



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS II LAGOA SECA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS - CCAA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE AGROECOLOGIA**

LEONARDO GASPAR RAMOS DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Pseudomonas* sp.
USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

**LAGOA SECA
2025**

LEONARDO GASPAR RAMOS DA COTA

**OTIMIZAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Pseudomonas* sp.
USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

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

Orientadora: Prof. Dra. Elida Barbosa Corrêa

Coorientador: Dr. Josely Dantas Fernandes

**LAGOA SECA
2025**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão 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.

C837o Costa, Leonardo Gaspar Ramos da.
Otimização da solubilização de fosfato por *Pseudomonas sp.*
usando metodologia de superfície de resposta [manuscrito]
/ Leonardo Gaspar Ramos da Costa. - 2025.
36 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agroecologia)
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, 2025.

"Orientação : Profa. Dra. Élide Barbosa Corrêa, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA".

"Coorientação: Dr. Josely Dantas Fernandes, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA".

1. Bactéria solubilizadora de fosfato. 2. Planejamento composto central. 3. Nutriente. I. Título

21. ed. CDD 572

LEONARDO GASPAR RAMOS DA COSTA

OTIMIZAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR PSEUDÔMONAS SP.
USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

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

Aprovada em: 05/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Élida Barbosa Corrêa** (***.980.538-**), em **25/06/2025 17:29:29** com chave **181b8672520311f084ef1a7cc27eb1f9**.
- **Mario Sergio de Araujo** (***.783.874-**), em **25/06/2025 20:56:09** com chave **f707316c521f11f0b8a41a1c3150b54b**.
- **Amanda de Melo Gonçalves Gaião** (***.903.744-**), em **25/06/2025 20:03:55** com chave **ab575e4c521811f08a191a1c3150b54b**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do
QRCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 26/06/2025

Código de Autenticação: fe9313



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	REFERENCIAL TEORICO	6
2.1	Disponibilidade de fósforo em solos tropicais e sua importância para a agricultura	6
2.2	Microrganismos solubilizadores de fosfato: mecanismos e aplicações	7
2.3	Mecanismos de solubilização de fosfato	8
2.4	Otimização da solubilização de fosfato: abordagem estatística	9
3	MATERIAIS E METODOS	10
3.1	Obtenção de <i>Pseudomonas</i> sp.....	10
3.2	Determinação do índice de solubilização de fosfato	10
3.3	Desenho experimental e análise estatística	11
3.4	Quantificação de fósforo solúvel, acidez, pH e da população bacteriana	14
4	RESULTADOS E DISCUÇÃO	21
4.1	Análise do índice de solubilização de fosfato	21
4.2	Regressão linear múltipla e análise da adequação do modelo ajustado	23
4.3	Desenvolvimento da equação do modelo de regressão	24
4.4	Análise de superfície de resposta	27
5	CONCLUSÕES	27
	REFERÊNCIAS	31
	AGRADECIMENTOS.....	31

OTIMIZAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *Pseudomonas* SP. USANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Leonardo Gaspar Ramos Da Costa^{1*}

RESUMO

Objetivou-se com este estudo analisar o efeito da temperatura de incubação e teores de glicose e de pó de rocha fosfática sobre o pH, acidez e solubilização de P por *Pseudomonas* sp. Dezenove experimentos foram definidos pela metodologia de superfície de resposta com base em um delineamento composto central (CCD), e os efeitos da variação da temperatura de incubação, glicose e pó de rocha fosfática (codificados por -1, 0 ou +1) no pH, acidez e solubilização de P foram explorados. Os resultados revelaram que o modelo CCD teve alta eficiência para prever o pH, acidez e a solubilização de P ($R^2 = 0,9421$; $0,9240$ e $0,9348$, respectivamente). Os parâmetros que exerceram o maior efeito percentual sobre as variáveis dependentes foram: glicose (26,14%), temperatura ao quadrado (27,52%) e a interação glicose e pó de rocha (22,01%) para o pH; temperatura (19,82%) para acidez e temperatura (34,01%) e pó de rocha para solubilização de fosfato. Os parâmetros operacionais ótimos para a solubilização máxima de fosfato ($57,73 \text{ mg L}^{-1}$) correspondeu a: $28,35 \text{ °C}$, $64,93 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $2,61 \text{ g}$ de fosfato natural. Nestas mesmas condições, o pH e a acidez titulável no meio de cultura apresentaram os seguintes valores: $4,31$ e $213,77 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A análise ANOVA confirmou a precisão e validade do modelo em termos de valor F ($0,26$; $1990,93$ e $207,16$) para pH, acidez e teor de fósforo, respectivamente, todos significativos com valor $p < 0,001$.

Palavras-chave: Bactéria solubilizadora de fosfato; planejamento composto central, nutriente.

¹Estudante de Agroecologia pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). **OPTIMIZATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZATION BY *Pseudomonas* SP. USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY**

ABSTRACT

This study aimed to analyze the effect of incubation temperature and contents of glucose and phosphate rock powder on pH, acidity and P solubilization by *Pseudomonas* sp. Nineteen experiments were defined by the response surface methodology based on a central composite design (CCD), and the effects of varying incubation temperature, glucose and phosphate rock powder (coded by -1, 0 or +1) on pH, acidity and P solubilization were explored. The results revealed that the CCD model had high efficiency in predicting pH, acidity and P solubilization ($R^2 = 0,9421$, $0,9240$ and $0,9348$, respectively). The parameters that exerted the greatest percentage effect on the dependent variables were: glucose (26,14%), temperature squared (27,52%) and the glucose and rock powder interaction (22,01%) for the pH; temperature (19,82%) for acidity and temperature (34,01%) and rock powder for phosphate solubilization. The optimal operating parameters for maximum phosphate solubilization ($57,73 \text{ mg L}^{-1}$) corresponded to: $28,35 \text{ °C}$, $64,93 \text{ g L}^{-1}$ of glucose and $2,61 \text{ g}$ of natural phosphate. Under these same conditions, the pH and titratable acidity in the culture medium presented the following

values: 4,31 and 213,77 mg L⁻¹, respectively. The ANOVA analysis confirmed the accuracy and validity of the model in terms of F value (0,26; 1990,93 and 207,16) for pH, acidity and phosphorus content, respectively, all significant with value $p < 0,001$.

Keywords: Phosphate-solubilizing bacteria; central composite planning, nutrient.

1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de fósforo (P) é um fator essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas em solos tropicais. No entanto, sua baixa disponibilidade representa um desafio para a produtividade agrícola, devido à fixação desse elemento por reações que resultam na formação de precipitados insolúveis com óxidos de alumínio (Al) e ferro (Fe) (Johan et al., 2021). Em solos tropicais alcalinos, o P reage com o cálcio (Ca), formando fosfatos de cálcio pouco solúveis (Khan et al., 2023). Esses processos reduzem a disponibilidade de P para as plantas, pois grande parte do elemento aplicado torna-se quimicamente ligado ao solo, permanecendo apenas uma pequena fração na solução do solo (Johan et al., 2021).

Microrganismos solubilizadores surgem como uma estratégia promissora e sustentável para aumentar a eficiência do uso desse nutriente na agricultura (Xie et al., 2021; Ghorehshizadeh et al., 2024). Segundo Xie et al. (2021), a produção de ácidos orgânicos, como o ácido glucônico, por *Pseudomonas* sp. é fundamental para a liberação de P retido em minerais, contribuindo para sua biodisponibilidade. No entanto, a atividade desse microrganismo é influenciada por fatores ambientais e nutricionais, como concentração de carbono (na forma de glicose), presença de fósforo (como rocha fosfática) e temperatura.

Embora estudos anteriores tenham avaliado isoladamente esses fatores, a interação simultânea entre glicose, pó de rocha e temperatura sobre o pH, acidez e solubilização de P ainda é pouco compreendida. No entanto, espera-se que o aumento da glicose estimule a atividade microbiana, reduzindo o pH e favorecendo a solubilização de P (Sanchez-Gonzalez et al., 2022). O pó de rocha pode atuar como tampão, dependendo dos minerais presentes (Marcotte et al., 2020), enquanto a temperatura pode otimizar ou limitar as reações bioquímicas e a dissolução mineral (Luo et al., 2024; Sharma et al., 2024).

Diante desse contexto, objetivou-se com este estudo analisar o efeito da temperatura de incubação, teor de glicose e pó de rocha fosfática sobre o pH, acidez e solubilização de P por *Pseudomonas* sp. Para isso, foram utilizados modelos de superfície de resposta a fim de identificar as condições ideais que maximizem a solubilização de fósforo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Disponibilidade de fósforo em solos tropicais e sua importância para a agricultura

O fósforo (P) é um macronutriente essencial ao crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo determinante para a produtividade agrícola. Ele participa de diversos processos metabólicos fundamentais, como a fotossíntese, o transporte de energia, a síntese de ácidos nucleicos e a formação de membranas celulares (Luo et al., 2024; Abbasi, 2023). Sua deficiência compromete significativamente a fisiologia das plantas, afetando negativamente o crescimento radicular, o metabolismo e, conseqüentemente, o rendimento das culturas (Puga et al., 2024).

