

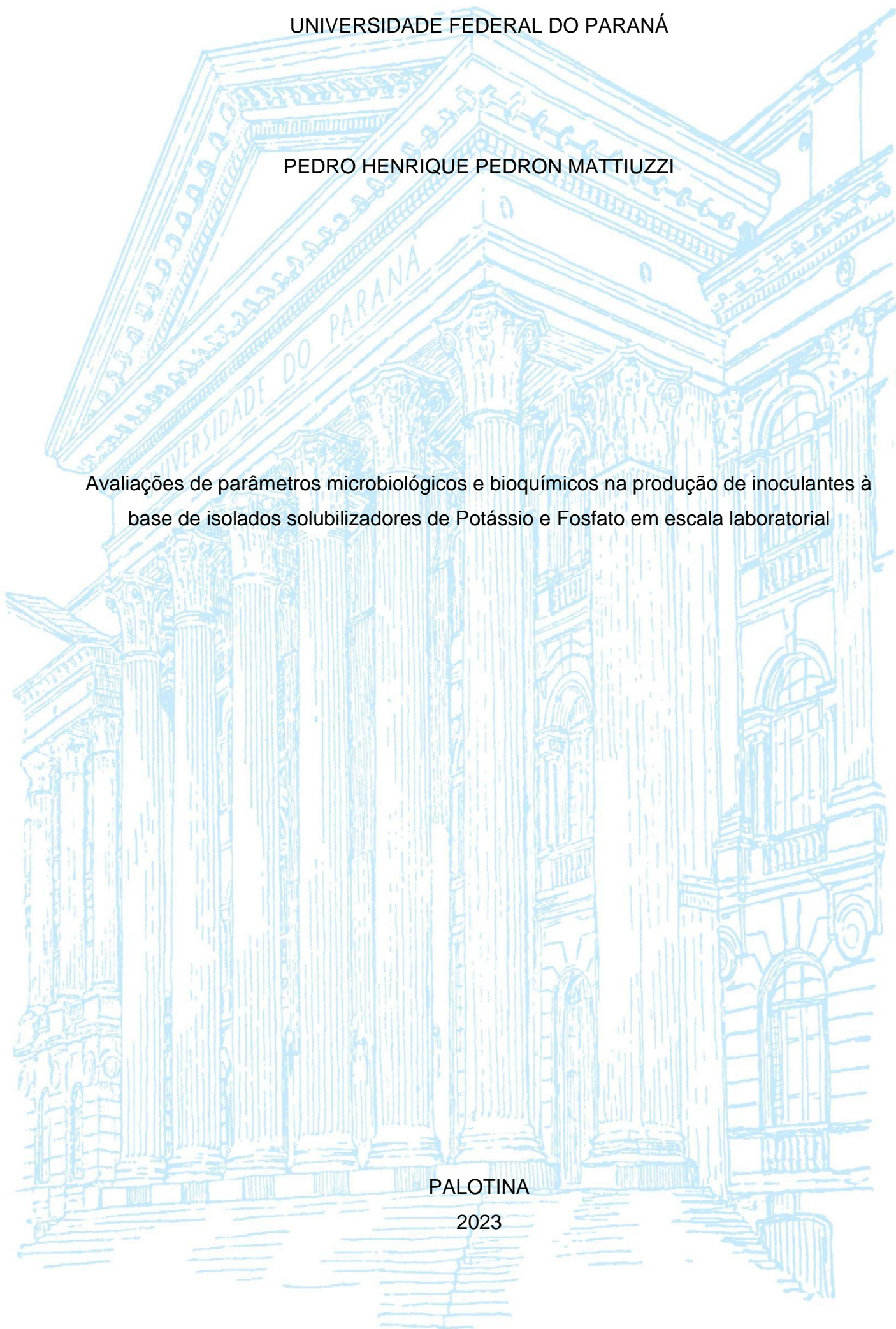
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO HENRIQUE PEDRON MATTIUZZI

Avaliações de parâmetros microbiológicos e bioquímicos na produção de inoculantes à base de isolados solubilizadores de Potássio e Fosfato em escala laboratorial

PALOTINA

2023



PEDRO HENRIQUE PEDRON MATTIUZZI

Avaliações de parâmetros microbiológicos e bioquímicos na produção de inoculantes à base de isolados solubilizadores de Potássio e Fósforo em escala laboratorial

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

PALOTINA
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-
000Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

os quinze dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e três, às dezesseis horas , na Sala virtual link da Plataforma Teams, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Avaliações de parâmetros microbiológicos e bioquímicos na produção de inoculantes à base de isolados solubilizadores de Potássio e Fosfato em escala laboratorial" apresentado pelo discente **Pedro Henrique Pedron Mattiuzzi, orientado pela Profa. Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo**, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra ao discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: **Prof(a). Dr(a). Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, nota: 98 (noventa e oito), Prof(a). Dr(a). Roberta Paulert , nota: 100 (cem), e Prof(a). Dr(a). Tania Sila Campioni Magon, nota: 95 (noventa e cinco)**. A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi **98 (noventa e oito)**. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelo discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 17:25, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ROBERTA PAULERT, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 17:25, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **TANIA SILA CAMPIONI MAGON, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 17:25, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **5288174** e o código CRC **84E244A5**.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por me dar suporte e incentivo durante todo o período acadêmico, e fora dele muito antes disso. Obrigado Pai, Mãe e irmão.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, por ter confiado em mim durante todo este tempo, acreditado que eu poderia fazer, me incentivando a continuar na pesquisa. Por toda orientação, profissional e pessoal, e por todo desenvolvimento que me proporcionaste.

Aos colegas da graduação, que estiveram presentes comigo durante estes cinco anos, dentro e fora do campus, Acacio, Francielli, Giovana, Maria, Nathalia. Obrigado por tudo, cada momento com vocês foi especial, e levarei comigo para sempre a amizade que construímos. Amo vocês (até, e em especial a Giovana).

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que vivenciaram comigo o período de pesquisas deste projeto, me incentivando e me dando suporte, obrigado por cada risada e momento que tornaram mais leve, apenas por estarem presentes: Erika, Giovana, Maria, Adriana, Kawana e João, e por aqueles que estiveram, em algum momento, e me marcaram imensamente, Dayana e Gabriel.

E por todos aqueles que me foi permitido conhecer por conta da Universidade, e que estiveram comigo em algum momento desta jornada, Hemilly, Larissa, Renan, Gabriel.

RESUMO

O uso de inoculantes produzidos a partir de bactérias promotoras de crescimento de plantas é uma técnica biotecnológica amplamente difundida na área agrícola. O desenvolvimento de novas formulações a partir de novos isolados é uma demanda da indústria de inoculantes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar três isolados da coleção de bactérias endofíticas do Labiogen (UFPRPALT1-7, UFPRPALT 2-36 e UFPRPALT3-45), quanto suas capacidades bioquímicas. As cepas foram cultivadas em escala laboratorial para estudo da cinética de crescimento, e também foram realizados experimentos para aumento de escala em volume de 50mL, 500mL e 5000mL. Os isolados foram analisados quanto as melhores condições para crescimento usando diferentes pHs (4-9) do meio de cultivo, concentrações crescentes de glicose e salinidade (0-10%), temperatura de crescimento (25-37°C), capacidade de solubilização de fosfato e potássio, produção de oxidases, antagonismo fúngico e capacidade hemolítica. Também foi determinado as identidades das sequências e o posicionamento taxonômico dos 3 isolados com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. No escalonamento em laboratório foram avaliados 3 volumes de crescimento observando-se os valores de DO e UFC durante 12h de cultivo. Como resultados obtidos, foi observado que os isolados 7 e 45 foram solubilizadores de P enquanto o isolado 36 foi solubilizador de K. A salinidade foi o fator mais limitante para o crescimento dos isolados: o isolado 7 apresentou maior sensibilidade ao crescimento em condições salinas (<5%) e os demais em até 5% de NaCl. Nenhum dos isolados apresentou capacidade hemolítica ou produção de oxidases e apenas o isolado 36 apresentou capacidade antagônica. Os isolados 7/45 e 36 foram classificados taxonomicamente como pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. e à espécie *Bacillus velezensis*, respectivamente. Em relação ao escalonamento, os dados obtidos demonstram que o volume de meio de crescimento influenciou o crescimento bacteriano. Não houve proporcionalidade entre os valores de DO observados e o número de UFC, demonstrando que protocolos que se baseiam apenas na quantificação da DO podem trazer valores super ou subestimados de UFC dependendo do volume de cultivo utilizado.

