



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS II
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**

GABRIELLE CUSTÓDIO MELO

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Bacillus* SPP.

**LAGOA SECA-PB
2023**

GABRIELLE CUSTÓDIO MELO

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Bacillus* SPP.

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Agroecologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agroecologia.

Orientadora: Prof. Dra. Élide Barbosa Corrêa

Coorientador: Dr. Josely Dantas Fernandes

**LAGOA SECA-PB
2023**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M528s Melo, Gabrielle Custodio.
Solubilização de fosfato por *Bacillus spp.* [manuscrito] /
Gabrielle Custodio Melo. - 2023.
24 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agroecologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, 2023.

"Orientação : Profa. Dra. Élide Barbosa Corrêa, Coordenação do Curso de Agroecologia - CCAA."

"Coorientação: Profa. Dra. Josely Dantas Fernandes , Departamento de Agroecologia e Agropecuária - CCAA."

1. Metabolismo microbiano. 2. Rizobactérias. 3. Sistema agroecológico. 4. Sustentabilidade. I. Título

21. ed. CDD 577.55

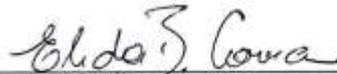
GABRIELLE CUSTÓDIO MELO

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Bacillus* SPP.

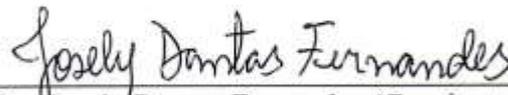
Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Agroecologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agroecologia.

Aprovada em: 13/06/2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Elida Barbosa Corrêa (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dr. Josely Dantas Fernandes (Coorientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Shirleyde Alves dos Santos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dr. Antonio Fernandes Monteiro Filho
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

“O segredo da vida é o solo, porque do solo dependem as plantas, a água, o clima e a nossa vida. Tudo está interligado.”

Ana Primavesi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	METODOLOGIA	9
2.1	Isolamento de <i>Bacillus</i> spp.	9
2.2	Teste de Gram	10
2.3	Teste preliminar de meio sólido para ensaio qualitativo da solubilização de fosfato	10
2.4	Ensaio qualitativo da solubilização de fosfato	11
2.5	Análise Estatística	12
3	RESULTADOS	12
3.1	Isolamento de <i>Bacillus</i> spp.	12
3.2	Teste de Gram	14
3.3	Teste preliminar de meio sólido para ensaio qualitativo da solubilização de fosfato	15
3.4	Ensaio qualitativo da solubilização de fosfato	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
	REFERÊNCIAS	20

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Bacillus* SPP.

Gabrielle Custódio Melo¹

RESUMO

O fósforo é um nutriente fundamental para o crescimento das plantas e seu fornecimento é realizado, principalmente, por meio de fertilizantes minerais fosfatados. No entanto, essa utilização pode causar impactos ambientais negativos e elevados custos de produção, devido à solubilidade e disponibilidade do fósforo aplicado, o que reduz sua eficácia no solo. Uma alternativa sustentável para mitigar os danos do uso de fertilizantes fosfatados é o uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSFs). Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência de rizobactérias do gênero *Bacillus* na solubilização de fosfato, por meio de análise qualitativa. Para isso, 19 rizobactérias foram isoladas do solo rizosférico manejado em sistema agroecológico e caracterizadas quanto ao gênero *Bacillus* spp. por meio do teste Gram e pelas características morfológicas da colônia. No total, foram selecionados 17 isolados gram-positivos. Em seguida, realizou-se um teste preliminar para determinar qual meio de cultura sólido (NBRIP adaptado e NBRIP adaptado com adição de azul de bromofenol) apresentaria a melhor visualização da formação do halo, em função dos 22 isolados (17 isolados oriundos da rizosfera mais 5 do banco de micro-organismos do laboratório de Fitopatologia) e três fontes de fosfato (Fosfato de cálcio monobásico monohidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Fosfato bicálcico (CaHPO_4) e pó de Rocha, adquirido na empresa Mibasa S.A.. Após os testes preliminares, conduziu-se um experimento utilizando o meio NBRIP contendo azul de bromofenol no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3, com dez repetições. Durante a condução do experimento, foram realizadas observações para identificar a formação de halo ao redor das colônias bacterianas e o cálculo do Índice de Solubilização (IS). Como resultados, a região rizosférica da couve foi a que apresentou a maior população bacteriana, contabilizada pela unidade formadora de colônia. O meio NBRIP com azul de bromofenol apresentou-se como mais eficaz para a avaliação da solubilização de fosfato, e entre os fatores avaliados, observou-se que os isolados de *Bacillus* spp. e as fontes de fosfato influenciaram significativamente o IS, cujas maiores médias foram obtidas com o isolado CFB 007 e com o fosfato bicálcico. No entanto, os isolados testados apresentaram baixo índice de solubilização, ou seja, menor que 2 mm, independentemente da fonte de fosfato.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano. Rizobactérias. Sistema Agroecológico. Sustentabilidade.

¹ Estudante de Bacharelado em Agroecologia pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

SOLUBILIZATION OF PHOSPHATE BY *Bacillus* SPP.

ABSTRACT

Phosphorus is a crucial nutrient for plant growth, and its supply is mainly achieved through phosphate mineral fertilizers. However, this usage can cause negative environmental impacts and high production costs due to the solubility and availability of applied phosphorus, reducing its effectiveness in the soil. A sustainable alternative to mitigate the damage caused by phosphate fertilizers is the use of phosphate-solubilizing microorganisms (PSMs). Thus, this study aims to evaluate the efficiency of *Bacillus* genus rhizobacteria in phosphate solubilization through qualitative analysis. For this purpose, 19 rhizobacteria were isolated from the rhizospheric soil managed in an agroecological system and characterized as *Bacillus* spp. genus through the Gram test and morphological characteristics of the colony. A total of 17 gram-positive isolates were selected. Subsequently, a preliminary test was conducted to determine which solid culture medium (adapted NBRIP and adapted NBRIP with bromophenol blue addition) would provide the best visualization of halo formation, considering the 22 isolates (17 isolates from the rhizosphere and 5 from the laboratory's Microorganism Bank of Phytopathology) and three phosphate sources (Calcium monobasic monohydrate phosphate ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Dicalcium phosphate (CaHPO_4), and Rock powder acquired from Mibasa S.A. company). After the preliminary tests, an experiment was carried out using NBRIP medium containing bromophenol blue in a completely randomized design in a 4 x 3 factorial scheme with ten replications. During the experiment, observations were made to identify halo formation around bacterial colonies, and the Solubilization Index (SI) was calculated. As results, the rhizospheric region of kale showed the highest bacterial population, quantified by the colony-forming unit. The NBRIP medium with bromophenol blue proved to be more effective for phosphate solubilization evaluation, and among the evaluated factors, it was observed that *Bacillus* spp. isolates and phosphate sources significantly influenced the SI, with the highest means obtained with the CFB 007 isolate and dicalcium phosphate. However, the tested isolates showed a low solubilization index (SI), less than 2 mm, regardless of the phosphate source.

Keywords: Agroecological system. Microbial metabolism. Rhizobacteria. Sustainability.

1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para as plantas, sendo fundamental para o desenvolvimento de suas funções metabólicas, como, por exemplo, fotossíntese, divisão celular, geração de energia e integridade da membrana (RAWAT et al., 2021). O macronutriente é responsável pelo aumento e aprimoramento do crescimento radicular, fortalecimento do caule, formação de sementes e capacidade de fixação de nitrogênio (BILLAH et al., 2019). Logo, a baixa oferta desse nutriente é responsável pela restrição do crescimento vegetal (MARRA, 2012), o que gera a necessidade de manter a sua disponibilidade para o bom desenvolvimento das culturas agrícolas.

