegetal

As gemas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), variedade SP80-3280, foram gentilmente cedidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de São Carlos (RIDESA), por intermédio da Dra. Monalisa Sampaio Carneiro.

2.2.2.2. Ensaio em casa-de-vegetação

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba/SP de outubro de 2021 a fevereiro de 2022. A temperatura na estufa foi controlada para atingir o valor máximo de até 28 °C durante todo esse período. Informações referentes á fertilidade do solo utilizado no ensaio foram obtidas previamente (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Caracterização físico-química do solo utilizado no bioensaio em casa de vegetação.

pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	K	Al	H+Al	SB	CTC	V	A	S	Arg.	Textura
-	g.dm. ⁻³	mg.dm. ⁻³					mmolc.dm. ⁻³				%		g kg. ⁻¹		-
6,2	30,8	91,7	15,9	70,2	31,8	5,04	<0,1	18,2	107	125,2	85	368	204	428	Argilosa

pH: potencial hidrogeniônico; M.O.: matéria orgânica; P: fósforo; S: enxofre; Ca: cálcio; Mg: manganês; K: potássio; Al: Alumínio; H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação da CTC por bases; A: Areia; S: Silte e Arg.: Argila (Laboratório de Solos e Tecido Vegetal, ESALQ/USP).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco repetições por tratamento. Cada bloco possuía 10 vasos/copos com uma planta cada, representando uma unidade experimental. As plantas destinadas às avaliações aos 30 dias após a inoculação foram plantadas em copos plásticos de 500 mL e as plantas destinadas às avaliações aos 120 dias após a inoculação foram plantadas em vasos de 20 L.

Ao todo, foram avaliados 10 tratamentos (Tabela 2.3), o controle positivo consistiu nas linhagens *B. subtilis* CNPMS B2084 e *B. megaterium* CNPMS B119 isoladas do inoculante comercial BiomaPhos, desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo, e o controle negativo continha apenas meio LB.

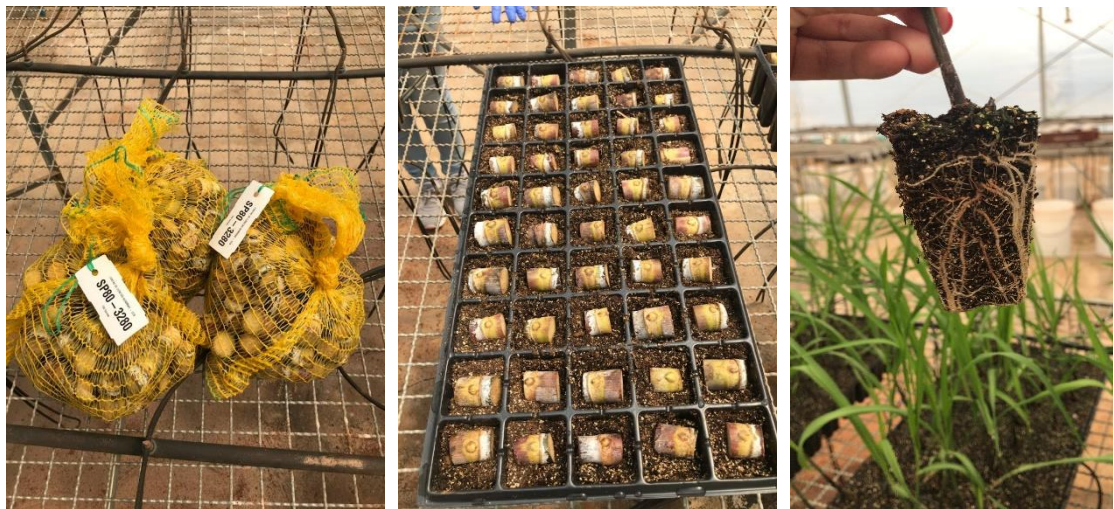
Tabela 2.3 Tratamentos utilizados no ensaio em casa de vegetação.

Tratamento	Descrição
Controle negativo	Meio LB
Controle positivo	<i>B. subtilis</i> CNPMS B2084 + <i>B. megaterium</i> CNPMS B119 (BiomaPhos)
MGB3314	<i>Priestia. megaterium</i> (Syn. <i>Bacillus megaterium</i>)
MGB2281	<i>B.licheniformis</i>
MGB293	<i>B.altitudinis</i>
MGB227	<i>B. toyonensis</i>
MGB25	<i>B.altitudinis</i>
MGB293+ MGB227	<i>B.altitudinis</i> + <i>B. toyonensis</i>
MGB227+ MGB25	<i>B. toyonensis</i> + <i>B.altitudinis</i>
MGB293+ MGB227+ MGB25	<i>B. toyonensis</i> + <i>B.altitudinis</i> + <i>B.altitudinis</i>

Para o preparo dos inóculos as bactérias foram cultivadas *overnight* em 10 mL de meio LB, a 28°C, sob agitação constante a 150 rpm. As concentrações iniciais foram ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro para $OD_{600nm} = 0,1$, ou seja, aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL.

Após o ajuste das concentrações, os tratamentos em consórcios foram devidamente estruturados. Primeiramente, calculou-se o volume total necessário de cultivo para cada tratamento. O volume total requerido foi dividido pela metade (2), no caso do consórcio composto por 2 linhagens bacterianas distintas, ou dividido em 3, no consórcio composto por 3 linhagens, sendo cada parte do volume destinado a uma linhagem.

As gemas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 foram pré-germinadas em substrato Carolina Soil, composto por Turfa, vermiculita expandida, calcário dolomítico e gesso agrícola. Após 15 dias, as gemas já haviam germinado e apresentavam um sistema radicular bem desenvolvido para serem transplantadas aos vasos e copos (Figura 2.1).

**Figura 2. 1** Pré-germinação das gemas de cana-de-açúcar para montagem do ensaio

Para a realização do plantio, o solo foi umedecido e as mudas de cana-de-açúcar transplantadas. A inoculação com os tratamentos foi realizada no sulco, sendo aplicados 2 mL por muda, o que equivale a aproximadamente 2×10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

2.2.2.3. Promoção de crescimento de plantas

Aos 30 dias, 5 plantas de cada tratamento foram coletadas para avaliação de altura e acúmulo de matéria seca de raízes e da parte aérea. A altura foi medida da base da planta (início da raiz) até a bainha da última folha completamente expandida com o auxílio de uma régua milimetrada. Após a avaliação, parte aérea e raízes foram separadas em sacos de papel *craft* para a secagem em estufa com fluxo contínuo de ar quente sob temperatura de 60 °C, durante 72 h até atingir um peso constante (Fávaro; Sebastianes; Araújo, 2012) e em seguida as massas secas de parte aérea e raízes foram obtidas com auxílio de uma balança semi-analítica.

Aos 120 dias, foram realizadas as coletas e avaliações finais. As 5 plantas restantes de cada tratamento foram coletadas para avaliação de altura, diâmetro, número de perfilhos e acúmulo de matéria seca de parte aérea. A altura foi medida da base da planta (início da raiz) até a bainha da última folha completamente expandida com o auxílio de uma régua milimetrada. O diâmetro de colmo foi medido na parte média do colmo com o auxílio de um paquímetro. Para avaliar o acúmulo de matéria seca de parte aérea todas as folhas foram coletadas em sacos de papel *craft* e secas em estufa com fluxo contínuo de ar quente sob temperatura de 60 °C, durante 72 h até atingir um peso constante (Fávaro; Sebastianes; Araújo, 2012) e em seguida as massas secas de parte aérea e raízes foram obtidas com auxílio de uma balança semi-analítica.

2.2.2.4. Atividade enzimática do solo

Para realização das análises de atividade das enzimas fosfatases e fitase, amostras de solo rizosférico foram coletadas aos 30 e aos 120 dias após o plantio (DAP) das mudas de cana-de-açúcar. Para a coleta as plantas foram retiradas dos recipientes e todo o excesso de terra em volta das raízes foi retirado e descartado, foi utilizado para a análise o solo aderido as raízes.

2.2.2.4.1. Fosfatase ácida e alcalina

Para a realização das análises, em uma amostra de 1g de solo rizosférico foram adicionados 4 mL de tampão MUB (12,1g/l de THAM; 11,6 g/l de ácido maleico; 14 g/l de

ácido cítrico anidro; 6,3 g/l de ácido bórico e 488 ml de NaOH 1N) com pH 6,5 para a determinação da fosfatase ácida, ou pH 11 para fosfatase alcalina. Em seguida 1 mL do substrato p-nitrofenil fosfato (PNF) 0,05M foi adicionado apenas nas amostras. Após breve agitação, os tubos foram incubados por 1 hora a 37°C. Ao final do período de incubação, foram adicionados 1mL de 0.5M CaCl₂ e 4mL de NaOH 0.5M. Além disso, apenas nos controles (brancos) foi adicionado também 1 mL de PNF. Os tubos foram novamente agitados e centrifugados a 9.000 rpm por 5 min. Por fim, o sobrenadante foi coletado e lido em espectrofotômetro a 410 nm (Tabatai, 1994). O cálculo da atividade enzimática, as absorbâncias foram interpoladas em uma curva padrão construída utilizando as concentrações: 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 e 100 µg/ml de p-nitrofenol (PN).

2.2.2.4.2. Fitase

Em uma amostra de 1g de solo rizosférico foram adicionados 5mL de tampão acetato de sódio 0,2 M contendo 1 mM de fitato de sódio. Após breve agitação, os tubos foram incubados por 1 h a 37°C. Nas amostras controles (branco), foram adicionados 5 mL de tampão acetato de sódio 0,2M sem fitato de sódio. Ao final da incubação, adicionou-se 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% em todas as amostras, incluindo os controles. Os tubos foram novamente agitados e permaneceram em repouso por 20 min sob temperatura ambiente. Após o período de repouso, os tubos foram centrifugados a 9.000 rpm por 5 min. Em seguida, 300 µL dos sobrenadantes foram aliqüotados e adicionados em 1200 µL de solução contendo 0,02M de molibdato de amônio, 0,01 M de metavanadato de amônio e 0,18 M de ácido nítrico. Após 10 min de repouso, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 420 nm (Ames, 1966). O cálculo da atividade enzimática, as absorbâncias foram interpoladas em uma curva padrão construída utilizando as concentrações: 0; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,2 µg/ml de KH₂PO₄.

2.2.2.5. Teores de P no solo e material vegetal

As análises de P no solo ocorreram no início do ensaio e aos 120 DAP. Foram realizadas pelo Laboratório de Pesquisa em Fertilidade, Adubação e Nutrição, sob coordenação do Professor Paulo Pavinato, do Departamento de Ciência do Solo, da ESALQ/USP. Os teores de P foram determinados pelo método de extração com resina trocadora de íons, esse método consiste na quantificação do P na forma disponível para as plantas (P lábil) através da

dissolução gradativa de compostos fosfatados da fase sólida do solo e transferência de íons ortofosfato para a resina de troca iônica (Hedley et al. 1982).

As análises de macronutrientes do material vegetal ocorreram aos 120 DAP e foram realizadas pelo Laboratório de Solos e Tecido Vegetal, sob coordenação do Professor Dr. Miguel Cooper, do Departamento de Ciência do Solo, da ESALQ/USP. A análise foi realizada pelo método de digestão nitroperclórica e os teores de P foram determinados pelo método de colorimetria (Santos et al., 2009). O acúmulo de P na parte aérea foi estimado multiplicando-se a concentração de P (mg.kg^{-1}) nos tecidos pela massa seca da parte aérea vegetal (kg) (Fernandes; Soratto, 2020).

2.2.2.6. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas no ambiente computacional R (R Core Team, 2021) versão 4.1.0. utilizando o pacote estatístico ExpDes.pt versão 1.2.2. Atendidos os pressupostos da análise de variância (ANOVA) os dados foram submetidos aos testes de múltiplas comparações. Nos bioensaios de seleção de linhagens, foi realizado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% ($p < 0,05$) para o ranqueamento das médias por bactéria. Para as avaliações e análises realizadas no ensaio em casa de vegetação, a significância do efeito dos diferentes tratamentos foi avaliada através da comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), considerando o delineamento experimental inteiramente casualizado.

2.3. Resultados

2.3.1. Seleção e caracterização das linhagens quanto à capacidade de mineralizar e solubilizar fosfato

As 38 linhagens de *Bacillus* spp. listadas na Tabela 2.1, foram avaliadas quanto à solubilização de fosfato de cálcio (Ca_3HPO_4) e produção das enzimas fitase e fosfatase. Dentre essas, 9 apresentaram a capacidade de solubilização de Ca_3HPO_4 , 16 de produzir a enzima fitase, 35 a enzima fosfatase e 8 de realizar os 3 mecanismos (Tabela 2.4).

Tabela 2. 4 Avaliação da capacidade das linhagens de *Bacillus* spp. de solubilização de fosfato de cálcio (Ca_3HPO_4) e produção das enzimas fitase e fosfatase.

Linhagens	ISF Médio ¹	IAF Médio ²	Concentração p-nitrofenol ($\mu\text{g/g.h}$) ³
RZ1MS16	0f	0e	2,17b
RZ2MS9	0f	0e	2b
RZ1MS9	1,38d	1,17d	0,73d
EpD2-5	1,28e	0e	0,8d
MGB3314	1,32e	1,51c	1,3c
MGB3324	0f	0e	0,97d
MGB31A	0f	0e	1,77c
MGB233	0f	0e	0e
MGB2267	0f	1,26c	0,67d
MGB2256	0f	1,19d	1,4c
MGB2289	0f	0,85d	1,9b
MGB2295	0f	0,95d	0,57d
MGB1210	0f	1,31c	0,4e
MGB289	1,46d	1,46c	0,83d
MGB1215B	0f	0e	1,57c
MGB1338	0f	0e	0,3e
MGB1337	0f	1,77b	0,87d
MGB2281	1,41d	1,36c	2,53b
MGB293	1,96a	1,30c	1,1d
MGB252	0f	1,31c	0,13e
MGB2254	0f	0e	0,77d
MGB272	0f	0e	0,5d
MGB3GMI	0f	0e	2,27b
MGB3JL	1,64c	1,37c	0,17e
MGB263B	0f	0e	1,43c
MGB3328	0f	0e	1,6c
MGB227	0f	0e	5,93a
MGB25	1,44d	2,31a	0,53d
MGB2276	0f	0e	1,03d
MGB2297	0f	0e	0e
MGB238A	0f	1,35c	0,6d
MGB2261	0f	0e	5,8a
MGB27	0f	0e	0e
MGB1339	0f	0e	1,47c
93(1)	0f	0e	0,9d
MGB1232	0f	0e	0,8d
MGB1241 B	1,49d	1,50c	0,97d
MGB1 241 A	0f	0e	1,53c

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% ($p < 0,05$).

¹ Índice de Solubilização (ISF) = D Halo (cm) / d Colônia (cm); ² Índice de Atividade da Fitase (IAF) = D Halo (cm) / d Colônia (cm) (Berraquero; Baya; Cormenzana, 1976); ³ Indicador da produção da enzima Fosfatase.

Ao final dos testes *in vitro*, 28 linhagens foram selecionadas pela capacidade de solubilizar e/ou mineralizar fosfato. Dentre estas 4% possuem apenas a capacidade de solubilizar P, 21% de produzir a enzima fitase e 41% a de produzir a enzima fosfatase. Algumas linhagens possuíam a capacidade de realizar mais de um mecanismo e dentre estas 17% apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato e produzir a enzima fitase, 7% a de produzir as enzimas fitase e fosfatase e 10% a capacidade solubilizar e produzir os dois tipos de enzimas (Figura 2.2).

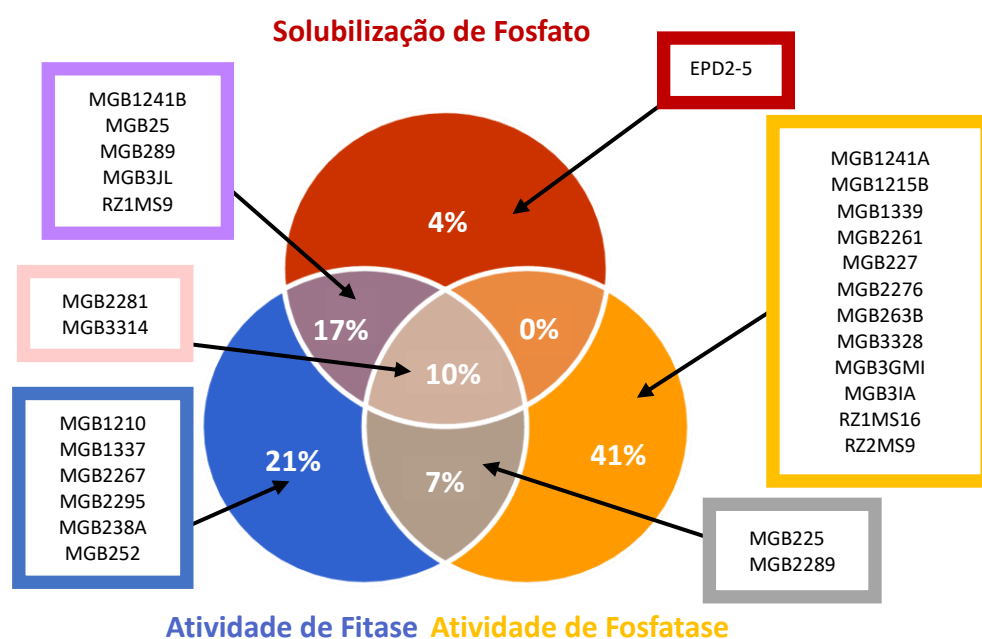


Figura 2. 2 Diagrama de Venn das linhagens de *Bacillus* spp. selecionadas com potencial de solubilização e/ou mineralização de fosfato.

Optou-se por seguir para as próximas etapas apenas com as linhagens capazes de realizar mais de um dos mecanismos estudados, ou que tivessem sido classificadas como a com maior potencial dentro de um determinado mecanismo. As 12 linhagens escolhidas foram classificadas a nível de espécie por meio do sequenciamento total do gene 16S rRNA (Tabela 2.5).

Tabela 2. 5 Linhagens de *Bacillus* spp. utilizadas neste estudo

Linhagem	Identificação taxonômica	Solubilizador de Ca ₃ HPO ₄	Produtor de fitase	Produtor de fosfatase
MGB3314	<i>Priestia. megaterium</i> (Syn. <i>Bacillus megaterium</i>)	+	+	+
MGB2256	<i>B. toyonensis</i>	-	+	+
MGB2289	<i>B. wiedmannii</i>	-	+	+
MGB289	<i>Priestia. megaterium</i> (Syn. <i>Bacillus megaterium</i>)	+	+	-
MGB1337	<i>B. mobilis strain</i>	-	+	-
MGB2281	<i>B. licheniformis</i>	+	+	+
MGB293	<i>B. altitudinis</i>	+	+	-
MGB3JL	<i>B. siamensis</i>	+	+	-
MGB227	<i>B. toyonensis</i>	-	-	+
MGB25	<i>B. altitudinis</i>	+	+	-
MGB2261	<i>B. toyonensis</i>	-	-	+
MGB1241B	<i>B. altitudinis</i>	+	+	-

Nota: (+) Presença ou (-) ausência do mecanismo.

2.3.1.1. Antibiose entre as linhagens selecionadas

Considerando o efeito de antibiose entre as linhagens e o potencial solubilizador e/ou mineralizador, foram selecionadas 5 linhagens para a realização das etapas posteriores do projeto: *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227 e *B. altitudinis* MGB25. A ausência do efeito de antibiose entre as linhagens MGB293, MGB227 e MGB25 e suas diferentes características, permitiu a formação de consórcios entre elas com o objetivo de complementar ou potencializar a solubilização e/ou mineralização de fosfato. Apesar das linhagens MGB3314 e MGB2281 possuírem efeito antagônico com algumas linhagens testadas, inclusive entre elas, por apresentarem a capacidade de solubilizar e produzir as enzimas fitase e fosfatase optou-se por testá-las individualmente, sem a formação de consórcios (Tabela 2.6).

Tabela 2. 6 Efeito de antibiose entre as linhagens de *Bacillus* spp. selecionadas neste estudo.

Linhagens Desafiadas	Linhagens Desafiantes											
	MGB3314	MGB2256	MGB2289	MGB289	MGB1337	MGB2281	MGB293	MGB3JL	MGB227	MGB25	MGB2261	MGB1241B
<i>Bacillus megaterium</i> MGB3314	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus toyonensis</i> MGB2256	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus wiedmannii</i> MGB2289	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus megaterium</i> MGB289	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus mobilis</i> MGB1337	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus licheniformis</i> MGB2281	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus altitudinis</i> MGB293	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus siamensis</i> MGB3JL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus toyonensis</i> MGB227	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Bacillus altitudinis</i> MGB25	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus toyonensis</i> MGB2261	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus altitudinis</i> MGB1241B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Nota: Presença (+) e ausência (-) de halo de inibição de crescimento

2.3.1.2. Efeito do consórcio das linhagens selecionadas na mineralização e solubilização de fosfato

2.3.1.2.1. Solubilização do fosfato inorgânico

Em geral, o efeito esperado de potencialização dos mecanismos estudados com o uso dos consórcios não foi observado. Avaliando todos os tratamentos em conjunto, os consórcios *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 e *B. altitudinis* MGB25 + *B. toyonensis* MGB227 estiveram entre os três melhores tratamentos na avaliação do ISF, indicando que houve um efeito de complementação entre as linhagens dos consórcios (Figura 2.3). Observou-se que a combinação de duas linhagens solubilizadoras, sendo uma com índice maior em relação a outra, apresentou um valor de índice intermediário, como pode ser observado nas figuras 2.3B, C e D.

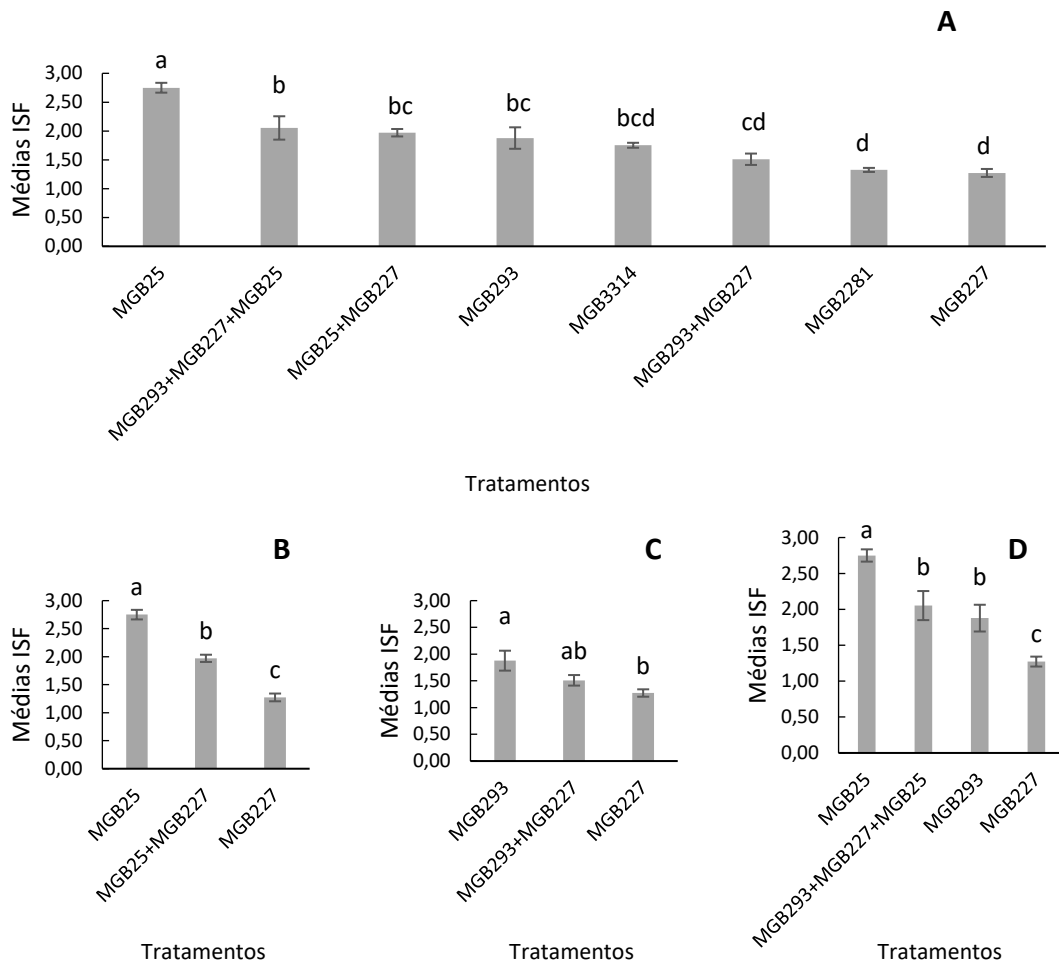


Figura 2.3 Solubilização de fosfato de Ca_3HPO_4 por *Bacillus* spp. testados individualmente e em consórcios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Comparação entre todos os tratamentos *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25 e seus respectivos consórcios; (B) Comparação entre o consórcio MGB25+MGB227 e as linhagens que o compõem testadas individualmente; (C) Comparação entre o consórcio MGB293+MGB227 e as linhagens que o compõem testadas individualmente e (D) Comparação entre o consórcio MGB293+MGB227+MGB25 e as linhagens que o compõem testadas individualmente.

2.3.1.2.2. Mineralização de fosfato orgânico

Para a atividade da enzima fitase não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos testados (p -valor $> 0,05$ no teste de Tukey). Assim como no teste de solubilização de fosfato, a maior média pertenceu a uma linhagem testada individualmente. O *B. licheniformis* MGB2281 apresentou a maior média de IAF seguida pelo consórcio *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 (Figura 2.4A). No caso do consórcio formado pelos *B. altitudinis* MGB25 + *B. toyonensis* MGB227, a média foi menor do que as duas linhagens testadas individualmente (Figura 2.4B). No consórcio entre os *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227, a média de IAF foi intermediária entre as linhagens isoladas,

indicando um efeito de complementariedade (Figura 2.4C). E no consórcio dos *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25, percebeu-se um efeito de potencialização de atividade enzimática de fitases em comparação as linhagens isoladas (Figura 2.4D).