Palavras-chave: Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas, *Burkholderia*, *Bacillus*, escalonamento.

ABSTRACT

The use of inoculants produced from plant growth promoting bacteria is a widespread biotechnology in the agricultural area. The development of new formulations from new isolates is demanded from the inoculant industry. The objective of this work was to characterize 3 isolates, from the endophytic bacterial collection of Labiogen (UFPRPALT1-7, UFPRPALT 2-36 and UFPRPALT3-45), regarding their biochemical and microbiological capabilities. An evaluation of the growth and scale-up of these strains, on a laboratory scale, was also conducted to study the potential use of these isolates as inoculants. The isolates were analyzed for best growth conditions using different pHs (4-9) of culture medium, increasing concentrations of glucose and salinity (0-10%), growth temperature (25-37°C), phosphate and potassium solubilization capacity, oxidases production, fungal antagonism and hemolytic capacity. Sequence identities and taxonomic placement of the 3 isolates were also determined based on partial sequencing of the 16S rDNA gene. In the laboratory scale-up, 3 volumes were evaluated (50, 500 and 5000mL), measures of the OD and CFU values for 12 h of cultivation were quantified every 2 hours. As results, it was observed that isolates 7 and 45 were P solubilizers while isolate 36 was K solubilizer. Salinity was the most limiting factor for the growth of the isolates: isolate 7 showed higher sensitivity to growth in saline conditions (<5%) and the others up to 5% NaCl. None of the isolates showed hemolytic capacity or oxidases production and only isolate 36 was partially antagonistic to *Trichoderma* sp. Isolates 7/45 and 36 were taxonomically classified as belonging to the genus *Burkholderia* sp. and to the species *Bacillus velezensis*, respectively. Regarding scaling, the data obtained show that the volume of growth medium influenced bacterial growth. There was no proportionality between the observed OD values and the number of CFU, demonstrating that protocols that are based only on the quantification of OD can bring over or underestimated CFU values depending on the culture volume used.

Keywords: Plant Growth Promoting Bacteria, *Burkholderia*, *Bacillus*, scale up.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS ISOLADOS AVALIADOS.....	19
TABELA 2. ANÁLISE TAXONÔMICA DOS ISOLADOS AVALIADOS.....	21

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MACROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS CULTIVADOS EM MEIO LB.....	19
FIGURA 2. ASPECTO VISUAL DA CAPACIDADE SOLUBILIZADORA DOS ISOLADO..	20
FIGURA 3. ANTAGONISMO DO ISOLADO 36 COM <i>TRICHODERMA SP.</i>	20
FIGURA 4. DENDOGRAMA DE SIMILARIDADE DOS ISOLADOS CONSTRUÍDOS A PARTIR DOS DADOS MOLECULARES	22
FIGURA 5. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DOS ISOLADOS AVALIADOS	25

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 JUSTIFICATIVA.....	10
1.2 OBJETIVO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	11
2.2 INOCULANTES.....	13
2.3 PRODUÇÃO E ESCALONAMENTO.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS ISOLADOS.....	14
3.1.1 TOLERÂNCIA À SALINIDADE (NaCl) E PRESENÇA DE GLICOSE NO MEIO DE CRESCIMENTO	14
3.1.2 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMOS DE CRESCIMENTO	15
3.1.3 CAPACIDADE DA SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E POTÁSSIO	15
3.1.4 TESTE DA OXIDASE	16
3.1.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTAGÔNICA E DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA... ..	16
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO.....	16
3.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS PARA SCALE UP.....	17
3.3.1 MANUTENÇÃO DO ISOLADO E PREPARO DO INÓCULO.....	17
3.3.2 ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS.....	18
4.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS AVALIADOS	21
4.3 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS PARA SCALE UP.....	24
5. CONCLUSÕES	28
6. REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

A demanda global de alimentos cresce exponencialmente, junto com a o aumento populacional, que promete alcançar quase 10 bilhões de pessoas até 2050 (USA, 2017). Atualmente, a fim de suprir essa maior demanda por alimentos, agricultores buscam por meios de garantir campos agricultáveis mais rentáveis, com uma produção de maior qualidade e grãos mais nutritivos (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). Para isto, a extensiva utilização de químicos, como fertilizantes, herbicidas e pesticidas são empregadas visando um menor custo de produção (ALORI; BABALOLA, 2018). Embora garantam maior produção, a utilização de fertilizantes químicos podem acarretar impactos na cadeia de produção, nos solos agricultáveis, por meio do acúmulo de compostos tóxicos nos solos, e os possíveis danos que a exposição e o manuseio destes produtos podem causar aos aplicadores (SUYAL ET. AL. 2016), ALORI; BABALOLA (2018) E KHAN (2022).

A utilização de alternativas mais sustentáveis, renováveis e menos poluentes aos solos podem ocorrer por meio da utilização de compostos biológicos como os inoculantes, à base de microrganismos vivos, ou produtos bioativos produzidos por estes (FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019; VASSILEV et al., 2020). Os mecanismos de ação dos microrganismos utilizados como promotores de crescimento vegetal podem ser de forma direta e indireta, atuando como fitoestimulantes, biofertilizantes e no biocontrole de patógenos (AREMU et al., 2017).

Os inoculantes são produtos compostos por microrganismos vivos, capazes de beneficiar o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). Dentre os microrganismos utilizados estão as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que atuam na produção de fitohormônios, sideróforos, solubilização de nutrientes (fósforo, potássio), fixação de nitrogênio, indução do sistema imune vegetal, entre outros metabólitos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018; WANG et al., 2020; YAGHOUBI KHANGHAHI et al., 2018).

Com relação ao fornecimento de nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal, temos que o fósforo e o potássio são macronutrientes importantes e requeridos pelas plantas (KALAYU, 2019). O conteúdo médio de fósforo (P) no solo é de quase 0,05% deste, apenas 0,1% estão disponíveis para absorção vegetal, fazendo do fósforo, um macronutriente restritivo para o crescimento vegetal (LAMBERS, 2022). Dessa forma, se

vê necessário, em muitos dos solos agricultáveis, uma suplementação nutricional de P para um melhor desenvolvimento e crescimento vegetal.

Uma alternativa à utilização de fertilizantes químicos à base de fósforo, seria a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF), que convertem o P (tanto o inorgânico quanto o orgânico) em fósforo disponível para absorção vegetal. Entre as formas de solubilização desenvolvidas por estes microrganismos, estão a produção de ácidos orgânicos (WANG et al., 2020), para dissolver os compostos inorgânicos, a quebra dos minerais ligados ao fósforo inorgânico (KALAYU, 2019) e a secreção de fosfatases para mineralização dos compostos orgânicos (CHEN; LIU, 2019).

A utilização de bactérias solubilizadoras de potássio (BSP), que dissolvem o potássio (K) de minerais insolúveis, podem ter efeito positivo na disponibilidade deste nutriente para absorção vegetal (ETESAMI et al., 2017; WANG et al., 2020; ZHANG; KONG, 2014), como reportado para culturas como o trigo (WANG et al., 2020), onde foram utilizados uma combinação de isolados solubilizadores de K e P. Na cultura do tabaco, o uso de bactérias solubilizadoras promoveu incrementos na massa seca, e nos níveis de absorção de K (ZHANG; KONG, 2014). O milho quando inoculado com isolados solubilizadores de K e P, obteve-se aumento na concentração destes nutrientes, e também um aumento na massa seca e área das raízes (ABOU-EL-SEOUD; ABDEL-MEGEED, 2012).