Na fase sólida do solo, o fósforo está presente em duas frações, uma trocável (lábil) e outra não trocável (não lábil). A forma trocável indica que esse elemento é assimilável, isto é, está disponível para as plantas e os microrganismos do solo (BINI; LOPES, 2016). A forma não lábil é composta pelo P sob a forma de compostos de baixa solubilidade (P mineralogicamente estável) ou adsorvido às partículas do solo. A depender do pH, o P na solução é encontrado nas formas de H_3PO_4 , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} . Considerando essas frações, pode-se classificá-lo também em inorgânico (Pi) e orgânico (Po). Quando inorgânico (Pi) é composto por fosfatos minerais e ânions fosfatos adsorvidos a hidróxidos de Fe e Al, silicatos de Al e carbonatos de Ca. Caso orgânico (Po), é encontrado principalmente nas formas de inositol-fosfatos, fosfolipídios e ácidos nucleicos (MENDES; JUNIOR, 2003).

Desse modo, mesmo existindo um grande reservatório desse nutriente no solo, grande parte dele encontra-se na forma indisponível, sendo não assimilável pelas plantas (BHATTACHARYYA, JHA, 2012; AHMED; KRIBET, 2014). Como efeito, uma maneira de solucionar esse problema e garantir o rendimento das culturas na agricultura, é a alta utilização de fertilizantes fosfatados (OLIVEIRA et al., 2021). Entretanto, grande parte desse fósforo utilizado fica retido nas partículas de solo, tornando-se em fosfato inorgânico insolúvel ao longo do tempo (MARRA, 2012), além de provocar impactos ambientais negativos devido às altas doses (CHEN et al., 2006), como a eutrofização (KLEIN; AGNE, 2012) e o esgotamento da fertilidade do solo associada à utilização de outros fertilizantes químicos (GYANESHWAR et al., 2002) e agrotóxicos.

Assim, a adoção de estratégias que possibilitem a eficiência do fósforo é cada vez mais necessária para a promoção da sustentabilidade dos sistemas agrícolas e a segurança e soberania alimentar e nutricional da sociedade (ZUCARELI et al., 2018). Uma delas é a utilização de microrganismos rizosféricos capazes de solubilizar o fosfato, o que apresenta-se como a alternativa mais promissora e econômica (BILLAH et al., 2019), desempenhando um papel fundamental na nutrição das plantas (CHEN et al., 2006).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são responsáveis por diversos efeitos benéficos, exercidos através de mecanismos diretos, como o fornecimento de nutrientes (SUYAL et al., 2016), e indiretos, como a indução da resistência sistêmica (ISR) (SAXENA et al., 2020). Ainda, essa relação próspera com a rizosfera é propiciada pela alta capacidade de adaptação a diversos ambientes, rápida taxa de crescimento e ampla capacidade de metabolização de compostos realizada por esses microrganismos (BHATTACHARYYA, JHA, 2012).

Um dos meios pelos quais esses microrganismos disponibilizam nutrientes que normalmente estão indisponíveis é através da solubilização (SANSINENA, 2019). Logo, essas bactérias rizosféricas que são capazes de solubilizar o fosfato são também conhecidas como MSF (Microrganismos solubilizadores de fosfato). E, de acordo com Katznelson et al. (1962) e Raghu et al. (1966), estes são encontrados principalmente nas regiões rizosféricas do solo, quando comparados com outras regiões (apud RODRÍGUES; FRAGA, 1999).

Segundo Marra (2012), os MSFs são responsáveis não somente pela solubilização e utilização, mas também pela liberação do mesmo na solução do solo. Tanto o fosfato orgânico, quanto o inorgânico são disponibilizados para as plantas através da ação desses microrganismos. Além disso, estes são capazes de melhorar a fixação biológica de nitrogênio, acelerar a disponibilidade de outros microelementos e produzir fitohormônios (ZAIDI et al., 2009). Assim, os MSFs podem ser utilizados na promoção do desenvolvimento das plantas e equilíbrio do P (RAWAT et al., 2021), ampliando a disponibilidade desse nutriente.

Continuamente, quando consideramos a solubilização do fosfato mineral, esta ocorre principalmente através da produção de ácidos orgânicos (AO) sintetizados por microrganismos (HALDER et al., 1990; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Esses AO, tais como: cítrico, glucônico, láctico, succínico e propiônico, desempenham um papel fundamental na solubilização do fosfato insolúvel (CHEN et al., 2006). Pois, ao serem excretados, quelam os íons minerais ou diminuem o pH, o que é responsável por disponibilizar o fósforo na solução. Essa reação de liberação de P ocorre por substituição do H^+ por Ca^{2+} (PRADHAN; SUKLA, 2005; ZAIDI et al., 2009).

Outrossim, considerando o fosfato orgânico, o processo de solubilização é denominado de mineralização. Essa atividade é caracterizada pela transformação da estrutura orgânica do fósforo em uma forma solúvel, mediante a ação das fosfatases que atuam como catalisadoras na quebra de diversos tipos de fosfomonoésteres orgânicos, por meio da hidrólise. Assim, na região rizosférica, as bactérias, plantas e outros microrganismos são responsáveis pela produção de fosfatases (REJSEK et al., 2012; BINI; LOPES, 2016), que podem ser alcalina ou ácida, atuando na transformação do fosfato orgânico para inorgânico (KALAYU et al., 2019).

De acordo com Tao et al. (2008), a solubilização e mineralização podem ser realizadas pela mesma cepa bacteriana. Dessa forma, as bactérias, juntamente com os fungos e actinobactérias (MARRA, 2012), apresentam-se como uma das principais na disponibilização de fósforo para as plantas. Para as bactérias, esse macronutriente é um dos principais para seu metabolismo, sendo fundamental para a síntese de ácidos nucleicos e fosfolípidios, utilizando-o principalmente na forma inorgânica, como o fosfato, ou após a ação de enzimas (fosfatases) sobre a forma orgânica, liberando o fosfato inorgânico (BADO, et al., 2008.)

Entre os principais gêneros bacterianos responsáveis pela disponibilidade de fósforo, destaca-se o *Bacillus* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Estes microrganismos possuem formato de bastão, são aeróbicos ou anaeróbios facultativos, gram-positivos e capazes de formar endósporos. Além disso, caracterizam-se pela identificação em uma ampla variedade de ambientes (TURNBULL, 1996). Também, espécies do gênero *Bacillus* são responsáveis pela solubilização de diversas substâncias (STEIN, 2005 apud KUMAR et al., 2012), produção de ácido indol acético (IAA), sideróforo e metabólicos antagonistas (SHAHID et al., 2021), indicando a possibilidade de utilização com foco no crescimento vegetal e no controle biológico.

Ademais, é crescente o interesse atual por alternativas biológicas no manejo de nutrientes, as quais têm como finalidade contribuir para a produção agrícola (AHEMAD; KRIBET, 2014). Sendo assim, diversos estudos têm destacado a importância e eficiência de *Bacillus* spp. na solubilização do fosfato (KUMAR et al., 2012; QURESHI et al., 2012; QARNI et al., 2021; MAHARANA; DHAL, 2022). No entanto, é necessária a realização de mais pesquisas levando em consideração as particularidades de cada região, como as características edafoclimáticas e as culturas agrícolas, bem como a ampla diversidade de bactérias solubilizadoras.

Diante da relevância do tema e da demanda por abordagens ecologicamente corretas e economicamente viáveis nos sistemas agroecológicos e orgânicos de produção, objetiva-se

com a realização deste trabalho, avaliar por meio de método qualitativo, a capacidade de solubilização de fosfatos por *Bacillus* spp. isolados de solos rizosféricos.

2 METODOLOGIA

2.1 Isolamento de *Bacillus* spp.

Inicialmente, realizou-se a coleta de amostras de solo da mandala - Área Agroecológica, situada na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus II, em Lagoa Seca-PB. Três amostras simples de solo foram coletadas da região rizosférica de plantas distintas, sendo elas a crotalária (*Crotalaria juncea* L.), o margaridão (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.)) e a couve (*Brassica oleracea*). Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Fitopatologia da UEPB, localizado no mesmo Campus, onde foram conduzidos os procedimentos metodológicos, adaptados de Mariano e Silveira (2005), para isolamento das rizobactérias do gênero *Bacillus*.