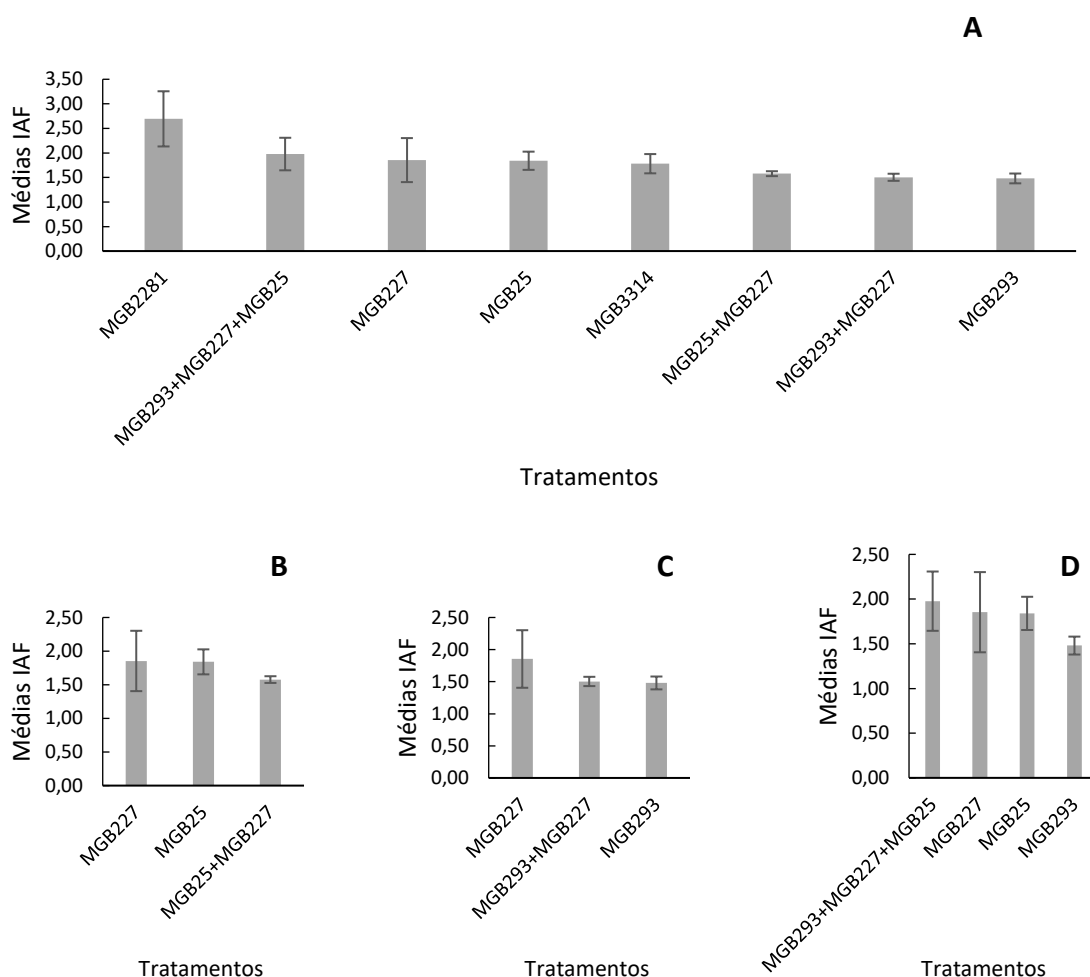


Figura 2. 4 Atividade da enzima fitase de *Bacillus* spp. testados individualmente e em consórcios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Comparação entre todos os tratamentos *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25 e seus respectivos consórcios; (B) Comparação entre o consórcio MGB25+MGB227 e as linhagens que o compõem testadas individualmente; (C) Comparação entre o consórcio MGB293+MGB227 e as linhagens que o compõem testadas individualmente e (D) Comparação entre o consórcio MGB293+MGB227+MGB25 e as linhagens que o compõem testadas individualmente.

Assim como no teste de solubilização de fosfato, não foram observados efeitos de potencialização da atividade enzimática da fosfatase com a formação dos consórcios. O *B. toyonensis* MGB227 apresentou a maior atividade média da enzima entre todos os tratamentos (Figura 2.5A). Os consórcios *B. altitudinis* MGB25 + *B. toyonensis* MGB227 e o *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 apresentaram médias intermediárias comparadas às linhagens que os compõem isoladamente (Figura 2.5B e 2.5C).

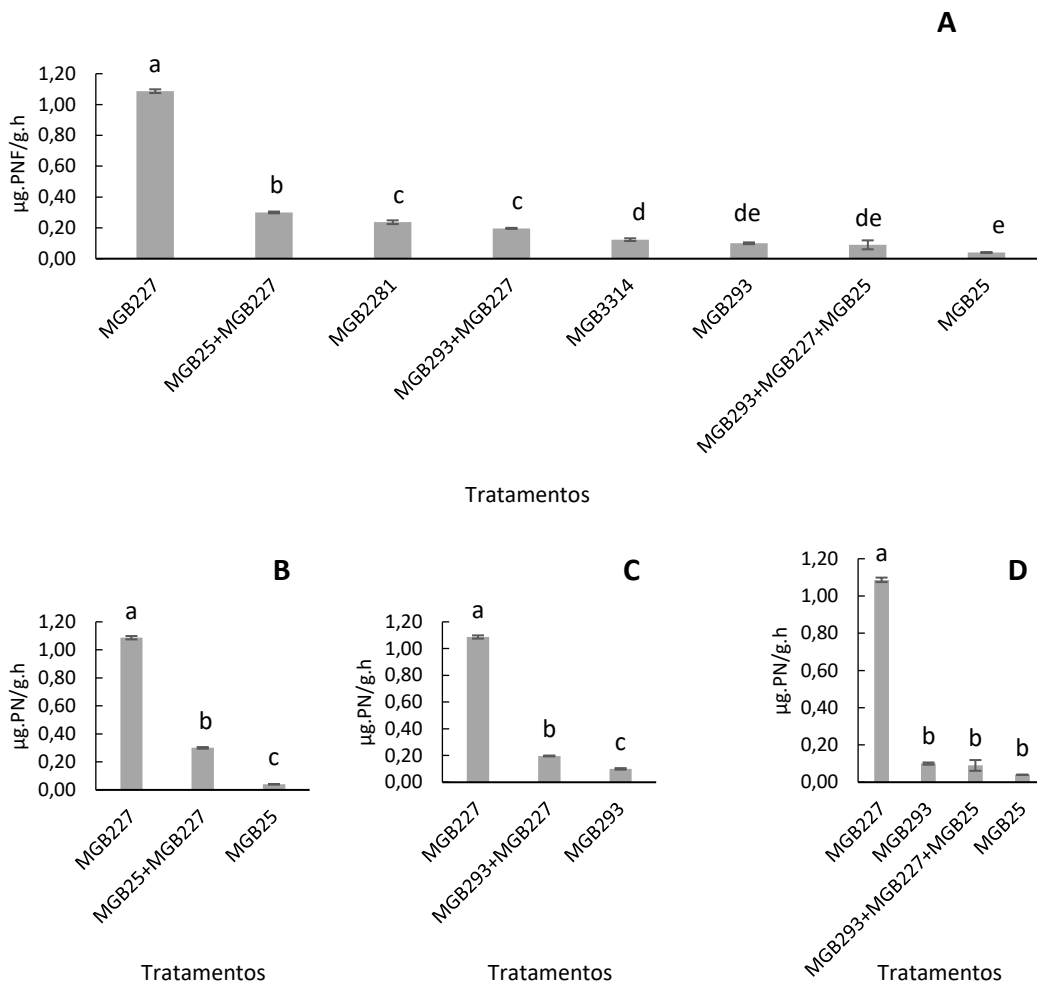


Figura 2. 5 Atividade da enzima fosfatase por *Bacillus* spp. testados individualmente e em consórcios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Comparação entre todos os tratamentos *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25 e seus respectivos consórcios; (B) Comparação entre o consórcio MGB25+MGB227 e as linhagens que o compõem testadas individualmente; (C) Comparação entre o consórcio MGB293+MGB227 e as linhagens que o compõem testadas individualmente e (D) Comparação entre o consórcio MGB293+MGB227+MGB25 e as linhagens que o compõem testadas individualmente

2.3.1.3. Efeito do P solúvel na solubilização de fosfato

Foi possível observar que o aumento da concentração de fosfato solúvel no meio de cultura teve um efeito negativo na formação do halo translúcido em torno das colônias e conseqüentemente no índice de solubilização de fosfato (Figura 2.6). Em alguns *Bacillus* testados, como *B. altitudinis* MGB25 e *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, também foi observado o efeito negativo com o aumento da concentração de fosfato solúvel no crescimento das colônias (Tabela 2.7).

Tabela 2. 7 Influência da concentração de fosfato solúvel na solubilização de fosfato por linhagens de *Bacillus* spp.

Linhagem	Parâmetros avaliados	Concentrações de P solúvel (mM)			
		0	0,5	5	10
<i>B. altitudinis</i> MGB293	Diâmetro da colônia (cm)	0,9 a	0,86 a	0,83 a	0,8 a
	Diâmetro do halo (cm)	1,27 a	1 b	0 c	0 c
	Índice de solubilização	1,4 a	1,19 b	0 c	0 c
<i>B. altitudinis</i> MGB25	Diâmetro da colônia (cm)	0,9 a	0,8 b	0,8 b	0,73 b
	Diâmetro do halo (cm)	1,23 a	1,06 b	0 c	0 c
	Índice de solubilização	1,33 a	1,43 a	0 c	0 c
<i>B. licheniformis</i> MGB2281	Diâmetro da colônia (cm)	1 a	0,97 a	1 a	0,97 a
	Diâmetro do halo (cm)	3,5 a	3 ab	2,5 b	1,7 c
	Índice de solubilização	3,5 a	3,1 ab	2,5 bc	1,77 c
<i>Priestia</i> <i>megaterium</i> MGB3314	Diâmetro da colônia (cm)	1,37 a	1,1 b	0,93 bc	0,83 c
	Diâmetro do halo (cm)	1,6 a	1,37 a	0,77 ab	0 b
	Índice de solubilização	1,17 a	1,24 a	0,85 ab	0 b
<i>B. toyonensis</i> MGB227	Diâmetro da colônia (cm)	1,24 b	1,42 a	1,5 a	1,44 ab
	Diâmetro do halo (cm)	0 a	0 a	0 a	0 a
	Índice de solubilização	0 a	0 a	0 a	0 a

Nota: Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$).

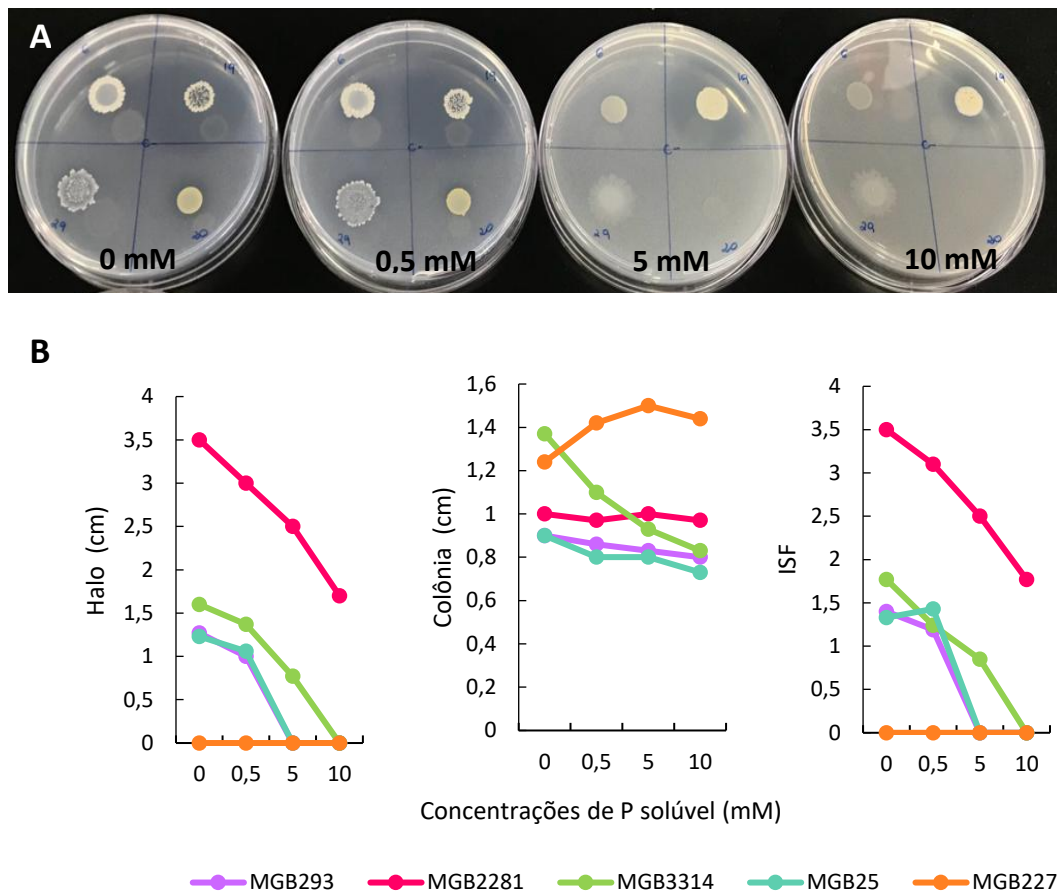


Figura 2. 6 Efeito da concentração de fosfato solúvel na solubilização pelas linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25. (A) Ensaio de solubilização de fosfato in vitro com diferentes concentrações de P solúvel. (B) Influência da concentração de P solúvel (mM) na formação de halo, no crescimento de colônia e no índice de solubilização de fosfato (ISF) de *Bacillus* spp.

2.3.2. Efeito das linhagens de *Bacillus* spp. selecionadas na promoção de crescimento de cana-de-açúcar e na dinâmica do P

2.3.2.1. Promoção de crescimento de plantas

Aos 30 DAP, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$) (Tabela 2.8).

Tabela 2. 8 Efeito de *Bacillus* spp na promoção de crescimento de cana-de-açúcar aos 30 dias após o plantio (DAP).

Tratamentos ¹	Altura (cm)	Massa seca de parte aérea (g)	Massa seca de raiz (g)
Controle negativo	16,66	2,79	8,76
Controle positivo	16,60	2,80	6,94
MGB3314	16,10	2,83	11,79
MGB2281	17,36	3,06	8,73
MGB293	16,94	3,18	11,81
MGB227	16,80	2,88	7,78
MGB25	15,84	2,66	7,64
MGB293+MGB227	16,22	2,88	6,69
MGB227+MGB25	17,92	3,74	8,59
MGB293+MGB227+MGB25	16,20	2,88	6,89
Médias	16,66	2,97	8,56

¹ Controle negativo: Meio LB; Controle positivo: *B. subtilis* CNPMS B2084 + *B. megaterium* CNPMS B119 (BiomaPhos); MGB3314: *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*); MGB2281: *B. licheniformis*; MGB293: *B. altitudinis*; MGB227: *B. toyonensis* e MGB25: *B. altitudinis*.

Aos 120 DAP, o controle negativo (sem inoculação) apresentou um incremento significativo de massa seca foliar em comparação aos tratamentos com o *B. toyonensis* MGB227 e consócio *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227. Para os outros parâmetros avaliados não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 2.9).

Tabela 2. 9 Efeito de *Bacillus* spp na promoção de crescimento de cana-de-açúcar aos 120 dias após o plantio (DAP).

Tratamentos ¹	Altura (m)	Diâmetro (mm)	Nº de perfilhos	Nº de nós	MS de parte aérea (g)
Controle negativo	1,68	24,6	2,2	7,2	44,03 a
Controle positivo	1,74	23,4	2,8	7,8	33,35 ab
MGB3314	1,50	26	2,2	7,2	27,08 ab
MGB2281	1,69	25,2	2	7,2	32,89 ab
MGB293	1,66	24,2	2,6	7,6	30,25 ab
MGB227	1,43	24,4	2	7,6	24,91 b
MGB25	1,64	24,8	2,2	7	29,92 ab
MGB293+ MGB227	1,41	23	2,4	6,6	24,36 b
MGB227+ MGB25	1,68	22,36	2,4	7,6	29,58 ab
MGB293+ MGB227+ MGB25	1,57	28,6	3	7,2	29,58 ab
Média	1,60	24,66	2,38	7,30	30,60

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$).

¹ Controle negativo: Meio LB; Controle positivo: *B. subtilis* CNPMS B2084 + *B. megaterium* CNPMS B119 (BiomaPhos); MGB3314: *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*); MGB2281: *B. licheniformis*; MGB293: *B. altitudinis*; MGB227: *B. toyonensis* e MGB25: *B. altitudinis*.

2.3.2.2. Atividade enzimática do solo

Aos 30 DAP, a atividade de fosfatase ácida de todos os tratamentos inoculados foi maior que a do controle negativo (sem inoculação), indicando o efeito da inoculação na atividade enzimática. O *B. licheniformis* MGB2281 apresentou a maior média de atividade enzimática entre os tratamentos (Figura 2.7). Nas avaliações de 120 DAP não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Apesar disso, foi possível observar que os tratamentos *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25 e *B. licheniformis* MGB2281 apresentaram médias superiores ao controle negativo não inoculado.

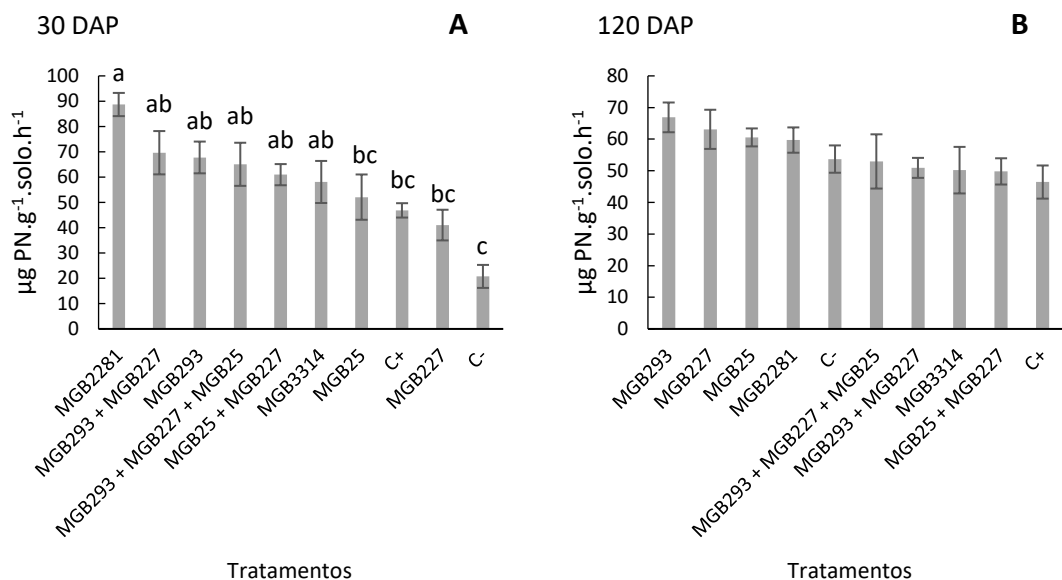


Figura 2.7 Atividade da enzima fosfatase ácida nos solos inoculados com as linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25, seus respectivos consórcios e os controles negativo (C-): Meio LB e positivo (C+): *B. subtilis* CNPMS B2084 + *B. megaterium* CNPMS B119 (BiomaPhos). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Médias da concentração de p-nitrofenol (PN) aos 30 dias após o plantio (DAP) e (B) Médias da concentração de p-nitrofenol (PN) aos 120 dias após o plantio (DAP).

A atividade da fosfatase alcalina aos 30 DAP, de todos os tratamentos inoculados foi maior que a do controle negativo (sem inoculação), indicando o efeito da inoculação na atividade enzimática. O *B. licheniformis* MGB2281 apresentou a maior média de atividade enzimática entre os tratamentos (Figura 2.8). Nas avaliações de 120 DAP não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Apesar disso, foi possível observar que os tratamentos das linhagens *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B.*

altitudinis MGB25 e *B. licheniformis* MGB2281 apresentaram médias superiores ao controle negativo não inoculado.

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto à atividade da fosfatase alcalina aos 30 DAP (Figura 2.8), os tratamentos com os consórcios bacterianos *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 e *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 apresentaram médias superiores quando comparados aos outros tratamentos. Aos 120 DAP não houve diferença significativa entre os tratamentos, no entanto, observou-se que a maioria dos tratamentos inoculados, apresentaram médias de concentração de p-nitrofenol (PN) superiores ao controle negativo, mantendo o que foi observado aos 30 DAP.

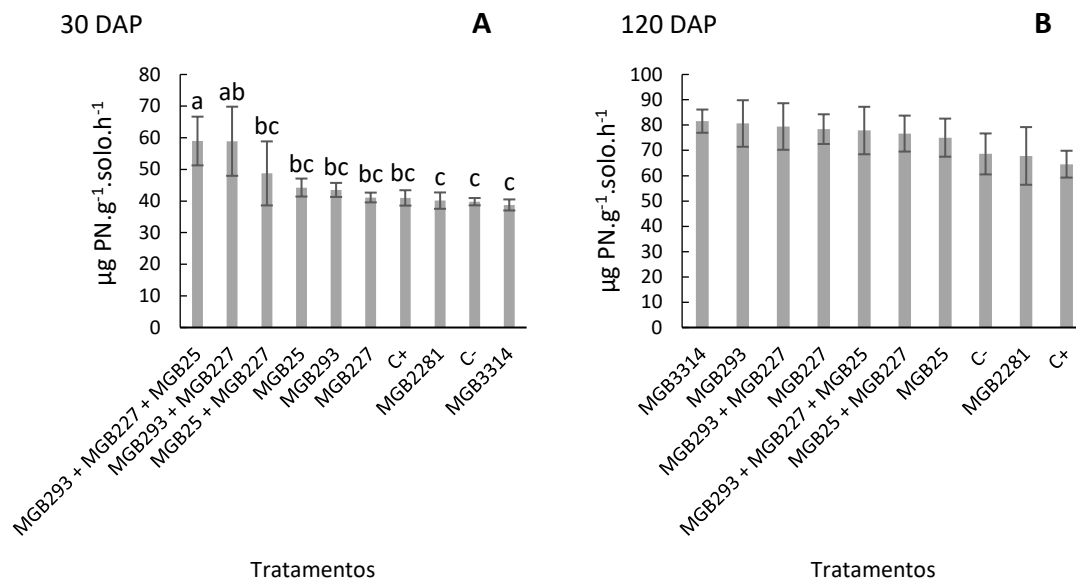


Figura 2. 8 Atividade da enzima fosfatase alcalina nos solos inoculados com as linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25, seus respectivos consórcios e os controles negativo (C-): Meio LB e positivo (C+): *B. subtilis* CNPMS B2084 + *B. megaterium* CNPMS B119 (BiomaPhos). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Médias da concentração de p-nitrofenol (PN) aos 30 dias após o plantio (DAP) e (B) Médias da concentração de p-nitrofenol (PN) aos 120 dias após o plantio (DAP).

A atividade enzimática de fitase foi o único parâmetro avaliado em que os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas aos 30 e aos 120 DAP. O *B. toyonensis* MGB227 teve destaque aos 30 dias, apresentando a maior média de contração de P entre os tratamentos (Figura 2.9A). Aos 120 dias a maior média foi obtida pelo *B. altitudinis* MGB293 estatisticamente igual ao controle positivo e a menor o *B. licheniformis* MGB2281 (Figura 2.9B).

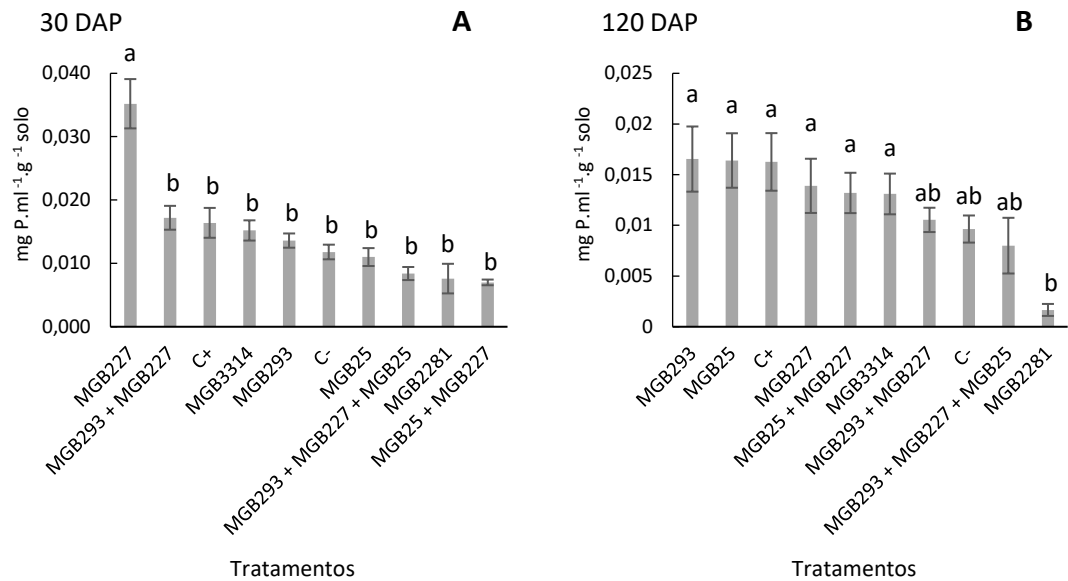


Figura 2. 9 Atividade da enzima fitase nos solos inoculados com as linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25, seus respectivos consórcios e os controles negativo (C-): Meio LB e positivo (C +): *B. subtilis* CNPMS B2084 + *B. megaterium* CNPMS B119 (BiomaPhos). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Médias da concentração de P aos 30 dias após o plantio (DAP) e (B) Médias da concentração de P aos 120 dias após o plantio (DAP).