1.2 OBJETIVO

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos, a identificação e caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal, quanto à solubilização de P e K, efeito hemolítico e capacidade antagônica, produção de oxidases, pH e temperatura ótima de crescimento, tolerância a NaCl e Glicose dos isolados da coleção de microrganismos do Labiogen. Também foi conduzida uma avaliação escalonada do processo de crescimento destes isolados visando potencialmente a utilização destas estirpes como inoculantes comerciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

O termo “bactérias promotoras de crescimento de plantas” (BPCP) é utilizado para se referir as bactérias que promovem o crescimento vegetal quando em associação com

estas, e são indispensáveis como biota rizosférica de um solo biologicamente ativo. Devido à grande adaptabilidade destes microrganismos, estes são encontrados facilmente em diversos tipos de solo, podendo produzir uma grande gama de metabólitos (fitohormônios, ácidos orgânicos, sideróforos, antibióticos, moléculas protetoras), solubilizando nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas, e fixando nitrogênio (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; BABALOLA; GLICK, 2012; BHATTACHARYYA; JHA, 2012; SANTANA et al., 2020; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). Podem atuar também no controle biológico, para o manejo de doenças de plantas (fúngicas e bacterianas), em um ou mais mecanismos de indução do sistema imune, interagindo direta ou indiretamente com o patógeno (BONATERRA et al., 2022; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

Na solubilização e mineralização de nutrientes essenciais para as plantas, as bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) e as bactérias solubilizadoras de potássio (BSP) atuam de forma similar. O principal mecanismo de solubilização ocorre com a acidificação do pH do solo, principalmente pela produção de ácidos orgânicos destes microrganismos, produtos da respiração celular e da via glicolítica (ALVES et al., 2021; T. NIKITHA; B. SADHANA; VANI, 2017; YAGHOUBI KHANGHAHI et al., 2018).

Outro mecanismo para solubilização de fósforo no solo ocorre pela quelação de cátions e pela competição com o fosfato ligado a estes. Os ácidos produzidos pelas BSF competem pelos sítios de ligação dos óxidos insolúveis de Fe e Al, quelando algum destes minerais (KHAN et al., 2009; SIDDIQUE et al., 2021). Entre os ácidos citados, está o ácido 2-cetoglucônico como um forte quelante para o cálcio ((KHAN et al., 2009). A solubilização de fosfatos orgânicos também pode ocorrer pela mineralização que corresponde à conversão do P orgânico presente no solo em formas utilizáveis. Este fenômeno ocorre pela ação de enzimas secretadas pelas BSF, como fosfatases, fitases, e outras, sobre restos de animais e plantas no solo (KHAN et al., 2009; SANTANA; MARQUES; DIAS, 2016).

Semelhante a solubilização de P, a solubilização de K pode ocorrer por diferentes mecanismos, sendo a principal delas, por meio da produção de ácidos orgânicos e decorrente acidificação do solo (ETESAMI; EMAMI; ALIKHANI, 2017). Além do mecanismo de acidificação do solo, os ácidos orgânicos produzidos pela KSB podem liberar íons K do mineral por quelação (formação do complexo) Si^{4+} , íons Al^{3+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} associados aos minerais (MEENA; MAURYA; VERMA, 2014).

Uma ampla gama de microrganismos rizosféricos é relatada como os solubilizadores de K, incluindo bactérias do gênero *Burkholderia* (FEI et al., 2008), *Pseudomonas* (UROZ et al., 2007), *Bacillus*, outros filos de bactérias, como Actinobactérias, e alguns fungos como *Aspergillus sp.* (MEENA; MAURYA; VERMA, 2014).

2.2 Inoculantes

A utilização de inoculantes vêm como uma alternativa promissora e de baixo impacto ambiental para aumentar a eficiência e a qualidade dos grãos cultiváveis, além de reduzir o uso de fertilizantes químicos, garantindo elevadas produtividades, com melhor relação custo-benefício e sustentabilidade (NEHRA; CHOUDHARY, 2015; SINGH; SINGH; PRABHA, 2016).

Os inoculantes são categorizados pelas ações modificadoras do solo, que advém do uso de microrganismos para promover o crescimento e desenvolvimento de plantas. Contém células vivas ou dormentes, que quando em contato com as plantas, garantirão, por diferentes métodos, um melhor desenvolvimento desta (CHAUDHARY et al., 2020). O sucesso de qualquer inoculante, à campo, depende da qualidade das bioformulações e a formulação em que são comercializadas. Acerca da formulação, são utilizadas abordagens como formulações líquidas, formulações à base de portadores sólidos ou turfosos, e formulações à base de polímeros sintéticos (AREMU et al., 2017; GOPAL; BABY, 2016; GOPI et al., 2019), ou liofilizados (BASHAN, 1998).

As legislações vigentes acerca do processo de qualidade a instrução normativa SDA Nº 30 DE 12/11/2010 do MAPA estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, entre elas a metodologia proposta para contagem de células viáveis (BRASIL, 2010). Já a instrução normativa SDA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011 discorre sobre especificações, e garantias dos inoculantes destinados à agricultura, visando garantir uma quantidade de células viáveis mínimas para comercialização (BRASIL, 2011).

Segundo dados da ANPII, 2018 (Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes) o total de doses vendidas de inoculantes no Brasil, de 2009 a 2018, vem crescendo de maneira exponencial, passando de 20 milhões de doses para 73 milhões de doses durante este período.

2.3 Produção e escalonamento

O desenvolvimento de um inoculante à base de BPCP depende de vários fatores, como as características das formulações (líquidas, orgânicas, inorgânicas, poliméricas ou

encapsuladas), das técnicas de inoculação (aplicação foliar, aplicação na semente ou inoculação do solo), ou dos aspectos biológicos e de estabilidade do produto (BASHAN et al., 2014).

O escalonamento da produção visa a fabricação de maiores quantidades de produtos, com um aumento simultâneo nos índices de rendimentos específicos, e é um dos principais processos desejados a fim de se garantir a qualidade do processo, e uma maior produção (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

O escalonamento da produção da massa de microrganismos tem vários gargalos, como garantir a qualidade de mistura, reduzindo a exposição ao estresse no crescimento do microrganismo e, manter a consistência metabólica e celular do processo durante todo seu período (TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013). Entre os parâmetros fisiologicamente mais relevantes estão o pH do processo, a temperatura, a massa de microrganismo, a viabilidade celular, as concentrações de substratos, metabólitos e produtos, entre outros mais específicos (SCHMIDELL et al., 2001; SCHMIDT, 2005; TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para este trabalho, foram utilizadas estirpes bacterianas isoladas das raízes e solo cultivável aderida à estas, de plantas milho e trigo, crescidas em áreas da região Oeste do Paraná, e mantidas na coleção de isolados endofíticos do Labiogen. Foram selecionados os isolados UFPRPALT1-7, UFPRPALT 2-36 e UFPRPALT3-45, denominados no trabalho como isolado 7, isolado 36 e isolado 45, respectivamente. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Genética (Labiogen), UFPR-Setor Palotina.

3.1 Avaliação de parâmetros bioquímicos dos isolados

3.1.1 Tolerância à salinidade (NaCl) e presença de glicose no meio de crescimento.

Os microrganismos foram mantidos em placa de Petri com meio de cultivo LB sólido (10 g.L⁻¹ ,Peptona, 5 g.L⁻¹ Cloreto de Sódio, 5 g.L⁻¹ Extrato de levedura, 15 g.L⁻¹ Ágar). Para a avaliação dos níveis de tolerância destes isolados ao cloreto de sódio (NaCl) os

mesmos foram inoculados (uma alçada) em meio LB acrescido de 1%, 2%, 5% e 10% de NaCl, e cultivados por 48 h a 30 °C para avaliação visual do crescimento dos isolados, seguindo o protocolo de SNAK et al.,(2021). O teste para tolerância à glicose ocorreu de modo similar, onde os isolados foram inoculados (uma alçada) em meio LB sólido contendo concentrações crescentes de glicose (1%, 2%, 5% e 10%), incubados à 30 °C por 48 h.

3.1.2 Avaliação da temperatura e pH ótimos de crescimento

Para análise do pH ótimo de crescimento, os isolados foram inoculados em meio LB líquido com diferentes pHs: 4.0; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5, 8.0 e 9.0 (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). A avaliação foi realizada após 48h de crescimento em temperatura constante (30 °C) e agitação de 150 rpm, e a avaliação ocorreu por meio da observação visual do aumento da turbidez do meio de cultura, indicando crescimento microbiológico.

A temperatura ótima de crescimento foi conduzida numa faixa de temperatura de 25 a 37 °C, onde meio de cultura LB líquido foi acrescido do inóculo, e após 72 h de crescimento foram avaliados quanto ao crescimento celular (VIDEIRA et al. (2007).