Para garantir a qualidade das amostras de solo, essas foram cuidadosamente peneiradas para remover os restos culturais. Em seguida, cada amostra foi subdividida em duas subamostras - A1 e A2 - cada uma com 1g e acondicionadas em placas de Petri para o isolamento dos microrganismos. Ambas as amostras foram submetidas a tratamento térmicos diferentes. As subamostras A1 foram submetidas ao tratamento térmico e secagem em estufa com circulação e renovação de ar, a temperatura de 80°C, por 30 minutos. Depois disso, foram transferidas para tubos de ensaio com água destilada estéril e agitadas vigorosamente em um Agitador Vortex e adicionadas em banho-maria a 60°C, por mais 30 minutos. Já as subamostras A2 foram diretamente imersas no banho-maria a 60°C, por mais 30 minutos.

Após o tratamento térmico, adotado para seleção de espécies do gênero *Bacillus*, pela capacidade das bactérias em resistirem a elevadas temperaturas por produzirem endósporos, todas as subamostras foram encaminhadas para o processo de diluição seriada, realizado dentro de uma cabine de segurança biológica para diminuir os riscos de contaminações. Para realização da diluição seriada cada subamostra foi agitada por um minuto em um agitador Vortex e, em seguida, transferiu-se 1 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo água destilada, resultando em uma diluição de 10^{-1} . Em seguida, a diluição 10^{-1} foi agitada por 1 minuto e retirou-se 1 mL para compor a diluição 10^{-2} . O procedimento foi repetido até a composição da diluição 10^{-3} .

Após isso, foi feito o plaqueamento das subamostras com a diluição 10^{-3} . Para o plaqueamento utilizou-se três repetições por diluição, essas, foram agitadas por 1 minuto e com auxílio de uma micropipeta foi retirado 1 μ L para cada placa de petri, depois, com o auxílio de uma alça de Drigalski flambada a suspensão foi espalhada sobre o meio de cultura Nutrient Agar (NA) (13g de Nutrient Broth e 16g de Agar por litro).

Após o processo de plaqueamento, as placas foram cuidadosamente fechadas com filme PVC e armazenadas em uma incubadora com temperatura controlada de 25°C por um período de 48 horas. Para evitar a contaminação das amostras, as placas foram invertidas durante o armazenamento, a fim de prevenir a condensação do vapor e a contaminação das amostras com outras bactérias presentes no ambiente.

Logo após o período de incubação, as Unidades Formadoras de Colônia (UFC), que são provenientes de uma única célula bacteriana, foram contabilizadas e identificadas conforme Tejera-Hernández et al. (2003), quanto às características de cor, formato e textura. As colônias que possuíam características semelhantes foram agrupadas e uma única colônia representativa foi transferida para uma nova placa, possibilitando a separação de uma cultura pura.

Inicialmente, a transferência das colônias para outra placa foi realizada utilizando a técnica de semeadura por esgotamento. Foram feitas duas réplicas de cada colônia em meio de cultura NA, as quais foram incubadas a 25°C até a observação do crescimento bacteriano.

Após a identificação do crescimento bacteriano, uma amostra com características mais adequadas e com melhor formação de colônias foi selecionada para a realização do método zig-zag (MARIANO; SILVEIRA, 2005), também conhecido como estria simples. Nesse método, uma alça com a suspensão foi depositada em uma placa de Petri, e o meio de cultura foi inoculado com movimentos em formato de zig-zag.

Concluído o isolamento das bactérias, estas foram preservadas por meio do método de óleo mineral (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Nesse método, uma camada de óleo mineral foi utilizada para impedir a dessecação e oxigenação das bactérias. As cepas foram conservadas em tubos e armazenadas em geladeira para garantir a estabilidade e integridade do material biológico.

2.2 Teste de Gram

As cepas foram caracterizadas com base no teste de Gram, que é aplicado para identificar se as bactérias são Gram-positivas ou Gram-negativas. O método utilizado, Coloração de Gram, foi feito de acordo com Mariano e Silveira (2005). Assim, preparou-se um esfregaço bacteriano diluído em lâmina limpa e flambada. Cobriu-se com cristal violeta por 1 minuto, lavou-se com água e cobriu-se com lugol por 1 minuto. Lavou-se novamente e descorou-se com álcool por 30 segundos. Posteriormente, aplicou-se a safranina por 30 segundos e lavou-se em água destilada. Secou-se ao ar e observou-se com objetiva de imersão. Células Gram-positivas ficaram violetas e Gram-negativas ficaram avermelhadas. As mesmas foram analisadas através da utilização de um microscópio binocular.

2.3 Teste preliminar de meio sólido para ensaio qualitativo da solubilização de fosfato

Para a avaliação do meio mais efetivo para o ensaio de solubilização em placa, foram utilizados isolados de *Bacillus* spp. provenientes da região rizosférica da Crotalária (*C. juncea* L.), do Margaridão (*T. diversifolia* (Hemsl.)) e da Couve (*B. oleracea*), totalizando 17 isolados (CFB 031, CFB 032, CFB 033, CFB 034, CFB 035, CFB 036, CFB 037, CFB 038, CFB 039, CFB 041, CFB 042, CFB 043, CFB 045, CFB 046, CFB 047, CFB 048 e CFB 049). Além de 5 isolados da Coleção de Microorganismos do Laboratório de Fitopatologia, localizado no Campus II-UEPB, sendo identificados pela nomenclatura CFB 002, CFB 004, CFB 007, CFB 010 e CFB 011. No total, 22 isolados foram utilizados para o teste preliminar.

Os meios utilizados foram o National Botanical Research Institute (NBRI) e o meio NBRI com azul de bromofenol. O NBRI para o meio de crescimento de fosfato, por litro, contém: glucose, 10 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g; KCl, 0,2 g e $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g e 1,5% de Bacto-agar (NAUTIYAL, 1999). No lugar de 5g de $Ca_3(PO_4)_2$, utilizou-se em mesma quantidade três fontes de fósforo: Fosfato de Cálcio Monobásico Monohidratado ($Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$), Fosfato Bicálcico ($CaHPO_4$), que é comumente utilizado na alimentação animal, e Pó de Rocha, adquirido da empresa Mibasa S.A. As concentrações de fósforo podem ser encontradas na Tabela 1. Para o segundo meio, foi utilizado o mesmo meio sólido modificado, acrescido de 0,025 g de azul de bromofenol por litro (MEHTA; NAUTIYAL, 2001).

O meio NBRI foi incubado a $28 \pm 1^\circ C$ por um período de 14 dias (NAUTIYAL, 1999). Já o meio NBRI com azul de bromofenol foi incubado a mesma temperatura, por um período de 3 dias (KUMAR et al., 2012). Ambos os meios tiveram o pH ajustado para 7,0 (neutro) antes da autoclavagem (NAUTIYAL, 1999; MEHTA; NAUTIYAL, 2001).

No teste realizado com o meio NBRIP, cada parcela (placa de Petri) contendo uma fonte de fosfato foi formada por 3 bactérias, e esse experimento foi conduzido em triplicata. Já no ensaio com o meio NBRIP contendo azul de bromofenol, utilizou-se 4 bactérias por placa para cada fonte de fosfato, e também foram realizadas três repetições para cada parcela.

A presente análise não foi submetida a uma análise estatística formal, mas sim a uma observação qualitativa da formação do halo. Os resultados foram interpretados com base na presença ou ausência de halos de solubilização ao redor das colônias dos isolados de *Bacillus* spp. nos meios NBRIP e NBRIP com azul de bromofenol. Dos 22 isolados testados, apenas 4 demonstraram resultados satisfatórios em relação à solubilização do fosfato. Esses isolados foram selecionados para a etapa subsequente, que consistiu no ensaio qualitativo da solubilização de fosfato.