2.3.2.3. Teores de P no solo e material vegetal

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre médias na análise de teores de P foliar (Figura 2.10A). No entanto, na estimativa do acúmulo de P total (massa seca foliar x teor de P) o controle negativo apresentou a maior média enquanto os demais tratamentos inoculados não variaram significativamente entre si (Figura 2.10B).

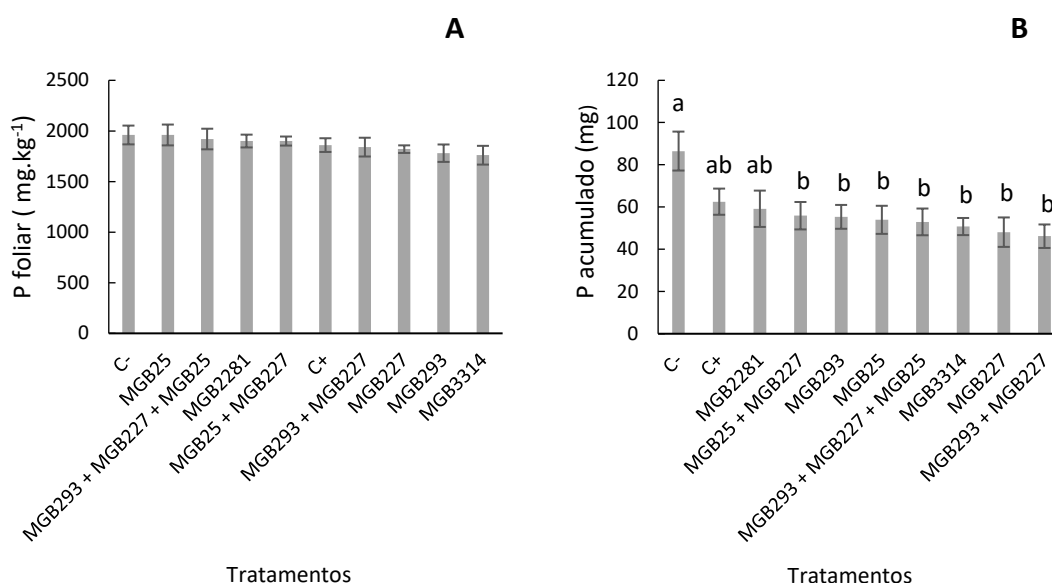


Figura 2. 10 Concentração e acúmulo de P foliar aos 120 dias após o plantio (DAP) de plantas inoculadas com as linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25, seus respectivos consórcios e os controles negativo (C-): Meio LB e positivo (C +): *B. subtilis* CNPMS B2084 + *B. megaterium* CNPMS B119 (BiomaPhos). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Médias da concentração de P foliar e (B) Médias da concentração do acúmulo de P foliar.

Na comparação entre os teores de P inicial e final, após 120 DAP, houve a diminuição de praticamente 50% do P disponível no solo, o que indica a absorção esperada do nutriente ao longo do desenvolvimento da cultura avaliada (Figura 2.11). A comparação do teor de P entre os tratamentos não apresentou diferenças estatísticas significativas. Contudo, foi observado um ligeiro incremento no teor de P nos tratamentos inoculados quando comparados ao controle negativo sem inoculação. O tratamento com o consórcio formado pelos *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 apresentou a maior média de teor de P. Essa diferença pode indicar que as linhagens testadas contribuíram positivamente para a concentração do P disponível para as plantas, mesmo não apresentando diferença significativa na comparação com o controle negativo (Figura 2.11).

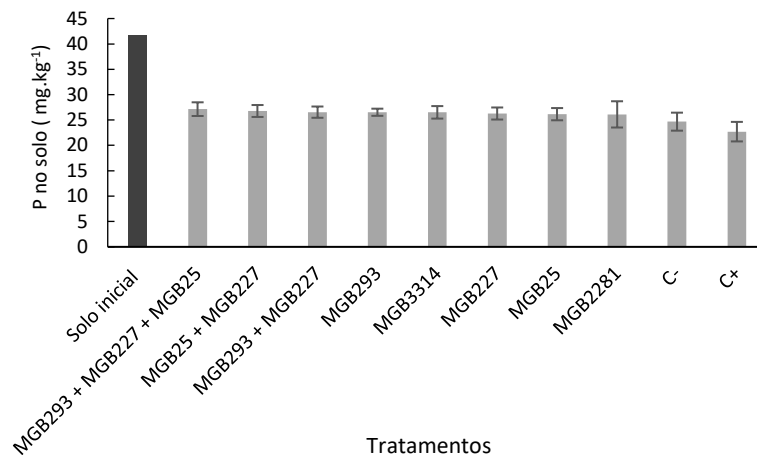


Figura 2. 11 Teores de fósforo resina dos solos inoculados com as linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227, *B. altitudinis* MGB25, seus respectivos consórcios e os controles negativo (C-): Meio LB e positivo (C +): *B. subtilis* CNPMS B2084 + *B. megaterium* CNPMS B119 (BiomaPhos) aos 120 dias após o plantio (DAP).

2.4. Discussão

O estudo foi iniciado com 38 linhagens de *Bacillus*, que é um gênero bacteriano conhecidamente promissor para a promoção do crescimento de plantas, como a solubilização e mineralização de fosfato. Ao final dos testes seleção *in vitro*, 28 linhagens foram selecionadas pela capacidade de solubilizar e/ou mineralizar fosfato, dentre estas 4% possuem apenas a capacidade de solubilizar, 21% de produzir a enzima fitase e 41% a de produzir a enzima fosfatase. As porcentagens maiores de linhagens com a capacidade de produzirem as enzimas fitase e fosfatase, corrobora com princípio da modulação da expressão gênica a partir das características do ambiente em que o microrganismo habita (López-Maury; Marguerat; Bähler, 2009). Neste estudo a maioria das linhagens testadas são isoladas de área de manguezal, ambiente em que a maior fonte de fósforo é a orgânica (Po), alvo dessa classe de enzimas. A partir deste resultado, foram selecionadas bactérias que continham mais de uma característica de interesse, chegando ao número final de 5 potenciais *Bacillus*: *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227 e *B. altitudinis* MGB25. Estas linhagens foram testadas individualmente e em consórcios, apresentando resultados promissores nos ensaios *in vitro*. A capacidade de solubizar e mineralizar P das espécies *Priestia megaterium*, *B. licheniformis*, *B. altitudinis* e *B. toyonensis* também foram descritas por outros autores (Zhao et al., 2022; Barman; Dutta; Jha, 2022; Moradi; Rasouli, 2019; Singh; Banik, 2019).

Apesar das constatações iniciais dos ensaios *in vitro*, no ensaio em casa de vegetação, não foi possível confirmar o efeito positivo dos tratamentos inoculados na promoção de crescimento da cana-de-açúcar quando comparados ao controle negativo. O controle negativo (sem inoculação) apresentou maior média de massa seca de parte aérea em comparação com os outros tratamentos aos 120 dias após a inoculação. Nos demais parâmetros fenotípicos avaliados, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. A ausência de respostas consistentes de promoção de crescimento vegetal mediante a inoculação bacteriana pode estar condicionada a uma série de fatores, como as condições ambientais e físicas e químicas do solo, que podem influenciar na sobrevivência e atuação dos microrganismos (Batista, 2018). Outro fator que pode influenciar na resposta da planta à inoculação com bactérias é a grande biodiversidade presente no solo. As bactérias inoculadas precisam competir por nichos com as comunidades microbianas nativas que estão em maior concentração no solo e isso pode resultar em uma baixa colonização da rizosfera pelas bactérias inoculadas. Diversos estudos mostram que a supressão da competição com comunidades microbianas nativas, através do uso de solos esterilizados, resultou em maior abundância e efeitos mais positivos de bactérias solubilizadoras de fosfato no crescimento de plantas e nutrição fosfatada (Sarabia et al., 2018; Efthymiou et al., 2018). Além disso, é preciso considerar a especificidade da associação entre a bactéria e a planta, sendo o genótipo da planta um fator determinante para a obtenção de bons resultados com a inoculação. As condições nutricionais do solo também influenciam a atividade bacteriana. O solo utilizado neste experimento, foi coletado de uma área de produção agrícola, cultivada anualmente com a cultura do milho, apresentando teores ideais de nutrientes para altas produtividades. Alguns estudos demonstram que em ambientes ricos nutricionalmente, o microbioma presente no solo torna-se um potencial competidor de nutrientes, em vez de estabelecer uma relação benéfica as plantas (Da Costa et al., 2013; Di Salvo et al., 2018), explicando os resultados expressivos apresentados pelo controle negativo. Essa característica do solo, também pode ter influenciado os resultados de outros parâmetros avaliados, como a atividade enzimática das fosfatases e das fitases, e os teores de P foliar e no solo.

Ao contrário do que foi observado nas avaliações de promoção de crescimento de plantas, nas análises de atividade enzimática houve um efeito positivo da inoculação. Aos 30 DAP a atividade de fosfatase ácida de todos os tratamentos inoculados foi maior que a do controle negativo e para a atividade das enzimas fosfatase alcalina e fitase esse efeito ocorreu nos dois períodos avaliados (30 e 120 DAP). Os resultados obtidos na análise de concentração de P disponível no solo mostram que todos os tratamentos inoculados apresentaram médias superiores ao controle negativo, indicando que a atividade microbiana foi substancial para

disponibilização de P às plantas. No entanto, as diferenças entre os tratamentos não foram significativas, indicando que não houve efeito das linhagens e consórcios na promoção de crescimento da cana-de-açúcar nas condições estudadas.

A presença de P prontamente disponível no solo, afeta diretamente a atuação de bactérias solubilizadoras e mineralizadoras. O solo utilizado no experimento em casa de vegetação, apresentou um teor de P disponível de 41,7 mg.kg⁻¹ de solo, esse valor na escala de classes de disponibilidade de P é classificado como muito alto (> 35mg.kg⁻¹) (Sousa; Lobato; Rein, 2004). Para que os microrganismos ativem os mecanismos envolvidos na solubilização e mineralização de P, é preciso perceber a falta deste nutriente no ambiente, ou seja, quando o se torna limitante, o potencial de ativação é aumentado (Ehlers et al., 2010). Isso ocorre porque os microrganismos do solo tendem a buscar uma estequiometria equilibrada (Coonan et al., 2020). Porém se o ambiente que habitam oferece prontamente tudo que necessitam, não há necessidade de desencadear a produção de enzimas específicas e de ácidos orgânicos, atividades que representam um custo energético muito alto para as bactérias. Mander et al. (2012) relataram maiores teores de solubilização de P em solos não fertilizados quando comparados a solos que receberam adubação fosfatada em três áreas de pastagem cultivadas a longo prazo. Silva et al. (2018) também observaram que a atividade da fosfatase ácida foi inversamente proporcional a disponibilidade de P no solo, ou seja, quanto maior a concentração de P disponível, menor a atividade de fosfatase ácida em ensaios de campo com cana-de-açúcar.

Respostas semelhantes também foram descritas em estudos em que a expressão de genes específicos relacionados aos mecanismos de solubilização foi analisada. Na presença de P solúvel, houve a repressão da expressão de genes como os da glicose desidrogenase (gcd) (Zeng; Wu; Wen, 2015), da fosfatase alcalina bacteriana *phoD* (Ikoyi; Fowler; Schmalenberger, 2018) e da fosfatase ácida *phoC* (Zheng et al., 2019).

As bactérias mineralizadoras e solubilizadoras são descritas como sensíveis a condições ricas em nutrientes (Widdig et al., 2019). Nicolitch et al., (2016), verificaram que a abundância de microrganismos solubilizadores foi significativamente maior em áreas de floresta com solos pobres do que em solos ricos em nutrientes. O efeito negativo no crescimento das bactérias pelo aumento da oferta de P, também foi relatada por Long et al., (2018), em que o autor observou que a adubação fosfatada em áreas de cultivo de arroz diminuiu o crescimento de bactérias inoculadas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Alicyclobacillus*.

Esses relatos, corroboram com os resultados encontrados no ensaio *in vitro* do efeito de diferentes concentrações de P solúvel na solubilização de fosfato. Houve uma redução significativa, tanto no tamanho das colônias, quanto no tamanho dos halos formados pelas

bactérias testadas com o aumento da concentração de P solúvel no meio. Para as linhagens MGB25 e MGB3314, houve uma redução de aproximadamente 19% e 39%, respectivamente, do diâmetro das colônias com o aumento da concentração de P solúvel de 0 mM para 10 mM. Na concentração de 10 mM não houve formação de halo translúcido para estas duas linhagens, evidenciando a inativação dos mecanismos de solubilização de fosfato *in vitro* quando expostas a condições de maior disponibilidade de P.

Fica evidente que o estudo com linhagens de *Bacillus* spp. candidatas a solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato, contribuiu para um maior entendimento sobre o funcionamento destes mecanismos e a sua relação com a promoção de crescimento vegetal em bactérias deste gênero. Os resultados verificados evidenciam a alta complexidade e como a obtenção de resultados efetivos dependem diretamente de um conjunto de variáveis ambientais, microbiológicas e moleculares. Nesse sentido, estudos futuros com diferentes tipos de solo, outras culturas e dose variável de adubação fosfatada é de suma importância para obtenção de conclusões mais assertivas sobre a capacidade de promoção de crescimento vegetal das linhagens selecionadas.

Referências

- AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 115-118, 1966.
- BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 183-196, 2018.
- BATISTA, B. D. et al. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33-42, 2018.
- BARMAN, D.; DUTTA, I.; JHA, D. K. Heavy metal resistant bacteria from coal dumping site with plant growth promoting potentials. **Biologia**, v. 77, n. 2, p. 533–545, 2022.
- BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.
- COONAN, E. C. et al. Soil carbon dynamics following the transition of permanent pasture to cereal cropping: influence of initial soil fertility, lime application and nutrient addition. **Crop and Pasture Science**, v. 71, n. 1, p. 23, 2020.

CORADI, V. G. **Produção, purificação e caracterização de fitases microbianas e potencial de produção de mioinositóis**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

DA COSTA, P. B. et al. The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: guidelines for directed bacterial prospection and testing. **Plant and Soil**, v. 368, n. 1-2, p. 267–280, 2013.

DI SALVO, L. P. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation and nitrogen fertilization increase maize (*Zea mays* L.) grain yield and modified rhizosphere microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 126, p. 113–120, 2018.

EFTHYMIOU, A. et al. Augmentation of the phosphorus fertilizer value of biochar by inoculation of wheat with selected *Penicillium* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 116, p. 139–147, 2018.

EHLERS, K. et al. Phosphorus limitation in a Ferralsol: impact on microbial activity and cell internal P pools. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 558–566, 2010.

FAO. **FAOSTAT. Sugar cane year: 2020**. Rome: FAO, 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_exports>. Acesso em: abril 2022.

FÁVARO, L.C.L.; SEBASTIANES, F.L.; ARAÚJO, W.L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **Plos One**, v. 7, n. 6, 2012.

FERNANDES, A. M.; SORATTO, R. P. Nutrition, dry matter accumulation and partitioning and phosphorus use efficiency of potato grown at different phosphorus levels in nutrient solution. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 5, p. 1528–1537, 2012.

HEDLEY, M. J.; STEWART, J. W. B.; CHAUHAN, B. S. Changes in inorganic and organic soil-phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, n. 5, p. 970-976, 1982.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl Environ Microbiol**. 1997

IKOYI, I.; FOWLER, A.; SCHMALENBERGER, A. One-time phosphate fertilizer application to grassland columns modifies the soil microbiota and limits its role in ecosystem services. **Science of The Total Environment**, v. 630, p. 849–858, 2018.

LONG, X. E. et al. Phosphate levels influence the utilisation of rice rhizodeposition carbon and the phosphate-solubilising microbial community in a paddy soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 118, p. 103–114, 2018.

LÓPEZ-MAURY, L.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 8, p. 583–593, 2008.

MANDER, C. et al. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 93–101, 2012.

MARIANO, R. L. R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.

MORADI, N.; RASOULI-SADAGHIANI, M. Effect of Phosphate-solubilizing bacteria (PSB) on distribution of phosphorus forms in a calcareous soil. **Applied Soil Research**, v. 7, n. 2, p. 67–81, 2019.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27; n. 31-36, 1962.

NICOLITCH, O. et al. Soil type determines the distribution of nutrient mobilizing bacterial communities in the rhizosphere of beech trees. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 429–445, 2016.

OLIVEIRA, C. A. et al. **Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 210).

QUECINE, M. C. Sugarcane growth promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 21, v.78, p. 7511-7518, 2012.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, L. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10-18, 2019.

RAWAT, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 49-68, 2020.

R CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RICCI, M. et al. General principles to justify plant biostimulant claims. **Frontiers in Plant Science**, v.10, art. 494, 2019.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3ª. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SANTOS, A. D. et al. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ª ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

SANTOS-TORRES, M. et al. Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. **Rhizosphere**, v. 17, art. 100290, 2021.

SARABIA, M. et al. Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. **Applied Soil Ecology**, v. 125, p. 18–25, 2018.

SILVA, A. M. M. **Aumento da produtividade e mudanças na microbiota do solo em cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de composto e inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato**. 2018. Dissertação (Mestrado em Solo e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

SILVA, G. N. F.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311-329, 2000.

SINGH, P.; BANIK, R. M. Effect of purified alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* on growth of *Zea mays* L. **Plant Science Today**, v. 6, p. 1–9, 2019.

SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E.; REIN, T. A. Adubação com fósforo. In: SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. (eds.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 147-168.

STÖCKMANN, C. et al. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 2, p. 195–205, 2003.

TABATAI, M. A. Soil enzymes. In: BOTTOMLEY, P. J.; ANGLE, J. S.; WEAVER, R.W. **Methods of soil analysis: part 2 - microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. cap. 37. p. 775-833. (series 5).

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

WIDDIG, M. et al. Nitrogen and phosphorus additions alter the abundance of phosphorus-solubilizing bacteria and phosphatase activity in grassland soils. **Frontiers in Environmental Science**, v. 7, art. 185, 2019.

ZENG, Q.; WU, X.; WEN, X. Effects of Soluble Phosphate on Phosphate-Solubilizing Characteristics and Expression of *gcd* Gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2. **Current Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 198–206, 2015.

ZHAO, D. et al. Isolation and genome sequence of a novel phosphate-solubilizing Rhizobacterium *Bacillus altitudinis* GQYP101 and its effects on rhizosphere microbial community structure and functional traits of corn seedling. **Current Microbiology**, v. 79, n. 9, art. 249, 2022.

ZHENG, M. M. et al. Soil nutrients drive function and composition of *phoC*-Harboring bacterial community in acidic soils of Southern China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, art. 2654, 2019.

3. EFEITO DE *BACILLUS* SPP. NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR ASSOCIADO A DIFERENTES DOSES DE ADUBAÇÃO FOSFATADA

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior consumidor de fertilizantes fosfatados (P_2O_5) do mundo, a grande dependência do insumo resulta da complexa dinâmica do fósforo (P) no solo. Devido às características físico-químicas das regiões produtoras do Brasil o P é rapidamente fixado tornando-se indisponível para as plantas, e como forma de assegurar a produtividade das lavouras convencionou-se a utilização de altas doses do nutriente. Práticas como essa são insustentáveis, oneram os custos de produção e causam impactos negativos ao meio ambiente. Na busca de solucionar esse problema global, estudos têm explorado diferentes alternativas e formas de manejo mais econômicas, sustentáveis e inteligentes para o uso eficiente de P. Dentre as diferentes soluções encontradas podemos citar, a inoculação com microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fosfato, utilização de fontes orgânicas como a torta de filtro e os fosfatos naturais reativos, como o Bayovar. A cana-de-açúcar está entre as principais culturas produzidas no Brasil e é utilizada como matéria-prima na indústria sucroalcooleira para a produção de açúcar e álcool, bem como para a alimentação animal e produção de energia, sendo considerada uma commodity de alto rendimento. A deficiência de P limita muito a produtividade na cana-de-açúcar, afetando o desenvolvimento das plantas, o rendimento de açúcar e a durabilidade dos canaviais. Nesse sentido, o presente capítulo teve por objetivo verificar o efeito na promoção de crescimento da cana-de-açúcar por meio da associação entre a inoculação com bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato e diferentes doses de fosfato natural reativo de Bayovar como a fonte de P em casa-de-vegetação. Para tanto a linhagem *B.licheniformis* MGB2281 e o consórcio bacteriano de *B.altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B.altitudinis* MGB25, além de um controle negativo sem inoculação, foram avaliados em três doses de P_2O_5 : 0, 90 $kg\cdot ha^{-1}$ e 180 $kg\cdot ha^{-1}$ representando 0%, 50% e 100% da dose recomendada para a obtenção de altas produtividades da cultura. Os resultados apresentados mostram que a inoculação com a linhagem MGB2281 promoveu significativamente o crescimento de plantas aos 30 dias após o plantio, com maiores médias de altura de planta e massa seca de parte aérea. A dose de 90 $kg\cdot ha^{-1}$ de P_2O_5 associada à inoculação com a linhagem MGB2281 e o consórcio bacteriano MGB293 + MGB227 MGB25, contribuiu para uma maior atividade da enzima fosfatase alcalina cerca de seis vezes maior que o controle sem inoculação, os resultados positivos de atividade enzimática refletiram positivamente nos teores de P lábil no solo. Apesar dos resultados promissores, não foi possível observar diferenças entre os tratamentos para teores de P na parte aérea de plantas. Os resultados obtidos sugerem que a combinação da inoculação das linhagens estudadas em cana-de-açúcar cultivada em solos deficientes em P pode ser uma alternativa viável para melhorar o desenvolvimento de plantas e compor uma estratégia de manejo mais sustentável para o uso de fertilizantes fosfatados. Nesse sentido, este estudo abre novas oportunidades para investigações em campo, considerando outras variáveis como diferentes tipos de solo, fontes fosfatadas e variedade de cana-de-açúcar, para o melhor entendimento dos efeitos dessas linhagens de *Bacillus* spp. como alternativas para solubilização e mineralização de fosfato.

Palavras-chave: P_2O_5 ; Bayovar; fertilizantes fosfatados; cana-de-açúcar; *Bacillus*

ABSTRACT

Brazil is the third largest consumer of phosphate fertilizers (P_2O_5) in the world, the great dependence on the input results from the complex dynamics of phosphorus (P) in the soil. Due to the physicochemical characteristics of the producing regions in Brazil, P is quickly fixed, making it unavailable to plants, as a way of ensuring crop productivity. The use of high doses of the raw material was agreed. The unrestrained use of phosphate fertilizers has become increasingly unfeasible, as it is a finite mineral resource, burdening production costs and causing negative effects on the environment. To solve this global problem, studies have explored different alternatives and more biological, conscious, and intelligent ways of handling for the efficient use of P. The inoculation with phosphate solubilizing and mineralizing microorganisms, use phosphate from organic sources and reactive natural phosphates such as Bayovar are great alternative. Sugarcane is among the main crops produced in Brazil and is used as raw material in the sugar and alcohol industry to produce sugar and alcohol, as well as for animal feed and energy production, being considered a high-yield commodity. P deficiency limits productivity in sugarcane, affecting plant development, sugar yield the durability of cane fields. In this sense, this chapter aimed to verify the effects of elite phosphate solubilizing and mineralizing bacteria on promoting sugarcane growth using different doses of reactive natural phosphate Bayovar as a source of phosphorus at greenhouse. Thus, the *B. licheniformis* MGB2281 strain and the bacterial consortium of *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25, in addition to a negative control without inoculation, were satisfied with three doses of P_2O_5 : 0.90 kg.ha⁻¹ and 180 kg.ha⁻¹ representing 0%, 50% and 100% of the recommended dose for obtaining high crop productivity. The presented results show that inoculation with the MGB2281 strain significantly promoted plant growth 30 days after planting, with higher means of plant height and shoot dry mass. The dose of 90 kg.ha⁻¹ of P_2O_5 associated with the inoculation with the MGB2281 strain and the bacterial consortium MGB293 + MGB227 MGB25, contributed to a greater activity of the enzyme alkaline phosphatase, about six times greater than the control without inoculation. Despite the promising results, it was not possible to observe differences between treatments for P levels in the aerial part of plants and in the soil. The results obtained suggest that the combination of inoculation of the strains studied in sugarcane cultivated in soils deficient in P can be a viable alternative to improve plant development and compose a more sustainable management strategy for the use of phosphate fertilizers. Thus, this study opens new opportunities for field investigations, considering other variables such as different types of soil, phosphate sources and sugarcane variety, for a better understanding of the effects of these strains of *Bacillus* spp. as alternatives for phosphate solubilization and mineralization.

Keywords: P_2O_5 ; Bayovar; phosphate fertilizers; sugar cane; *Bacillus*

3.1. Introdução

O Brasil é o quarto maior consumidor de fertilizantes do mundo, importando em 2022 cerca de 39 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2023). As culturas de soja, milho e cana-de-açúcar são as três principais demandantes e juntas representaram 73% do consumo anual (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA, 2022).

Dentre os principais fertilizantes mais consumidos no país, estão os fosfatados (P_2O_5), sendo o Brasil o terceiro maior consumidor do mundo (CEPEA, 2022). O P é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas e na cultura da cana-de-açúcar atua diretamente no desenvolvimento de raízes e no perfilhamento, com efeito direto na produtividade final e o rendimento de açúcar (Santos et al., 2009). Os solos das regiões produtoras do Brasil, em sua grande maioria, possuem baixa concentração de P disponível. Isso ocorre devido a algumas características físico-químicas como os baixos teores de pH, a grande presença de minerais de argila e óxidos de Fe e Al, responsáveis pela imobilização ou adsorção de P no solo tornando-o indisponível para as plantas. A dinâmica complexa do P no solo resulta em uma efetividade de aplicação extremamente baixa, estima-se que 80% do total do P é rapidamente fixado, sendo aproveitado apenas 20% do total aplicado (Holford, 1997). Como consequência, convencionou-se a utilização de altas doses de fertilizantes fosfatados visando mitigar o efeito de perda do nutriente no solo e assegurar a produtividade das culturas (Mendes; Reis Junior, 2003).

O uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados tem se mostrado uma prática insustentável por inúmeros motivos. Dentre os principais estão a produção a partir de recursos naturais finitos, os problemas de contaminação ao meio ambiente causados pela cadeia de produção e uso, além de representarem parte significativa nos custos de produção de uma lavoura. Nesse sentido, diferentes alternativas e formas de manejo mais econômicas, sustentáveis e inteligentes para o uso eficiente do P têm sido exploradas, como a inoculação com microrganismos solubilizadores e mineralizadores de fosfato, utilização de fontes orgânicas como a torta de filtro e também os fosfatos naturais reativos (Gumiere et al., 2019).

Os fosfatos naturais reativos (FNR) ou rochas fosfáticas, são processados de rochas sedimentares, formadas por minerais do grupo das apatitas e pela deposição de materiais orgânicos, possuindo alta porosidade e reatividade no solo (Soares, 2000). Possuem baixo custo e solubilidade intermediária quando comparados aos fertilizantes acidulados tradicionais, possibilitando dessa forma a disponibilização gradual de P para as plantas, reduzindo a intensidade de perdas desse elemento pelas reações de fixação no solo (Souza et al., 2014). Existem diversos tipos de FNRs como o de Bayovar e Marrocos, divergindo entre si nas composições, percentual de P_2O_5 e local de origem (Kaminski; Peruzzo, 1997). O fosfato natural reativo de Bayovar, é oriundo do oeste do deserto de Sechura, costa norte do Peru, é composto por sedimentos marinhos e, aproximadamente 14% da concentração total de fosfato solúvel em ácido cítrico a 2 % (Bech et al., 2010). Em estudo sobre o efeito da adubação utilizando diferentes fontes de P na produtividade e desenvolvimento de cana-de-açúcar, Albuquerque et al. (2016), verificaram que a utilização do fosfato natural reativo de Bayovar resultou no aumento do diâmetro de colmo e na massa seca de plantas.

Assim como as rochas fosfáticas, o uso de microrganismos solubilizadores também tem se mostrado uma alternativa promissora, seja combinado aos fertilizantes fosfatados tradicionais ou então a outras fontes alternativas. Rosa et al. (2020), observou um acréscimo de 38% da massa seca de plantas, no acúmulo de P total e perfilhamento, além da redução de 75% de adubação fosfatada com superfosfato triplo ao associar a inoculação de consórcio bacteriano (*A. brasilense* + *B. subtilis*) e dose de $45 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de P_2O_5 em cana-de-açúcar. Resultados positivos também foram apresentados por Lopes et al. (2021), com um acréscimo de 17,3 t/ha na produtividade de cana-de-açúcar utilizando um composto formado por torta de filtro, rocha fosfática (Bayovar e Araxá) e bactérias solubilizadoras de fosfato, demonstrando a interação positiva entre esses fatores na produtividade da cultura.

Nesse sentido, o presente capítulo teve por objetivo verificar o efeito na promoção de crescimento da cana-de-açúcar através da associação entre a inoculação com bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato e diferentes doses de fosfato natural reativo (FNR) de Bayovar como a fonte de P em casa-de-vegetação. Para tanto a linhagem *B.licheniformis* MGB2281 e o consórcio bacteriano de *B.altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B.altitudinis* MGB25, além de um controle negativo sem inoculação, foram avaliados em três doses de P_2O_5 : 0, $90 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ e $180 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ representando 0%, 50% e 100% da dose recomendada para a obtenção de altas produtividades da cultura.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material Biológico

As linhagens de *Bacillus* spp. utilizadas no presente estudo foram selecionadas como potenciais solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato no solo, conforme demonstrado no capítulo 1 (Tabela 3.1).

Tabela 3. 1 Linhagens utilizadas no ensaio em casa-de-vegetação

Linhagem	Espécie	Solubilizador de Ca ₃ HPO ₄	Produtor de fitase	Produtor de fosfatase
MGB2281	<i>B.licheniformis</i>	+	+	+
MGB293	<i>B.altitudinis</i>	+	+	+
MGB227	<i>B. toyonensis</i>	-	-	+
MGB25	<i>B.altitudinis</i>	+	+	-

Nota: (+) Presença ou (-) ausência do mecanismo.

Para o preparo dos inóculos as bactérias foram cultivadas *overnight* em 10 mL de meio Luria Bertani – LB (10 g/l de Triptona; 5 g/l de Extrato de Levedura; 5 g/l de Cloreto de Sódio e pH final: 7,0 ± 0,2), a 28°C, sob agitação constante a 150 rpm. Em seguida as concentrações iniciais foram ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro para OD_{600nm} = 0,1, ou seja, aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL. Para o preparo do consórcio MGB293 + MGB227 + MGB25, o volume total de inóculo necessário foi calculado e dividido por 3 e cada parte foi destinada a uma linhagem.

3.2.2. Material Vegetal

As gemas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), variedade SP80-3280, foram gentilmente cedidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de São Carlos (RIDESA), por intermédio da Dra. Monalisa Sampaio Carneiro. Para a realização do bioensaio em casa-de-vegetação, as gemas de cana-de-açúcar foram pré-germinadas por 30 dias em substrato Basaplant, composto por casca de pinus, turfa, carvão, vermiculita e adubação inicial com NPK e micronutrientes.

3.2.3. Área experimental e preparo do solo

O experimento foi conduzido na casa-de-vegetação do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, no período de julho de 2022 a novembro de 2022. Ao longo do ensaio a temperatura média variou entre 19,5 e 23,5 °C (Departamento de Engenharia de Biosistemas - LES). O solo utilizado foi coletado no perfil de 0-20 cm de uma área de pasto dentro do campus, possuía textura arenosa e foi classificado como pobre em P (<7 mg.dm⁻³), condição ideal para a realização do ensaio, outras informações de fertilidade química sobre o solo estão descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2 Caracterização química do solo utilizado no bioensaio em casa de vegetação

pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	K	Al	H+Al	SB	CTC	V	m
-	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³									%	
4,47	11,3	<7	7,7	6,9	4,1	0,9	4,8	25,2	11,9	37,1	32	29

pH: potencial hidrogeniônico; M.O.: matéria orgânica; P: fósforo; S: enxofre; Ca: cálcio; Mg: magnésio; K: potássio; Al: Alumínio; H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação da CTC por bases; m: Saturação por alumínio (Laboratório de Solos e Tecido Vegetal, ESALQ/USP).

O pH do solo foi corrigido com calcário dolomítico (PRNT 98%), permanecendo em repouso por 60 dias a fim de elevar a saturação por bases (V%) em 60% e equilibrar o pH na faixa de 5,5-6, condições ideais para o desenvolvimento da cana-de-açúcar (Van Raij et al., 1997). Após esse período, foi incorporada ao solo, torta de filtro na dosagem de 5 g/kg de solo (base seca), equivalente a cerca de 10 t/ha com objetivo de elevar os teores de matéria orgânica presente no solo (Tabela 3.3). Também foram corrigidos os teores de N e K utilizando a ureia como fonte de N e aplicada a uma dose de 35mg/kg de solo e cloreto de potássio como fonte de K, aplicado a uma dose de 100 mg/kg de solo.

Tabela 3. 3 Caracterização química da torta de filtro

M.O.	CO	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B
%												
36,35	20,19	1,73	2,25	0,19	2,95	1,51	0,14	0,003	1,323	0,066	0,012	<0,001

M.O.: matéria orgânica; CO: Carbono Organico; N: nitrogênio total; P: fósforo total; K: potássio total; Ca: cálcio total; Mg: magnésio total; S: enxofre total; Cu: Cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Zn: zinco e B: boro (Laboratório de Solos e Tecido Vegetal, ESALQ/USP).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com seis repetições por tratamento, considerando 9 tratamentos. Cada vaso continha uma planta, representando uma unidade experimental. As plantas destinadas às avaliações aos 30 dias após o plantio (DAP) foram plantadas em vasos de 2,5 L e as destinadas às avaliações aos 120 DAP foram plantadas em vasos de 10L, contendo 2kg e 10kg de solo respectivamente (Figura 3.1).



Figura 3. 1 Ensaio em casa de vegetação. (A) Vasos destinados as coletas de 30 DAP e (B) Vasos as coletas de 120 DAP.

3.2.4. Tratamentos

O bioensaio foi composto por 9 tratamentos, gerados pela combinação de dois fatores, a presença ou a ausência de bactérias solubilizadores/mineralizadoras de fosfato em diferentes doses de P_2O_5 (Tabela). Para inoculação das plantas, foram utilizadas a linhagem *B. licheniformis* MGB2281 aplicada individualmente e um consórcio bacteriano formado pelas linhagens de *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25, além de um tratamento sem inoculação (B0). Como fonte de fosforo foi escolhido o fosfato natural reativo (FRN) Bayovar (28,9% P_2O_5) e as doses foram definidas com base no recomendado pelo Boletim 100 (Van Raij et al., 1997), que indica $180 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de P_2O_5 para a obtenção de altas produtividades em cana-de-açúcar. A partir desse valor, foram definidas três doses de P_2O_5/kg de solo: 90 mg que correspondem a $180 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de P_2O_5 (100% da dose recomendada), 45 mg que correspondem a $90 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de P_2O_5 (50% da dose recomendada) e o tratamento sem adição de FRN (0%). As doses foram incorporadas ao solo dos vasos 1 dia antes da realização do plantio.

Tabela 3. 4 Tratamentos utilizados no ensaio em casa de vegetação.

Tratamentos	Dose de P ₂ O ₅ (kg.ha ⁻¹)	Inóculo
1		B0
2	0	<i>B. licheniformis</i> MGB2281
3		<i>B. alitudinis</i> MGB293 + <i>B. toyonensis</i> MGB227 + <i>B. alitudinis</i> MGB25
4		B0
5	90	<i>B. licheniformis</i> MGB2281
6		<i>B. alitudinis</i> MGB293 + <i>B. toyonensis</i> MGB227 + <i>B. alitudinis</i> MGB25
7		B0
8	180	<i>B. licheniformis</i> MGB2281
9		<i>B. alitudinis</i> MGB293 + <i>B. toyonensis</i> MGB227 + <i>B. alitudinis</i> MGB25

3.2.5. Plantio e inoculação de cana-de-açúcar

Após 30 dias de plantio em substrato, as gemas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 haviam germinado e apresentavam um sistema radicular bem desenvolvido para serem transplantadas nos vasos.

Para a realização do plantio, o solo foi umedecido e as mudas de cana-de-açúcar transplantadas. A inoculação com os tratamentos foi realizada no sulco, sendo aplicados 2 mL por muda, o que equivale a aproximadamente $2 \cdot 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) ou 2 mL de meio LB no caso dos tratamentos não inoculados.

3.2.6. Promoção de crescimento de plantas

Aos 30 dias após o plantio (DAP), as 6 plantas de cada tratamento foram coletadas e avaliadas quanto à altura e ao acúmulo de matéria seca de raízes e da parte aérea. A altura foi medida da base da planta (início da raiz) até a bainha da última folha completamente expandida com o auxílio de uma régua milimetrada. Após a avaliação, parte aérea e raízes foram separadas em sacos de papel *craft* para a secagem em estufa com fluxo contínuo de ar quente sob temperatura de 60 °C, durante 72 h até atingir um peso constante (Fávaro; Sebastianes; Araújo, 2012) e em seguida pesadas para determinação da massa seca de raiz e parte aérea de cada planta.

Aos 120 DAP, foram realizadas as coletas e avaliações finais. As 6 plantas de cada tratamento foram coletadas e avaliadas quanto à altura, diâmetro de colmo, número de perfilhos, e acúmulo de matéria seca da parte aérea. A altura foi medida da base da planta (início da raiz) até a bainha da última folha completamente expandida com o auxílio de uma régua milimetrada e o diâmetro de colmo foi medido na parte média do colmo com o auxílio de um paquímetro. Após as avaliações biométricas a parte aérea foi armazenada em sacos de papel *craft* para a

secagem em estufa com fluxo contínuo de ar quente sob temperatura de 60 °C, por 72 h até atingir um peso constante (Fávaro; Sebastianes; Araújo, 2012) e em seguida pesada para determinação da massa seca de cada planta.

3.2.7. Atividade enzimática do solo

3.2.7.1. Fosfatases ácidas e alcalinas

Para a realização das análises de atividade das enzimas fosfatase ácida e alcalina foram coletadas amostras de solo rizosférico aos 30 e aos 120 DAP. Em uma amostra de 1g de solo rizosférico foram adicionados 4 mL de tampão MUB (12,1g/l de THAM; 11,6 g/l de ácido maleico; 14 g/l de ácido cítrico anidro; 6,3 g/l de ácido bórico e 488 ml de NaOH 1N) com pH 6,5 para a determinação da fosfatase ácida, ou pH 11 para fosfatase alcalina. Em seguida 1 mL do substrato p-nitrofenil fosfato (PNF) 0,05M foi adicionado apenas nas amostras. Após breve agitação, os tubos foram incubados por 1 hora a 37°C. Ao final do período de incubação, foram adicionados 1mL de 0.5M CaCl₂ e 4mL de NaOH 0.5M. Além disso, apenas nos controles (brancos) foi adicionado também 1 mL de PNF. Os tubos foram novamente agitados e centrifugados a 9.000 rpm por 5 min. Por fim, o sobrenadante foi coletado e lido em espectrofotômetro a 410 nm (Tabatai, 1994). O cálculo da atividade enzimática, as absorbâncias foram interpoladas em uma curva padrão construída utilizando as concentrações: 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 e 100 µg/ml de p-nitrofenol (PN).

3.2.7.2. Fitase

Para a realização das análises de atividade da enzima fitase foram coletadas amostras de solo rizosférico aos 30 e aos 120 DAP. Em uma amostra de 1g de solo rizosférico foram adicionados 5mL de tampão acetato de sódio 0,2 M contendo 1 mM de fitato de sódio. Após breve agitação, os tubos foram incubados por 1 h a 37°C. Nas amostras controles (branco), foram adicionados 5mL de tampão acetato de sódio 0,2M sem fitato de sódio. Ao final da incubação, adicionou-se 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% em todas as amostras, incluindo os controles. Os tubos foram novamente agitados e permaneceram em repouso por 20 min sob temperatura ambiente. Após o período de repouso, os tubos foram centrifugados a 9.000 rpm por 5 min. Em seguida, 300 µL dos sobrenadantes foram aliqüotados e adicionados em 1200 µL de solução contendo 0,02M de molibdato de amônio, 0,01 M de metavanadato de amônio e 0,18 M de ácido nítrico. Após 10 min de repouso, as amostras foram lidas em

espectrofotômetro a 420 nm (Ames, 1966). O cálculo da atividade enzimática, as absorvâncias foram interpoladas em uma curva padrão construída utilizando as concentrações: 0; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,2 µg/ml de KH_2PO_4 .

3.2.8. Teores de P no solo e material vegetal

3.2.8.1. Frações de P no solo

A análise de fracionamento de P do solo foi realizada conforme proposto por Hedley, Stewart e Chauhan (1982), com modificações introduzidas por Condon, Goh e Newman (1985), pelo Laboratório de Pesquisa em Fertilidade, Adubação e Nutrição, sob coordenação do Professor Paulo Pavinato, do Departamento de Ciência do Solo, da ESALQ/USP. As análises ocorreram no início do ensaio e aos 120 DAP.

Foram determinados os teores de P orgânico (Po), P inorgânico (Pi) e P total a partir de diferentes extratores, cada um com uma força iônica específica. Em escala crescente de força estão ranqueados da seguinte forma: o extrator por resina (RTA) > extrator por NaHCO_3 0,5 mol.L⁻¹ (BIC) > extrator por NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (NaOH - 0,1) > extrator por NaOH 0,5 mol.L⁻¹ (NaOH - 0,5) > extrator por HCl 1 mol.L⁻¹ (HCl) > extrator por H_2SO_4 e H_2O_2 (1:1).

A labilidade do solo foi calculada com base nos extratores, sendo: Lável = PRTA+PiBIC+PoBIC; Moderadamente lábil = PiNaOH - 0,1+ PiNaOH - 0,1 + HCl e a Não lábil = PiNaOH - 0,5 + P residual + PoNaOH - 0,5.

3.2.8.2. Análise nutricional do material vegetal

As análises de macronutrientes do material vegetal ocorreram aos 30 (parte aérea e raízes) e aos 120 (parte aérea) DAP. As análises foram realizadas pela Pirasolo Laboratório Agrotécnico Piracicaba.

A análise química dos tecidos vegetais foi realizada pelo método de digestão nitroperclórica e os teores de P foram determinados pelo método de colorimetria (Santos et al., 2009).

3.2.9. Análise estatística dos dados

As análises foram realizadas no ambiente computacional R (R Core Team, 2022) versão 4.1.0. utilizando o pacote estatístico ExpDes.pt versão 1.2.2. Atendidos os pressupostos da análise de variância (ANOVA) os dados foram submetidos aos testes de múltiplas comparações. Para as avaliações e análises realizadas no ensaio em casa-de-vegetação, a significância do efeito dos diferentes tratamentos foi avaliada através da comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), considerando o delineamento experimental blocos casualizados, fatorial 3x3 com 4 repetições.

3.3. Resultados

3.3.1. Promoção do crescimento de plantas

Aos 30 DAP, o efeito de interação entre as diferentes doses de P_2O_5 e as inoculações não foi significativo, demonstrando que os efeitos de cada um desses fatores são independentes.

As análises individuais de cada fator revelaram que as diferentes doses de P_2O_5 não influenciaram significativamente a promoção de crescimento das plantas, mas houve efeito significativo da inoculação na promoção de crescimento das plantas (Figura 3.2). O tratamento com a linhagem MGB2281 apresentou as maiores médias para altura de planta e massa seca de parte aérea (Figura 3.2A e 3.2C). Para massa seca de raiz os tratamentos inoculados foram superiores quando comparados ao tratamento sem inoculação (B0) (Figura 3.2E).

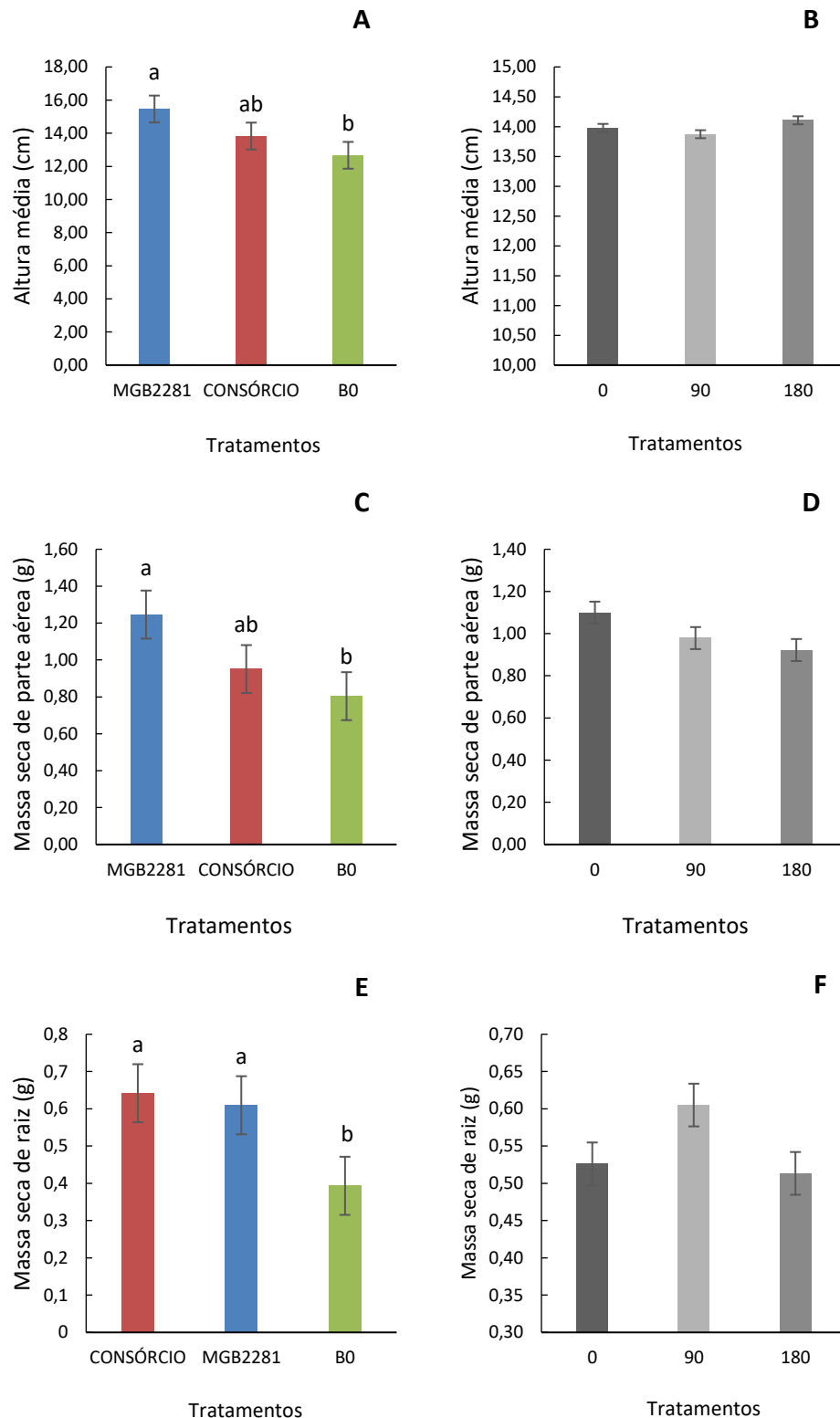


Figura 3. 2 O efeito das diferentes doses de P₂O₅ e a inoculação com o *B. licheniformis* MGB2281 e o consórcio das linhagens *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 aos 30 dias após o plantio (DAP) analisados isoladamente na promoção de crescimento das plantas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Altura média em função da inoculação; (B) Altura média em função das doses em kg.ha⁻¹ de P₂O₅; (C) Massa seca de parte aérea em função da inoculação; (D) Massa seca de parte aérea em função das doses em kg.ha⁻¹ de P₂O₅; (E) Massa seca de raiz em função da inoculação; (F) Massa seca de raiz em função das doses em kg.ha⁻¹ de P₂O₅

Aos 120 DAP, também não houve efeito significativo de interação entre as diferentes doses de P_2O_5 e as inoculações. Na análise individual em função de cada um dos fatores, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados (Tabelas 3.5 e 3.6).

Tabela 3.5 Efeito da inoculação na promoção de crescimento aos 120 dias após o plantio

Tratamentos	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Nº de perfilhos	Massa seca de parte aérea (g)
B0	45,53	18,25	2,84	25,58
MGB2281	45,69	19,44	2,78	28,07
CONSÓRCIO	48,47	20,19	3,05	29,55

Nota: B0: Controle não inoculado; MGB2281: *B. licheniformis* MGB2281; CONSÓRCIO: *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25.

Tabela 3.6 Efeito das diferentes doses de P_2O_5 na promoção de crescimento aos 120 dias após o plantio

Tratamentos (kg.ha ⁻¹)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Nº de perfilhos	Massa seca de parte aérea (g)
0	45,69	18,3	2,84	27,46
90	47,92	19,9	2,95	28,94
180	46,08	19,7	2,89	26,82

3.3.2. Atividade enzimática do solo

Para a atividade da enzima fosfatase ácida, o efeito da interação entre as diferentes doses de P_2O_5 e as inoculações não foi significativo em nenhum dos tempos avaliados. Na análise individual de cada um dos fatores também não foi observada nenhuma diferença entre os tratamentos (Tabelas 3.7 e 3.8). Porém, os resultados do tratamento consórcio foram maiores do que B0 aos 30 e 120 DAP, mesmo não havendo diferença significativa, indicando uma tendência de aumento da atividade enzimática com o consórcio bacteriano. Além disso, os resultados da análise em função das diferentes doses de P_2O_5 , mostra que no solo sem adubação a atividade enzimática se manteve entre os 30 e 120 DAP, mas nos tratamentos com as doses 90 e 180 kg.ha⁻¹ de P_2O_5 , houve um aumento da atividade enzimática ao longo do tempo (Tabela 3.8).

Tabela 3.7 Efeito da inoculação na atividade da enzima fosfatase ácida aos 30 e 120 dias após o plantio.

Tratamentos	Concentração p-nitrofenol $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{solo.h}^{-1}$	
	30 DAP	120 DAP
B0	48,43	61,17
MGB2281	45,44	57,36
CONSÓRCIO	54,12	67,18

Nota: B0: Controle não inoculado; MGB2281: *B. licheniformis* MGB2281; CONSÓRCIO: *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25.

Tabela 3.8 Efeito da das diferentes doses de P_2O_5 na atividade da enzima fosfatase ácida aos 30 e 120 dias após o plantio.

Tratamentos (kg.ha^{-1})	Concentração p-nitrofenol $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{solo.h}^{-1}$	
	30 DAP	120 DAP
0	57,5	56,26
90	44,21	65,62
180	46,25	63,82

O efeito de interação entre os fatores, níveis de P_2O_5 e inoculação na atividade da enzima fosfatase alcalina foi significativo aos 30 DAP, indicando que os fatores são dependentes, ou seja, a atividade enzimática depende diretamente da relação entre a inoculação e a dose de P_2O_5 .