Apesar de sua importância, o fósforo é um dos nutrientes com menor disponibilidade no solo, especialmente em regiões tropicais. Isso se deve, em grande parte, à sua forte tendência de se ligar a cátions como ferro, alumínio e cálcio, formando compostos insolúveis que não estão prontamente disponíveis para as plantas (Koczorski et al., 2023; Ghorehshizadeh et al., 2024). Esse processo resulta na formação do chamado "legado de fósforo", uma reserva de P que se acumula no solo ao longo do tempo, mas que permanece inacessível para a maioria das culturas (Doydora et al., 2020).

Para superar essa limitação, as plantas desenvolveram estratégias adaptativas conhecidas como *Phosphate Starvation Response* (PSR), que envolvem alterações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas voltadas à melhoria da captação de fósforo (Puga et al., 2024). Além disso, há evidências de que mecanismos moleculares, como a ativação do gene *OsPHR2* no arroz, podem mediar a interação entre raízes e microrganismos benéficos, promovendo a absorção de fósforo por meio da modulação do microbioma rizosférico (Liu et al., 2024).

Nos solos tropicais, o problema da fixação de fósforo é agravado pela acidez acentuada. Nessas condições, o fósforo tende a se precipitar com íons de ferro e alumínio, tornando-se ainda mais indisponível (Li & Tian, 2023). O uso contínuo e inadequado de fertilizantes sintéticos pode intensificar esse problema ao aumentar a acidez do solo, reduzindo ainda mais a eficiência do uso do P (Dejene et al., 2023).

Diversas abordagens têm sido propostas para aumentar a disponibilidade de fósforo em solos ácidos. A calagem é uma prática amplamente recomendada por sua capacidade de neutralizar a acidez, favorecendo a solubilidade dos fosfatos e melhorando a absorção pelas plantas. Estudos demonstram que a combinação da calagem com fontes alternativas de P, como o fosfato de rocha parcialmente acidulado (PARP), resulta em maior eficiência na

utilização de nutrientes e incremento da produtividade agrícola (Dejene et al., 2023).

Outra alternativa promissora envolve o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB), capazes de transformar formas insolúveis de fósforo em formas assimiláveis pelas plantas. A inoculação com PSB tem se mostrado eficaz, por exemplo, no aumento do fósforo disponível na rizosfera de plantas de chá (Guo et al., 2024). Além disso, tecnologias emergentes como o uso de nanofertilizantes à base de hidroxiapatita vêm ganhando destaque por apresentarem biocompatibilidade, baixa toxicidade e potencial para liberação controlada de fósforo em solos ácidos (Noruzi et al., 2023).

A escolha adequada de espécies vegetais também pode representar uma estratégia eficaz. Culturas como o tremoço demonstram capacidade de mobilizar fósforo não lábil, contribuindo para o aumento da disponibilidade desse nutriente em ambientes tropicais (Mori Alvez et al., 2024).

Outro desafio relevante está relacionado à baixa eficiência de utilização dos fertilizantes fosfatados. Em determinadas regiões, como no Paquistão, a eficiência de uso pode ser inferior a 25%, reflexo da precipitação do fósforo em solos calcários e alcalinos (Khan et al., 2023). Além disso, a alta solubilidade de fertilizantes convencionais favorece perdas por lixiviação e escoamento superficial, o que compromete não apenas a eficiência agrônômica, mas também a sustentabilidade ambiental (Ramesh & Raghavan, 2024).

A escolha inadequada do tipo de fertilizante fosfatado em função da cultura ou das características do solo também contribui para a baixa eficiência. O fosfato diamônico, por exemplo, embora amplamente utilizado, pode não ser a melhor opção em determinados contextos agrônômicos (Liang et al., 2023).

Recentemente, diferentes estratégias têm sido propostas para contornar essas limitações. A adição de ácidos húmicos aos fertilizantes fosfatados pode aumentar a mobilidade e a disponibilidade do P aplicado (Jing et al., 2023). Já o revestimento de fertilizantes com materiais como o biocarvão ou o desenvolvimento de formulações de liberação lenta tem se mostrado eficaz na redução das perdas e na extensão do tempo de disponibilização do nutriente no solo (Ramesh & Raghavan, 2024).

2.2. Microrganismos solubilizadores de fosfato: mecanismos e aplicações

Microrganismos solubilizadores de fósforo (PSMs) desempenham um papel crucial na biodisponibilidade de fósforo e na regulação dos processos de transformação desse nutriente no solo (Li et al., 2024a). Esses microrganismos benéficos, incluindo bactérias e fungos, são

capazes de converter formas insolúveis de fósforo em compostos assimiláveis pelas plantas (Wang et al., 2023). Dentre esses, as bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB) são amplamente estudadas pelo seu potencial no contexto da agricultura sustentável.

Diversos gêneros bacterianos têm sido identificados como solubilizadores eficientes de fosfato, tais como *Pseudomonas sp.*, *Pantoea sp.*, *Burkholderia cepacia* e *Acinetobacter baumannii*, isolados da rizosfera do milho (Luo et al., 2024a). Além disso, estudos relataram a presença de *Klebsiella variicola* em intestinos de minhoca (Kerketta et al., 2025) e *Pseudomonas taetrolens* na rizosfera de plantas de lúpulo (Ghoreshizadeh et al., 2024) como potenciais PSB. Gêneros microbianos de baixa abundância, frequentemente negligenciados nas análises convencionais, também foram identificados como PSB ativos, por meio de espectroscopia Raman de célula única e sequenciamento metagenômico (Li et al., 2024b).

Entre os PSB, as espécies do gênero *Pseudomonas* se destacam por sua alta capacidade de solubilizar compostos fosfatados insolúveis, além de desempenharem outras funções benéficas no solo, como produção de fitormônios, sideróforos, enzimas e compostos antimicrobianos (Qingwei et al., 2023; Georgieva et al., 2023). Espécies como *P. putida*, *P. asiatica*, *P. poae*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* têm demonstrado elevado potencial de solubilização de fósforo (Georgieva et al., 2023; Tang et al., 2025; Wu et al., 2024).

A eficácia dessas bactérias, no entanto, depende de diversos fatores, incluindo as características do solo e a espécie vegetal. Por exemplo, *P. asiatica* JP233 foi eficaz em aumentar a solubilização de fósforo e o crescimento do tomateiro, com efeitos mais pronunciados em solos com alto teor de P, mesmo sem adubação adicional (Tang et al., 2025). Além disso, compostos produzidos por plantas, como glucosinolatos da *Camelina sativa*, podem inibir a colonização radicular de microrganismos benéficos, como *Trichoderma viride* (Hofmann et al., 2023).

2.3. Mecanismos de solubilização de fosfato

A solubilização de fosfato por Bactérias Solubilizadoras de Fosfato (PSBs) e fungos promotores de crescimento vegetal ocorre por diferentes mecanismos, sendo a produção de ácidos orgânicos o mais relevante. A liberação de ácidos como cítrico, fumárico, cetoglutárico, málico e oxálico por *Enterobacter sp.* (cepa 15S), por exemplo, foi diretamente correlacionada com a solubilização de trifosfato de cálcio (Zuluaga et al., 2023; Mengesha & Legesse, 2024).

Outro mecanismo importante é a produção de sideróforos, que aumentam a solubilização indireta de fósforo por meio da mobilização de metais quelantes. *Aspergillus*

flavus JKJ7 apresentou elevada produção de sideróforos (83,7%), indicando seu potencial na melhoria da absorção de ferro e fósforo pelas plantas (Moropana et al., 2024). *Pseudomonas taetrolens* ULE-PH5 e *Pseudomonas sp.* ULE-PH6 também apresentaram essa capacidade (Ghoreshizadeh et al., 2024).

Além disso, a atividade enzimática, em especial a produção de fosfatases ácida e alcalina, contribui significativamente para a solubilização de fontes orgânicas e inorgânicas de fósforo (Ghoreshizadeh et al., 2024; Luo et al., 2024b).

Vários estudos sugerem que a combinação de diferentes mecanismos em consórcios microbianos pode resultar em sinergias benéficas. A análise de componentes principais demonstrou que diferentes linhagens fúngicas apresentam perfis funcionais distintos, como produção de ácido indol-3-acético (AIA) e solubilização de fósforo, indicando sua aplicabilidade em formulações microbianas mistas (Moropana et al., 2024).

2.4. Otimização da solubilização de fosfato: abordagem estatística

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) constitui uma ferramenta estatística avançada amplamente utilizada na modelagem e otimização de processos complexos, como a solubilização de fosfato. Essa abordagem permite investigar, simultaneamente, múltiplos fatores e suas interações, oferecendo uma visão mais abrangente do sistema analisado em comparação aos métodos convencionais que consideram um fator por vez (Waday et al., 2022).