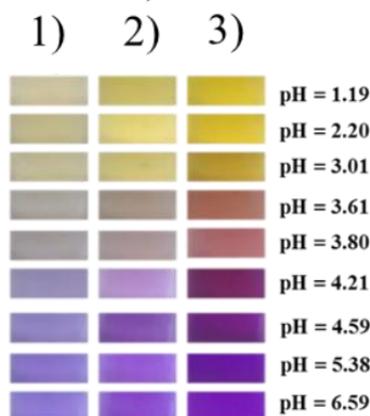
2.4 Ensaio qualitativo da solubilização de fosfato

O ensaio de solubilização de fosfato foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições e com tratamentos distribuídos em esquema fatorial 4x3. O primeiro fator correspondeu aos isolados de *Bacillus* spp. (CFB 049, CFB 041, CFB 007 e CFB 011) e o segundo fator a três fontes de fosfato (Fosfato de Cálcio Monobásico Monohidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Fosfato Bicálcico (CaHPO_4) e Pó de Rocha).

Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri contendo 4 isolados de *Bacillus* spp. e uma fonte de fosfato. As análises de solubilização de fosfato foram realizadas com isolados de *Bacillus* spp., sendo repicados em placas utilizando 1 μl de suspensão e uma micropipeta para a transferência. Para preparar a solução, as bactérias foram diluídas em uma solução salina estéril. O meio sólido utilizado foi o NBRIP modificado com azul de bromofenol, incubado a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, por três dias (KUMAR et al., 2012). O ensaio foi feito de maneira isolada para as três fontes de fósforo.

Após o período de incubação, a análise qualitativa foi realizada observando-se a zona de descoloração ao redor das colônias, o que indica a capacidade das rizobactérias de solubilizar o fosfato. Em seguida, a coloração formada foi comparada com uma escala de cores que está relacionada ao pH (Figura 1), para o Azul de Bromofenol, conforme apresentado por Pastore et al. (2022). Dessa forma, foi possível também identificar visualmente a variação do pH com base na coloração observada.

Figura 1- Variação da coloração do indicador Azul de Bromofenol em função do pH e diferentes concentrações (1, 2 e 3).



Fonte: Pastore et al., 2022.

Assim como realizado por Pande et al. (2017) e Kiprotich et al. (2023), o diâmetro da colônia (CD) e o diâmetro da zona do halo (HD) foram medidos, utilizando-se um paquímetro digital. Para o cálculo de Índice de Solubilização (IS), utilizou-se a equação proposta por Sane e Mehta (2015), onde:

$$IS = \frac{\text{Diâmetro da colônia (CD)} + \text{Diâmetro do halo (DH)}}{\text{Diâmetro da colônia (CD)}}$$

Por conseguinte, para a avaliação do Índice de Solubilização (IS) e categorização dos isolados, esses são classificados em: baixa ($IS < 2$ mm), média ($2 \leq IS < 4$ mm) e alta ($IS > 4$ mm) (MARRA et al., 2012; COSTA et al., 2013).

2.5 Análise Estatística

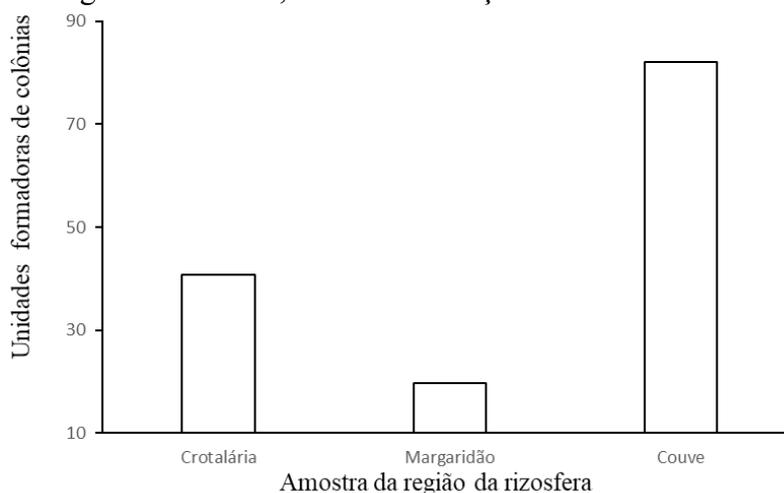
Os resultados obtidos no ensaio qualitativo de solubilização foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Quando verificado efeito significativo a 1% e 5% de probabilidade, aplicou-se o teste de Tukey para os isolados e o teste t para as fontes de fosfato. Os dados obtidos com a fonte pó de rocha foram excluídos da análise estatística, uma vez que os isolados não foram eficientes em solubilizar o fosfato contido nesta fonte, resultando em um menor coeficiente de variação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Isolamento de *Bacillus* spp.

Os resultados demonstram (Gráfico 1) que a coleta simples realizada na região rizosférica da couve foi responsável pelo maior número de unidades formadoras de colônia (UFC), quando comparadas com as coletas da crotalária e do margaridão. Observa-se uma variação nas quantidades de UFC entre as amostras, indicando uma possível diferença na diversidade e abundância das bactérias associadas à região rizosférica dessas plantas.

Gráfico 1 - Média da quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por amostra simples da região rizosférica, com uma diluição de 10^{-3} em meio NA.

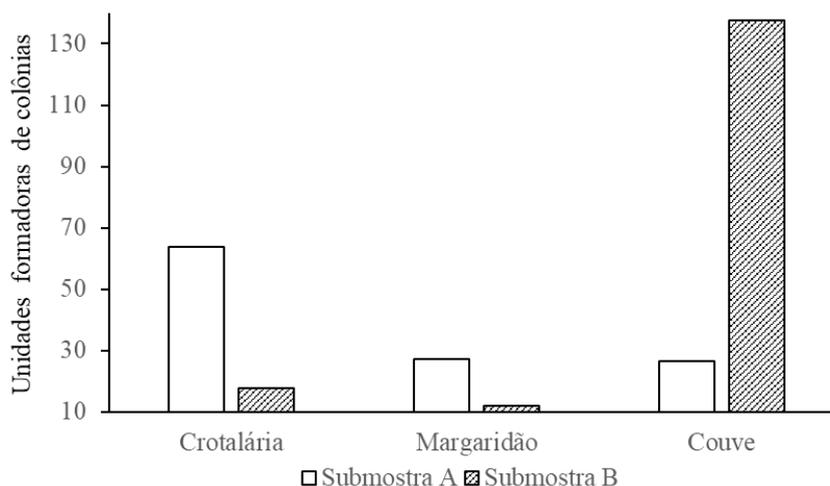


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Além disso, as subamostras A1, submetidas ao tratamento térmico de 80°C por 30 minutos em uma estufa, apresentaram uma média inferior de UFC em comparação com as

subamostras A2, submetidas apenas ao banho-maria a 60°C por 30 minutos, devido à seleção de espécies mais resistentes ao calor (Gráfico 2). Isso sugere que o tratamento térmico teve um impacto na UFC, resultando em diferenças na contagem.

Gráfico 2 - Subamostra A corresponde ao tratamento térmico inicial adicional de 80°C por 30 min e ao banho-maria a 60°C por 30 min. A subamostra B foi submetida somente ao tratamento térmico em banho-maria (60°C/30min).



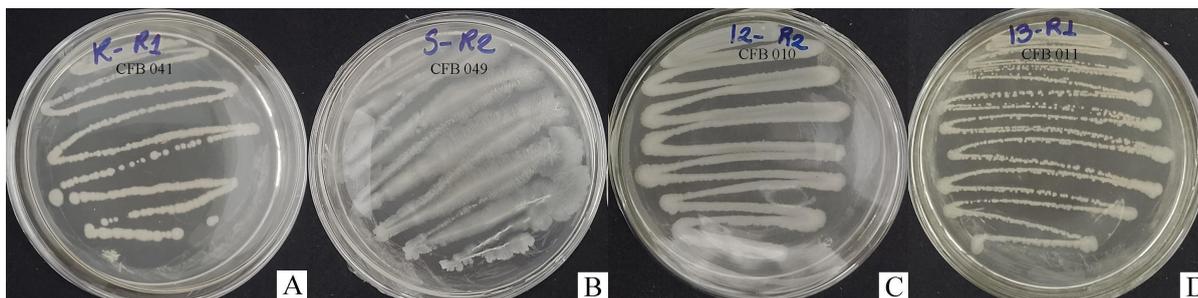
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Em seguida, foram isoladas 19 bactérias com características morfológicas distintas obtidas das amostras de solo. As colônias observadas apresentaram aspectos representativos e semelhantes ao gênero *Bacillus*, também identificados por Monnerat et al. (2020). Esses aspectos variados incluem coloração esbranquiçada, creme e creme claro, além de colônias opacas e com pouco brilho. Quanto à superfície, algumas colônias eram lisas, enquanto outras apresentavam rugosidades, e algumas delas mostravam uma elevação na parte central.