3.1.3 Capacidade de solubilização de fósforo e potássio

A solubilização de fosfato insolúvel pelos isolados foi avaliada com a inoculação das cepas (uma alçada) em meio NBRIP (10 g.L⁻¹ de glucose; 5 g.L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂; 0.5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; , 0.2 g.L⁻¹ de NaCl; 0.1 g.L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O; 0.2 g.L⁻¹ de KCl; 0.002 g.L⁻¹ de MnSO₄·H₂O; 0.002 g.L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O), incubados por 10 dias a 30 °C. A capacidade de solubilização dos isolados foi avaliada visualmente pela formação de halo de solubilização, que indicou resultado positivo. De modo semiquantitativo, índices de solubilização (IS) de cada isolado foram obtidos relativos ao tamanho dos halos formados, medidos com o auxílio de uma régua graduada, onde o IS foi considerado como: IS= Diâmetro de Halo formado (mm) / Diâmetro de colônia (mm)conforme metodologia de NAUTIYAL(1999). Neste experimento para cada isolado foram cultivadas três placas distintas (repetições), onde cada uma delas foi dividida em quatro partes, e cada quadrante da placa foi inoculado, totalizando doze repetições por isolado.

A solubilização de potássio foi avaliada pela inoculação dos isolados em meio Aleksandrov sólido (5 g.L⁻¹ de glicose, 0,005 g.L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 0,1 g.L⁻¹ de FeCl₃, 2 g.L⁻¹ de CaCO₃, 3 g.L⁻¹ de Silicato de potássio, 2 g.L⁻¹ de fosfato de cálcio e 20 g.L⁻¹

de ágar) conforme protocolo de SUN et al., (2020). As placas foram incubadas por 3 dias a 30 °C, e após esse período foram avaliadas quanto à formação de halo pela bactéria solubilizadora. A eficiência de solubilização foi medida com o auxílio de uma régua graduada, e foi avaliada conforme a razão entre o diâmetro do halo (mm)/diâmetro da colônia (mm) (YAGHOUBI KHANGHAHI et al. (2018)).

3.1.4 Teste da oxidase

A presença de oxidase nos isolados foi testada usando TEMED 1 % (N-N-dimetil-p-fenilenodiamina (KOVACKS, 1956), onde num papel-filtro autoclavado umedecido com a solução, os isolados bacterianos foram depositados neste com o auxílio de um palito de madeira autoclavado. A variação da coloração do papel, de incolor para azul indicou resultado positivo.

3.1.5 Avaliação da capacidade antagônica e da atividade hemolítica

O teste de antagonismo foi realizado pelo método de cultura pareada, que consistiu no confronto direto dos antagonistas (isolados avaliados) e dos fungos *Trichoderma sp.* e *Aspergillus flavus* (FREITAS et al., 2016). Os fungos foram cultivados em placas de Petri com meio Ágar Sabauroud (Kasvi ®) à 28 °C, de 7 a 14 dias. Com o auxílio de uma alça de platina estéril, foram retirados cubículos de ágar de 5 mm de diâmetro, das bordas das colônias dos fungos em crescimento e colocados em placas de Petri contendo meio LB sólido. Em paralelo, com o auxílio de uma alça de platina estéril, foram inoculadas nas extremidades das placas contendo os fungos, as colônias dos isolados. As placas foram incubadas por 10 dias a 30 °C e posteriormente observadas a olho nu, se houve inibição do crescimento dos fungos pelos isolados. O teste foi realizado em quintuplicata.

Para a avaliação do teste de biossegurança através da atividade hemolítica, foram utilizadas placas de ágar sangue (5 % (v/v) de sangue de ovelha) (SULEMAN et al., 2018). A capacidade de formação de halo solubilizador dos isolados foi avaliada após 48h de crescimento em estufa a 30°C. O teste foi realizado em triplicata.

3.2. Extração de DNA e sequenciamento

A identificação dos isolados se deu pela extração do DNA, com a utilização de Kit de extração Qiagen. Após, foi realizada uma PCR, A amplificação do 16S rDNA foi realizada com os primers universais 27F e 1492R, que abrangem quase todo o comprimento do gene 16S rRNA, com um amplicon esperado de ~ 1400 pb. Os primers

usados foram 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (HEUER et al., 1997)

O sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rDNA dos diferentes isolados foram realizados na empresa GoGenetic/ Curitiba-Pr (em protocolos específicos da empresa, que por motivos comerciais não foram disponibilizados).

As sequências obtidas pelo sequenciador ABI3500 xL saíram no formato do programa *ab1 sequencing analyses*, no formato FASTA – *Fast All* (alinhamentos rápidos para toda a informação biológica, disponível on-line no NCBI), e foram analisadas pelo programa *Mega*, utilizado para classificar as sequências de acordo com a taxonomia bacteriana proposta no Bergey's Trust ou como classificadas pelo NCBI- disponível no *site (Ribosomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu>)*.

Para a busca de similaridade, foi realizada a análise dos dados através do programa BLAST - Basic Local Alignment Search Too (ASTACHUL et al., 1997) usando o banco de dados do GenBank), disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências de consenso foram inspecionadas visualmente usando o software MEGA v. 7 (TAMURA et al., 2007). O alinhamento das sequências obtidas foi realizado por meio da interface MAFFT online ((KATO, 2008); <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>).

Para as análises filogenéticas baseadas em Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana, foi escolhido o melhor modelo evolutivo para o grupo de dados usando o software MrModelTest v. 2.3 (NYLANDER, 2004). MrBayes v. 3.1.1 (RONQUIST F, 2003) foi usado para gerar as árvores filogenéticas sob critérios ótimos por partição de dados dentro do software Phylosuite (ZHANG et al., 2020).

3.3 Avaliação de parâmetros microbiológicos para Escalonamento

3.3.1 Manutenção dos isolado e preparo do inóculo

Os isolados foram mantidos em placa com meio de cultura LB sólido e armazenados em estufa de crescimento bacteriano a 28 °C para estoque, repique e reativação. O pré-inóculo foi preparado em tubo Falcon de 50 mL, contendo 5 mL de meio de cultura e uma colônia bacteriana retirada das placas de meio sólido, os quais foram crescidos em incubadora tipo Shaker a 28°C e 150 rpm por 24 h.

3.3.2 Escalonamento da produção

Para o escalonamento da produção, foram utilizados recipientes Erlenmeyers em batelada única, contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani) nos seguintes volumes: 1-50mL, 2-500mL e 3-5000mL.

Primeiramente, para o volume 1 (50mL), erlenmeyers de 250mL foram inoculados com 5mL do pré-inóculo acrescidos de 45mL de meio de cultura, e então mantidos em agitação constante de 150 rpm a uma temperatura de 28 °C. O crescimento celular foi determinado pela densidade óptica a 600nm, medidos em espectrofotômetro, e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas por diluições em série (1:10), em NaCl 0,85 % acrescido de Tween 80 (1g.L⁻¹), e então cultivados em meio LB sólido para desenvolvimento e contagem das colônias, modificado de (TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013). O pH dos meios foi avaliado com a utilização do pHmetro DL- pH® , onde retirou-se amostras durante o período de crescimento e avaliação da curva.

Para os volumes 2 (500mL) e 3 (5000mL) do pré-inóculo, da biomassa crescida foi transferida para o Erlenmeyer seguinte 10% do volume final deste recipiente como inóculo, e o restante composto pelo meio de cultura proposto. Durante esse processo, foram avaliados a densidade óptica, plaqueamento e contagem das células viáveis (UFC), pH e temperatura do meio de cultura. Foram coletadas amostras para a avaliação dos parâmetros de crescimento durante as primeiras 12 h de cultivo, com intervalo de 2h entre cada amostragem.

Como os isolados 7 e 45 pertencem ao mesmo gênero (*Burkholderia*), optou-se pelo isolado 45 para a realização das avaliações do escalonamento.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização bioquímica dos isolados.

Os dados obtidos para a caracterização bioquímica dos isolados, estão demonstrados na Tabela 1, e a morfologia dos isolados crescidos em meio LB estão dispostos na Figura 1.