No âmbito da solubilização de fosfato, a MSR revela-se estratégica para determinar as condições experimentais ideais, como temperatura, pH, tempo de incubação e concentração do substrato, com o objetivo de maximizar a eficiência do processo. Para tanto, são comumente empregados delineamentos experimentais robustos, como o Central Composite Design (CCD) ou o Box-Behnken Design (BBD), que subsidiam a construção de modelos matemáticos capazes de descrever com precisão a resposta do sistema frente às variações dos fatores avaliados (Rajewski & Dobrzyńska-Inger, 2021).

Uma das principais vantagens da MSR é sua capacidade de identificar efeitos sinérgicos entre variáveis do processo, os quais dificilmente seriam perceptíveis mediante análises univariadas. No caso da solubilização de fosfato, esse aspecto é particularmente relevante, visto que o processo envolve interações complexas entre a atividade microbiana, as condições ambientais e as propriedades físico-químicas do substrato (Waday et al., 2022)

Além de possibilitar a determinação de condições ótimas com elevada acurácia, a MSR permite uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos que regulam a resposta do

sistema. Modelos empíricos gerados por essa metodologia frequentemente apresentam altos coeficientes de determinação, contribuindo com informações valiosas para o aprimoramento da eficiência dos processos estudados (Dušan Veličković et al., 2020). Contudo, é fundamental destacar que a eficácia desses modelos depende da qualidade dos dados experimentais, sendo possível empregar estratégias complementares, como o recorte de coeficientes, para mitigar o impacto de erros experimentais e aumentar a confiabilidade das predições (Kim et al., 2023).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção de *Pseudomonas* sp.

O isolado CFB 004 (GenBank ID: 16S rRNA, OR660289.1) foi obtido a partir da rizosfera da batateira (*Solanum tuberosum*) cultivada na horta mandala em manejo agroecológico – sem a utilização de fertilizantes sintéticos - da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus II, Lagoa Seca. O isolado está preservado na coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia do campus.

3.2. Determinação do índice de solubilização de fosfato

A determinação do índice de solubilização de fosfato foi realizada por meio da medição do halo formado ao redor das colônias bacterianas do isolado CFB 004 em placas de Petri contendo o meio de cultura Pikovskaya's Agar. Previamente, o isolado preservado em tubos contendo meio Ágar Nutriente (AN) a 4°C foi multiplicado em placas de Petri contendo meio AN. Após 48 h de cultivo a 25°C em estufa tipo BOD no escuro, as colônias bacterianas foram suspensas em solução salina (0,85% de NaCl) e ajustadas quanto a densidade ótica de 1,0 a 600 nm. 10 µL da suspensão bacteriana foi adicionada em quatro pontos equidistantes da placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio de cultura Pikovskaya's Agar. As colônias foram acondicionadas em estufa tipo BOD no escuro a 25°C.

A atividade solubilizadora bacteriana foi avaliada pela medição diária do halo de solubilização formado ao redor das colônias em crescimento por 7 dias. Para o cálculo do Índice de Solubilização de Fosfato (ISF) foi utilizada a Equação 1 (Waday et al., 2022):

$$\text{ISF} = \frac{\text{Diâmetro total (colônia+zona halo)}}{\text{diâmetro da colônia}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Eq. (1)

Para a obtenção do ISF médio foram utilizadas duas placas de Petri, cada uma contendo quatro colônias bacterianas. Dessa forma, o valor final foi calculado com base em 08 unidades experimentais independentes.

3.3. Desenho experimental e análise estatística

A relação entre diferentes parâmetros foi avaliada pelo método experimental estatístico de superfície de resposta usando o software Minitab 18. Este estudo foi conduzido usando a metodologia de superfície de resposta e o planejamento composto central, considerando como variáveis independentes: temperatura de incubação (T) e concentrações de glicose (S) e de pó de rocha (R). O planejamento composto central envolveu oito pontos no cubo, seis pontos axiais e cinco pontos centrais no cubo totalizando 19 experimentos, conforme mostrado na Eq. (2).

$$N = 2^n + 2*n + n_c = 2^3 + 2*3 + 5 = 19 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde N é o número total de experimentos necessários, n é o número de variáveis e n_c é o número de réplicas.

As variáveis independentes foram ajustadas em cinco níveis codificados ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$). A relação entre o valor codificado e o valor real das variáveis é apresentada Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis utilizados no CCD para solubilização de fosfato e acidez.

Fatores Independentes	Unidade	Símbolo codificado	Níveis codificados				
			$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura de incubação	o C	T	25,61	28,0	31,5	35,0	37,39

Substrato	g L ⁻¹	S	6,07	18,0	35,5	53,0	64,93
Pó de rocha	g	R	2,61	5,0	8,5	12,0	14,39

No planejamento foi adotado como resposta (variável dependente) os resultados de fósforo solúvel em mg ml⁻¹. Além disto, foram realizadas as análises de pH e acidez do sobrenadante após o período de incubação de 10 dias. O meio de cultura líquido utilizado neste estudo foi o NBRIP (10 g L⁻¹ de glicose, 0,15 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g L⁻¹ de KCl, 5 g L⁻¹ de MgCl₂.6H₂O e 0,25 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O) (NAUTIYAL, 1999), com exceções, para o substrato (glicose) e o pó de rocha que tiveram concentrações variáveis (de acordo com os 5 níveis experimentais da Tabela 2). O pó de rocha foi um produto comercial da marca maxgreen® com teor aproximado de 24% de P₂O₅ e 32% de cálcio total.

A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento experimental com as combinações de variáveis e níveis.

Tabela 2. Resultados da matriz do planejamento experimental para solubilização de fosfato

Experimento	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais			Variáveis analisadas		
	T	S	PR	T (°C)	S (g L ⁻¹)	R (g L ⁻¹)	pH	Acidez mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹
1	-1,00	-1,00	-1,00	28,00	18,00	5,00	6,00	140,89	35,79
2	1,00	-1,00	-1,00	35,00	18,00	5,00	5,30	134,48	16,57
3	-1,00	1,00	-1,00	28,00	53,00	5,00	4,82	185,72	37,77
4	1,00	1,00	-1,00	35,00	53,00	5,00	4,72	115,27	27,88
5	-1,00	-1,00	1,00	28,00	18,00	12,00	4,90	131,00	21,66
6	1,00	-1,00	1,00	35,00	18,00	12,00	5,00	122,00	8,37
7	-1,00	1,00	1,00	28,00	53,00	12,00	4,80	108,87	22,30
8	1,00	1,00	1,00	35,00	53,00	12,00	5,00	51,23	15,30
9	-1,68	0,00	0,00	25,61	35,50	8,50	5,36	121,68	25,61
10	1,68	0,00	0,00	37,39	35,50	8,50	5,30	70,44	1,18
11	0,00	-1,68	0,00	31,50	6,07	8,50	5,10	134,40	20,00
12	0,00	1,68	0,00	31,50	64,93	8,50	4,37	70,00	43,20
13	0,00	0,00	-1,68	31,50	35,50	2,61	5,00	172,91	40,60
14	0,00	0,00	1,68	31,50	35,50	14,39	4,50	153,70	19,10
15	0,00	0,00	0,00	31,50	35,50	8,50	4,70	131,28	22,79
16	0,00	0,00	0,00	31,50	35,50	8,50	4,80	115,27	21,37
17	0,00	0,00	0,00	31,50	35,50	8,50	4,70	134,48	23,63
18	0,00	0,00	0,00	31,50	35,50	8,50	4,70	134,48	21,37
19	0,00	0,00	0,00	31,50	35,50	8,50	4,70	124,88	23,63

Para cada experimento da matriz do planejamento experimental utilizou-se Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio de cultura. Os recipientes foram tampados com rolhas de algodão e em seguida esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Após esfriamento a temperatura ambiente, foram adicionadas aos erlenmeyers suspensões bacterianas resultando numa concentração final de 10⁶ UFC mL⁻¹. Os erlenmeyers foram mantidos em incubadoras em sistema sem agitação por 10 dias nos 5 níveis de temperatura estabelecidos na Tabela 2.

A relação entre as variáveis independentes e respostas foi estabelecida através da equação de regressão polinomial quadrática múltipla de segunda ordem (Eq. 1).

$$Y = \mu_0 + \sum_{i=1}^k \mu_i X_i + \sum_{i=1}^k \mu_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \mu_{ij} X_i X_j + s \quad \epsilon \neq 0 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde Y é a variável resposta (pH, acidez e P solubilizado), X_i e X_j são as variáveis independentes codificadas, k é o número de variáveis independentes, ε são os resíduos do

modelo (diferença entre valores observados e valores estimados pelo modelo) e β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os efeitos do intercepto y , funções lineares, função quadrática e interação das variáveis, respectivamente. Para facilitar a interpretação dos resultados da modelagem e classificar os efeitos dos parâmetros incluídos no modelo CCD (Equação 1), o efeito percentual de cada parâmetro foi estimado pela análise de Pareto usando a Equação (2):

$$P_i = \left(\frac{\beta_i^2}{\sum \beta_i^2} \right) \times 100 \quad i \neq 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que, P_i é o efeito percentual de cada variável incluída no modelo CCD, e β_i são os coeficientes da equação polinomial.