Todos os isolados bacterianos isolados foram obtidos das subamostras B. As subamostras A também apresentaram formação de colônias bacterianas, porém, devido à semelhança dessas colônias com as observadas nas subamostras B, decidiu-se não isolá-las separadamente para evitar duplicação de isolados. O tratamento térmico adicional aplicado às subamostras A pode ter influenciado a viabilidade de certas espécies bacterianas. Portanto, para fins deste estudo, os isolados bacterianos representativos foram selecionados exclusivamente das três subamostras B.

Isolados bacterianos representativos podem ser visualizados na Figura 2, na qual estão dispostos em placas contendo meio de cultura Nutrient Agar (NA). Esses, foram obtidos utilizando a técnica de estria.

Figura 2 - Isolados bacterianos após 48 horas de incubação. A: Isolado CFB 041. B: CFB: 049. C: CFB 010. D: CFB 011.



Fonte: Aatoria própria, 2023.

É importante destacar que essas características indicam similaridades com o gênero *Bacillus*, mas, para uma identificação precisa da espécie, é necessário realizar o sequenciamento genético, analisando os genes das bactérias e identificando de forma mais precisa a espécie correspondente aos isolados bacterianos observados.

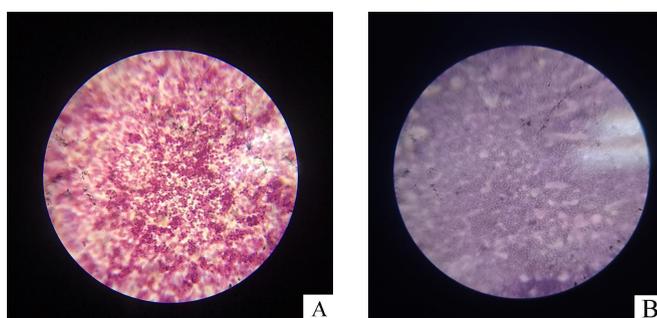
A diversidade de isolados associados ao gênero *Bacillus* apresenta-se como um indicador favorável das regiões rizosféricas de plantas em sistemas agroecológicos de produção. Essa diversidade atua como um indicador biológico da qualidade do solo (ZILLI et al., 2003), uma vez que as bactérias isoladas confirmam a presença desse gênero associado às raízes. Além disso, a identificação de *Bacillus* spp. pressupõe benefícios diretos para as plantas exercidos por meio de mecanismos diretos e/ou indiretos (SAXENA et al., 2020).

3.2 Teste de Gram

Para o teste de Gram (Figura 3), do total de 19 isolados testados, 17 isolados apresentaram-se como Gram-positivos, caracterizados pela coloração violeta escura, ao final do teste, correspondendo a um total de 89,47% das amostras. Para identificação desses isolados, foi adotada a seguinte nomenclatura: CFB 031, CFB 032, CFB 033, CFB 034, CFB 035, CFB 036, CFB 037, CFB 038, CFB 039, CFB 041, CFB 042, CFB 043, CFB 045, CFB 046, CFB 047, CFB 048 e CFB 049.

O teste foi utilizado para confirmar essa característica, especialmente considerando que as bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas. Portanto, a presença de isolados Gram-positivos reforça a identificação desses organismos como pertencentes ao gênero.

Figura 3 - Identificação de bactérias gram-negativas (A) e gram-positivas (B).



Fonte: Aatoria própria, 2023.

3.3 Teste preliminar de meio sólido para ensaio qualitativo da solubilização de fosfato

Durante o período de incubação de 14 dias a $28\pm 1^\circ\text{C}$ em meio NBRIP, foram identificadas visualmente a ausência de formação de halo e algumas formações pouco perceptíveis para as bactérias isoladas. Logo, a utilização do meio não favoreceu a identificação da formação de halo de maneira eficiente durante o período de incubação.

Embora a formação de halo não tenha sido significativa, vários isolados demonstraram capacidade de crescimento em meio NBRIP (Figura 4) com diferentes fontes de fosfato, indicando uma possível habilidade de se adaptar e utilizar esses nutrientes para seu desenvolvimento.

Figura 4 - Crescimento da colônia dos isolados CFB 002, CFB 048 e CFB 049 em meio NBRIP adaptado.



Fonte: Autoria própria, 2023.

No meio contendo $(\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O})$, 12 isolados apresentaram crescimento: CFB 031, CFB 034, CFB 035, CFB 036, CFB 037, CFB 038, CFB 041, CFB 049, CFB 042, CFB 007, CFB 008 e CFB 011, correspondendo a 54,55%. No meio com (CaHPO_4) , 10 isolados (45,45%) apresentaram crescimento expressivo, sendo eles: CFB 031, CFB 034, CFB 035, CFB 036, CFB 037, CFB 038, CFB 041, CFB 049, CFB 007 e CFB 011. O meio contendo Pó de Rocha obteve 7 isolados com crescimento favorável: CFB 031, CFB 035, CFB 036, CFB 037, CFB 038, CFB 049 e CFB 011, representando aproximadamente 31,82% dos isolados.

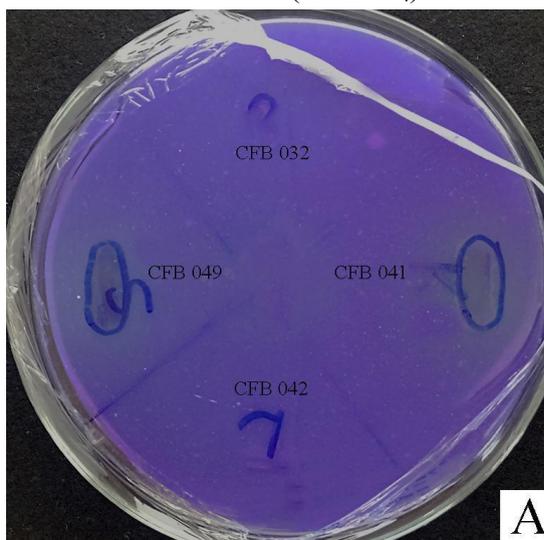
Assim, essas bactérias podem ser consideradas potenciais solubilizadoras de fosfato, uma vez que seu desenvolvimento pode estar associado à solubilização, mesmo que não tenha sido observada a formação de halo. É importante destacar que a ausência de halo em meio sólido não invalida a capacidade das bactérias em solubilizar fosfato. Um exemplo foi observado por Nautiyal (1999), onde algumas bactérias foram capazes de solubilizar fosfato em meio líquido (caldo), mesmo não formando halo em placa. De acordo com o autor, o ensaio em placa é prejudicado quando a formação do halo não é perceptível.

Em um estudo conduzido por Marra et al. (2012), foi observado que muitas cepas bacterianas foram capazes de solubilizar Fosfato Bicálcico (CaHPO_4) em meio líquido em comparação com o meio sólido. Esse resultado foi atribuído à maior difusão dos ácidos orgânicos no meio líquido, o que facilita a solubilização do fosfato.

Desse modo, a identificação do desenvolvimento da bactéria em meio contendo P é favorável à identificação de potenciais solubilizadores desse nutriente. Maharana e Dhal (2021) apresentaram resultados que corroboram para a importância do crescimento bacteriano, onde esse foi similar à solubilização de P para *Bacillus cereus*, sugerindo uma relação proporcional entre o crescimento bacteriano e a capacidade de solubilização.

Posteriormente, ao final do período de incubação, avaliou-se a solubilização de fosfato em meio NBRIP com azul de bromofenol. A formação de uma zona de descoloração ao redor das bactérias foi observada, o que indica a acidificação do meio e a disponibilização de fósforo (P) (Figura 5). Apenas os isolados CFB 041, em placa com $(\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O})$, e os isolados CFB 049, CFB 041, CFB 007 e CFB 011 em placa contendo CaHPO_4 , apresentaram a descoloração do ambiente ao seu redor, indicando a capacidade de acidificação. No entanto, nenhuma formação de descoloração foi identificada nas placas com Pó de Rocha.