O desdobramento do fator inoculação dentro de cada dose de adubação, apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos apenas na dose de 90 kg.ha^{-1} em que os dois tratamentos inoculados MGB2281 e o consórcio apresentaram uma concentração de p-nitrofenol (PN) aproximadamente 6 vezes maior que a do tratamento sem inoculação.

Tabela 3.9 Efeito da interação entre diferentes doses de P_2O_5 e a inoculação com bactérias na atividade da enzima fosfatase alcalina aos 30 DAP.

Tratamentos ¹	Doses de P_2O_5 (kg.ha^{-1})		
	0	90	180
	Concentração p-nitrofenol $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{solo.h}^{-1}$ ²		
B0	16,7ABa	5,3Bb	25,2Aa
MGB2281	16,7Ba	30,1Aa	29,3Aa
CONSÓRCIO	21,9Aa	32,5Aa	29,3Aa

Nota: ¹ B0: Controle não inoculado; MGB2281: *B. licheniformis* MGB2281; CONSÓRCIO: *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25.

² Letras minúsculas comparam médias em um mesmo nível de dose de P_2O_5 e letras maiúsculas comparam médias em um mesmo nível de inoculação.

No desdobramento do fator de doses de P_2O_5 dentro de cada nível de inoculação, foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas para o tratamento inoculado com a linhagem MGB2281 apresentando maior atividade enzimática nas doses de 90 e 180 $kg\cdot ha^{-1}$.

Aos 120 DAP, não houve interação significativa entre os fatores doses de P_2O_5 e inoculação. As análises individuais de cada fator revelaram que entre os tratamentos inoculados não houve diferenças significativas na atividade da enzima fosfatase alcalina, porém entre as diferentes doses de P_2O_5 , a dose de 90 $kg\cdot ha^{-1}$ apresentou uma média significativamente maior que o controle não adubado, com uma concentração de 61,8 a de p-nitrofenol (PN) (Figura 3.3).

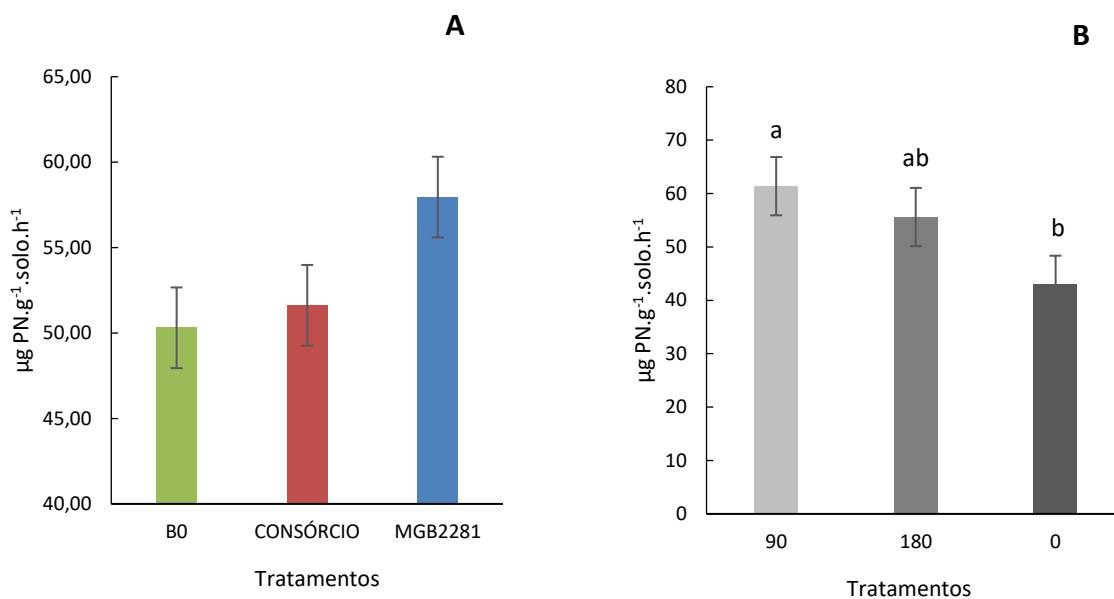


Figura 3.3 O efeito das diferentes doses de P_2O_5 e inoculação com o *B. licheniformis* MGB2281 e o consórcio das linhagens *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 na atividade da enzima fosfatase alcalina aos 120 dias após o plantio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Efeito dos tratamentos inoculados e (B) Efeito das diferentes doses em $kg\cdot ha^{-1}$ de P_2O_5 .

Semelhantemente ao observado na análise da enzima fosfatase alcalina, a atividade enzimática da fitase também apresentou interação significativa entre os fatores estudados aos 30 DAP. O desdobramento do fator inoculação dentro de cada dose de adubação, apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos inoculados apenas na dose 0 $kg\cdot ha^{-1}$. O tratamento inoculado com a linhagem MGB2281 apresentou a maior média em comparação ao controle e o consórcio (Tabela 3.10). No desdobramento das doses de adubação dentro dos tratamentos inoculados, apenas o consórcio apresentou diferenças estatísticas entre as doses testadas. A atividade da enzima fitase na dose de 180 $kg\cdot ha^{-1}$ foi maior quando comparada ao tratamento sem adubação (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 Efeito da interação entre diferentes doses de P_2O_5 e a inoculação com bactérias na atividade da enzima fitase. Letras minúsculas comparam médias em um mesmo nível de dose de P_2O_5 e letras maiúsculas comparam médias em um mesmo nível de inoculação.

Tratamentos ¹	Doses de P_2O_5 ($kg \cdot ha^{-1}$)		
	0	90	180
	Contração de P $mg \cdot ml^{-1} \cdot g^{-1} \text{ solo}^2$		
B0	0,01Aab	0,02Aa	0,01Aa
MGB2281	0,04Aa	0,014Aa	0,017Aa
CONSÓRCIO	0Bb	0,014ABa	0,03Aa

Nota: ¹ B0: Controle não inoculado; MGB2281: *B. licheniformis* MGB2281; CONSÓRCIO: *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25. ² Letras minúsculas comparam médias em um mesmo nível de dose de P_2O_5 e letras maiúsculas comparam médias em um mesmo nível de inoculação.

Aos 120 DAP também não houve efeito significativo da interação entre os fatores analisados na atividade da enzima fitase. Nas análises individuais dos fatores, os tratamentos inoculados apresentaram diferenças significativas em comparação ao controle não inoculado B0 (Figura 3.4A). Não houve diferença significativa entre as médias de atividade da enzima fitase nas doses de P_2O_5 (Figura 3.4B).

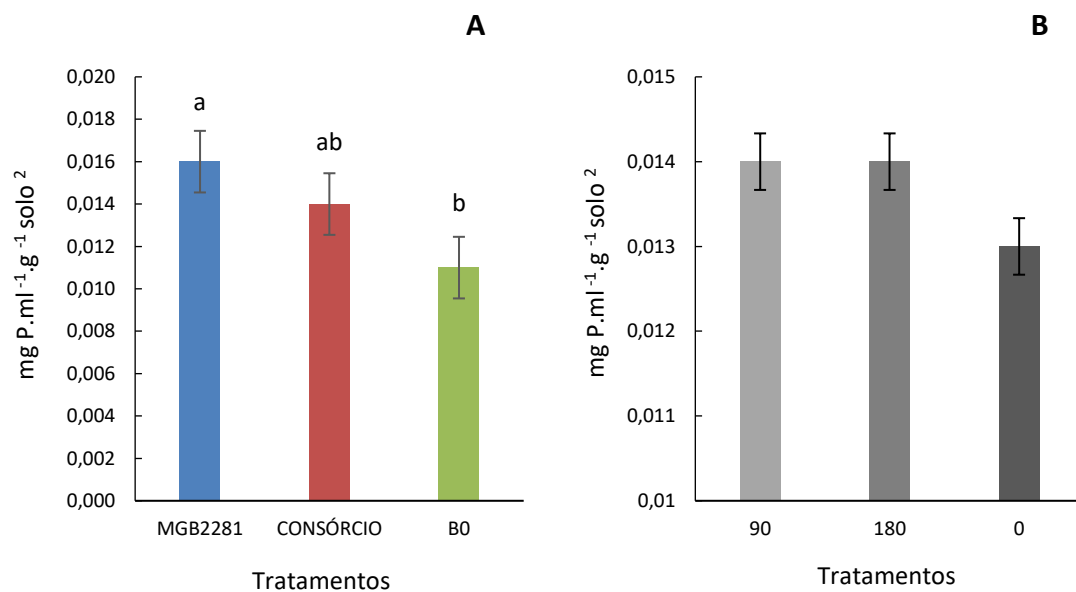


Figura 3. 4 O efeito das diferentes doses de P_2O_5 e inoculação com o *B. licheniformis* MGB2281 e o consórcio das linhagens *B.altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B.altitudinis* MGB25 na atividade da enzima fitase aos 120 dias após o plantio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Efeito dos tratamentos inoculados e (B) Efeito das diferentes doses em $kg \cdot ha^{-1}$ de P_2O_5 .

3.3.3. Teores de P no solo e no material vegetal

O efeito da interação entre as diferentes doses de P_2O_5 e as inoculações não foi significativa para as análises da concentração de P na parte aérea das plantas e no solo realizadas aos 120 dias após o plantio.

Na análise individual dos fatores, tanto para as diferentes doses de P_2O_5 quanto para os tratamentos inoculados, houve diferenças significativas entre as médias de concentração de P na parte aérea das plantas. Entre os tratamentos inoculados, B0 apresentou a maior concentração de P e entre as diferentes doses de P_2O_5 o tratamento sem adubação fosfatada foi superior na concentração de P em comparação aos demais (Figura 3.5).

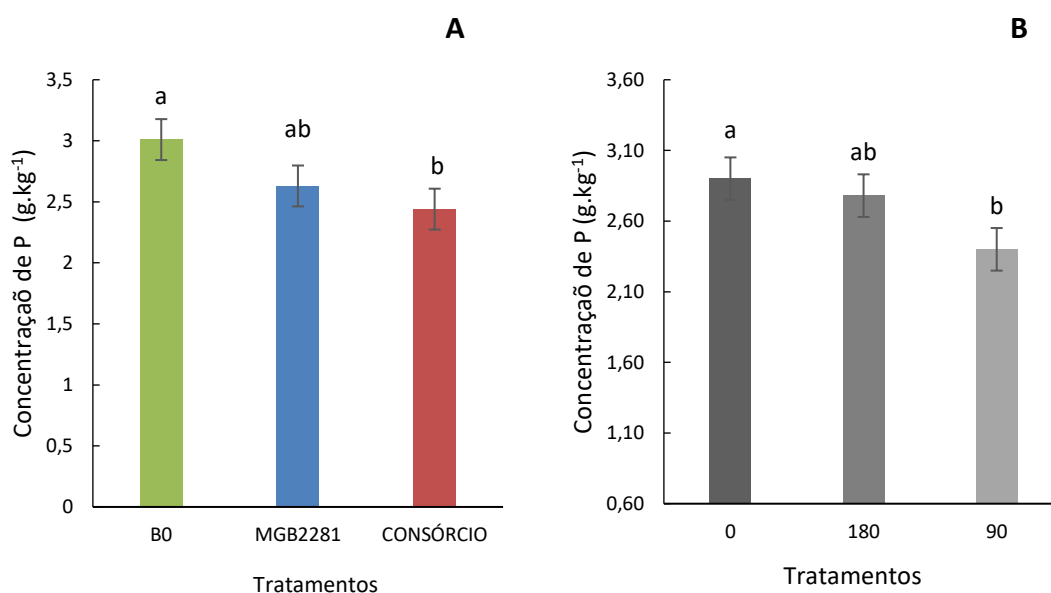


Figura 3. 5 O efeito das diferentes doses de P_2O_5 e inoculação com o *B. licheniformis* MGB2281 e o consórcio das linhagens *B.alitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B.alitudinis* MGB25 na concentração de fósforo (P) na parte aérea das plantas aos 120 dias após o plantio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Efeito dos tratamentos inoculados e (B) Efeito das diferentes doses em $kg.ha^{-1}$ de P_2O_5 .

Na análise do teor de P-lábil, houve diferenças significativas entre as médias dos tratamentos inoculados, o tratamento com o consórcio bacteriano apresentou média superior aos tratamentos com a linhagem MGB2281 e B0 (Figura 3.6A), sugerindo o papel positivo das bactérias na disponibilização de P no solo. Entre as doses de P_2O_5 , não houve diferenças estatísticas (Figura 3.6B).

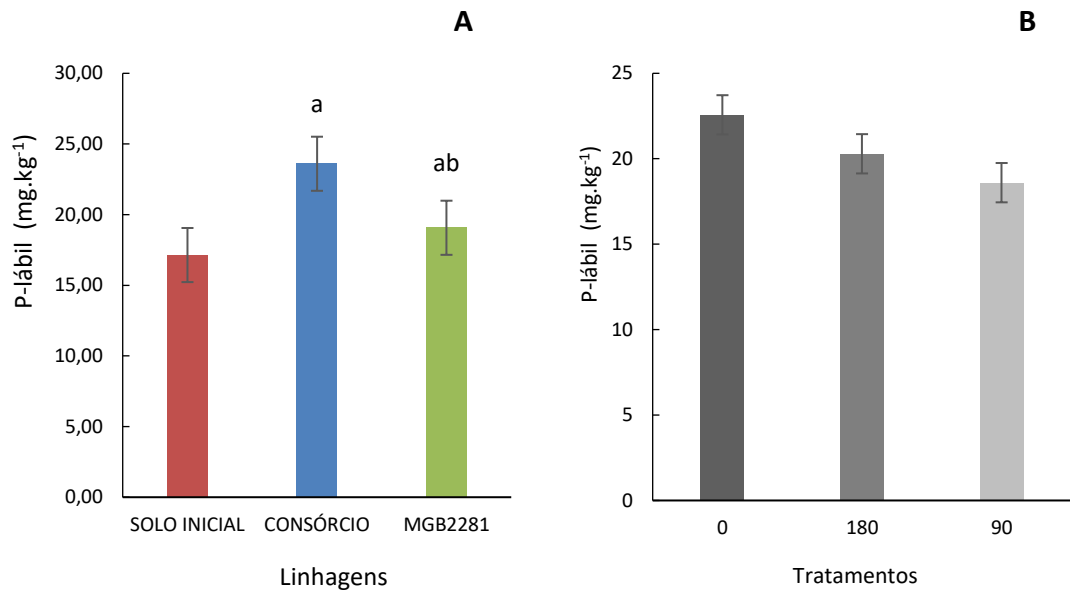


Figura 3. 6 O efeito das diferentes doses de P₂O₅ e inoculação com o *B. licheniformis* MGB2281 e o consórcio das linhagens *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 na concentração de P-lábil no solo aos 120 dias após o plantio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$). (A) Efeito dos tratamentos inoculados e (B) Efeito das diferentes doses em kg.ha⁻¹ de P₂O₅.

Diferentemente do que foi observado para o teor P-lábil, na análise do teor de P moderadamente lábil e P não lábil no solo não foram observadas diferenças significativas nas análises dos fatores individuais em função da inoculação (Tabela 3.11 e 3.13) e em função das diferentes doses de P₂O₅ (Tabela 3.12 e 3.14).

Tabela 3. 11 . Concentração de P moderadamente lábil no solo aos 120 dias após o plantio em função da inoculação.

Tratamentos	P moderadamente lábil (mg.kg ⁻¹)
B0	116,69
MGB2281	113,33
MGB293+MGB227+MGB25	116,84

Nota: B0: Controle não inoculado; MGB2281: *B. licheniformis* MGB2281; CONSÓRCIO: *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25.

Tabela 3. 12 Concentração de P moderadamente lábil no solo aos 120 dias após o plantio em função da dose de P₂O₅.

Tratamentos (kg.ha ⁻¹)	P moderadamente lábil (mg.kg ⁻¹)
0	123,6
90	112,32
180	110,94

Nota: B0: Controle não inoculado; MGB2281: *B. licheniformis* MGB2281; CONSÓRCIO: *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25.

Tabela 3. 13 Concentração de P não lábil no solo aos 120 dias após o plantio em função da inoculação.

Tratamentos	P não lábil (mg.kg ⁻¹)
B0	116,1
MGB2281	116,88
MGB293+MGB227+MGB25	118,57

Nota: B0: Controle não inoculado; MGB2281: *B. licheniformis* MGB2281; CONSÓRCIO: *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25.

Tabela 3. 14 Concentração de P não lábil no solo aos 120 dias após o plantio em função da dose de P₂O₅.

Tratamentos (kg.ha ⁻¹)	P não lábil total (mg.kg ⁻¹)
0	122,77
90	126,26
180	102,52

3.4. Discussão

O presente capítulo teve por objetivo verificar o efeito na promoção de crescimento da cana-de-açúcar através da associação entre a inoculação com bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato e diferentes doses de fosfato natural reativo de Bayovar como a fonte de P em casa-de-vegetação. Para tanto a linhagem *B.licheniformis* MGB2281 e o consórcio bacteriano de *B.altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B.altitudinis* MGB25, além de um controle negativo sem inoculação, foram avaliados em três doses de P₂O₅: 0, 90 kg.ha⁻¹ e 180 kg.ha⁻¹ representando 0%, 50% e 100% da dose recomendada para a obtenção de altas produtividades da cultura. O solo utilizado foi retirado de uma área de pasto e possuía baixo teor de P (<7 mg.dm⁻³), condição ideal para realização do estudo. Parâmetros envolvidos no desenvolvimento vegetal, acúmulo de P e atividade enzimática no solo foram avaliados.

As análises dos parâmetros relacionados à promoção de crescimento de plantas mostraram que não houve relação entre as diferentes doses de P_2O_5 e as inoculações. Os efeitos de cada um desses fatores foram independentes para os parâmetros avaliados. A ausência de interação pode estar relacionada ao curto período de duração do ensaio e a fonte de P utilizada. O fosfato reativo de Bayovar, possui baixa solubilidade e por isso, apenas uma pequena porcentagem do P presente em sua composição é prontamente disponível. Esta característica induz as bactérias consumirem primeiramente o que está disponível no solo para só então iniciar-se o processo de solubilização/mineralização de fosfato, influenciando o crescimento das plantas de forma significativa (Ehlers et al., 2010).

As análises individuais de cada um dos fatores revelaram que os tratamentos inoculados apresentaram as maiores médias de altura, massa aérea e raiz aos 30 DAP confirmando a hipótese inicial de que as linhagens selecionadas são promotoras do crescimento de plantas. Resultados semelhantes foram descritos por Ibarra-Galeana et al. (2017), em estudo realizado em casa-de-vegetação com a cultura do milho, em que a inoculação das linhagens de *Bacillus flexus* e *Bacillus megaterium* separadamente e em consórcio em solo deficiente de P tiveram efeitos de incremento na altura da planta, massa seca da parte aérea e da raiz, bem como nutrição de P nas plantas.

Apesar da ausência de diferenças significativas entre os tratamentos para promoção de crescimento aos 120 DAP, na análise individual dos tratamentos em função da inoculação, o consórcio das linhagens *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 e a linhagem *B. licheniformis* MGB2281 apresentaram médias superiores ao tratamento não inoculado (B0). As pequenas diferenças entre as médias podem estar relacionadas a inibição do desenvolvimento das plantas devido às baixas temperaturas durante a realização do estudo. Segundo a Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba-SP (LES, 2022) as temperaturas médias entre os meses de julho e novembro de 2022 variaram entre 19,5 e 23,5 °C, cerca de 10°C abaixo da temperatura considerada ideal para o desenvolvimento da cultura que está entre 30 e 34°C (Marchiori, 2004). As baixas temperaturas podem afetar o desenvolvimento da cana-de-açúcar, reduzindo eficiência fotossintética, altura das plantas, massa seca e diâmetro do colmo, tendo como causa principal uma limitação bioquímica pela redução da atividade enzimática da Rubisco (Guerra et al., 2013).

Diferentemente do que foi observado nas avaliações de promoção de crescimento, aos 30 DAP na análise enzimática de fosfatase alcalina houve interação entre inoculação e doses de P_2O_5 , evidenciando que a atividade desta enzima depende diretamente da relação entre estes

dois fatores. Os tratamentos inoculados com consórcio das linhagens *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 e a linhagem *B. licheniformis* MGB2281 na dose de 90 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ apresentaram médias de p-nitrofenol aproximadamente 6 vezes maiores que a do tratamento sem a inoculação. Aos 120 DAP mesmo com a ausência da interação entre os fatores, as doses de 90 kg.ha⁻¹ e 180 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ foram superiores ao tratamento sem adubação, ocorrendo o mesmo para fosfatase ácida no mesmo período avaliado. Apesar da baixa disponibilidade de P no solo ser amplamente considerada como uma condição favorável para que os microrganismos expressem características de solubilização e mineralização de P, estudos recentes, sugerem um limite mínimo de P para o bom funcionamento desses mecanismos e a obtenção de respostas positivas na promoção de crescimento nas plantas (Sánchez-Esteva et al., 2016; Gómez-Muñoz et al., 2018).

Na análise da atividade de fosfatase ácida não houve interação entre os fatores e nem diferenças estatísticas entre os tratamentos nas análises individuais. No entanto, o tratamento inoculado com o consórcio apresentou a maior atividade da enzima tanto aos 30 quanto aos 120 DAP. Em relação as doses de P₂O₅, o tratamento sem adubação apresentou maior atividade enzimática aos 30 DAP e a dose de 90 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ aos 120 DAP. De forma geral, a atividade da fosfatase ácida foi inversamente proporcional à disponibilidade de P no solo. Em ensaio com cana-de-açúcar associada à adubação com composto (torta de filtro e cinzas) enriquecido com fosfato de Bayovar e inoculada com consórcio de linhagens de *Pseudomonas* e *Bacillus*, também não houve efeito da inoculação na produção da enzima fosfatase ácida aos 6 meses após o plantio, apenas após 12 meses de ensaio houve efeito da inoculação quando o teor de P disponível no solo havia diminuído (Silva, 2018).

A atividade enzimática da fitase apresentou interação significativa entre os fatores apenas aos 30 DAP, em que o tratamento inoculado com a linhagem *B. licheniformis* MGB2281 na dose de 0 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ apresentou a maior média. Apesar da ausência de interação entre os fatores, aos 120 DAP o tratamento com MGB2281 manteve a maior média entre os tratamentos. A ausência de interação entre os fatores inoculação e diferentes doses de P₂O₅ pode estar relacionada a maior afinidade das linhagens utilizadas no ensaio com as frações orgânicas do solo das quais o fitato faz parte. Além disso, a baixa atividade da enzima fitase pode estar relacionada com a maior estabilidade do fitato no solo uma vez que este possui elevada afinidade com os colóides do solo, dificultando o processo de mineralização (Bhat et al., 2017).

Os resultados positivos de atividade enzimática para os tratamentos inoculados refletiram positivamente nos teores de P lábil no solo, apresentando conseqüentemente maiores concentrações des P nessa fração. De forma semelhante Moradi e Rasouli (2019) constataram

que a inoculação do solo com *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus megaterium* resultou no aumento de 66% de P disponível, 15% de Po e 92% Pi em relação ao controle sem inoculação. Aye et al. (2021), em ensaio de campo com cana-de-açúcar, associando inoculação com *Kosakonia radicincitans* e *Bacillus subtilis* e adubação com fosfato de diamônio e fosfato de rocha, verificou que os tratamentos inoculados apresentaram um incremento na concentração de P total no solo.

Apesar dos resultados promissores para atividade enzimática e concentração de P no solo, a inoculação ou a adição de P_2O_5 não influenciaram os teores de P nas plantas aos 120 DAP. Resultados semelhantes foram relatados por Lopes et al. (2021), após dois anos de condução de ensaio em campo com cana-de-açúcar, combinando adubação com torta de filtro + diferentes fontes de P e inoculação com bactérias solubilizadoras, os autores relataram que não foi observado o efeito das fontes de P e da inoculação nos teores foliares do nutriente em ambos os anos, também não houve diferenças em outros aspectos fisiológicos da planta como o perfilhamento, teor de fibra, Brix, pol e ATR .

A ausência de influência da inoculação nos teores de P presente na parte aérea pode ser estar relacionada a competição entre a microbiota nativa e as linhagens inoculadas, Ibarra-Galeana et al. (2017), ao comparar os resultados em solo esterilizado e solo não estéril inoculados separadamente com as linhagens *B. megaterium* e *B. flexus*, verificaram que o desenvolvimento e os teores de P das plantas de milho foram afetados negativamente no solo não estéril inoculado com *B. flexus*, enquanto que para *B. megaterium* os resultados não foram afetados pela competição ou interação com os microrganismos nativos do solo não estéril.

O estudo associando a inoculação de cana-de-açúcar com a linhagem *B. licheniformis* MGB2281 e o consórcio bacteriano de *B. altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B. altitudinis* MGB25 à diferentes doses de P_2O_5 utilizando FNR Bayovar, confirmou as hipóteses iniciais de que as linhagens escolhidas são promotoras do crescimento vegetal e que a capacidade de solubilização e mineralização de fosfato é regulada pelo teor de P disponível no solo, dependendo da fonte e da quantidade do nutriente para que esses mecanismos sejam ativados. A combinação da inoculação das linhagens estudadas em cana-de-açúcar cultivada em solos deficientes em P pode ser uma alternativa viável para melhorar o desenvolvimento de plantas e compor uma estratégia de manejo mais sustentável para o uso de fertilizantes fosfatados. Nesse sentido, estudos futuros em campo, considerando outras variáveis como diferentes tipos de solo, fontes fosfatadas e variedade de cana-de-açúcar, retratando o mais próximo possível da realidade dos canaviais serão necessários para obtenção de uma conclusão mais assertiva sobre o uso benéfico dessas linhagens.