3.4. Quantificação de fósforo solúvel, acidez, pH e da população bacteriana

O fósforo no sobrenadante foi determinado de acordo com (Teixeira, et al., 2017). As amostras retiradas foram filtradas através de papel de filtro de 0,2 mm. Uma alíquota de 0,1 ml desse extrato foi retirada e colocada em Erlenmeyer de 125 ml; posteriormente foram adicionados 10 ml de solução ácida de molibdato de amônio diluída e aproximadamente 30 mg de ácido ascórbico em pó, como redutor; Os erlenmeyers foram acondicionados em agitador circular horizontal, por 1 a 2 minutos e deixado desenvolver a cor durante 1 hora. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade ótica no espectrofotômetro-UV-Vis, usando filtro vermelho (comprimento de onda de 660 nm) e a quantidade de P solubilizado pela tensão foi extrapolada da curva padrão (Waday et al., 2022).

A determinação da Acidez Total foi realizada de acordo com o procedimento descrito em APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: America Public Health Association, 1998. – part 2000 Physical & Aggregate properties, 2310 Acidity.

Para titulação dos extratos líquidos obtidos nos ensaios, utilizou-se o volume de 10 ml, em seguida adicionou-se 0,2 ml (5 gotas) da solução de fenolftaleína. A titulação foi realizada com NaOH 0,02 N, previamente padronizada com KHC₈H₄O₄, até a mudança de cor persistente, de incolor para rósea.

O cálculo da acidez, assumindo que o ácido cítrico foi o agente acidificante presente na amostra, foi realizado considerando a equação 3:

$$\text{Acidez, mg H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \text{ L}^{-1} = \frac{A \times B}{\text{ml da amostra}} \times 64040 \text{ (Eq.3)}$$

Sendo:

A = ml de NaOH titulante consumido na titulação;

B = Normalidade do NaOH.

A determinação do pH foi de acordo com o procedimento descrito em APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1998. – part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-H pH value.

A leitura do pH das amostras foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando phmetro, introduzindo o eletrodo diretamente nos extratos líquidos ao final dos ensaios.

A quantificação da população bacteriana foi realizada por meio de diluição seriada de 1 ml das amostras em tubos Falcon contendo 9 ml de solução salina (0,85% de NaCl), até a diluição de 10^{-9} e plaqueamento de 100 μL da suspensão em meio de cultura NA. As culturas foram incubadas em estufa tipo BOD a 25 °C no escuro por 48 h. Posteriormente, foi realizada a quantificação das colônias presentes em cada placa, que representam as unidades formadoras de colônias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do índice de solubilização de fosfato

Foi observado o crescimento bacteriano no meio de cultivo Pikovskaya's Agar e a solubilização do fosfato inorgânico presente no meio, característica evidenciada pela formação do halo translúcido ao redor da colônia (Figura 1). A presença dessa zona clara indica a liberação de ácidos orgânicos e outros metabólitos capazes de promover a solubilização de

compostos fosfatados insolúveis presentes no meio.

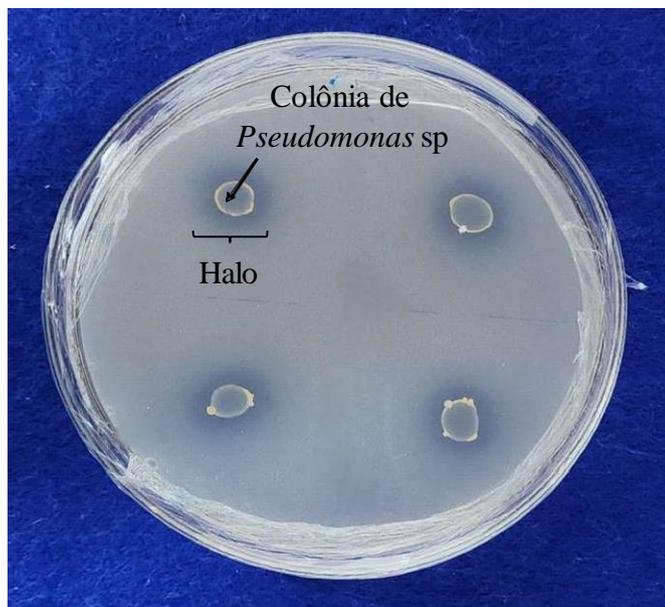


Figura 1. Formação de halo de solubilização em torno de colônias do isolado CFB 004 em meio Pikovskaya's Agar, indicando atividade solubilizadora de fosfato.

Do ponto de vista qualitativo, o isolado de *Pseudomonas* sp. 004 analisado demonstrou perfil de solubilização considerado precoce, uma vez que a formação do halo ao redor da colônia tornou-se evidente até o terceiro dia de incubação. O Índice de Solubilização de Fosfato (Phosphate Solubilization Index – PSI) calculado foi, em média, de 2,72, valor que, segundo a classificação proposta por Chagas Júnior et al. (2010), caracteriza o isolado como apresentando capacidade intermediária de solubilização ($2 < \text{PSI} < 4$).

Comparativamente, esse desempenho foi inferior ao registrado por Joshi et al. (2023), cujo estudo revelou que o isolado L4, proveniente da região de Lacchiwala, apresentou um PSI significativamente mais elevado ($4,75 \pm 0,06$), além de uma atividade quantitativa de solubilização de fosfato de $891,38 \pm 18,55 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses dados ilustram o potencial de variabilidade existente entre diferentes linhagens bacterianas.

Essa heterogeneidade na capacidade de solubilização entre cepas de *Pseudomonas* tem sido amplamente documentada na literatura, refletindo a diversidade metabólica do gênero (Guardiola-Márquez et al., 2023; Joshi et al., 2023). Enquanto alguns isolados demonstram elevada eficiência na solubilização de fosfatos, outros apresentam desempenho moderado ou até mesmo reduzido (Guardiola-Márquez et al., 2023; Qingwei et al., 2023). Essa variação pode ser atribuída, em parte, a fatores intrínsecos aos isolados, bem como a condições ambientais

específicas, como o tipo de solo, pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, que afetam diretamente a expressão dos mecanismos de solubilização (Janati et al., 2023).

4.2. Regressão linear múltipla e análise da adequação do modelo ajustado

A capacidade de solubilização de fosfato por *Pseudomonas* sp. 004, os valores de pH e a acidez em cada ensaio experimental (Tabela 2) foram determinadas e a ANOVA foi usada para obter a interação entre as variáveis independentes e as respostas. Os termos do modelo de regressão para cada variável independente (temperatura de incubação (T) e concentrações de glicose (S) e de pó de rocha (R)) estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância para modelo quadrático de superfície de resposta para pH, acidez e teor de fósforo solúvel.

Fonte de variação	GL	pH		Acidez		Fósforo	
		QM	Valor-P	QM	Valor-P	QM	Valor-P
Modelo	9	0,26	0,00	1990,93	0,00	207,16	0,00
Linear	3	0,34	0,00	2973,29	0,00	470,20	0,00
T	1	0,03	0,14	3861,59	0,00	599,70	0,00
S	1	0,70	0,00	2257,65	0,01	262,60	0,00
R	1	0,29	0,00	2800,63	0,00	548,40	0,00
Quadrado	3	0,26	0,00	1880,92	0,00	136,50	0,00
T x T	1	0,79	0,00	1518,93	0,01	181,00	0,00
S x S	1	0,01	0,30	958,09	0,04	106,50	0,01
R x R	1	0,02	0,22	2387,41	0,00	64,60	0,03
Interação com 2 Fatores	3	0,19	0,00	1118,59	0,01	14,80	0,26
T x S	1	0,06	0,04	1586,99	0,01	30,50	0,10
T x R	1	0,15	0,00	13,04	0,78	9,80	0,33
S x R	1	0,34	0,00	1755,76	0,01	4,10	0,52
Erro	9	0,01		162,21		9,20	
Falta de ajuste	5	0,02	0,03	238,66	0,12	15,50	0,02
Erro puro	4	0,002		66,64		1,3	

GL = Grau de liberdade; QM = Quadrado médio.

Os resultados da ANOVA mostraram um ajuste significativo ($p < 0,01$) ao modelo de regressão quadrática para pH, acidez e fósforo solúvel dentro do intervalo das variáveis estudadas. Ainda com relação a Tabela 3, verifica-se que a maioria dos termos do modelo

influenciaram significativamente a variável resposta, com exceção de T, S² e R² para pH, T x R para acidez e a interação entre dois fatores (T x S; T x R e S x R) para fósforo solúvel.