Figura 5 - Identificação da descoloração do meio NBRIP pelos isolados CFB 049 e CFB 041, em meio contendo Fosfato Bicálcico (CaHPO_4) com azul de bromofenol.



Fonte: A autoria própria, 2023.

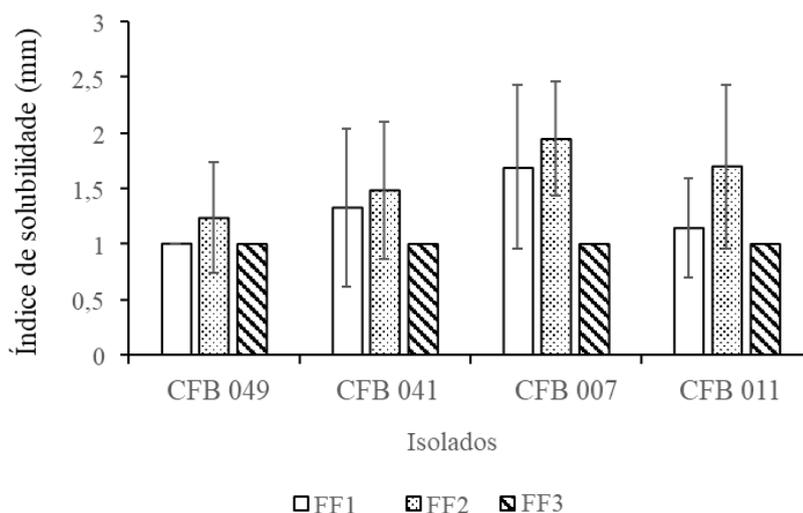
O meio NBRIP com azul de bromofenol caracterizou-se qualitativamente como o mais eficiente para a identificação da solubilização de fosfato por bactérias. A identificação das mudanças de coloração do meio torna a análise mais efetiva, facilitando o reconhecimento e reduzindo o tempo de incubação.

Portanto, o meio NBRIP com azul de bromofenol foi definido como o mais favorável para o ensaio qualitativo da solubilização de fosfato, uma vez que a descoloração do meio facilita a identificação da formação do halo. Assim como, os isolados CFB 049, CFB 041, CFB 007 e CFB 011, que formaram halo, foram selecionados para o ensaio qualitativo da solubilização de fosfato e índice de solubilização.

3.4 Ensaio qualitativo da solubilização de fosfato

Nos resultados obtidos no ensaio qualitativo de solubilização de fosfato, conforme apresentado no Gráfico 3, verificou-se solubilização do fosfato quando utilizou-se o isolado CFB 049 com a fonte FF2 e nos isolados CFB 041, CFB 047 e no CFB 011 com as fontes FF1 e FF2, contudo, em todos estes tratamentos o IS foi <2 mm, caracterizando um baixo índice de solubilização. Nos demais tratamentos o IS foi igual a 1, indicando ausência da solubilização do fosfato.

Gráfico 3 - Análise do Índice de Solubilidade em DIC em esquema fatorial 3×4 . Onde, FF1 corresponde ao Fosfato de Cálcio Monobásico Monohidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), FF2 ao Fosfato Bicálcico (CaHPO_4) e FF3 ao Pó de Rocha. As linhas verticais representam o desvio padrão.

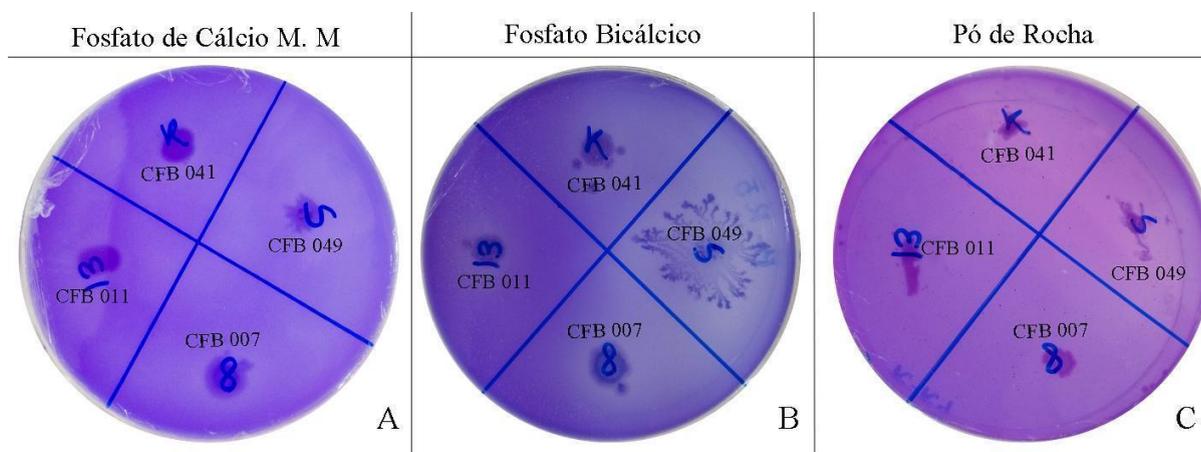


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Sendo assim, independente da fonte de fósforo utilizada, nenhuma interação entre *Bacillus* foi responsável por apresentar alto IS. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2013) para bactérias em meio NBRIP contendo fosfato bicálcico, onde 94% das estirpes avaliadas também produziram um baixo índice de solubilização. Além disso, em um estudo desenvolvido por Marra et al. (2012), 78 das estirpes (bactérias) avaliadas obtiveram baixo índice de solubilização em meio GELP contendo CaHPO_4 , $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ e $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Ao comparar a escala de variação de cor do azul de bromofenol, de Pastore et al. (2022), com a descoloração do meio provocada pelos isolados, observou-se visualmente que estes não apresentaram uma descoloração intensa e queda significativa de pH, indicada pela cor amarela. Contudo, a descoloração do meio causada pelos isolados sugere uma variação de pH entre 4,59 e 4,21. Ainda, é importante destacar que a identificação da descoloração foi realizada de maneira visual, sem a utilização de métodos ou técnicas analíticas específicas para identificação com precisão.

Figura 6 - Isolados de *Bacillus* spp. CFB 049, CFB 041, CFB 007 e CFB 011 em meio NBRIP com azul de bromofenol. A: descoloração do meio para os isolados CFB 041 e CFB 007. B: descoloração do meio para todos os isolados. C: ausência de descoloração para todos os isolados.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Ainda, com base na Figura 6, esses resultados indicam que a descoloração e formação do halo provocadas pela solubilização de fosfato, aliadas a fatores como produção de ácidos orgânicos e queda do pH, não foram identificadas de maneira expressiva na avaliação presente. Esse efeito pode ser justificado pela utilização do meio sólido, o que dificulta a difusão dos ácidos orgânicos (MARRA et al., 2012), indicando a necessidade de avaliação quantitativa em meio líquido.

Além disso, em meio líquido e quantitativo, essas rizobactérias poderiam apresentar outros mecanismos de solubilização além da produção de ácidos orgânicos, uma vez que essa produção não foi expressiva na análise qualitativa. Para Sharma et al. (2013), a solubilização de fosfato pela produção de ácidos orgânicos e queda do pH não se apresenta como o único meio. Em resultados apresentados por Chen et al. (2006), três isolados foram responsáveis por solubilizar fosfato por outro mecanismo não interligado com a produção de ácidos orgânicos, indicando que outras estratégias podem ser utilizadas para a solubilização.

Considerando o meio contendo Pó de Rocha, o índice de solubilização não variou além de 1, devido à falta de formação ou identificação da zona de descoloração. Observou-se também que a FF3 resultou no menor percentual de crescimento das colônias bacterianas no teste com meio NBRIP incubado por um período de 14 dias. Com base nesses resultados, concluiu-se que o pó de rocha utilizado não é uma fonte eficiente de fósforo no contexto deste estudo.