Nenhum dos isolados demonstrou inibição no crescimento nos meios contendo de 1 a 10% de glicose. Em relação à salinidade, os isolados 36 e 45 foram inibidos pela concentração de 10% de NaCl, enquanto o isolado 7 demonstrou maior sensibilidade não crescendo em concentrações maiores que 5% NaCl. Em relação à temperatura, apenas o isolado 45 não apresentou crescimento em temperatura de 37 °C. Os isolados 7 e 45, avaliados numa faixa de pH entre 4.0 e 9.0, apresentaram desenvolvimento e crescimento

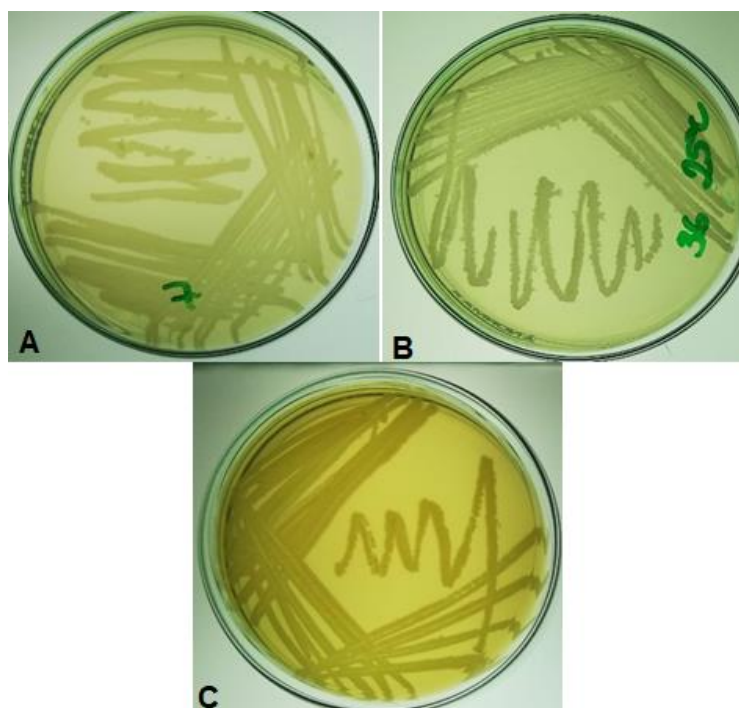
característico no meio de cultura até o pH de 8, enquanto o isolado 36 cresceu apenas entre os pH's 5.5 e 7. 5.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos dos isolados avaliados

	Tolerância NaCl	Tolerância Glicose	Temperatura	Faixa de pH	IS (K)	IS (P)
Isolado 7	1 até 2%	1 até 10%	25-37°C	4,0 – 8,0	0.00b	3.35±0.40 a
Isolado 36	1 até 5%	1 até 10%	25-37°C	5,5 – 7,5	6.90±1.86a	0.00b
Isolado 45	1 até 5%	1 até 10%	25-30°C	4,0 – 8,0	0.00b	3.21±0.27a

IS- Índice de solubilização, P-Fósforo, K-Potássio
Fonte: Autor, 2023.

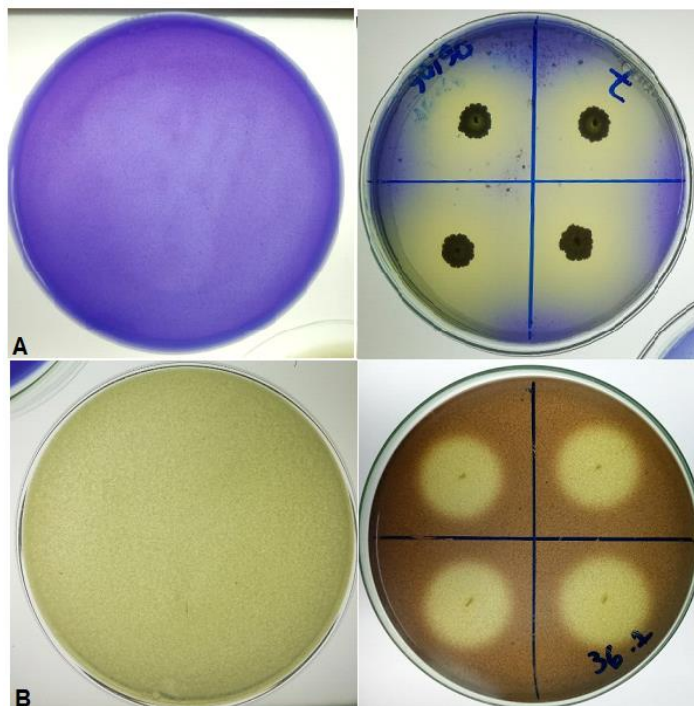
Figura 1. Macromorfologia dos isolados cultivados em meio LB



Isolados cultivados em meio LB sólido. A- Isolado 7, B- Isolado 36, C- Isolado 45. Fonte: Autor, 2023.

Dos isolados avaliados, apenas 2 (isolados 7 e 45) apresentaram capacidade solubilizadora similar demonstrando IS em torno de 3,0 (Figura 2). Já, para solubilização de Potássio em meio Aleksandrov sólido, apenas o isolado 36 apresentou resposta positiva. A análise de média dos resultados foi avaliada por teste de Tukey a 5% de significância.

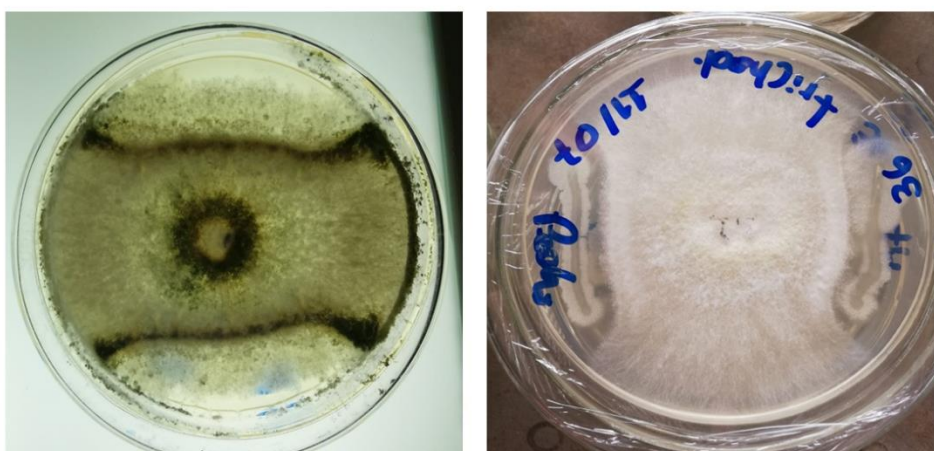
Figura 2. Aspecto visual da capacidade solubilizadora dos isolados



A- Meio NBRIP antes e após inoculação do isolado 7, em quadruplicata na placa. B- Meio Aleksandrov antes a após inoculação do isolado 36, em quadruplicata na placa. Fonte: Autor (2022)

Nenhum dos isolados apresentou oxidase positiva e, pelo método de cultura pareada, usada para verificar o potencial de biocontrole dos isolados, apenas o isolado 36 apresentou inibição parcial de crescimento do fungo *Trichoderma sp*, enquanto os isolados 7 e 45 não apresentaram inibição aparente (Figura 3). Também, nenhum dos isolados apresentou atividade hemolítica

Figura 3. Antagonismo do isolado 36 com *Trichoderma sp*.



Capacidade antagônica do isolado 36 ao crescimento de *Trichoderma sp*. Verso e frente da placa, respectivamente. Fonte: Autor, 2023.

4.2 Caracterização molecular dos isolados avaliados

O DNA genômico dos 3 isolados bacterianos foi extraído e submetido a reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) para amplificação de seus genes 16S rDNA. Essa reação foi realizada com os pares de oligonucleotídeos 27F e 1492R originando uma banda de aproximadamente 1500bp.

Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Essa análise apresentou valores de identidade variando entre 92% e 98%, sendo o isolado 7 foi o que apresentou a menor identidade e o isolado 45, o maior valor (98%). Os isolados 7 e 45 foram caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia sp*, e o isolado 36 como *Bacillus*, e especificamente *Bacillus velezensis*, com identidade de 95%. Das sequências obtidas para os gêneros *Bacillus* e *Burkholderia* foi feita uma comparação filogenética com vários type strains para a conferência da classificação taxonômica (Figura 4). Como resultados obtidos, observou-se que os isolados pertencem à classificação dentro da família *Bacillaceae*, *phylum Firmicutes* como era esperado, após análise das sequências na plataforma Blast, do NCBI.

Tabela 2. Análise taxonômica dos isolados avaliados

Isolado	Classificação	Tamanho do fragmento	E value	% identidade	Acesso no Genbank
7	<i>Burkholderia sp</i>	1494	1e-138	92.70%	NR_037046.1
36	<i>Bacillus velezensis</i>	1407	0.0	95%	OP584969.1
45	<i>Burkholderia sp.</i>	1527	0.0	98%	NR_102890.1

Fonte: Autor, 2023.