4.3. Desenvolvimento da equação do modelo de regressão

Equações polinomiais de segunda ordem foram desenvolvidas visando expressar a relação entre as variáveis do processo (temperatura de incubação (T), glicose (S) e pó de rocha (R)) e as variáveis resposta. As equações finais obtidas em termos de fatores codificados após a exclusão dos termos insignificantes são observadas nas Eqs. 3, 4 e 5.

$$\text{pH} = 4,7685 - 0,2261S - 0,145R + 0,232T^2 + 0,0875TS + 0,1375TR + 0,2075SR \text{ (Eq. 3)}$$

$$\text{Acidez} = 127,94 - 16,82T - 12,86S - 14,32R - 10,55T^2 - 8,38S^2 + 13,22R^2 - 14,08TS - 14,81SR \text{ (Eq. 4)}$$

$$\text{P solúvel} = 22,63 - 6,626T + 4,38S - 6,337R - 3,642T^2 + 2,793S^2 + 2,175R^2 \text{ (Eq. 5)}$$

O sinal, de cada parâmetro do modelo, significa que o fator em questão tem um efeito positivo (sinal +) ou negativo (sinal -) na resposta. De acordo com os coeficientes lineares da equação de segunda ordem, temperatura (T) e pó de rocha (R) promoveram um efeito negativo no fósforo solúvel. Comportamento semelhante também foi observado para pH, havendo efeito negativo para os coeficientes lineares de glicose (S) e pó de rocha. Quanto a acidez, todos os coeficientes, com exceção do efeito quadrático de pó de rocha, influenciaram negativamente tal parâmetro.

Os modelos de regressão encontrados (Eq. 3, 4 e 5) foram altamente significativos e apresentaram coeficiente de determinação (R²) equivalentes a 94,21; 92,40 e 93,48 para as variáveis pH, acidez e fósforo solubilizado, respectivamente; indicando que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais. Além disso, o valor do R² ajustado para tais variáveis, ou seja, 91,31; 86,32 e 90,22, respectivamente, também confirma que os modelos foram altamente significativos, indicando boa concordância entre os valores experimentais e previstos das variáveis dependentes. O coeficiente de variação (CV%) e o desvio padrão das três variáveis resposta foram razoavelmente baixos e aceitáveis, mostrando um grau de precisão e alta confiabilidade dos experimentos conduzidos (Tabela 4). Assim, os modelos ajustados foram adequados para predições na faixa das variáveis experimentais.

Tabela 4. Coeficientes de regressão do modelo de segunda ordem previsto para as variáveis pH, acidez e solubilização de fosfato.

Parâmetro de resposta	pH	Acidez	Fósforo solubilizado
Média	4,82	123,84	23,59
Desvio Padrão	0,109	12,136	3,253
CV%	2,26	9,80	13,79
R ²	94,21	92,40	93,48
R ² ajustado	91,31	86,32	90,22
Modelo sugerido	Quadrático	Quadrático	Quadrático

O efeito percentual de cada parâmetro obtido pela análise de Pareto do modelo obtido pelo projeto composto central para pH, acidez e solubilização de P é observado na Figura 2. Verifica-se que o efeito quadrático de temperatura (27,52%) e linear de glicose (26,14%) promoveram a maior variação do pH, a interação S x R foi responsável por 22,01% e o efeito linear de pó de rocha por 10,75% (Figura 2A). Já para a acidez, o efeito linear de temperatura promoveu a maior contribuição percentual (19,82%), os menores percentuais foram observados para os efeitos quadráticos de temperatura ($T^2 = 7,80\%$) e glicose ($S^2 = 4,92\%$), enquanto que os demais parâmetros, ou seja, S, R, R², T x S e S x R, contribuíram de forma semelhante, com percentuais variando entre 11,59 e 15,37% (Figura 2B). Quanto ao fósforo solubilizado, o efeito linear de temperatura (34,01%), pó de rocha (31,11%) e glicose (14,9%), como também o efeito quadrático de temperatura (10,28%) foram os parâmetros mais fortes, sendo responsáveis por um total de 90,3% da solubilização do fosfato (Figura 2C).

Para avaliar a precisão dos modelos derivados do planejamento composto central, após a exclusão dos termos insignificantes (Equações 3, 4 e 5), os valores mensurados das variáveis resposta: pH, acidez e fósforo solubilizado avaliados em cada experimento (Tabela 2) foram plotados em relação às quantidades ajustadas pelos modelos (Figura 3). Os resultados mostram que o modelo estimou apropriadamente tais variáveis, respondendo por 94%, 92% e 94% da variação do pH, teor de acidez e na solubilização de P, respectivamente.

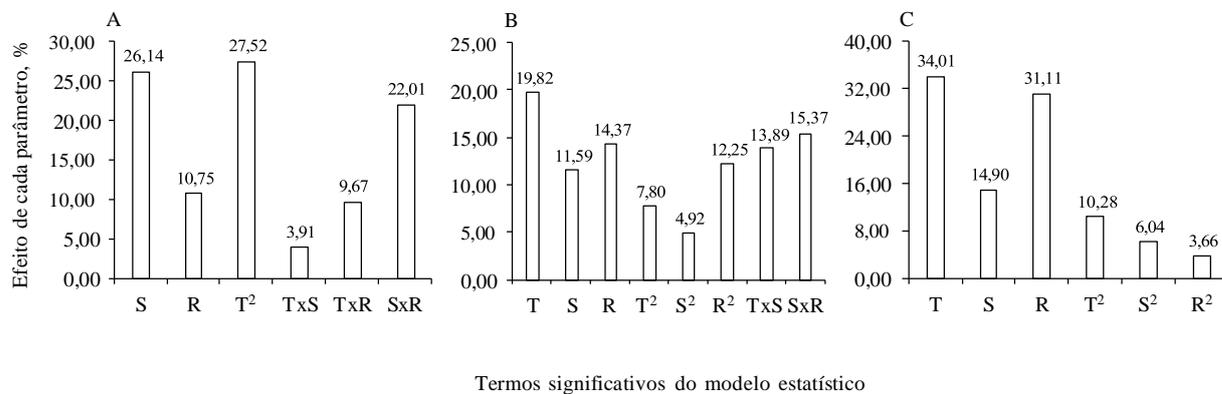


Figura 2. Efeito percentual dos parâmetros significativos estimado pela análise de Pareto do modelo de projeto composto central para pH (A), acidez (B) e solubilização de P (C). T – Temperatura; S – glicose; R – pó de rocha.

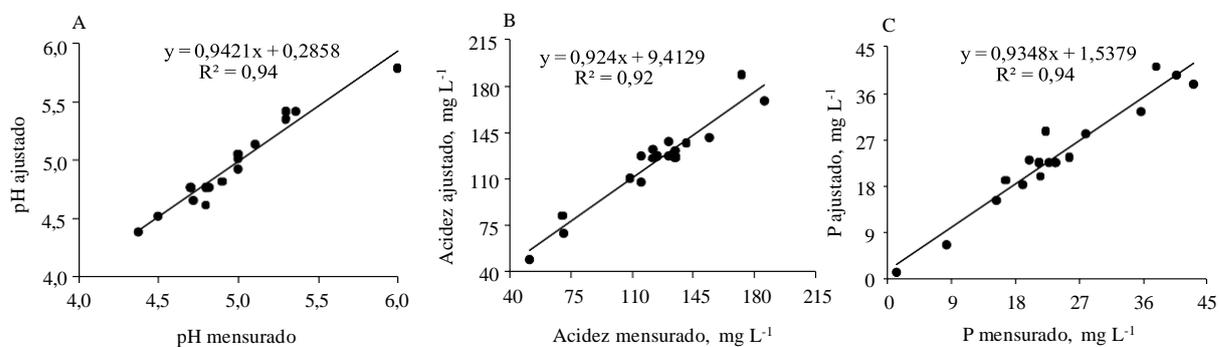
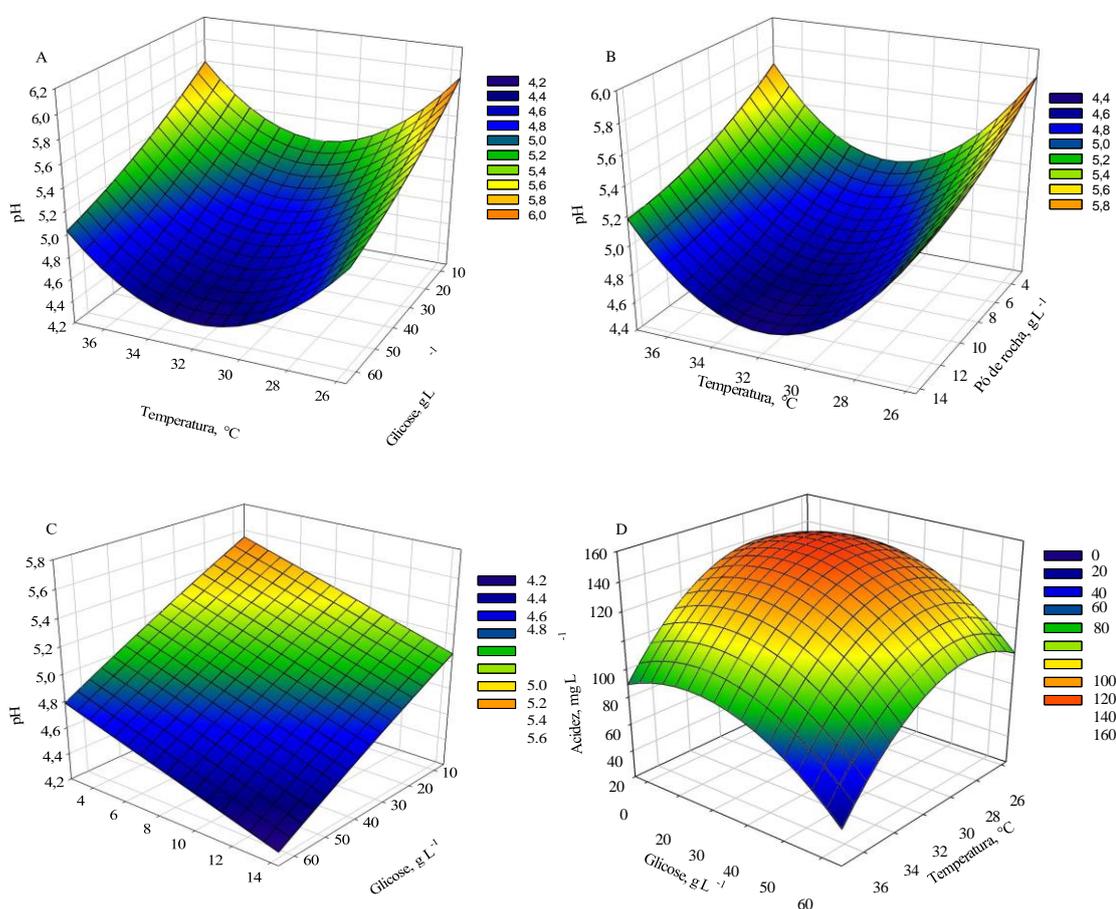