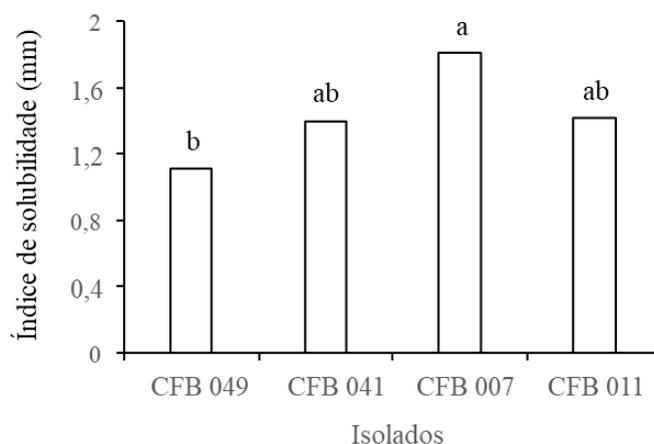
Essa eficiência do pó de rocha pode estar relacionada a diversos fatores, como ao material de origem, segundo Pereira et al. (2019), a rocha originária apresenta diferentes composições químicas e mineralógicas. Essas diferentes composições podem afetar a presença e a ausência de determinados nutrientes no pó de rocha, sendo necessário realizar uma avaliação da sua composição antes de utilizá-lo como fonte alternativa de fósforo e outros nutrientes.

Além disso, a eficiência do pó de rocha no teste de solubilização também pode ser influenciada pela granulometria, ou seja, pelo tamanho das partículas. Em um estudo desenvolvido por Ratke et al. (2020), foi observado que partículas menores de rocha apresentam uma maior solubilidade e um tempo de dissolução mais curto, quando comparado com partículas maiores.

Dessa forma, é possível que a granulometria do pó de rocha tenha exigido um tempo de ação mais prolongado pelas bactérias isoladas, assim como um percentual de fósforo mais baixo em comparação com as duas outras fontes de fosfato de altas concentrações.

Através da análise de variância, constatou-se apenas efeito significativo para os fatores "isolado de *Bacillus*" (B) e "fontes de fosfato" (FF), não havendo influência da interação desses fatores (B x FF). Sendo assim, os gráficos 4 e 5 apresentam o índice de solubilidade para o efeito isolado de tais fatores. Analisando o gráfico 4, observa-se que o CFB 007 apresentou o maior IS, porém, sem diferir dos isolados CFB 041 e CFB 011. O menor IS foi obtido com a utilização do CFB 049, que por sua vez, também não difere dos isolados CFB 041 e CFB 011.

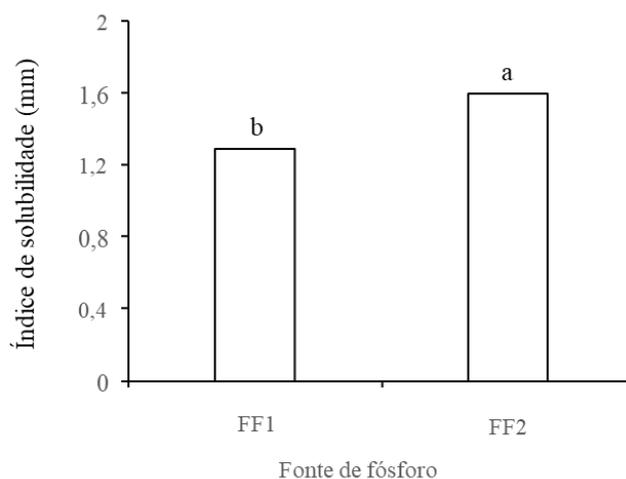
Gráfico 4 - Análise do índice de solubilidade (IS) em função do efeito isolado de *Bacillus* spp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Dessa forma, embora os isolados utilizados sejam indicativos de pertencerem a *Bacillus* spp., a variação do IS indica que a solubilização de fosfato varia de acordo com a espécie do gênero. Em trabalho realizado por Afzal et al. (2023), a variação da espécie de *Bacillus* spp. resultou em diferentes capacidades de solubilização de fosfato, onde *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus safensis* foram responsáveis pela formação de halo. No entanto, a solubilização foi maior para *B. velezensis* quando comparado com as outras duas espécies.

Gráfico 5 - Análise do índice de solubilidade (IS) em função do efeito isolado das fontes inorgânicas de fósforo (Fosfato de Cálcio Monobásico Monohidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e Fosfato Bicálcico (CaHPO_4). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de t a 5% de significância para as médias.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O IS em função do efeito isolado de fontes de fosfato (Gráfico 5), revelou que o Fosfato Bicálcico (CaHPO_4), foi superior quando comparado ao FF1, cuja média correspondeu a 1,59mm, o que representou uma superioridade de 23,25% quando comparado a fonte FF1 que apresentou 1,29mm. Em Marra et al. (2012), resultados favoráveis foram encontrados tanto para meio sólido quanto em meio líquido GELP contendo CaHPO_4 . No

meio sólido, observou-se um aumento significativo no número de cepas capazes de acidificar o meio. No meio líquido, foi observada uma maior concentração de ácidos orgânicos.

Apesar de ambos serem fontes de fosfato, o Fosfato Bicálcico demonstrou uma maior capacidade de solubilização pelas bactérias, resultando em um aumento no número de cepas capazes de acidificar o meio. Essa diferença pode estar relacionada à composição química do Fosfato Bicálcico e ao tratamento térmico ao qual é submetido, por se tratar de um alimento utilizado na ração animal. Esse tratamento térmico pode favorecer uma maior adaptabilidade do metabolismo bacteriano, permitindo uma maior eficiência na solubilização do fosfato.

4 CONCLUSÕES

Os sistemas agroecológicos de produção apresentam-se como promotores da diversidade de microrganismos, os quais atuam como indicadores da qualidade biológica do solo. Nesse contexto, as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas isoladas nesse estudo revelaram-se como indicadoras da presença do gênero *Bacillus* associado às espécies cultivadas na Mandala - Área Agroecológica da UEPB.

Embora a solubilização de fosfato tenha apresentado um índice de solubilização (IS) baixo para os isolados, em meio sólido NBRIP com azul de bromofenol, esse fator não se apresenta como um indicativo definitivo da capacidade de solubilização desses isolados.

Assim, a análise qualitativa da solubilização de fosfato é apenas o ponto inicial dos estudos dessa capacidade para os isolados bacterianos (*Bacillus* spp.) avaliados. Faz-se necessário desenvolver análises quantitativas e estudos em campo para avaliar essa capacidade em diferentes culturas, levando em consideração a quantidade solubilizada, como também o comportamento dos isolados frente a características ambientais não controladas, bem como em competição com outros microrganismos. Essa abordagem é essencial para permitir o uso desses isolados em sistemas agroecológicos e orgânicos, abrangendo uma ampla variedade de culturas na região paraibana.

REFERÊNCIAS

AFZAL, A.; BAHADER, S.; HASSAN, T. U.; NAZ, I. DIN. A. U. Rock Phosphate Solubilization by Plant Growth Promoting *Bacillus velezensis* and Its Impact on Wheat Growth and Yield. **Geomicrobiology Journal**, vol. 40, n. 2, p. 131-142, 2023.

AHEMAD, M.; KRIBET, 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.

BADO, I.; GARCÍA, V.; GROTIUZ, G.; VARELA, G. Fisiología y metabolismo bacteriano. *In: Org. Departamento de Bacteriología y Virología. Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 3. ed. Montevideo: Oficina del Libro-FEFMUR, 2018. 144p.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiol Biotechnol**, vol. 28, p. 1327-1350, 2012.

BILLAH, M.; KHAN, M.; BANO, A.; HASSAN, T. U.; MUNIR, A.; GURMANI, A; R. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 10, p. 904-916, 2019.

BINI, D.; LOPEZ, M. V. Transformações microbianas do fósforo. *In*: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 149-166.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W.A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, vol. 34, p. 33–41, 2006.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.48, n.9, p.1275-1284, set. 2013.