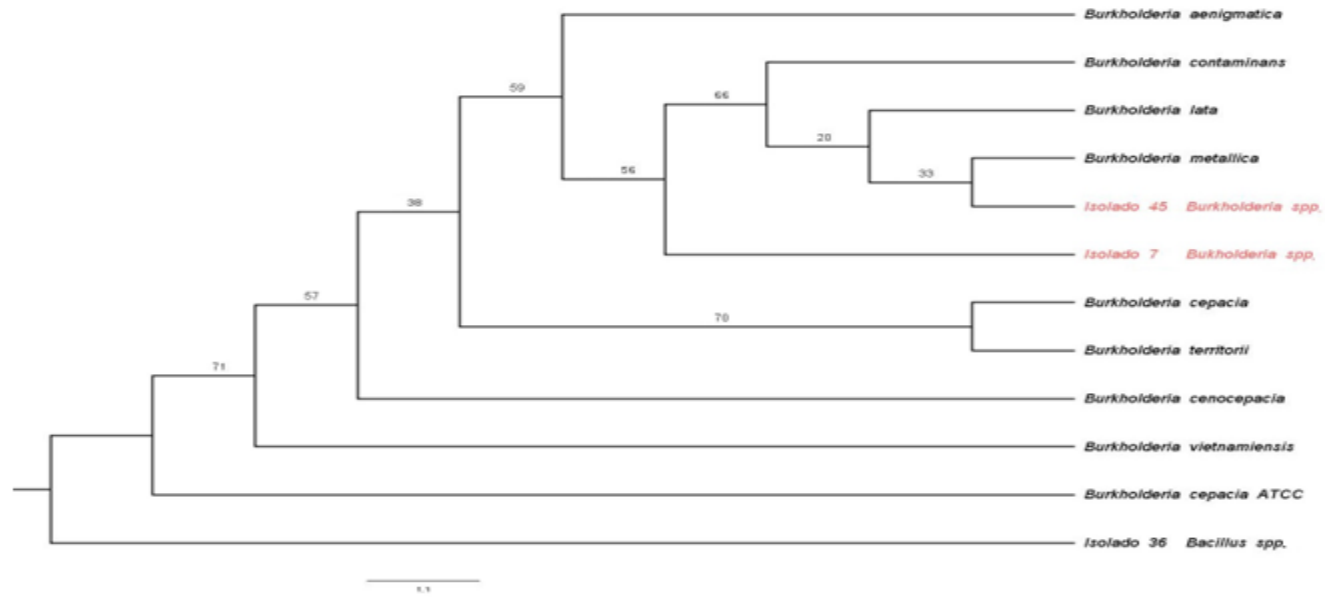
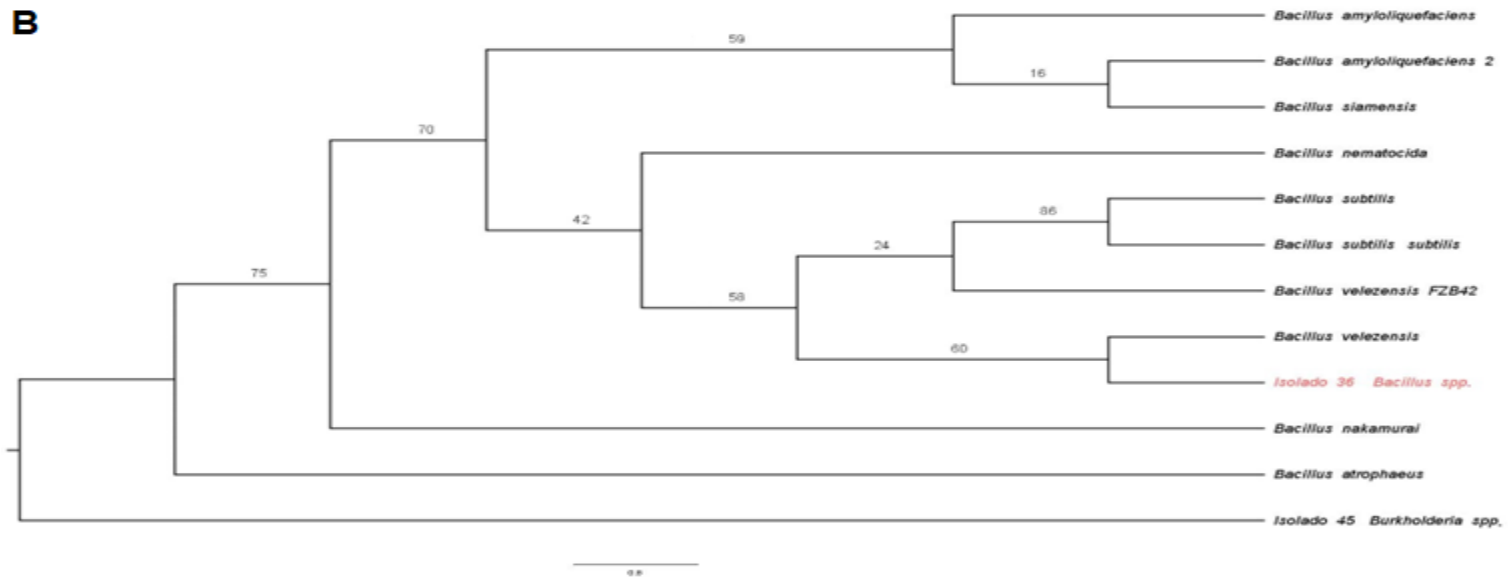
A**B**

Figura 4. Dendograma de similaridade dos isolados construídos a partir dos dados moleculares. A. Isolados 7 e 45 e B. Isolado 36. Os números em cada forquilha representam os valores de Bootstrap. Fonte: O autor (2023).

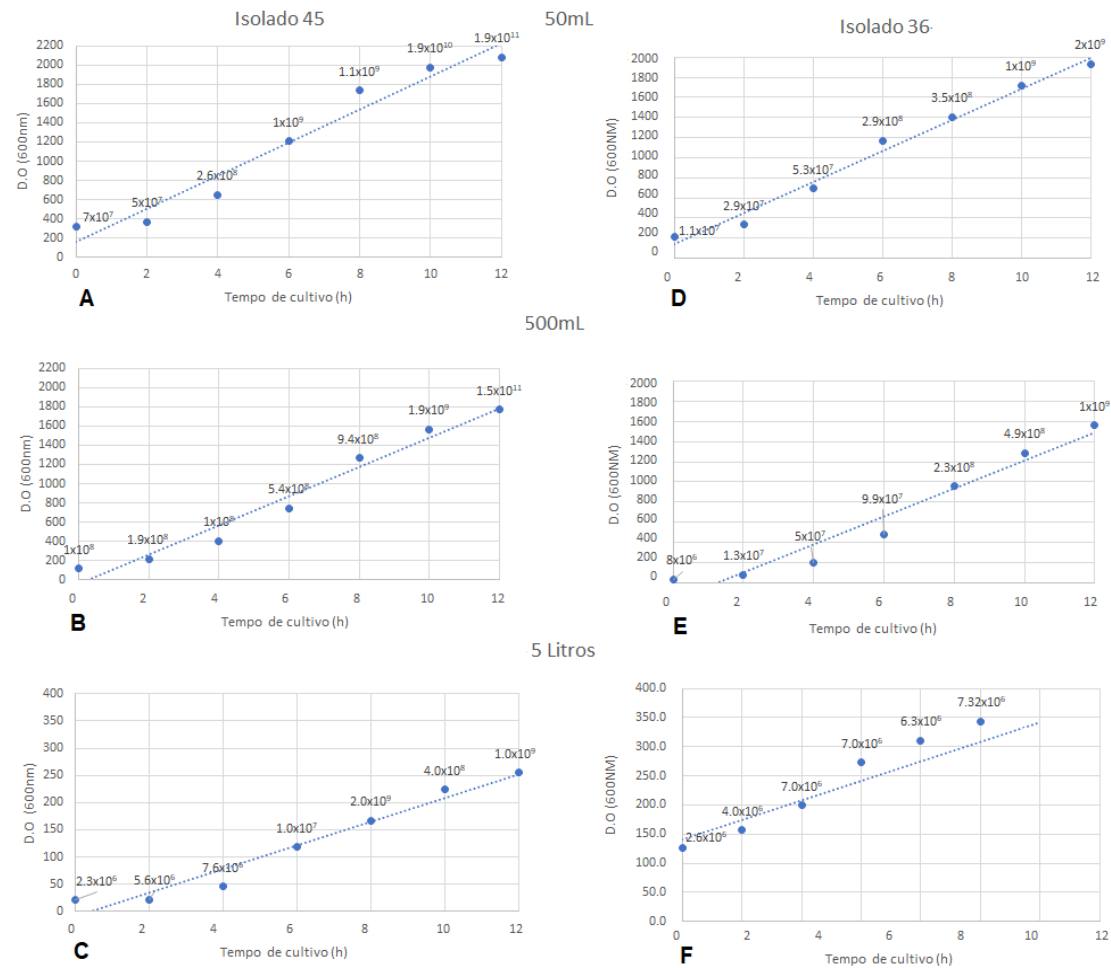
4.3 Parâmetros microbiológicos para Escalonamento

Os dados obtidos dos parâmetros de crescimento bacteriano para o escalonamento da produção nos três volumes (50 mL, 500 mL e 5000 mL) estão demonstrados na Figura 5.