Referências

- ALBUQUERQUE, A. W. DE et al. Growth and yield of sugarcane as a function of phosphorus doses and forms of application. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 29–35, 2016.
- AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 115-118, 1966.
- AYE, P. P.; PINJAI, P.; TAWORNPRUEK, S. Effect of Phosphorus Solubilizing Bacteria on Soil Available Phosphorus and Growth and Yield of Sugarcane. **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, v. 18, n. 12, 12 jun. 2021.
- BECH, J. et al. Selenium and other trace elements in phosphate rock of Bayovar–Sechura (Peru). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 107, n. 2, p. 136–145, 2010.
- BHAT, N. A. et al. Soil biological activity contributing to phosphorus availability in vertisols under long-term organic and conventional agricultural management. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, art. 01523, 2017.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **Conflito no leste europeu completa um mês e setor de fertilizantes segue apreensivo**. Piracicaba: USP, 2022. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opiniao-cepea/conflito-no-leste-europeu-completa-um-mes-e-setor-de-fertilizantes-segue-apreensivo.aspx>>. Acesso em: 22 dez. 2022.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Boletim Logístico – janeiro /2023**. abril 2023. Brasília, DF: CONAB, 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/boletim-logistico>>. Acesso em: abril 2023.
- CONDON L. M. ; GOH. K. M. ; NEWMAN, R. H. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ³¹P nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Soil Science**, v. 36, n. 2, p. 199-207, 1985.
- DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOSISTEMAS - LES. **Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, 2022. Disponível em: <<http://www.leb.esalq.usp.br/leb/postocon.html>>. Acesso em: 30 dez. 2022.
- EHLERS, K. et al. Phosphorus limitation in a Ferralsol: impact on microbial activity and cell internal P pools. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 558–566, 2010.
- FÁVARO, L.C.L.; SEBASTIANES, F.L.; ARAÚJO, W.L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **Plos One**, v. 7, n. 6, 2012.
- GÓMEZ-MUÑOZ, B. et al. Effects of *Penicillium bilaii* on maize growth are mediated by available phosphorus. **Plant and Soil**, v. 431, n. 1-2, p. 159–173, 2018.

GUERRA, A. et al. Efeitos da temperatura do ar na fotossíntese da cana-de-açúcar na fase inicial do desenvolvimento. **Agrarian**, v. 7, n. 24, p. 211–217, 2013.

GUMIERE, T. et al. Phosphorus source driving the soil microbial interactions and improving sugarcane development. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, art. 4400, 2019.

HEDLEY, M. J.; STEWART, J. W. B.; CHAUHAN, B. S. Changes in inorganic and organic soil-phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, n. 5, p. 970-976, 1982.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, p. 227-239, 1997.

IBARRA-GALEANA, J. A. et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 801–811, 2017.

KAMINSKI, J; PERUZZO, G. **Eficácia de fosfatos naturais reativos em sistemas de cultivo**. Santa Maria, RS: SBCS, Núcleo Regional Sul, 1997. 31 p. (Boletim Técnico; 3).

LOPES, C. M. et al. Improving the fertilizer value of sugarcane wastes through phosphate rock amendment and phosphate-solubilizing bacteria inoculation. **Journal of Cleaner Production**, v. 298, art. 126821, 2021.

MARCHIORI, L. F. S. **Influência da época de plantio e corte na produtividade da cana-de-açúcar**. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. 273 p.

MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos Solos: uma análise crítica**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 26 p. (Documentos; 85).

MORADI, N.; RASOULI-SADAGHIANI, M. Effect of Phosphate-solubilizing bacteria (PSB) on distribution of phosphorus forms in a calcareous soil. **Applied Soil Research**, v. 7, n. 2, p. 67–81, 23 ago. 2019.

R CORE TEAM (2022). R: A language and environment for statistical. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

ROSA, P. A. L. et al. Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, art. 00032, 2020.

SÁNCHEZ-ESTEVA, S. et al. The effect of *Penicillium bilaii* on wheat growth and phosphorus uptake as affected by soil pH, soil P and application of sewage sludge. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 3, n. 1, art. 21, 2016.

SANTOS, A. D. et al. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ª ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

SANTOS, V. R. Crescimento e produtividade agrícola de cana-de-açúcar em diferentes fontes de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, p. 389-396, 2009.

SILVA, A. M. M. **Aumento da produtividade e mudanças na microbiota do solo em cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de composto e inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato**. 2018. Dissertação (Mestrado em Solo e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

SOARES, W. V. **Uso de fosfatos naturais reativos em pastagens com gramíneas forrageiras tolerantes à acidez na região do cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2000. (Comunicado Técnico; 30).

SOUZA, R. M. DE et al. Eficiência agronômica de fosfatos de rocha em solo com elevado teor de cálcio trocável. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 6, p. 1816–1825, 2014.

TABATAI, M. A. Soil enzymes. In: BOTTOMLEY, P. J.; ANGLE, J. S.; WEAVER, R.W. **Methods of soil analysis: part 2 - microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. cap. 37. p. 775-833.

VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H. Outras culturas comerciais: Cana-de-açúcar. In: VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Boletim técnico 100: recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. Cap.22, p. 237-239.2ª. ed. IAC: FUNDAG, 1997.

4. DRAFT GENÔMICO DE *Bacillus licheniformis* MGB2281 E IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO

Nos últimos anos, a agricultura sustentável deixou de ser apenas uma alternativa e tornou-se uma necessidade. Estudos envolvendo a utilização de microrganismos benéficos às plantas têm permitido inúmeros avanços nessa direção, principalmente os voltados às bactérias promotoras de crescimento vegetal, que possibilitam a utilização mais racional de fertilizantes. Dentre os inúmeros grupos estudados, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, que além de possuírem diversas características benéficas as plantas, são capazes de produzir esporos altamente resistentes ao calor e estresse hídrico, permitindo sobreviver às condições do campo, viabilizando dessa forma a produção de inoculantes comerciais eficazes. Os efeitos positivos dessas bactérias incluem, a produção de fitormônios como o ácido indolilacético (AIA), as citocininas, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e as poliaminas. Além da produção de compostos bioativos, estas bactérias atuam como facilitadoras na obtenção de nutrientes, aumentando a disponibilidade mineral de compostos como fósforo (P), nitrogênio (N), potássio (K), enxofre (S) e ferro (Fe) nos solos, que são macro e micronutrientes essenciais para o bom desenvolvimento das culturas. Devido a essa grande diversidade de mecanismos, o entendimento do funcionamento e das interações bactéria-planta, é algo desafiador. A abordagem molecular utilizando técnicas como os Sequenciamentos de Nova Geração (NGS) e a bioinformática tem permitido uma visão mais profunda dessas vias, revelando todo aparato genético que as suportam, permitindo a descoberta de possíveis genes de interesse e auxiliando na elucidação das vias envolvidas na promoção de crescimento de plantas. Nesse sentido, este estudo foi realizado o sequenciamento e montagem do *draft* de genoma do *B. licheniformis* MGB2281 bem como a anotação e identificação de genes relacionados aos mecanismos de promoção de crescimento, principalmente os relacionados ao ciclo do P. A linhagem *Bacillus licheniformis* MGB2281 é promotora de crescimento de cana-de-açúcar e possui capacidade de solubilizar e mineralizar fosfatos, verificados em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação. O *draft* genômico da linhagem estudada foi obtido por meio da plataforma Illumina MiSeq e confirmou a grande diversidade de genes relacionados a promoção de crescimento vegetal, além dos genes relacionados ao ciclo do P, revelando genes responsáveis pela biossíntese de AIA, fixação biológica do nitrogênio (FBN), produção de sideróforos entre outros, sugerindo o grande potencial de *B. licheniformis* MGB2281 como promotor de crescimento vegetal.

Palavras-chave: NGS; Genoma; *Bacillus*; Promoção de crescimento vegetal.

ABSTRACT

In recent years, sustainable agriculture has ceased to be just an alternative and has become a necessity. Studies involving the use of microorganisms that are beneficial to plants have allowed for numerous advances in this direction, especially those aimed at plant growth-promoting bacteria, which enable a more rational use of chemical fertilizers. Among the numerous groups studied, bacteria belonging to the genus *Bacillus* stand out, which in addition to having several beneficial characteristics for plants, are capable of producing spores that are highly resistant to heat and water stress, allowing them to survive in field conditions, thus enabling the production of effective commercial inoculants. The positive effects of these bacteria include the production of phytohormones such as indolylacetic acid (IAA), cytokinins, gamma-aminobutyric acid (GABA) and polyamines. In addition to the production of bioactive compounds, these bacteria act as facilitators in obtaining nutrients, increasing the mineral availability of compounds such as phosphorus (P), nitrogen (N), potassium (K), sulfur (S) and iron (Fe) in soils, which are essential macro and micronutrients for the proper development of crops. Due to this great diversity to control, the understanding of the functioning and of the plant-bacteria is something challenging. The molecular approach using techniques such as Next Generation Sequencing (NGS) and bioinformatics has allowed a deeper view of these pathways, revealing all the genetic apparatus that support them, allowing the discovery of possible genes of interest and supporting to elucidate the pathways involved in the plant growth promotion. In this sense, this study was carried out with the sequencing and assembly of the draft genome of *Bacillus licheniformis* MGB2281 as well as the annotation and identification of genes related to growth promotion switches, mainly those related to the P cycle. The *B. licheniformis* MGB2281 strain is promoter of sugarcane growth and has the ability to solubilize and mineralize phosphates, verified in in vitro tests and in greenhouse. The MGB2281 genomic draft was obtained through the Illumina MiSeq platform and confirmed the great diversity of genes related to the promotion of plant growth, in addition to the genes related to the P cycle, revealing genes responsible for the biosynthesis of AIA, biological and biological (FBN), production of siderophores, among others. suggesting a multifunctional potential of *B. licheniformis* MGB2281 as a plant growth promoter.

Keywords: NGS; Genome; *Bacillus*; Plant growth promotion.

4.1. Introdução

Entre as diferentes espécies microbianas consideradas benéficas as plantas, destacam-se as do gênero *Bacillus*. A relevância das bactérias deste gênero está relacionada às diferentes características presentes em seus membros, que além de conferirem um melhor desenvolvimento vegetal, possibilitam o desenvolvimento de produtos comerciais e a melhor sobrevivência dos inoculantes no campo (Nascimento et al., 2020).

A promoção de crescimento vegetal está associada a diferentes mecanismos realizados por essas bactérias. Dentre eles, estão a produção de substâncias bioativas como os fitormônios indutores de crescimento vegetal, ácido indolilacético (AIA), citocininas, ácido gama-aminobutírico (GABA) e as poliaminas. Além da produção dos compostos bioativos, as bactérias promotoras de crescimento vegetal do gênero *Bacillus* atuam como facilitadoras na obtenção de nutrientes, aumentando a disponibilidade mineral de compostos como P, N, K, S e Fe nos solos, elementos essenciais para o bom desenvolvimento das culturas (Olanrewaju et al., 2021).

O funcionamento dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal resulta da expressão de genes específicos que possivelmente foram selecionados ao longo da evolução das interações microrganismo-planta (Bruto et al., 2014). A identificação de tais genes, tornou-se possível por meio do uso de ferramentas moleculares como os Sequenciamentos de Nova Geração (NGS), que possibilitaram a construção de genomas. Associados aos programas de bioinformática, os dados de sequenciamento genômico permitiram a comparação e anotação de genes de interesse a partir de bancos de dados mundiais, expandindo o conhecimento genético acerca do potencial dos genomas bacterianos (Melo et al., 2011).

Analisar os mecanismos moleculares de promoção de crescimento vegetal sob uma perspectiva genômica é de suma importância, uma vez que, possibilita a identificação de genes de interesse, tornando possível a utilização destes genes na transformação de plantas e/ou outros organismos, além da compreensão dos sistemas de regulação destes mecanismos para melhor aproveitamento no campo (Batista, 2016). Nesse sentido, este capítulo apresenta o *draft* do genoma do *B. licheniformis* MGB2281, a anotação e curadoria manual de genes relacionados aos mecanismos de promoção de crescimento, principalmente os relacionados ao ciclo do P, com o objetivo de complementar e validar os resultados de promoção do crescimento descritos nos capítulos anteriores.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Linhagem bacteriana

A linhagem *B. licheniformis* MGB2281 foi isolada do sedimento de mangue de Bertioga/SP e pertence a coleção do laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”.

4.2.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico, a linhagem MGB2281 foi cultivada *overnight* em 5 mL de meio LB, a 28°C, sob agitação constante (150 rpm). O cultivo foi posteriormente centrifugado (1,5 mL) e o pellet de células obtido foi utilizado na extração de DNA utilizando o Kit *DNeasy Blood&Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante para bactérias Gram-positivas. A amostra de DNA extraída foi analisada em gel de agarose (1%) e a concentração determinada em espectrofotômetro BioDrop μ LITE (Biochrom).

4.2.3. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

O sequenciamento genômico foi realizado pela NGS Soluções Genômicas (<https://ngsgenomica.com.br/>), em Piracicaba-SP. Bibliotecas de DNA de *B. licheniformis* MGB2281 foram preparadas utilizando o Kit DNA Nextera XT (Illumina, San Diego, EUA), e sequenciadas através da Plataforma Illumina MiSeq com kit reagente V3 (Illumina), gerando leituras (reads) de 2x 250 bp. Os programas FastQC (versão 0.11.8) e MultiQC (versão 1.11) (Ewels et al., 2016) foram utilizados para verificação da qualidade dos dados brutos. As reads foram trimadas ($\text{Phred} \geq 25$) removendo adaptadores e sequências menores que 50 bp pelo programa Trimmomatic (versão 0.39) (Bolger et al., 2014).

Após o pré-processamento das reads, o genoma bacteriano foi montado com o *software* SPAdes (versão 3.15.3) (Prjibelski et al., 2020) utilizando os parâmetros `--isolate` e `--cov-cutoff "auto"`. Para identificação taxonômica de cada um dos contigs pertencentes a *B. licheniformis* MGB2281, foi utilizado BlobTools (versão 1.0.1) (Laetsch; Blaxter, 2020). *Scaffolding* e *gap closing* foram realizados pelo programa Platanus (versão 1.2.4) (Kajitani et al., 2014), e *scaffolds* menores que 1000 nt foram excluídos com Pullseq (versão 1.0.2) (github.com/bcthomas/pullseq). Por fim, as reads trimadas foram mapeadas com BWA-MEM v0.7.17 (Li, 2013) e usadas para o polimento do genoma com *Pilon* (versão 1.24) (Walker et al., 2014). As estatísticas do genoma foram obtidas com *Quast* (versão 5.0.2) (Gurevich et al.,

2013) e a integridade foi avaliada com CheckM (versão 1.2.0) (Parks et al., 2015) e BUSCOv5 (Simão et al., 2015) via gVolante2 web server (Nishimura et al., 2017).

A predição gênica foi realizada usando *Prokaryotic Genome Annotation System* (PROKKA, versão 1.14.6). A anotação funcional das sequências codificadoras de proteínas foi realizada com bases de dados biológicos de grupos ortólogos. Categorias de *Clusters of Orthologous Groups* (COG) foram atribuídas usando eggNOG-mapper (versão 5.0). Da mesma forma, vias metabólicas e designações de ortologia baseadas em *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) foram obtidas com os programas BlastKOALA (versão 2.2) e KEGG Automatic Annotation Server (KAAS, versão 2.1). Além disso, uma categorização funcional em subsistemas SEED foi realizada usando o servidor web *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST, versão 2.0). A construção do mapa para visualização do genoma foi realizada utilizando o Proksee.

4.2.4. Busca de genes relacionados a promoção de crescimento vegetal

Para o direcionamento da busca por genes de interesse no genoma do *B. licheniformis* MGB2281 primeiramente foi realizado um levantamento de estudos com diferentes espécies de *Bacillus* e outras bactérias promotoras de crescimento vegetal que tiveram os genomas montados e anotados (Nanjani et al., 2022; Olanrewaju et al., 2021; Teixeira et al., 2021; Santos-Torres et al., 2021; Nascimento et al., 2020; Zeng et al., 2018; Batista et al., 2016). A partir disso, foram listados genes relacionados aos mecanismos de solubilização de fosfatos, mineralização de fosfatos e o ciclo do P em bactérias, além de outros relacionados à promoção do crescimento vegetal que posteriormente foram utilizados como base para investigação dos genes anotados de MGB2281. A curadoria foi realizada através da comparação entre os resultados obtidos nos bancos de dados COG, KEGG, NCBI nonredundant protein e UniProtKB/Swiss-Prot. Agrupamentos de genes biossintéticos de metabólitos secundários foram detectados com antiSMASH (versão 6.1.1) (Blin et al., 2021).

4.3. Resultados

4.3.1. Características gerais do genoma de *B. licheniformis* MGB2281

O sequenciamento do genoma do *B. licheniformis* MGB2281 por meio da plataforma Illumina MiSeq gerou aproximadamente 2.814.526 *reads* com tamanho médio de 250 pb. O *draft* genômico dessa linhagem é composto por 22 contigs, com N50 de 808.095 pb, conteúdo

médio de G+C de 46,08 % e cobertura de 136x. O genoma bacteriano é formado por 4.250.629 pb e a predição resultou em 4.354 CDSs (sequencias codificantes) (Tabela 4.1).

Tabela 4. 1 Métricas do genoma de *B.licheniformis* MGB2281

Tamanho do genoma (bp)	4.250.629
Cobertura (vezes)	136
Número de <i>scaffolds</i>	22
N50 (pb)	808.095
L50	3
Conteúdo G+C (%)	46.08
Compleitude (%)	99.11
BUSCOs	446
Genes (total)	4442
CDS (total)	4354
rRNAs	8
tRNAs	79
Número de genes codificadores com COGs atribuídos	3.802
Número de genes codificadores com KOs atribuídos	2.507

Nota: CDS: Coding DNA Sequence; COGs: *Clusters of Orthologous Groups*; KOs: KEGG *Orthology*

Por meio da ferramenta RAST, 2.167 (50%) genes oriundos da anotação do genoma do MGB2281 foram classificados funcionalmente, sendo divididos em 26 grupos. Os mais abundantes foram “Carboidratos”, representando 19% do número total de genes codificadores de proteínas do genoma bacteriano, seguido de “Aminoácidos e Derivados” (15%) e “Metabolismo de Proteínas” (10%). Dentre os relacionados à promoção de crescimento vegetal estão os de metabolismo secundário, em que estão contidos os fitormônios e os de metabolismo de nutrientes como, N (1%), P (1%), S (1%), K (0,5 %) e Fe (1%) que englobam genes relacionados à aquisição, transporte e outros mecanismos (Figura 4.1).

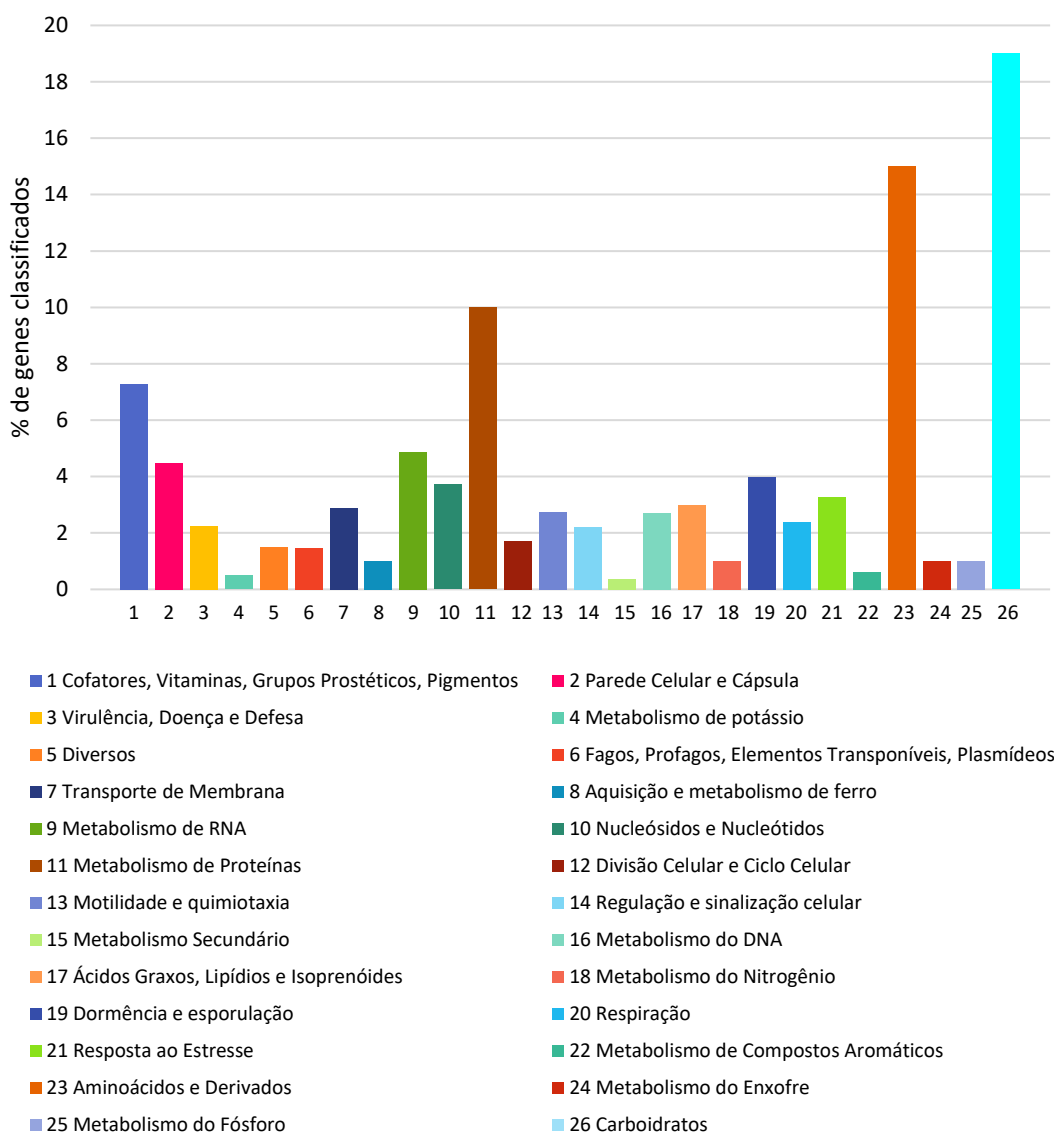


Figura 4. 1 Distribuição de genes de *B.licheniformis* MGB2281 em categorias funcionais fornecidas pelo programa RAST.

Foram classificados 3.802 genes presentes no genoma de *B. licheniformis* MGB2281 em categorias e subcategorias COG pelo programa eggNOG-mapper. As subcategorias mais abundantes foram a S (função desconhecida) representando 28% do número total de genes, seguida de E (Metabolismo e transporte de aminoácidos) e K (Transcrição), ambas com 9% dos genes e a G (Metabolismo e transporte de carboidratos) com 7% (Figura 4.2).

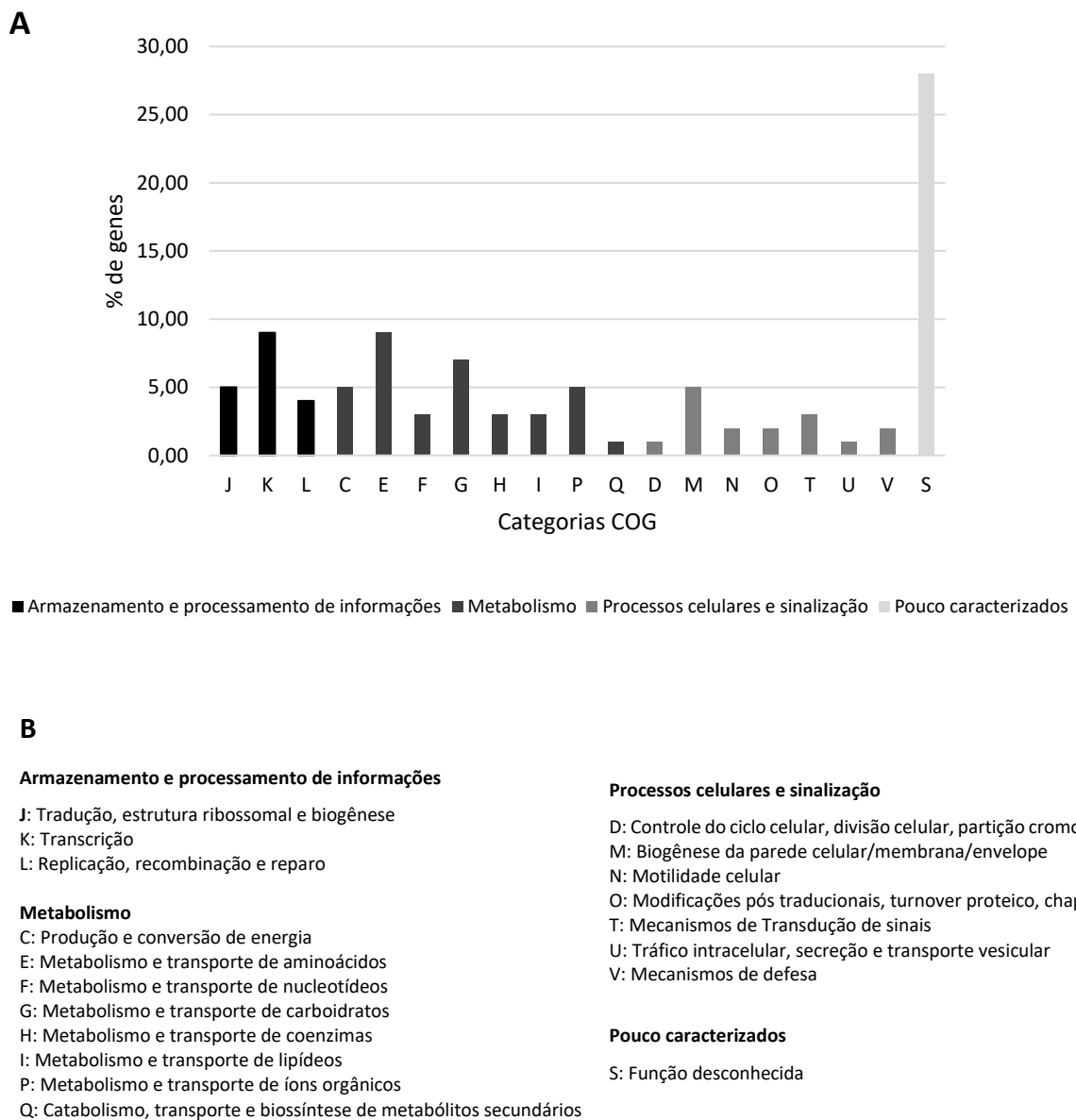


Figura 4. 2 Distribuição dos genes de *B.licheniformis* MGB2281 em classes funcionais de *Clusters of Orthologous Groups* (COG) fornecidas pelo programa eggNOG-mapper. A) Proporção de sequencias codificantes de cada categoria COG, o percentual foi calculado a partir do numero total de genes anotados. B) Categorias COG e suas respectivas funções

4.3.2. Genes de em *B. licheniformis* MGB2281 relacionados a promoção de crescimento vegetal

No genoma de *B. licheniformis* MGB2281 foram identificados 170 genes envolvidos na promoção de crescimento vegetal. Dentre os relacionados a aquisição de P foram identificados os envolvidos nos mecanismos de mineralização como *phoD* e *phoH* responsáveis pela codificação da enzima fosfatase alcalina e o gene *phy* responsável pela produção da enzima fitase. Também foram encontrados genes envolvidos no processo de solubilização de P por meio

da produção de ácidos orgânicos como *ldh*, *sdhABC*, *pflAB* e *gdh* presentes nas vias de produção dos ácidos láctico, cítrico, fórmico e glucônico, ou por meio da ação de sideróforos apresentando os genes envolvidos na biossíntese dos tipos bacilibactina (*dhbABCEF* e *feuABC*) e aerobactina (*iucABCD*), e seus transportadores *yusV*, *yfiZ* e *yfiY*. Além disso, genes pertencentes as vias metabólicas do P também foram identificados como *phoR* e *phoP* envolvidos no processo de regulação e homeostase e os *pstABCS* e *pit* codificadores dos transportadores específicos de P no interior das células.