Figura 3. Curva dos valores reais em função do pH, acidez e fosfato solúvel previsto.

Estudos semelhantes foram relatados para otimização de meio de baixo custo para cultura da cepa rizobacteriana *Pseudomonas putida* Rs-198 isolada de solos salinizados (Peng et al., 2014) e cepas rizobacterianas isoladas de nódulos radiculares de *Acacia cyanophylla* (Lebrazi et al., 2020).

4.4. Análise de superfície de resposta

Gráficos de superfície tridimensionais (3D) foram gerados a partir da equação polinomial ajustada e ilustram os efeitos interativos mais significativos das variáveis independentes no pH, acidez e solubilidade do fosfato. Os parâmetros mais significativos em cada resposta são demonstrados nas figuras 4 e 5. Nesses gráficos, um fator é mantido constantes no nível ótimo, enquanto os outros dois fatores são variados dentro de suas faixas experimentais.



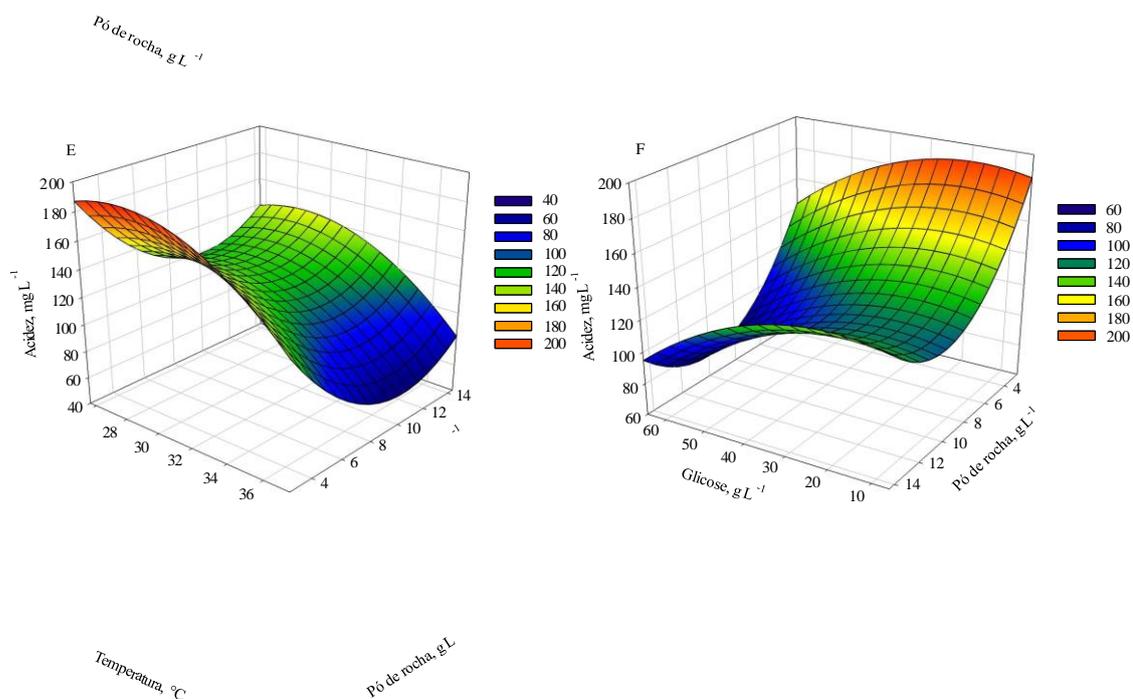


Figura 4. Superfície de resposta e curva de contorno para pH em função da variação de temperatura e glicose com pó de rocha constante no ponto central (A), temperatura e concentração de rocha com glicose constante no ponto central (B), glicose e concentração de rocha com temperatura constante no ponto central (C) e variação na concentração de acidez em função da variação de temperatura e glicose com pó de rocha constante no ponto central (D), temperatura e concentração de rocha com glicose constante no ponto central (E), glicose e concentração de rocha com temperatura constante no ponto central (F).

O pH do meio de cultura foi inversamente proporcional à concentração de pó de rocha e à glicose, de forma que o aumento desses componentes reduziu o pH até atingir um valor ótimo (Eq. 3). As interações avaliadas (temperatura \times glicose, temperatura \times pó de rocha e glicose \times pó de rocha) apresentaram efeito positivo, sendo as interações envolvendo pó de rocha e glicose as mais significativas ($p < 0,01$) (Tabela 3). Esse comportamento pode ser explicado pela neutralização dos íons H^+ promovida pelos minerais presentes no pó de rocha (como cálcio e magnésio) e pelo estímulo da atividade microbiana induzido pela glicose, que intensifica a mineralização da matéria orgânica (Xie et al., 2021). No efeito quadrático, apenas a temperatura exerceu influência significativa sobre o pH.

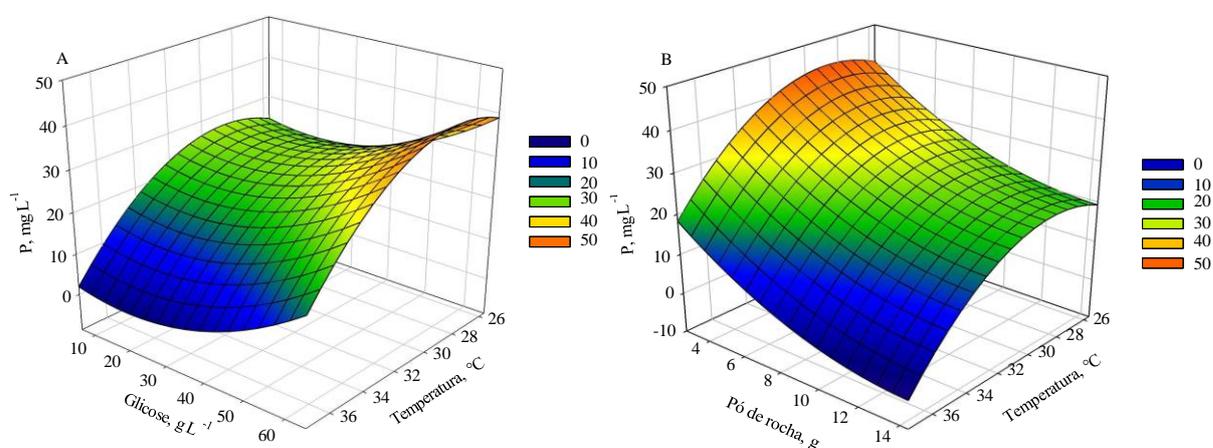
A análise das relações entre pH e os fatores experimentais revelou dois padrões distintos. Em determinadas condições, os menores valores de pH (4,36 e 4,47) foram observados com 64,93 g L⁻¹ de glicose, 30,37° C e 8,50 g L⁻¹ de pó de rocha (Figura 4A) e com 29,76° C, 35,5 g L⁻¹ de glicose e 14,38 g L⁻¹ de pó de rocha (Figura 4B), sendo o pH mais elevado nas extremidades dos eixos. Esse padrão sugere que a máxima atividade microbiana, responsável pela produção de ácidos orgânicos (tais como ácido cítrico, láctico e acético), ocorre em condições intermediárias, enquanto a solubilização dos minerais do pó de rocha, que libera H^+ , contribui para a redução do pH. Por outro lado, quando as concentrações de pó de rocha e glicose foram reduzidas para 2,61 g L⁻¹ e 6,07 g L⁻¹, respectivamente, o pH atingiu 5,98 (Figura 4C), refletindo o equilíbrio entre a produção de ácidos e a ação tamponante dos minerais.