Para o isolado 45 (*Burkholderia sp.*) foi possível observar que para o volume de 50 e 500 mL, na primeira hora de cultivo, a concentração de células viáveis foi similar (7×10^7 e 1×10^8 UFC.mL⁻¹, respectivamente), evidenciada nos pontos em razão de UFC.mL⁻¹, enquanto, para o volume de 5L a concentração de células viáveis foi 10 vezes inferior (2×10^6 UFC.mL⁻¹). Após 12 h de cultivo, o valor da DO foi de 2,2 (50mL), 1,8 (500mL) e 0,2 (5000mL) correspondendo a uma UFC de $1,9 \times 10^{11}$; $1,5 \times 10^{11}$ e 1×10^9 , respectivamente. Durante o cultivo dos 3 diferentes volumes, o pH se manteve entre 6,5 e 7,7, e a temperatura entre 22 °C e 26 °C.

Para o isolado 36 (*Bacillus velezensis*), a concentração inicial de UFC foi de 1×10^7 e 8×10^6 UFC.mL⁻¹, para os volumes de 50 e 500 mL de cultivo, respectivamente. Porém, nesta espécie, houve uma diminuição na UFC na ordem de 10x em volume de 500mL, demonstrando uma maior sensibilidade às condições de crescimento, provavelmente nas condições de transferência de oxigênio. No volume de 5L, a DO inicial foi de 0,130 com uma UFC de $2,6 \times 10^6$. Após 12 h de cultivo, o valor da DO foi de 2,0 (50mL), 1,6 (500mL) correspondendo a uma UFC de 2×10^9 ; 1×10^9 , respectivamente. No maior volume, a DO final foi de 0,270, porém os dados de UFC não puderam ser quantificados. Os valores obtidos para o pH do meio permaneceram entre 6,5 e 7,4, e a temperatura na faixa de 22°C a 25 °C.

Figura 5. Parâmetros microbiológicos dos isolados avaliados.



(A-C) Curva de crescimento do isolado 45 (*Burkholderia sp.*) (D-F) Isolado 36 (*Bacillus velezensis*) nos diferentes volumes avaliados (50, 500 e 5000mL).

Fonte: Autor, 2023

Atualmente, há uma tendência para o uso de novas tecnologias, principalmente voltadas para processos biológicos, para reciclagem e aproveitamento eficiente de resíduos orgânicos que podem ser metabolizados por diversos microrganismos como fonte de energia (MAZUCOTTELLI, 2013). O primeiro passo neste processo, é a caracterização enzimática e molecular para a escolha da melhor espécie ou estirpe e adequação das condições de cultivo comercial (BASHAN et al., 2014). Os isolados 7 e 45 caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp., e o isolado 36 como *Bacillus*, especificamente *Bacillus velezensis*, ambos compõem a coleção de isolados endofíticos do Labiogen e foram isolados de culturas comerciais.

Em relação às condições ótimas de crescimento, o fator mais limitante foi a salinidade, onde concentrações maiores que 5% inibiram o crescimento. Entre os isolados, o gênero *Burkholderia* apresentou a maior limitação pela concentração salina (>2%) e temperaturas (>30°C), enquanto para *Bacillus velezensis*, o fator mais limitante foi o pH sendo a faixa ideal entre 5,5 e 7,5. Robertson et al., (2010) observaram o crescimento de cepas de *Burkholderia pseudomallei* numa faixa de temperatura entre 20 e 40 °C. Os autores avaliaram também o efeito da variação de pH, entre 3 a 7, e observaram que esta espécie apenas não se desenvolveu no pH mais ácido testado (3.0), similar aos resultados encontrados. Em relação ao stress de crescimento por salinidade (NaCl), os autores observaram que *Burkholderia* cresceu em meio com até 4% de NaCl, embora apresentasse valores de UFC menores. Outros autores observaram que o crescimento satisfatório de *B. pseudomallei*, ocorreu em pH de 4 a 7, com menores concentrações celulares em pH 8 e salinidade até 2,5%, corroborando com os resultados encontrados para o isolado 7 e 45 (*Burkholderia*). (WANG-NGARM; CHAREONSUDJAI; CHAREONSUDJAI, 2014).

WEKESA et al (2022) ao caracterizarem isolados *Bacillus velezensis* observaram que o crescimento foi otimizado em pH 7.0 a 8.5, havendo crescimento até pH10. Os autores também relataram que as melhores temperaturas para esta espécie foi entre 30–35 °C, e uma salinidade entre 0–0.5 M NaCl. LI et al., (2020) caracterizou uma cepa de *B. velezensis*, com crescimento satisfatório num espectro de temperatura entre 25 e 37°C e pH de 5 a 9, além disso a cepa testada cresceu em concentrações salinas superiores a 20%.

Em relação à capacidade solubilizadora de *B. velezensis*, SETIAWATI et al., (2022) observaram IS de K similares aos obtidos para a cepa avaliada neste trabalho (de até 1,93). Os autores também observaram crescimento bacteriano e solubilização de P e K em meios com até 3% de salinidade. WESEKA et al (2022) observaram capacidade solubilizadora de P em duas estirpes de *B. velezensis* avaliadas mostrando que nem todos os isolados do mesmo gênero apresentaram a mesma capacidade bioquímica ou enzimática. Isso pode ser parcialmente explicado pela transferência horizontal de genes tornando os genomas bacterianos mais dinâmicos por meio de ganhos e perdas de genes (Bedhomme et al 2019) .

Bactérias do gênero *Burkholderia* são amplamente descritas na literatura, caracterizadas pelo seu potencial como PGCP, atuando principalmente como bioestimulantes e solubilizadoras de fosfato (CRUZ et al., 2001; GHOSH et al., 2016; SHAHID; KHAN, 2018; SUN et al., 2020; YOU et al., 2020) e produtoras de metabólitos de interesse. SONG et al (2008) observou em *B. cepacea*, a produção de ácido glicônico, causada pela atividade da glicose desidrogenase. A concentração desta enzima no meio de crescimento foi afetada pela regulação do fosfato e seria o provável mecanismo de solubilização do P.

Em relação ao escalamento laboratorial, os dados obtidos demonstram que o volume de meio de crescimento influencia o crescimento bacteriano. O maior efeito foi observado nos valores da DO que foram menores à medida do aumento do volume nos diferentes pontos avaliados (horas). No entanto, esta diminuição não acarretou numa diminuição proporcional nos valores das UFC (ordem de grandeza) que permaneceram inalteradas para os volumes de 50 e 500 mL em 10^9 e 10^{11} , respectivamente para a *Bacillus* e *Burkholderia*. No entanto, o aumento de 100x no volume (50 para 5000) promoveu reduções nos valores de DO e de UFC, o que pode ser parcialmente explicada pela dificuldade de agitação do Erlenmeyer de maior volume (5L), e da diferença de headspace entre este e os primeiros, garantindo uma menor troca de oxigênio do meio (TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013). A não proporcionalidade entre os valores de DO e o número de UFC, apontam que protocolos que se baseiam apenas na quantificação da DO podem trazer valores super ou subestimados da UFC dependendo do volume de cultivo utilizado.

5. CONCLUSÕES

1- Os isolados 7 e 45 foram solubilizadores de P enquanto o isolado 36 foi solubilizador de K.