A mineração do genoma de MGB2281 revelou uma grande diversidade de genes relacionados ao processo de promoção de crescimento vegetal. Foram identificados genes envolvidos na aquisição de N, K e S como *nifU* e *fix* que são codificantes de proteínas reguladoras da FBN, *ackA* e *mdh* presentes nas vias de produção dos ácidos acético e málico solubilizadores de K e os genes *ssu* e o *cys* que atuam na mineralização do S presente na matéria orgânica do solo. Além dos genes envolvidos na obtenção de macronutrientes essenciais para o bom desenvolvimento das plantas, foram identificados genes da biossíntese de poliaminas e fitormônios como os *spe* da via de produção de espermidina, *trp* que é o principal precursor da síntese de AIA e os genes *mia* e *yvd* envolvidos na produção de citocininas. Também foram identificados os genes *gabD* e *gabT* codificantes do ácido gama-aminobutírico (GABA), que é um aminoácido relacionado à tolerância ao estresse das plantas.

Esses genes podem ser visualizados no mapa do genoma de *B. licheniformis* MGB2281 (Figura 4.3). Outras informações como tamanho, funções, classes KO (KEGG) e COG estão no Anexo A.

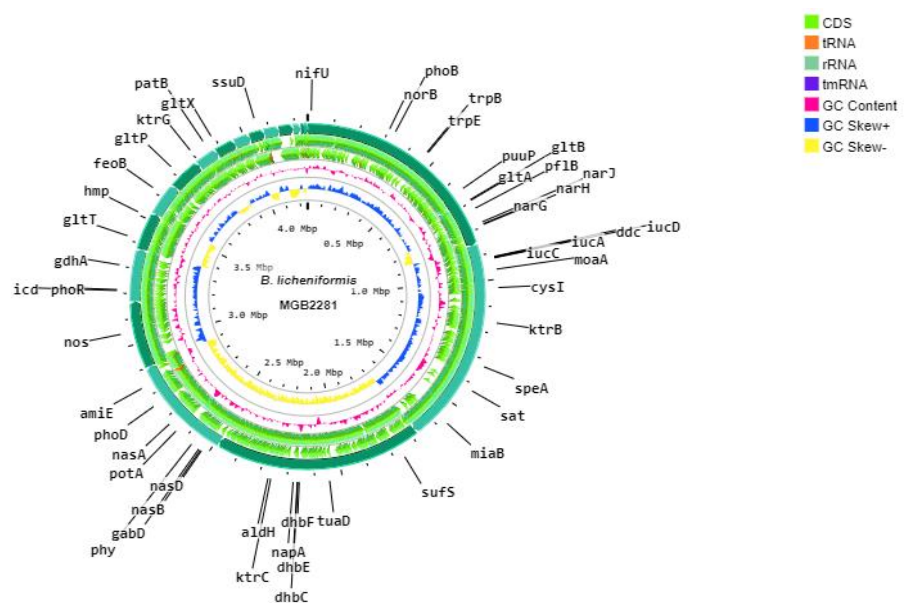


Figura 4. 3 Genoma de *B. licheniformis* MGB2281

Foram identificados 4 *clusters* gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários atuantes na promoção de crescimento de plantas no genoma (Tabela 4.2). Os *clusters* 1 e 2 estão relacionados à síntese de sideróforos dos tipos aerobactina e bacilibactina, e os *clusters* 3 e 4 estão relacionados à produção de compostos antimicrobianos como a liquenicidina e a liquenisina, respectivamente, evidenciando possivelmente uma vantagem competitiva de MGB2281 durante a colonização de plantas.

Tabela 4. 2 Clusters gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários de *B. licheniformis* MGB2281 definidos pela ferramenta antiSMASH

<i>Cluster</i> gênico	Tipo	<i>Scaffold</i>	Localização	Produto
1	Sideróforos	2	54,871 - 70,337	Aerobactina
2	NRPS	3	453,778 - 500,935	Bacilibactina
3	Lantipeptídeo classe II	3	690,487 - 717,448	Liquenicidina
4	NRPS	4	105,943 - 171,368	Liquenisina

4.4. Discussão

A utilização de microrganismos na agricultura tornou-se uma tendência em ascensão nos últimos anos, impulsionando diversos estudos nessa direção (Ramakrishna; Yadav; Li, 2019). Apesar disso, ainda existem questionamentos sobre o funcionamento e efetividade dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por bactérias (Dasgupta et al., 2021). O uso de ferramentas moleculares como os sistemas de sequenciamento de nova geração (NGS) e programas de bioinformática têm trazido respostas a esses questionamentos (Batista, 2016). Por meio da montagem de genomas, estas ferramentas permitem a visualização do aparato genético por trás destas vias, tornando possível a identificação de genes de interesse e a elucidação dos sistemas de regulação destes mecanismos (Krishnaraj; Dahale, 2014).

Nesse sentido, o presente estudo apresenta o *draft* do genoma de *B. licheniformis* MGB2281, que permitiu um melhor entendimento dos mecanismos relacionados ao ciclo do P nesta bactéria, assim como a verificação de outros genes relacionados a promoção de crescimento e possíveis interações sinérgicas entre esses genes. Apesar do *draft* genômico não consistir em um produto finalizado, pode fornecer informações valiosas sobre a biologia do microrganismo sequenciado, além de tornar possível estimar o número de genes, as suas classificações e relações com conjunto de genes de outros microrganismos (Batista, 2016).

O *draft* do genoma do *B. licheniformis* MGB2281 é composto por 4.250.629 pb, composto por 22 *contigs* e completude de 99,11%. A anotação e curadoria do genoma teve como foco os genes relacionados a promoção de crescimento vegetal, principalmente os relacionados ao ciclo do P em bactérias totalizando 170 genes curados.

Uma das principais características associadas à promoção do crescimento vegetal é a capacidade de aumentar a disponibilidade de nutrientes essenciais presentes no solo às plantas, através de diferentes mecanismos como a solubilização e mineralização de fosfatos, fixação biológica do nitrogênio (FBN), produção de sideróforos, redução do sulfato e solubilização de K. Desse modo a demanda por: P, N, Fe, S e K, respectivamente é suprida pela ação de bactérias benéficas.

O fósforo (P) é um dos macronutrientes limitantes a produtividade dos sistemas agrícolas (Holford, 1997). Apesar da sua grande importância a maior parte do P presente no solo encontra-se em uma forma indisponível para as plantas. As bactérias apresentam mecanismos que promovem a disponibilização de P a partir das diferentes formas presentes no solo, o P inorgânico (Pi) e o P orgânico (Po). Os mecanismos envolvidos na liberação de P a partir de uma fonte inorgânica, recebem o nome de solubilizadores e dentre eles estão: a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos, produção de exopolissacarídeo e de sideróforos. Os mecanismos envolvidos na liberação de P a partir de uma fonte orgânica recebem o nome de mineralizadores e dentre eles estão a produção das enzimas fosfatases e fitases (Rawat et al., 2020; Behera et al., 2013).

A linhagem *B. licheniformis* MGB2281 foi descrita anteriormente como uma linhagem potencial para a solubilização e mineralização de fosfatos, apresentando resultados positivos nos ensaios *in vitro* da produção das enzimas fitase e fosfatase e de solubilização de fosfato de cálcio. Além disso, também apresentou resultados positivos para atividade enzimática nos ensaios em casa de vegetação e atuou como promotora do crescimento vegetal em condições em que o P era o nutriente limitante. Corroborando com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e em casa de vegetação, no *draft* do genoma de *B. licheniformis* MGB2281 foram encontrados os genes, *phoD* e *phoH* responsáveis pela codificação da enzima fosfatase alcalina e o gene *phy* responsável pela produção da enzima fitase. Também foram encontrados genes relacionados a solubilização de fosforo inorgânico (Pi) como *ldh*, *sdhABC*, *pflAB* e o gene *gdh* responsáveis respectivamente pela produção dos ácidos lactato, cítrico, fórmico e glucônico (Krishnaraj; Dahale, 2014; Gyaneshwar et al., 2002; Santos-Torres et al., 2021). O ácido glucônico é reconhecido como principal ácido orgânico responsável pela solubilização de fosfatos (Duebel; Gransee; Merbach, 2000). A produção deste ácido ocorre pela via de oxidação

direta da glicose, em que a glicose é oxidada a ácido glucônico pela enzima glicose desidrogenase (GDH). Essa enzima é codificada pelo gene *gdh*, e possui como cofator a pirroloquinolina quinona (PQQ), uma molécula redox codificada pelo operon *pqq*, que consiste nos genes centrais *pqq* A, B, C, D, E e F (Wan et al., 2020). No genoma de *B. licheniformis* MGB2281 foram identificados dois genes responsáveis pela codificação da enzima GDH (*gdh*), mas não foram encontrados os genes *pqq* codificantes do cofator PQQ. A ausência dos genes *pqq* também foi relatada por Zeng et al. (2018) que analisou o genoma de *B. cereus* 905 comparando-o com o genoma de três linhagens distintas da mesma espécie, todas apresentaram o gene codificante da enzima GDH mas não do cofator PQQ.

Além dos genes diretamente relacionados aos mecanismos de solubilização e mineralização de fosfato, foram encontrados os genes *phoR* e *phoP*, codificadores das proteínas do sistema de dois componentes PhoR-PhoP que é responsável pela regulação e homeostase do P em bactérias do genero *Bacillus* (Hulett et al., 1994). Os genes dos transportadores específicos *pst* (*pstABC*) e *pit* (*pit*) componentes deste sistema também foram encontrados (Zeng et al., 2018).

Assim como o P, o N é um macronutriente fundamental para o bom desenvolvimento das plantas, sendo o principal constituinte das proteínas e da clorofila (Wagner, 2011). Algumas bactérias possuem a capacidade de converter o N atmosférico (N₂) em NH₃, forma assimilável pelas plantas, através da Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). A FBN é um processo complexo que necessita da expressão de genes específicos denominados *nif*, responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas diretamente no complexo nitrogenase (Teixeira, 1997). A nitrogenase é composta por duas metaloproteínas, a MoFe-proteína, que é responsável pela redução do substrato que contém Fe e molibdênio e a Fe-proteína, que é doadora de elétrons e ligada a molécula de ATP. Durante a fixação a Fe-proteína é reduzida por proteínas doadoras de elétrons denominadas ferredoxinas e/ou flavoxinas. No genoma de *B. licheniformis* MGB2281, foi encontrado um gene *nifU* codificador de proteínas diretamente relacionadas ao processo de FBN. Também foram encontrados os genes *moaABCDE* e os *moeAB* codificadores de proteínas envolvidas na biossíntese do cofator ferro-molibdênio componente principal da MoFe-proteína e os genes *fer* e *ykuPN* codificadores das proteínas ferredoxinas e flavoxinas, respectivamente. Alguns estudos definem diferentes espécies de *Bacillus* como fixadoras de N baseados na atividade da nitrogenase (Xie et al., 1998), mas poucos detectaram a presença do gene *nif*. Na análise do genoma de *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 assim como em *B. licheniformis* MGB2281, foram identificados os genes *moa* e *moe* e os genes envolvidos na produção de ferredoxinas e flavoxinas, além do gene *fix* codificador de proteínas envolvidas na

regulação do processo de FBN, porém genes *nif* não foram encontrados (Batista, 2016). Em estudo genômico de diferentes espécies de *Bacillus*, Ding et al. (2005), relataram a presença do gene *nifH* nas espécies *B. megaterium* e *B. cereus*, sendo o primeiro relato na literatura da presença desse gene nestas espécies.

Outro processo importante relacionado ao ciclo do N é a desnitrificação que consiste na redução biológica do nitrato (NO_3^-) para N gasoso (N_2). Esse processo ocorre quando a disponibilidade de oxigênio molecular é baixa, levando as bactérias desnitrificantes a empregarem o NO_3^- e outras formas de N como receptores de elétrons na respiração (Tonetti, 2013), sendo considerada uma vantagem adaptativa (Zilli et al., 2019). O genoma de *B. licheniformis* MGB2281 apresentou genes codificantes de algumas das enzimas específicas empregadas no processo de desnitrificação como os *narGHIIJ* codificantes da enzima nitrato redutase, o *narK* codificante da enzima nitrito redutase, o *nasA* codificante da proteína transportadora de nitrato, *norB* codificante do óxido nitroso e o *nos* codificante da enzima óxido nitroso redutase. A presença de genes relacionados ao processo de desnitrificação, evidencia que as características do ambiente de origem do microrganismo atuam diretamente na modulação da expressão gênica, pois MGB2281 é um isolado de área de manguezal, ambiente encharcado com baixa concentração de O_2 (López-Maury; Marguerat; Bähler, 2009).

O potássio (K) é um macronutriente que possui como funções a ativação enzimática, a regulação da abertura e fechamento dos estômatos e o controle osmótico dos tecidos nas plantas. Além disso, também está relacionado a processos fisiológicos vitais como a respiração, metabolismo de carboidratos e fotossíntese (Kinpara, 2013; Oliveira Junior; Castro; Oliveira, 2018). As bactérias possuem mecanismos próprios para a obtenção deste nutriente, assim como para o Pi, a aquisição de K no solo ocorre por meio da solubilização através da excreção de ácidos orgânicos como: ácido acético, ácido málico, ácido cítrico, ácido glucônico e ácido oxálico, sendo este considerado o principal mecanismo de solubilização de K (Alves et al., 2021). Como mencionado nos parágrafos anteriores, o genoma de *B. licheniformis* MGB2281 apresentou genes envolvidos na produção de alguns desses ácidos. Além destes, também foi detectado o gene *ackA* codificante da enzima chave no processo de produção de ácido acético a acetato quinase, e o gene *mdh* codificante da enzima malato desidrogenase que promove a produção do ácido málico. Também foram encontrados genes codificadores de transportadores específicos de K os *ktrABG*. Chen et al. (2022) também encontraram os genes *ackA* e *mdh*, além dos genes *gltA* e *ppc* codificantes da síntese do ácido málico e cítrico na montagem do genoma completo de *B. aryabhattai* SK1-7 potencial solubilizador de K.

No genoma de *B. licheniformis* MGB2281 também foram detectados genes relacionados à obtenção de S no solo. Este é um nutriente estrutural das ligações dissulfeto de proteínas, aminoácidos, vitaminas e cofatores. Cerca de 95% do S no solo está presente na matéria orgânica como sulfonatos (S ligado ao carbono) e ésteres de sulfato, formas inacessíveis às plantas. Semelhante ao Po, para que este nutriente se torne disponível para as plantas é preciso passar pelo processo de mineralização, transformando-se na forma aniônica SO_4^{2-} (Narayana et al., 2022). Nas bactérias, dentre os genes conhecidos envolvidos na de aquisição do S via mineralização estão os *dsz* que atuam na redução assimilatória de sulfato, os *ssu* responsáveis pela degradação de sulfonatos e a família de transportadores de sulfato e tiosulfato (Lyubetsky et al., 2013). Estudos realizados com a espécie *B. cereus*, evidenciaram a presença dos genes *dszABCD*, codificantes das enzimas DBT sulfona monooxigenase, 2-HBP desulfinaase, DBT monooxigenase e flavina redutase, respectivamente, além dos genes *cysC*, *cysK* e *csyU* (Kashif et al., 2022). Da mesma forma, Nascimento et al. (2020), identificou genes da família *cys* (*cysPUWA*) na linhagem STB1 de *B. megaterium* e *ssuD* codificantes da enzima alcanossulfonato monooxigenase também foram identificados. O genoma da linhagem MGB2281, não apresentou genes pertencentes a família *dsz*, porém foram encontrados os genes *ssuD*, *ssuA*, *ssuC* e o *cysP*, indicando que possa auxiliar as plantas na aquisição de S presente na matéria orgânica do solo.

O ferro (Fe) é um micronutriente importante nos mecanismos de transformação energética, necessários para a manutenção de processos metabólicos vitais as plantas. Também é um componente estrutural de diversas enzimas como a Fe-quilatase, que tem como função fornecer o Fe a cadeia do transportador da clorofila, e de carreadores de elétrons, como a ferredoxina e fitoferritina, presentes nos cloroplastos e envolvidas na transferência de elétrons na fotossíntese (Barbosa Filho; Dynia; Fageria, 1994). Assim como o P, K e o S, a grande parte do Fe presente no solo está em sua forma insolúvel, não prontamente disponível para absorção pelas plantas. Os sideróforos são compostos orgânicos produzidos por bactérias, atuam como captadores e transportadores de Fe, através da complexação de íons férricos presentes no solo, formando ligações estáveis com o nutriente. Alguns dos íons férricos complexados por essas moléculas orgânicas possuem em sua composição P, como o fosfato férrico ($FePO_4$) uma das principais formas de P não disponível no solo, nesse sentido os sideróforos também são considerados parte dos mecanismos de solubilização de P (Birch; Bachofen, 1990; Ochoa-Loza; Artiola; Maier, 2001).

Os sideróforos são classificados em vários grupos, como os hidroximatos (aerobactina, ferricromo, ferrioxamina B), catecolatos (enterobactina e bacilibactina), carboxilatos

(petrobactina e rizobactina) ou fenolatos (Eida et al., 2020). A análise do genoma da linhagem MGB2281 revelou a presença de dois clusters completos de produção de sideróforos do tipo bacilibactina (*dhbABCEF*) e de aerobactina (*iucABCD*). Também foram encontrados genes codificantes de proteínas transportadoras de sideróforos *yusV*, *yfiZ* e *yfiY* (Nascimento et al., 2020) e genes relacionados diretamente ao metabolismo, homeostase e transporte do Fe como os *feoAB*, *sufBCDT* e *fhuBCDG* (Olanrewaju et al., 2021; Zeng et al., 2018).

Além da disponibilização de macro e micronutrientes, a produção de fitormônios e de poliaminas também é considerada um mecanismo promotor de crescimento vegetal por bactérias, participando em vários processos celulares fundamentais, como a transcrição e modificação de RNA, síntese protéica e modulação de atividades enzimáticas, entre outros. Dessa forma, atuam em diferentes rotas de crescimento e respostas a estresses abióticos (Takahashi; Kakehi, 2010). As principais poliaminas são a putrescina, cadaverina, espermidina e espermina (Melo, 2002). Por este motivo essas substâncias também foram investigadas no genoma de *B. licheniformis* MGB2281, foram identificados genes de biossíntese de espermidina *speABEG* e codificadores de transportadores ABC específicos *potABC* e *puuP*. Genes relacionados a biossíntese de fitormônios como os codificantes das vias biossintéticas do aminoácido L-triptofano *trpABCDEFs*, principal precursor da síntese de AIA, os genes *miaAB* e *yvdD* envolvidos na produção de citocininas e os *gabD* e *gabT* codificantes do ácido gama-aminobutírico (GABA), um aminoácido relacionado a tolerância a estresse das plantas (Nascimento et al., 2020), também foram encontrados no genoma de *B. licheniformis* MGB2281.

A montagem e análise do genoma de *B. licheniformis* MGB2281 trouxe visibilidade para a grande diversidade de genes relacionados à promoção de crescimento vegetal, indo além dos genes relacionados ao ciclo do P, revelando funções importantíssimas ainda não exploradas. Além disso, a identificação de genes de interesse contribui para programas de melhoramento genético e transformação de plantas e microrganismos, possibilitando a inserção de *traits* de interesse. Essas informações, somadas ao conjunto de outros dados moleculares obtidos, reforçam a elucidação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal e seu real efeito benéfico para as plantas. No entanto, ainda são necessários estudos funcionais dos genes de interesse identificados para esclarecer se as funções atribuídas a eles são de fato relevantes na promoção do crescimento vegetal. Nesse sentido, estudos futuros que envolvam métodos de validação através do silenciamento de genes para validação dos resultados obtidos serão necessários.

Referências

- ALVES, V.M.C. et al. **Solubilização de potássio presente em minerais por microrganismos e efeitos no desenvolvimento de culturas agrícolas**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. (Documentos; 264).
- BARBOSA FILHO, M.P.; DYNIA, J.F.; FAGERIA, N.K. **Zinco e ferro na cultura do arroz**. Goiânia, GO: EMBRAPA – CNPAF, 1994. (Documentos; 49).
- BATISTA, B. D. et al. Draft genome sequence of multitrait plant growth-promoting *Bacillus* sp. Strain RZ2MS9. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, art. e01402-16, 2016.
- BEHERA, B. C. et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.3, p. 97–110, 2013.
- BIRCH, L.; BACHOFEN, R. Complexing agents from microorganisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 46, p. 827–834, 1990.
- BLIN, K. et al. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W29–W35, maio 2021.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, abr. 2014.
- BRUTO, M. et al. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6261, set. 2014.
- CHEN, Y. et al. Whole-Genome Sequencing and Potassium-Solubilizing Mechanism of *Bacillus aryabhattai* SK1-7. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, art. 722379, 2022.
- DASGUPTA, D. et al. Microbial biofertilizers: Recent trends and outlook. In: De MANDAL, S.; PASSARI, A. K. (eds.). **Recent Advancement in Microbial Biotechnology**. Cambridge, MA: Academic Press, 2021. Cap. 1, p. 1–26, 2021.
- DING, Y. et al. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 5, p. 1271–1281. 2005.
- DUEBEL, A.; GRANSEE, A.; MERBACH, W. Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. v. 163, p. 387–392, 2000.
- EIDA, A. A. et al. Genome insights of the plant-growth promoting Bacterium *Cronobacter muytjensii* JZ38 with volatile-mediated antagonistic activity against *Phytophthora infestans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, art. 369, 2020.
- EWELS, P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047–3048, jun. 2016.

GUREVICH, A. et al. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 19 fev. 2013.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83–93, 2002.

HENG, L. **Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM**. Cambridge, MA: Cambridge Center, Broad Institute of Harvard and MIT, 2013.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, p. 227–239, 1997.

HULETT, F. M. et al. Sequential action of two-component genetic switches regulates the Pho regulon in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1348–1358, 1994.

KAJITANI, R. et al. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. **Genome Research**, v. 24, n. 8, p. 1384–1395, abr. 2014.

KASHIF, M. et al. Whole-Genome and Transcriptome Sequencing-Based Characterization of *Bacillus Cereus* NR1 from Subtropical Marine Mangrove and Its Potential Role in Sulfur Metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, art. 856092, 2022.

KERTESZ, M. A. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 404, p. 1939–1945, jul. 2004.

KINPARA, D. I. **A importância estratégica do potássio para o Brasil**. Planaltina, DF: Empraba Cerrados, 2003. (Documentos 100).

KRISHNARAJ, P. U.; DAHALE, S. Mineral phosphate solubilization: concepts and prospects in sustainable agriculture. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 2, p. 389–405, 2014.

LAETSCH, D. R.; BLAXTER, M. L. BlobTools: Interrogation of genome assemblies. **G3 (Bethesda)**, v. 10, n. 4, p. 1361–1374, 2020.

LÓPEZ-MAURY, L.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 8, p. 583–593, 2008

LUCHETA, A. R.; LAMBAIS, M. R. Sulfur in agriculture. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 5, p. 1369–1379. 2012.

LYUBETSKY, V. A.; SELIVERSTOV, A. V.; ZVERKOV, O. A. Transcription Regulation of Plastid Genes Involved in Sulfate Transport in Viridiplantae. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

MELO, L.H.V. et al. **Base de dados genômica de *Bacillus thurigiensis* subsp. *kurstaki* – estirpe S76**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2011. (Documentos; 279).

MELO, N.F. **Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, Laboratório de Biotecnologia, 2002.

NANJANI, S. et al. Genome analysis uncovers the prolific antagonistic and plant growth-promoting potential of endophyte *Bacillus velezensis* K1. **Gene**, v. 836, art. 186671, 2022.

NARAYAN, O. P. et al. Sulfur nutrition and its role in plant growth and development. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, art. 2030082, 2022.

NASCIMENTO, F. X. et al. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. **Biotechnology Reports**, v. 25, e00406, 2020.