GYANESHWAR, P; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, vol. 245, p. 83-93, 2002.

HALDER, A. K.; MISHRA, A. K.; BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTYY, P. K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, vol. 36, p. 81-92, 1990.

KALAYU, Girmay. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, p. 1-7, 2019.

KIPROTICH, K.; MUOMA, J.; Omayio, D. O.; NDOMBI, T. S.; WEKESA, C. Molecular Characterization and Mineralizing Potential of Phosphorus Solubilizing Bacteria Colonizing Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Rhizosphere in Western Kenya. **International Journal of Microbiology**, vol. 23, p. 1-10, 2023.

KLEIN, C.; AGNE, S. A. A. Fósforo: de nutriente à poluente!. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n.8, p. 1713-1721, set.-dez., 2012.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, vol. 167, p. 493-499, 2012.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: UFRPE, 2005. 184 p.

MARRA, L. M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 2012. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, área de concentração Microbiologia e Bioquímica do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2012. p. 10-25.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.

MAHARANA, R.; DHAL, N. K. Solubilization of rock phosphate by phosphate solubilizing bacteria isolated from effluent treatment plant sludge of a fertilizer plant. **Folia Microbiologica**, vol. 67, p. 605–615, 2022.

MENDES, I. C.; JUNIOR, F. B. R. **Microorganismos e disponibilidade de Fósforo (P) nos solos: uma análise crítica**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2003. 26 p. - (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 85).

MEHTA, S.; NAUTIYAL, C. S. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. **Current Microbiology**, vol. 43, p. 51-56, 2001.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C. L.; MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R. M.; SILVA, E. Y. Y. S.; GARCIA, A. R. M.; CASTRO, M. T.; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C.; GOMES, A. C. M. M. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 46 p.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 170, p. 265-270, 1999.

OLIVEIRA, L. C. A.; CARNEIRO, M. A.; LITTER, F. A.; CARVALHO, M. A. C.; YAMASHITA, O. M.; CAIONE, G. Frações de fósforo em função do uso de fertilizantes fosfatados em distintas classes de solo. **Rev. Agro. Amb.**, v. 14, n. 4, e8921, 2021.

PANDE, A.; PANDEY, P.; MEHRA, S.; SINGH, M.; KAUSHIK, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, vol. 15, p. 379-391, 2017.

PASTORE, A.; BADOCCO, D.; CAPPELLIN, L.; PASTORE, P. Modeling the Dichromatic Behavior of Bromophenol Blue to Enhance the Analytical Performance of pH Colorimetric Sensor Arrays. **Chemosensors**, v. 10, n. 2, p. 1-11, 2022.

PEREIRA, M. G.; ANJOS, L. H. C.; JUNIOR, C. R. P.; PINTO, L. A. S. R.; NETO, E. C. S.; FONTAVA, A. Formação e caracterização de solos. *In*: TULLIO, L. (Org.). **Formação, classificação e cartografia dos solos**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 1-20.

PRADHAN, N.; SUKLA, L. B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, vol. 5, n. 10, p. 850-854, maio 2005.

QARNI, A. et al. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Rock Phosphate Mines and Their Potential Effect for Sustainable Agriculture. **Sustainability**, vol. 13, p. 2151, 2021.

QURESHI, M. A.; AHMAD, A.; AKHTAR, N.; IQBAL, A. MUJEEB. F.; SHAKIR, M. A. Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing p availability and promoting cotton growth. **J. Anim. Plant Sci.**, vol. 22, n. 1, p. 204-210, 2012.

- RAWAT, P.; DAS, R.; SHANKHDHAR, D.; SHANKHDHAR, S. C. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *J. Soil Sci. Plant Nut.*, v. 21, p. 49-68, 2021.
- RATKE, R. F.; ANDRADE, T. G.; ROCHA, S. G. da; SOUSA, A. de; DAI, P. V. da S.; SILVA-FILHO, E. C.; BERTOLINO, L. C.; ZUFFO, A. M.; OLIVEIRA, A. M. de; AGUILERA, J. G. Regional rock dust as a source of phosphorus and potassium for plants. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 7, p. e497974257, 2020.
- REJSEK, K.; VRANOVA, V.; PAVELKA, M.; FORMANEK, P. Acid phosphomonoesterase (E.C. 3.1.3.2) location in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, vol. 175, p. 196–211, 2012.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, vol. 17, p. 319–339, 1999.
- SANE, S. A.; MEHTA, S. K. Isolation and Evaluation of Rock Phosphate Solubilizing Fungi as Potential Biofertilizer. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, vol. 6, p. 1-6, 2015.
- SANSINENEA, E. *Bacillus* spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria. In: SINGH, H. B. et al (Eds.) **Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and applications**. Singapore: Springer, 2019. p 225-237.
- SAXENA, A. K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D. J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of applied microbiology*, v. 128, n. 6, p. 1583-1594, 2020.
- SHAHID, I.; HAN, J.; HANOOQ, S.; MALIK, K. A.; BORCHERS, C. H.; MEHNAZ, S. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 5, p 1-14. , feb. 2021.
- SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, v. 2, p. 1-14, 2013.
- SUYAL, D. C.; SONI, R.; SAI, S.; GOEL, R. Microbial Inoculants as Biofertilizer. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, vol. 1, p. 311-318, 2016.
- TAO, G. G.; TIAN, S. J.; CAI, M. Y.; XIE, G. H. Phosphate-Solubilizing and -Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. *Pedosphere*, v. 18, n. 4, p. 515–523, 2008.
- TEHERA-HERNÁNDEZ, B.; HEYDRICH-PÉREZ, M.; ROJAS-BADÍA, M. M. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 24, n. 2, p. 357-364, 2013.
- TURNBULL, P. C. B. *Bacillus*. In: BARON. S. ed. **Medical Microbiology**. 4 ed. Galveston (TX): Univ of Texas Medical Branch, 1996. p. 1-19.

ZAIDI, A.; KHAN, M. S.; AHMED, M.; OVES, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, vol. 56, n. 3, p. 263–284, 2009.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N; G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade Microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.

ZUCARELLI, C.; BARZAN, R. R.; SILVA, J. B.; CHAVES, D. P. Associação de fosfatos e inoculação com *Bacillus subtilis* e seu efeito no crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 65, n.2, p. 189-195, mar/abr, 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, na qual contribuíram não somente para a concretização dessa formação acadêmica, mas também para minha formação pessoal. Em especial aos meus pais, aos meus irmãos, a minha cunhada e meus tios (Edivaldo e Patrícia) por todo apoio.

Agradeço a André, por toda paciência e cumplicidade.

Agradeço aos meus Agromigos (Clara, Kerity, Vitor, Malu e Priscyla) com quem pude contar ao longo de todo esse percurso, sem vocês nada disso teria sido possível. Foi por meio da nossa convivência que percebi que um ambiente acadêmico pode ser também um local afetivo e de encontros.

Agradeço também aos meus colegas de curso, na qual tenho profundo carinho, principalmente a Josélia e Raíres.

Agradeço aos meus orientadores, Élida e Josely, na qual sempre nutri profunda admiração.

Obrigada pelo apoio, orientação e exemplo profissional.

Agradeço a todas as minhas professoras e professores, assim como, a todos os técnicos e funcionários do Campus II, fundamentais nessa minha formação. Em especial agradeço a Shirleyde Santos, Camila Firmino, Antônio Fernandes, Nem e Dedé.

Agradeço a Amanda de Melo, por toda paciência e orientação nas técnicas laboratoriais.

Agradeço também a todas as mulheres que vieram antes de mim e que possibilitaram que eu pudesse ocupar o local na qual me encontro hoje, minha formação é resultado de muitas outras mãos.

Agradeço a Universidade Pública por todas as oportunidades que ela me proporcionou, como acesso e garantia a uma educação justa e de qualidade.

Agradeço a todos os agricultores e agricultoras com quem tive contato ao longo desse período. Obrigada por demonstrarem a importância da Agroecologia e também, por despertarem meu amor e admiração pelo curso.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que possibilitaram e contribuíram direta ou indiretamente nessa minha formação.