No que se refere à acidez, observou-se que esta foi inversamente proporcional à concentração de glicose, temperatura e pó de rocha, sendo a temperatura e o pó de rocha os fatores de maior influência ($p < 0,01$) (Tabela 3). As interações entre temperatura e glicose, glicose e pó de rocha, bem como o efeito quadrático de temperatura e glicose, correlacionaram-se negativamente com o teor de acidez. A acidez exibiu um comportamento parabólico quando avaliada em função da temperatura e da glicose, com o pó de rocha constante (8,5 g L⁻¹), atingindo 139,57 mg L⁻¹ em condições intermediárias (28,70 °C e 22,12 g L⁻¹ de glicose) (Figura 4D).

Analisando a acidez em função da temperatura e do pó de rocha, com a glicose constante (35,5 g L⁻¹), observou-se uma região de alta acidez (196,13 mg L⁻¹) em baixas temperaturas (28,70 °C) e baixa concentração de pó de rocha (2,61 g L⁻¹) (Figura 4E); condições de maior temperatura e doses elevadas de pó de rocha reduziram a acidez, evidenciando o efeito tamponante dos carbonatos e silicatos, que neutralizam os ácidos

orgânicos e estabilizam o pH (Buss et al., 2023; Der et al., 2024). Por fim, a acidez atingiu $193,76 \text{ mg L}^{-1}$ em condições de $64,93 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $2,61 \text{ g L}^{-1}$ de pó de rocha (Figura 4F).

Em relação à solubilização de fosfato, a concentração de fósforo no meio de cultura aumentou com a adição de glicose, mas foi inversamente proporcional à temperatura e à concentração de pó de rocha (Eq. 5). Nenhuma interação entre os fatores apresentou efeito significativo, embora todos os efeitos quadráticos tenham sido relevantes, com a temperatura sendo o fator de maior influência ($p < 0,01$) (Tabela 3).



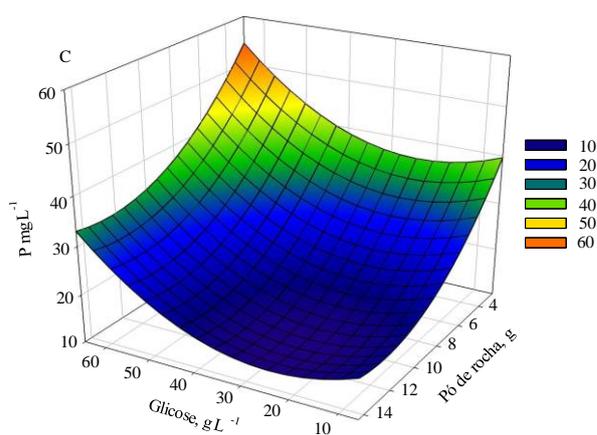


Figura 5. Superfície de resposta e curva de contorno para teor de fósforo em função da variação de temperatura e glicose com pó de rocha constante no ponto central (A), temperatura e concentração de rocha com glicose constante no ponto central (B), glicose e concentração de rocha com temperatura constante no ponto central (C).

A máxima concentração de fósforo observada foi de $40,92 \text{ mg L}^{-1}$ com $64,93 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, $28,30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8,50 \text{ g L}^{-1}$ de pó de rocha (Figura 5A); $42,45 \text{ mg L}^{-1}$ com $35,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, $28,32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $2,61 \text{ g L}^{-1}$ de pó de rocha (Figura 5B); e $54,72 \text{ mg L}^{-1}$ com $64,93 \text{ g L}^{-1}$ de

glicose, $31,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $2,61 \text{ g L}^{-1}$ de pó de rocha (Figura 5C). O aumento na solubilização de fosfato decorrente da adição de glicose deve-se ao estímulo da atividade microbiana, que intensifica a produção de ácidos orgânicos (como ácido cítrico e glucônico) capazes de converter formas insolúveis em formas solúveis de fósforo. Em contrapartida, o aumento da temperatura pode reduzir a viabilidade e a atividade metabólica das *Pseudomonas*, enquanto a elevação na concentração de pó de rocha, possivelmente devido à presença de silicatos de baixa solubilidade e à modificação do pH, torna o meio menos favorável à produção desses ácidos. Esses achados destacam a importância da caracterização mineralógica do pó de rocha para o desenvolvimento de estratégias eficazes de bioativação do fósforo no solo (Toscani et al., 2025). Por fim, os parâmetros operacionais ótimos para a solubilização máxima de fosfato ($57,73 \text{ mg L}^{-1}$) obtidos pelo planejamento estatístico composto central por *Pseudomonas* sp., correspondeu a: $28,35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $64,93 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $2,61 \text{ g}$ de fosfato natural. Nestas mesmas condições, o pH e a acidez titulável no meio de cultura apresentaram os seguintes valores: $4,31$ e $213,77 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

A solubilidade do fosfato neste experimento foi inferior ao obtido por Waday et al.,

(2022), cujos valores variaram na faixa de 125,67 a 270,12 mg L⁻¹, obtidas de bactérias *Pseudomonas* isoladas do solo rizosférico de plantas de café e compatível com os resultados de Peng et al., (2014), com médias entre 44,00 e 63,90 mg L⁻¹ utilizando bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de solos salinizados.

5. CONCLUSÕES

- A solubilização de fosfato por *Pseudomonas sp.* 004 foi significativamente influenciada pela interação entre temperatura, concentração de glicose e pó de rocha,
- As melhores condições operacionais para a solubilização de fosfato (57,73 mg L⁻¹) foram: temperatura de 28,35 °C, glicose a 64,93 g L⁻¹ e pó de rocha a 2,61 g L⁻¹, nas quais o meio apresentou pH de 4,31 e acidez titulável de 213,77 mg L⁻¹;
- A glicose foi determinante para a acidificação do meio e, conseqüentemente, para o aumento da solubilização do fósforo, enquanto maiores concentrações de pó de rocha exerceram efeito tamponante, limitando a redução do pH e a liberação do nutriente.

• REFERÊNCIAS

ABBASI, S. **Plant-microbe interactions ameliorate phosphate-mediated responses in the rhizosphere: a review.** *Frontiers in Plant Science*, [S.l.], v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1074279>.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1998. Parte 2000: Physical & Aggregate Properties, 2310 Acidity.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1998. Parte 4000: Inorganic Nonmetallic Constituents, 4500-H pH value.

BUSS, W. et al. **Stabilisation of soil organic matter with rock dust partially counteracted by plants.** *Global Change Biology*, v. 30, n. 1, e17052, 2023

CHAGAS JÚNIOR, A. F. et al. **Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia.** *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

DEJENE, M.; DESALEGN, T.; ABERA, G. **The effect of phosphorus fertilizer sources and lime on acidic soil properties of Mollic Rhodic Nitisol in Welmera District, Central Ethiopia.** *Applied and Environmental Soil Science*, London, v. 2023, p. 1-14, 2023. Disponível em:

DER, V. et al. **Accelerated weathering of silicate rock dusts predicts the slow-release liming in soils depending on rock mineralogy, soil acidity, and test methodology.** *Geoderma*, v. 441, p. 116734–

116734, 1 jan. 2024.

DOYDORA, S. et al. **Accessing Legacy Phosphorus in Soils.** *Soil Systems*, v. 4, n. 4, p. 74, 18 dez. 2020.

DUŠAN VELIČKOVIĆ et al. **Response Surface Methodology As a New Approach for Finding Optimal MALDI Matrix Spraying Parameters for Mass Spectrometry Imaging.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 31, n. 3, p. 508–516, 6 fev. 2020.

GEORGIEVA, G. et al. **Study of the plant growth-promoting capacity of *Pseudomonas putida* 1046 in a model plant system.** *BioRisk*, v. 20, p. 115-128, 2023. DOI:

GHORESHIZADEH, S. et al. ***Pseudomonas taetrolens* ULE-PH5 and *Pseudomonas* sp. ULE-PH6 isolated from the hop rhizosphere increase phosphate assimilation by the plant.** *Plants*, Basel, v. 13, n. 3, p. 402, 2024. Disponível em:.

GUARDIOLA-MÁRQUEZ, C. E. et al. **Identification and characterization of beneficial soil microbial strains for the formulation of biofertilizers based on native plant growth-promoting microorganisms isolated from Northern Mexico.** *Plants*, v. 12, n. 18, p. 3262, 2023. DOI:.

GUO, J.; LI, J.; ZHANG, S. **Impact of three exogenous phosphorus-solubilizing bacteria on zinc and selenium contents and rhizosphere soil nutrients of Longjing and Huangjinya tea plants.** *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 15, 2024. Disponível em

HOFMANN, D. et al. **Implications of below-ground allelopathic interactions of *Camelina sativa* and microorganisms for phosphate availability and habitat maintenance.** *Plants*, Basel, v. 12, n. 15, p. 2815, 2023.