NISHIMURA, O.; HARA, Y.; KURAKU, S. gVolante for standardizing completeness assessment of genome and transcriptome assemblies. **Bioinformatics**, v. 33, n. 22, p. 3635–3637, jul. 2017.

OCHOA-LOZA, F. J.; ARTIOLA, J. F.; MAIER, R. M. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 2, p. 479-485, 2001.

OLANREWAJU, O. S. et al. Genome Mining of Three Plant Growth-Promoting *Bacillus* Species from Maize Rhizosphere. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 12, p. 3949–3969, set. 2021.

OLIVEIRA JUNIOR, A. de; CASTRO, C. de; OLIVEIRA, F. A. de. **Potássio: cuidados para a manutenção do equilíbrio nutricional da soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2018.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, maio 2015.

PRJIBELSKI, A. et al. Using SPAdes De Novo Assembler. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 70, n. 1, jun. 2020.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, L. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10-18, 2019.

RAWAT, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 49-68, 2020.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SANTOS-TORRES, M. et al. Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. **Rhizosphere**. v. 17, art. 100290, 2021.

SIMÃO, F. A. et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210–3212, jun. 2015.

TAKAHASHI, T.; KAKEHI, J. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1–6, 2010.

TEIXEIRA, G. M. et al. Genomic Insights Into the Antifungal Activity and Plant Growth-Promoting Ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, art. 618415, jan. 2021.

TEIXEIRA, K.R.S. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio**. Seropédica, RJ: EMBRAPA, CNPAB, 1997.

TONETTI, A. L. et al. Desnitrificação em um sistema simplificado de tratamento de esgoto. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 381–392, dez. 2013.

WAGNER, S.C. Biological Nitrogen Fixation. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 15.

WALKER, B. J. et al. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e112963, nov. 2014.

WAN, W. et al. Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil. **Frontiers in Microbiology**. v.11, art. 752, 2020.

XIE, G.; SU, B.; CUI, Z. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River Valley. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 38, n. 6, p. 480–483, 1998.

ZENG, Q. et al. Comparative genomic and functional analyses of four sequenced *Bacillus cereus* genomes reveal conservation of genes relevant to plant-growth-promoting traits. **Scientific Reports**, v. 8, art. 17009, 2018.

ZILLI, J. É. et al. The importance of denitrification performed by nitrogen-fixing bacteria used as inoculants in South America. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1-2, p. 5–24, 2019.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tendência a adoção de práticas mais sustentáveis pela agricultura mundial, vem crescendo ao longo dos anos, sendo estimulada pelo aumento da demanda e pela conscientização dos impactos negativos na saúde ambiental e humana causado pelas práticas agrícolas convencionais, como o uso de fertilizantes minerais. O Brasil está entre os principais consumidores de fertilizantes do mundo, juntas as lavouras de soja, milho e cana de açúcar representaram em 2022, 73% do consumo de fertilizantes, dentre os principais fertilizantes consumidos estão os fosfatados (P_2O_5), sendo o país o terceiro maior consumidor do mundo. A deficiência de P na cana-de-açúcar afeta produtividade final, o rendimento de açúcar e a durabilidade dos canaviais. O uso de grandes quantidades do nutriente representa um grande problema ao produtor pois além do P ser um recurso mineral finito, o uso de grandes quantidades onera os custos de produção e causam impactos negativos ao meio ambiente. O uso de microrganismos promotores do crescimento vegetal, como os do gênero *Bacillus* tem se mostrado uma alternativa promissora para o uso eficiente do P e outros nutrientes, possibilitando a redução do uso de fertilizantes e garantindo a produtividade no campo. Dessa maneira, o estudo de bactérias promotoras do crescimento vegetal e sua interação nutriente-planta é de suma importância para agricultura, permitindo maior entendimento dos mecanismos por trás dos efeitos benéficos as plantas.

Inicialmente no capítulo 1, foram selecionadas as linhagens solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato, além de conferida a capacidade de promoverem o crescimento da cana-de-açúcar individualmente ou formando consórcios bacterianos. As linhagens *Priestia megaterium* (Syn. *Bacillus megaterium*) MGB3314, *B. licheniformis* MGB2281, *B. altitudinis* MGB293, *B. toyonensis* MGB227 e *B. altitudinis* MGB25 foram selecionadas, os ensaios *in vitro* revelaram a capacidade dos consórcios de potencializar ou complementar a solubilização e a mineralização. O mesmo foi observado no ensaio em casa-de-vegetação os tratamentos inoculados apresentaram maior atividade enzimática quando comparados ao controle. Isso refletiu-se na concentração de P disponível no solo, que todos os tratamentos inoculados apresentaram médias superiores ao controle negativo. Apesar destes resultados promissores, não se observou o efeito de promoção de crescimento entre os tratamentos, esse fato pode estar associado a diversos fatores como: competição com a comunidade microbiana nativa; especificidade da associação entre a bactéria-planta e principalmente as condições nutricionais do solo. No ensaio *in vitro* do efeito do P solúvel na solubilização de fosfato realizado com as 5 linhagens selecionadas, foi possível observar que quanto maior a disponibilidade de

P no meio, menor é o índice de solubilização, evidenciando a sensibilidade dessas bactérias em condições ricas de nutrientes.

Os resultados do Capítulo 2 corroboram os com os descritos acima, no ensaio realizado com solo pobre em P associando a inoculação de plantas de cana-de-açúcar com a linhagem *B.licheniformis* MGB2281 e o consórcio bacteriano de *B.altitudinis* MGB293 + *B. toyonensis* MGB227 + *B.altitudinis* MGB25 a três doses: 0, 90 kg.ha⁻¹ e 180 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, utilizando o fosfato natural reativo de Bayovar como a fonte de P. Concluiu-se que a inoculação com a linhagem MGB2281 promoveu o crescimento de plantas aos 30 dias após o plantio, com maiores médias para altura de planta e massa seca de parte aérea. A dose de 90 kg.ha⁻¹ associada a inoculação com a linhagem MGB2281 e o consórcio bacteriano MGB293 + MGB227 MGB25, contribuiu para uma maior atividade da enzima fosfatase alcalina, com uma concentração de p-nitrofenol cerca de 6 vezes maior que o controle sem inoculação. Os resultados positivos de atividade enzimática para os tratamentos inoculados refletiram positivamente nos teores de P lábil no solo, apresentando consequentemente maiores concentrações de P nessa fração.

Por fim, o *draft* genômico da linhagem *B.licheniformis* MGB2281 apresentado no Capítulo 3 confirmou a grande diversidade de genes relacionados a promoção de crescimento vegetal, indo muito além dos genes relacionados ao ciclo do P, revelando genes responsáveis pela biossíntese de AIA, FBN, produção de sideróforos entre outros, sugerindo seu grande potencial como promotor de crescimento vegetal.

Os resultados apresentados no presente trabalho contribuem com a elucidação dos mecanismos de promoção de crescimento na interação entre bactéria-planta, com enfoque na otimização do uso de P. Além disso, fomentam práticas agrícolas mais sustentáveis sugerindo o uso de microrganismos como alternativa viável para melhorar o desenvolvimento de plantas e compor uma estratégia de manejo mais eficiente do uso de fertilizantes fosfatados.

ANEXOS

Anexo A. Curação de genes de mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal identificados no genoma do *B. licheniformis* MGB2281, apresentados com produto codificado, classificação COG (*Cluster of Ortholog Groups*) fornecida pelo programa PROKKA, classificação KO (KEEG *Orthology*) fornecida pelo programa BlastKOALA e localização no genoma.

Mecanismo	Gene	Função/Produto	COG	KEEG	Locus
Metabolismo do Fósforo	phoP	Regulador de resposta de dois componentes	COG0745	K07658	42827..43549
Metabolismo do Fósforo	phoP	Regulador de resposta de dois componentes	COG0745	K07658	413550..414251
Metabolismo do Fósforo	phoR	Histidina quinase	COG0642	K07636	43542..45287
Metabolismo do Fósforo	phoH	Proteína induzida por ausência de fosfato	COG1702	K06217	184817..185776
Mineralização de fosfatos	phoB	Fosfatase alcalina III	COG1785	K01077	322910..324571
Mineralização de fosfatos	phoD	Fosfatase alcalina D	COG3540	K01113	273042..274793
Mineralização de fosfatos	phoD	Fosfatase alcalina D	COG3540	K01113	65339..66895
Mineralização de fosfatos	ppaX	Pirofosfatase inorgânica	COG0546	K06019	311867..312514
Mineralização de fosfatos	ppaC	Pirofosfatase inorgânica dependente de manganês	COG1227	K15986	459506..460435
Mineralização de fosfatos	phy	Síntase da enzima fitase	COG4247	K01083	80908..82053
Metabolismo do Fósforo	pstS	Proteína permease do sistema de transporte de fosfato	COG0226	K02040	228714..229643
Metabolismo do Fósforo	pstC	Proteína permease do sistema de transporte de fosfato	-	K02037	228714..229643
Metabolismo do Fósforo	pstA	Proteína permease do sistema de transporte de fosfato	COG0581	K02038	229643..230530
Metabolismo do Fósforo	PstB	Transportador de fosfato tipo ABC, proteína de ligação aoATP	COG1117	K02036	230550..231377
Metabolismo do Fósforo	PstB	Transportador de fosfato tipo ABC, proteína de ligação aoATP	COG1117	K02036	231390..232169
Solubilização de fosfatos	ldh	L-lactato desidrogenase	COG0039	K00016	186841..187800
Solubilização de fosfatos	pflA	Enzima ativadora de piruvato formato-liase	-	K04069	727883..728641
Solubilização de fosfatos	pflB	Acetiltransferase de formato	-	K00656	725600..727825
Solubilização de fosfatos	gdh	Glicose 1-desidrogenase	COG1028	K00034	321985..322770
Solubilização de fosfatos	gdh	Glicose 1-desidrogenase	COG1028	K00034	211553..212326
Solubilização de fosfatos	gdhA	Glutamato desidrogenase	COG0334	K00262	134266..135648
Solubilização de fosfatos	tuaD	UDP-glicose 6-desidrogenase	COG1004	K00012	368462..369796
Solubilização de fosfatos	fdhD	Proteína transportadora de enxofre	COG1526	K02379	495463..496254
Solubilização de fosfatos	yrhE	Formato desidrogenase	COG3383	K00123	146002..148941
Solubilização de fosfatos	yjgC	Domínio de ligação ferro-enxofre	COG3383	K00123	622415..625558
Solubilização de fosfatos	yrhG	Transportador de formato/nitrito	COG2116	K21993	143888..144688
Solubilização de fosfatos	ywdH	Aldeído desidrogenase	COG1012	K00128	588307..589689
Solubilização de fosfatos	icd	Isocitrato desidrogenase (ciclo do ácido cítrico)	COG0538	K00031	40180..41496
Solubilização de fosfatos	sdhC	Succinato desidrogenase	COG2009	K00241	112624..113232
Solubilização de fosfatos	sdhA	Subunidade da flavoproteína da succinato desidrogenase	-	K00239	113266..115029
Solubilização de fosfatos	sdhB	Succinato desidrogenase (proteína ferro-enxofre)	COG0479	K00240	115026..115790
Metabolismo do Fósforo	pit	Transportador de fosfato inorgânico de baixa afinidade	-	K03306	220281..221279
Metabolismo do Fósforo	phrG	Regulador da atividade da fosfatase	-	K06356	8097..8213
Metabolismo do Fósforo	phrK	Regulador da atividade da fosfatase	-	K06358	114150..114272

(Continuação)

Mecanismo	Gene	Função/Produto	COG	KEEG	Locus
FBN ¹	moaE	Fator de conversão de molibdopterina (subunidade 2)	-	K03635	433291..433785
FBN ¹	moaD	Fator de conversão de molibdopterina (subunidade 1)	-	K03636	433782..434015
FBN ¹	moaA	Proteína A da biossíntese do cofator de molibdênio	COG2896	K03639	494422..495447
FBN ¹	moaB	Proteína B da biossíntese do cofator de molibdênio	COG0521	K03638	16112..16630
FBN ¹	moaC	Proteína C da biossíntese do cofator de molibdênio	COG0315	K03637	6586..7092
FBN ¹	yvgL	Proteína de ligação ao substrato do sistema de transporte de molibdato	COG0725	K02020	25061..25855
FBN ¹	yvgM	Permease do sistema de transporte de molibdênio	COG4149	K02018	25864..26520
FBN ¹	moeA	Proteína de biossíntese de molibdopterina	-	K03750	431526..432818
FBN ¹	moeB	Proteína de biossíntese de molibdopterina	-	K21029	430424..431506
FBN ¹	fer	ferredoxina	-	K05337	424691..424939
FBN ¹	ykuN	ferredoxina	-	K03839	421868..422347
FBN ¹	ykuP	ferredoxina	COG0716	K03839	423260..423712
FBN ¹	etfB	flavoproteína transportadora de elétrons (subunidade beta)	COG2086	K03521	105969..106742
FBN ¹	etfA	flavoproteína transportadora de elétrons (subunidade alpha)	COG2025	K03522	106792..107769
FBN ¹	nifU	Proteína de formação de cluster Fe-S	COG0822	K04488	754487..754918
FBN ¹	nifU	Proteína fixadora de nitrogênio NifU	COG0822	K04488	85777..86223
Denitrificação	narG	Nitrato redutase	COG5013	K00370	788221..791907
Denitrificação	narH	Nitrato redutase	COG1140	K00371	791897..793366
Denitrificação	narJ	Nitrato redutase	COG2180	K00373	793385..793927
Denitrificação	narI	Nitrato redutase	COG2180	K00374	793924..794610
Denitrificação	narK	Proteína de extrusão de nitrito	COG2223	K02575	781831..783015
Denitrificação	yojN	Redutase putativa	COG0714	K04748	581205..582095
Denitrificação	ywcJ	Transportador de formato/nitrito	COG2116	K02598	716498..717286
Denitrificação	nasE	Nitrito redutase assimilatória (subunidade)	COG2146	K00363	37521..37841
Denitrificação	nasD	Nitrito redutase assimilatória (subunidade)	COG1251	K00362	37872..40292
Denitrificação	nasB	Nitrito redutase assimilatória (subunidade)	COG1251	K00362	42567..44861
Denitrificação	nos	Síntese de óxido nítrico	COG4362	K00491	40406..42565
Denitrificação	nasA	Transportador de nitrato	COG2223	K02575	188250..189455
Denitrificação	sodA	Superóxido dismutase	COG0605	K04564	223234..223842
Denitrificação	sodF	Superóxido dismutase	-	K04564	592461..593306
Metabolismo de N	nasC	Nitrato redutase	COG0243	K00372	188250..189455
Metabolismo de N	nasA	Transportador de nitrato	-	K02575	188250..189455
Metabolismo de N	norB	Óxido nítrico redutase	COG3256	K04561	778147..780501
Metabolismo de N	gltA	Glutamato sintase	COG0067	K00265	688603..693168
Metabolismo de N	gltB	Glutamato sintase	COG0493	K00266	693185..694666
Metabolismo de N	gltT	Proteína de simporte de prótons/glutamato	-	K11102	33212..34498

(Continuação)					
Mecanismo	Gene	Função/Produto	COG	KEEG	Locus
Metabolismo de N	gltP	Proteína de simporte de prótons/glutamato	COG1301	K11102	45913..47163
Metabolismo de N	gltX	Glutamato-tRNA ligase	-	K09698	9874..11331
Metabolismo de N	nsrR	Regulador transcricional responsivo ao óxido nítrico	COG1959	K13771	129758..130189
Metabolismo de N	hmp	Flavohemoproteína/estresse nitrosativo	COG1017	K05916	128286..129500
Metabolismo de N	nap	Amonificação de nitrato e nitrito	-	-	497811..500162
Metabolismo de Potássio	ktrD	transportador de cátions	COG0168	K03498	302491..303840
Metabolismo de Potássio	ktrC	site de ligação NAD	COG0569	K03499	454655..455317
Metabolismo de Potássio	ktrG	Transportador de K+	COG0168	K03498	578554..579900
Metabolismo de Potássio	ktrA	Transportador de K+	COG0569	K03499	6939..7595
Metabolismo de Potássio	ktrB	Transportador de K+	COG0168	K03498	7598..8917
Metabolismo de Enxofre	sat	Sulfato adenililtransferase	COG2046	K00958	566294..567430
Metabolismo de Enxofre	cysEA	Serina acetiltransferase	-	K00640	296443..296826
Metabolismo de Enxofre	cysL	Ativador transcricional do operon cysJI	COG0583	K21900	169628..170518
Metabolismo de Enxofre	cysI	Sulfito redutase (NADPH) flavoproteína alfa-componente	COG0369	K00380	170839..172668
Metabolismo de Enxofre	cysI	Sulfito redutase (NADPH) flavoproteína alfa-componente	COG0155	K00381	172696..174414
Metabolismo de Enxofre	cysH	Adenosina 5'-fosfosulfato redutase	COG0175	K00390	564650..565192
Metabolismo de Enxofre	cysP	Permease de sulfato	COG0306	K16331	565204..566268
Metabolismo de Enxofre	cysC	Adenilil-sulfato quinase	COG0529	K00860	567444..568037
Metabolismo de Enxofre	citR	Regulador transcricional CitR	COG0583	K19242	124398..125276
Metabolismo de Enxofre	ytID	Proteína permease do sistema de transporte de sulfonato putativo	COG0600	K02050	30630..31454
Metabolismo de Enxofre	YtIC	Proteína de ligação de ATP do sistema de transporte de sulfonato putativo	COG1116	K02049	31417..32205
Metabolismo de Enxofre	ssuD	Alcanossulfonato monooxigenase	COG2141	K04091	36733..37863
Metabolismo de Enxofre	ssuC	Sulfonato alifático transportador ABC (Permease)	COG0600	K15554	37877..38713
Metabolismo de Enxofre	ssuA	Transportador de sulfonato alifático ABC (lipoproteína de ligação)	COG0715	K15553	38710..39699
Metabolismo de Enxofre	ssuB	Sulfonatos alifáticos importam proteína de ligação de ATP SsuB	COG1116	K15555	39720..40487
Produção de sideróforos	fur	Regulador transcricional	COG0735	K03711	374531..374980
Produção de sideróforos	yusV	ABC transporter	COG1120	K25130	104425..105243
Produção de sideróforos	yfhA	Proteína permease do sistema de transporte-ABC	COG0609	K25111	105261..106316
Produção de sideróforos	yfiZ	Proteína permease do sistema de transporte-ABC	COG0609	K25110	106313..107314
Produção de sideróforos	yfiY	Proteína permease do sistema de transporte-ABC	COG0614	K25109	107467..108444
Produção de sideróforos	yclQ	Proteína permease do sistema de transporte-ABC	COG4607	K25282	60401..61348
Produção de sideróforos	yclP	Proteína permease do sistema de transporte-ABC	COG4604	K25285	61363..62121
Produção de sideróforos	yclO	Proteína permease	COG4605	K25283	62121..63065
Produção de sideróforos	yclN	Proteína permease	COG4606	K25284	63055..64008
Produção de sideróforos	yfmE	Proteína permease	COG0609	K23182	20008..21036
Produção de sideróforos	yfmD	Proteína permease	COG0609	K23183	21036..22034

(Continuação)

Mecanismo	Gene	Função/Produto	COG	KEEG	Locus
Produção de sideróforos	ylmA	Proteína permease do sistema de transporte-ABC	COG1119	K02013	540541..541338
Produção de sideróforos	ddc	L-2,4-diaminobutirato descarboxilase	COG0076	K13745	58363..59874
Produção de sideróforos	ddc	L-2,4-diaminobutirato descarboxilase	-	K13745	114602..116263
Produção de sideróforos	ddc	L-2,4-diaminobutirato descarboxilase	-	K13745	117914..119542
Produção de sideróforos	sirB	Biossíntese de cobalamina (vitamina B12) proteína CbiX	COG2138	K03794	568964..569749
Produção de sideróforos	sirA	Pecorrina-2 desidrogenase	-	K24866	569730..570224
Bacilibactina	dhbF	Bacilibactina sintetase componente F	COG1020	K04780	473778..480935
Bacilibactina	dhbB	Isocorismatase	COG1535	K01252	480950..481876
Bacilibactina	dhbE	2,3-dihidroxibenzoato-AMP ligase	COG1021	K02363	481901..483523
Bacilibactina	dhbC	Isocorismato sintase	COG1169	K02361	483537..484727
Bacilibactina	dhbA	2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato desidrogenase	COG1028	K00216	484752..485522
Bacilibactina	feuC	Proteína Integral de Membrana	COG0609	K02015	486642..487661
Bacilibactina	feuB	Proteína Integral de Membrana	COG0609	K02015	487654..488658
Bacilibactina	feuA	Proteína de ligação ao ferro	COG0614	K02016	488676..489632
Bacilibactina	feuA	Proteína de ligação ao ferro	COG0614	K25308	81584..82543
Aerobactina	iucA	Proteína de biossíntese de sideróforo	-	-	59871..61637
Aerobactina	iucB	Proteína de biossíntese de sideróforo	-	-	61634..62188
Aerobactina	iucD	Proteína de biossíntese de sideróforo	COG3486	K03897	62163..63506
Aerobactina	iucC	Proteína de biossíntese de sideróforo	COG4264	-	63523..65337
Metabolismo do Ferro	feoB	Proteína B de transporte de ferro	COG0370	K04759	78376..80388
Metabolismo do Ferro	fhuG	Ferricromo ABC transportador (Proteína Permease)	COG0609	K25289	153768..154781
Metabolismo do Ferro	fhuB	Ferricromo ABC transportador (Proteína Permease)	COG0609	K25288	154781..155845
Metabolismo do Ferro	fhuD	Ferricromo ABC transportador (Proteína Permease)	COG0614	K25308	242678..243625
Metabolismo do Ferro	fhuC	Ferricromo ABC transportador (Proteína Permease)	COG1120	K25290	152937..153749
Metabolismo do Ferro	FeoB	Proteína B do sistema de transporte Fe ²⁺	-	K04759	125460..127103
Metabolismo do Ferro	feoA	Proteína A de transporte de ferro	-	K04758	78152..78379
Metabolismo do Ferro	sufT	Proteína transportadora de aglomerado de ferro-enxofre	-	-	81325..81633
Metabolismo do Ferro	sufB	Proteína de montagem FeS SufB	-	K09014	84361..85758
Metabolismo do Ferro	sufD	Proteína de montagem de cluster FeS SufD	-	K09015	87433..88746
Metabolismo do Ferro	sufC	Montagem de cluster Fe-S ATPase SufC	COG0396	K09013	88764..89549
Metabolismo do Ferro	fhuD	Ferricromo ABC transportador (Proteína Permease)	COG0614	K25308	86095..87051
AIA ²	trpC	Indol-3-glicerol fosfato sintase	-	K01609	460283..461041
AIA ²	trpD	Antranilato fosforibosiltransferase	COG0547	K00766	459274..460290
AIA ²	trpD	Antranilato fosforibosiltransferase	COG0547	K00766	76478..77212
AIA ²	trpD	Antranilato fosforibosiltransferase	-	-	77176..77523
AIA ²	trpE	Antranilato sintase componente 1	COG0147	K01657	457755..459302
AIA ²	trpF	N-(5'-fosforibosil)antranilato isomerase	COG0135	K01817	461041..461697
AIA ²	trpB	Cadeia beta triptofano sintase	COG0133	K01696	461678..462904

(Continuação)

Mecanismo	Gene	Função/Produto	COG	KEEG	Locus
AIA ²	trpA	Cadeia alpha triptofano sintase	COG0159	K01695	462873..463676
AIA ²	trpS	Triptofano-tRNA ligase	COG0180	K01867	110044..111036
AIA ²	trpP	Proteína transportadora de triptofano	-	-	54433..54960
AIA ²	tspO	Proteína rica em triptofano	COG3476	K05770	54958..55434
AIA ²	patB	Aminotransferase	COG1168	K14155	63723..64886
AIA ²	patA	Aminotransferase	COG0436	K00841	407225..408394
AIA ²	amiE	amidase	-	K01426	206636..207232
AIA ²	amiE	amidase	-	K01426	207450..207812
AIA ²	aspB	Aminotransferase	-	K00812	486449..487633
AIA ²	dhaS	Aldeído desidrogenase	-	K00128	597975..599471
AIA ²	dhaS	Aldeído desidrogenase	COG1012	K00128	588307..589689
AIA ²	rtpA	Proteína inibidora da proteína atenuadora de ligação ao RNA do triptofano	-	-	247949..248110
Citocininas	miaB	tRNA-2-metiltio-N(6)-dimetilaliladenosina sintase	COG0621	K06168	713856..715385
Citocininas	miaA	tRNA dimetilaliltransferase	COG0324	K00791	747330..748274
Citocininas	yvdD	Citocinina ribosídeo 5'-monofosfato fosforribohidrolase	COG1611	-	286663..287238
Poliamina	speA	Arginina descarboxilase	COG1982	K01585	468450..469940
Poliamina	speB	Agmatinase	COG0010	K01480	555101..555973
Poliamina	speE	Poliamina aminopropiltransferase	COG0421	K00797	556028..556858
Poliamina	speG	Espermidina N(1)-acetiltransferase	COG1670	K00657	841858..842400
Poliamina	speG	Espermidina N(1)-acetiltransferase	COG1670	-	595882..596418
Poliamina	puuP	Transportador de aminoácidos/poliamina I	COG0531	K14052	641950..643287
Poliamina	potB	Sistema de transporte de espedina/putrescina tipo- ABC	COG1176	K02054	152911..153777
Poliamina	potA	Sistema de transporte de espedina/putrescina tipo- ABC	COG3842	K02052	153764..154891
Poliamina	potC	Sistema de transporte de espedina/putrescina tipo- ABC	-	K02053	152106..152918
GABA ³	gabD	Succinato-semialdeído desidrogenase	COG1012	K00135	49642..51036
GABA ³	gabT	4-aminobutirato aminotransferase	COG0160	K07250	52436..53749

¹FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio²AIA: Produção de Ácido Indol Acético³GABA: Ácido Gama-Aminobutírico