JANATI, W. et al. **Phosphate solubilizing bacteria from soils with varying environmental conditions: Occurrence and function.** *PLOS ONE*, v. 18, n. 12, p. e0289127, 2023

JING, J. et al. **Effects of incorporating different proportions of humic acid into phosphate fertilizers on phosphorus migration and transformation in soil.** *Agronomy*, Basel, v. 13, n. 6, p. 1576, 2023.

JOHAN, P. D. et al. **Phosphorus transformation in soils following co-application of charcoal and wood ash.** *Agronomy*, v. 11, n. 10, p. 2010, 2021

JOSHI, S. et al. **Functional characterization and molecular fingerprinting of potential phosphate solubilizing bacterial candidates from Shisham rhizosphere.** *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, 2023.

KERKETTA, V. et al. **Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria *Klebsiella variicola* PSEG-1 associated with *Aporrectodea rosea* gastrointestinal tract.** *Bacteria*, Basel, v. 4, n. 1, p. 5, 2025

KHAN, K. S. et al. **Bio-organically acidified product-mediated improvements in phosphorus fertilizer utilization, uptake and yielding of *Zea mays* in calcareous soil.** *Plants*, Basel, v. 12, n. 17, p. 3072, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12173072>.

KIM, J.; KIM, D.-G.; RYU, K. H. **Enhancing Response Surface Methodology through Coefficient**

Clipping Based on Prior Knowledge. Processes, v. 11, n. 12, p. 3392–3392, 8 dez. 2023.

KOCZORSKI, P. et al. **Large effect of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and gene expression of *Salix* spp. at low phosphorus levels.** Frontiers in Plant Science, [S.l.], v. 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1218617>.

LEBRAZI, S. et al. **Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from *Acacia cyanophylla* root nodules and their effects on its plant growth.** Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 18, p. 1-12, 2020.

LI, X.; TIAN, Y. **STOP1 and STOP1-like proteins, key transcription factors to cope with acid soil syndrome.** Frontiers in Plant Science, Lausanne, v. 14, 2023.

LIANG, C. et al. **Optimizing phosphorus fertilizer use on the Loess Plateau: impact on soil properties and crop production efficiency.** Soil Systems, Basel, v. 8, n. 1, p. 3, 2023

LUO, D. et al. **Consortium of phosphorus-solubilizing bacteria promotes maize growth and changes the microbial community composition of rhizosphere soil.** Agronomy, v. 14, n. 7, p. 1535, 2024a.

LUO, Y. et al. **Influence and role of fungi, bacteria, and mixed microbial populations on phosphorus acquisition in plants.** Agriculture, Basel, v. 14, n. 3, p. 358, 2024b

LIU, J. et al. **OsPHR2-mediated recruitment of Pseudomonadaceae enhances rice phosphorus uptake.** Plant Communications, v. 5, n. 8, p. 100930, ago. 2024.

MARCOTTE, A. R. et al. **Mineral dust and iron solubility: Effects of composition, particle size, and surface area.** Atmosphere, v. 11, n. 5, p. 533, 2020.

MENGESHA, A. S.; LEGESSE, N. H. **Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of lentil (*Lens culinaris* M.) collected from Hagere Mariam district, Central Ethiopia.** PLOS ONE, San Francisco, v. 19, n. 11, e0308915, 2024

MORI ALVEZ, C. et al. **Lupine cultivation affects soil's P availability and nutrient up-take in four contrasting soils.** Agronomy, Basel, v. 14, n. 2, p. 389, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy14020389>.

MOROPANA, T. J. et al. **Screening *Aspergillus flavus*, *Talaromyces purpureogenus*, and *Trichoderma koningiopsis* for plant-growth-promoting traits: a study on phosphate solubilization, IAA production, and siderophore synthesis.** Journal of Fungi, Basel, v. 10, n. 12, 2024

NORUZI, M. et al. **Hydroxyapatite nanoparticles: an alternative to conventional phosphorus fertilizers in acidic culture media.** Chemical and Biological Technologies in Agriculture, London, v. 10, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00437-0>.

NAUTIYAL, C. S. **An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms.** FEMS Microbiology Letters, v. 170, n. 1, p. 265–270, jan. 1999.

PENG, Y. et al. **Screening and optimization of low-cost medium for *Pseudomonas putida* Rs-198 culture using RSM.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 45, p. 1229–1237, 2014.

PUGA, M. I. et al. **Recent advances in research on phosphate starvation signaling in plants.** Journal of Plant Research, Tokyo, v. 137, n. 3, p. 315–330, 2024

QINGWEI, Z. et al. **Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere of poplar on road verge and their antagonistic potential against various phytopathogens.** BMC Microbiology, London, v. 23, n. 1, 2023.

RAJEWSKI, J.; DOBRZYŃSKA-INGER, A. **Application of Response Surface Methodology (RSM) for the Optimization of Chromium(III) Synergistic Extraction by Supported Liquid Membrane.** Membranes, v. 11, n. 11, p. 854, 4 nov. 2021.

RAMESH, K.; RAGHAVAN, V. **Agricultural waste-derived biochar-based nitrogenous fertilizer for slow-release applications.** ACS Omega, Washington, DC, v. 9, n. 4, p. 4377-4385, 2024.

SANCHEZ-GONZALEZ, M. E. et al. **Effect of pH and carbon source on phosphate solubilization by bacterial strains in Pikovskaya medium.** Microorganisms, v. 11, n. 1, p. 49, 2022..

SHARMA, P.; PANDEY, R.; CHAUHAN, N. S. **Unveiling wheat growth promotion potential of phosphate solubilizing *Pantoea agglomerans* PS1 and PS2 through genomic, physiological, and metagenomic characterizations.** Frontiers in Microbiology, v. 15, 2024.

TANG, Y. et al. **Unraveling the microecological mechanisms of phosphate-solubilizing *Pseudomonas asiatica* JP233 through metagenomics: insights into the roles of rhizosphere microbiota and predatory bacteria.** Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 16, 2025.

TEIXEIRA, P. C. et al. (Ed.). **Manual de métodos de análise de solo.** 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

TOSCANI, R.; ELOI, J.; MATOS, D. R. **Uso de fosforitos do grupo bambuí como remineralizadores e análise dos seus benefícios socio-ambientais.** Revista Políticas Públicas & Cidades, v. 14, n. 1, p. e1393–e1393, 2025.

WADAY, Y. A. et al. **Optimization of soluble phosphate and IAA production using response surface methodology and ANN approach.** Heliyon, v. 8, n. 12, p. e12224, 1 dez. 2022.

WU, D. et al. **Root exudates facilitate the regulation of soil microbial community function in the genus *Haloxylon*.** Frontiers in Plant Science, v. 15, 19 set. 2024.

WANG, C. et al. **Phosphorus solubilizing microorganisms: potential promoters of agricultural and environmental engineering.** Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Lausanne, v. 11, 2023..

XIE, J. et al. **A bacterium isolated from soil in a karst rocky desertification region has efficient phosphate-solubilizing and plant growth-promoting ability.** Frontiers in Microbiology, v. 11, p. 971, 2021.

ZULUAGA, M. Y. A. et al. **An insight into the role of the organic acids produced by *Enterobacter* sp. strain 15S in solubilizing tricalcium phosphate: in situ study on cu-cumber.** BMC Microbiology, London, v. 23, n. 1, 2023.

AGRADECIMENTOS

A meu Deus por me dar forças para concluir o curso e enfrentar todas as dificuldades.

A minha família, que me apoiaram em todas as minhas escolhas, em especial ao meu

pai Alexandre e à minha mãe Ivania, à minha noiva Silvia por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, às minhas irmãs: Alinne, Shirley, Patrícia e Thays que foi quem encontrou o curso e me matriculou, à Alexssandra, Ana Clara e ao meu irmão Eduardo. Todos eles têm uma participação especial em todos os momentos do curso.

A meus colegas de curso, em especial a Kaique Paladino, um irmão de todas as horas, à Maria Valdeane, à Maria Robeilsa, a Francisco Ryan, à Fernanda Paiva, a Fabio Roberto, a Siderlan, à Graziela e a todos os outros do campus II que foram de extrema importância para que os dias fossem proveitosos e divertidos, vocês serão sempre lembrados, e nossas conversas e brincadeiras serão lembradas para sempre.

Ao grupo de pesquisa Agrobiodiversidade do Semiárido e sua coordenadora professora Dra. Elida Barbosa por terem me acolhido e por tantos ensinamentos, ao meu orientador de Iniciação Científica Dr. Josely Dantas Fernandes que me acolheu e me passou grandes ensinamentos e mesmo assim tenho muito o que aprender junto a ele e ao grupo de pesquisa.

À Dra. Amanda de Melo que também tem grande contribuição em todos os passos no laboratório e os vários ensinamentos que a mim foram passados.

A todo pessoal da coordenação: Raphaela, Tiago e professor Leandro pela paciência e ajuda e por último e não menos importante ao professor Mario Sergio que foi meu primeiro orientador e se tornou um grande amigo, enfim a todos sou muito grato.

Obrigado!