2-A salinidade foi o fator mais limitante para o crescimento dos isolados: o isolado 7 apresentou maior sensibilidade ao crescimento em condições salinas (<5%) e os demais em até 5% de salinidade;

3- Nenhum dos isolados apresentou capacidade hemolítica ou de produção de oxidases e apenas o isolado 36 foi parcialmente antagônico ao *Trichoderma*.

4- Os isolados 7 /45 e 36 foram classificados taxonomicamente como pertencentes ao gênero *Burkholderia sp.* e à espécie *Bacillus velezensis*, respectivamente.

5- Os dados obtidos demonstram que o volume de meio de crescimento influenciou o crescimento bacteriano. Não houve proporcionalidade entre os valores de DO observados e o número de UFC, demonstrando que protocolos que se baseiam apenas na quantificação da DO podem trazer valores super ou subestimados da UFC dependendo do volume de cultivo utilizado.

6. REFERÊNCIAS

ABOU-EL-SEOUD, I. I.; ABDEL-MEGEED, A. Impact of rock materials and biofertilizations on P and K availability for maize (*Zea Maize*) under calcareous soil conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 55–63, 2012. DOI: 10.1016/j.sjbs.2011.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.09.001>.

AFZAL, Aftab; BAHADER, Shafaat; UL HASSAN, Tamoor; NAZ, Irum; DIN, Aziz ud. Rock Phosphate Solubilization by Plant Growth-Promoting *Bacillus velezensis* and Its Impact on Wheat Growth and Yield. **Geomicrobiology Journal**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–12, 2022. DOI: 10.1080/01490451.2022.2128113. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2128113>.

ALENEZI, Faizah N.; SLAMA, Houda Ben; BOUKET, Ali Chenari; CHERIF-SILINI, Hafsa; SILINI, Allaoua; LUPTAKOVA, Lenka; NOWAKOWSKA, Justyna Anna; OSZAKO, Tomasz; BELBAHRI, Lassaad. *Bacillus velezensis*: A treasure house of bioactive compounds of medicinal, biocontrol and environmental importance. **Forests**, [S. l.], v. 12, n. 12, 2021. DOI: 10.3390/f12121714.

ALORI, Elizabeth T.; GLICK, Bernard R.; BABALOLA, Olubukola O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00971.

ALORI, Elizabeth Temitope; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. SEP, p. 1–12, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02213.

ALVES, Vera Maria Carvalho; GOMES, Eliane Aparecida; RESENDE, Álvaro Vilela De; OLIVEIRA-PAIVA, Christiane Abreu De; MARRIEL, Ivanildo Evódio; SOUSA, Sylvia Morais De; LANA, Ubiraci Gomes de Paula. Solubilização de potássio presente em minerais por microrganismos e efeitos no desenvolvimento de culturas agrícolas. **Embrapa Milho e Sorgo**, [S. l.], v. Documentos, p. 20, 2021.

AREMU, Bukola Rhoda; ALORI, Elizabeth Temitope; KUTU, Raphael Funso; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Potentials of Microbial Inoculants in Soil Productivity: An Outlook on African Legumes. [S. l.], p. 53–75, 2017. DOI: 10.1007/978-981-10-6241-4_3.

ASTACHUL, Stephen F.; MADEN, Thomas; SCHAEFFER, Alejandro; ZHANG, Jinghui; ZHANG, Zheng; MILLER, Webb; LIPMAN, David. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. DOI: 10.2503/jjshs.58.977.

BABALOLA, Olubukola O.; GLICK, Bernard R. The use of microbial inoculants in African agriculture: Current practice and future prospects. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, [S. l.], v. 10, n. 3–4, p. 540–549, 2012.

BASHAN, Yoav. Inoculation of plant growth promoting bacteria for use in agriculture PII S0734-9750(98)00003-2 ELSEVIER. [S. l.], v. 16, n. 4, p. 729–770, 1998.

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, Juan Pablo. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, [S. l.], v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x.

BEDHOMME, S.; AMORÓS-MOYA, D.; VALERO, L.M.; BONIFACI, N.; PUJANA, M.À.; BRAVO, I.G.; GONZALEZ, J. Evolutionary changes after translational challenges imposed by horizontal gene transfer. **Genome Biol. Evol.** 2019, 11(3), 814–831.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9.

BONATERRA, Anna; BADOSA, Esther; DARANAS, Núria; FRANCÉS, Jesús; ROSELLÓ, Gemma; MONTESINOS, Emilio. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10091759.

BRASIL. Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010. Estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 nov. 2010. Disponível em: < https://www.normasbrasil.com.br/norma/decreto-7127-2010_60241.html>. Acesso em: 19 novembro 2022.

BRASIL. Decreto nº 7.127, de 24 de março de 2011. Aprovar as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília**, DF, 24 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view>>. Acesso em: 19 novembro 2022.

CHAUDHARY, Twinkle; DIXIT, Mandeep; GERA, Rajesh; SHUKLA, Amritash Kumar; PRAKASH, Anil; GUPTA, Govind; SHUKLA, Pratyosh. Techniques for improving formulations of bioinoculants. **3 Biotech**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1007/s13205-020-02182-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02182-9>.

CHEN, Qian; LIU, Shanjiang. Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. September, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02171.

CRUZ, Leonardo Magalhaes; DE SOUZA, Emanuel Maltempi; WEBER, Olmar Baler; BALDANI, José Ivo; DÖBEREINER, Johanna; DE OLIVEIRA PEDROSA,

Fábio. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus (L.) Merrill*). **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 2375–2379, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.5.2375-2379.2001.

ETESAMI, Hassan; EMAMI, Somayeh; ALIKHANI, Hossein Ali. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 897–911, 2017. DOI: 10.4067/S0718-95162017000400005.

FEI, Zhao; XIAFANG, Sheng; ZHI, Huang; LINYAN, He. Isolation of mineral potassium-solubilizing bacterial strains from agri-cultural soils in Shandong Province. **Biodiversity Science**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 593, 2008. DOI: 10.3724/sp.j.1003.2008.08121.

FUKAMI, Josiane; CEREZINI, Paula; HUNGRIA, Mariangela. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1186/s13568-018-0608-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.

GARCIA-OCHOA, Felix; GOMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>.

GHOSH, Ranjan; BARMAN, Soma; MUKHERJEE, Rajib; MANDAL, Narayan C. Role of phosphate solubilizing Burkholderia spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 183, p. 80–91, 2016. DOI: 10.1016/j.micres.2015.11.011.

GOPAL, Surendra; BABY, Akhila. Enhanced Shelf-Life of Azospirillum and Psb Through. **International Journal of Science, Environment ISSN 2278-3687 (O) and Technology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 2023–2029, 2016.

GOPI, Gokul K.; MEENAKUMARI, K. S.; NYSANTH, N. S.; SUBHA, P. An optimized standard liquid carrier formulation for extended shelf-life of plant growth promoting bacteria. **Rhizosphere**, [S. l.], v. 11, n. April, p. 100160, 2019. DOI: 10.1016/j.rhisph.2019.100160. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100160>.

HEUER, Holger; KRSEK, Martin; BAKER, Paul; SMALLA, Kornelia; WELLINGTON, Elizabeth M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997. DOI: 10.1128/aem.63.8.3233-3241.1997.

KALAYU, Girmay. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, [S. l.], v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/4917256.

KATOH, Toh. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment

Science. **Briefings in Bioinformatics**, [S. l.], v. 9, p. 286–298, 2008.

KHAN, A.; JILANI, Ghulam; SALEEM AKHTAR, Mohammad; JILANI, G.; AKHTAR, M. S.; S NAQVI, S. M.; RASHEED, M. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production Related papers Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency i... *Câm Mỹ BACTERIAL BIOFERTILIZERS FOR SUSTAINABLE CROP*. **J. agric. biol. sci.**, [S. l.], v. 1, n. February, p. 48–58, 2009.

KHAN, Shams Tabrez. Consortia-based microbial inoculants for sustaining agricultural activities. **Applied Soil Ecology**, [S. l.], v. 176, n. April, p. 104503, 2022. DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104503. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104503>.

LAMBERS, Hans. Annual Review of Plant Biology Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants Measuring Plant Respiration using stable isotopes of oxygen View project SoilCare View project Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. **Article in Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], n. January, 2022. DOI: 10.1146/annurev-arplant-102720-CITATIONS. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720->.

LI, Xixi; GAO, Xiaojian; ZHANG, Shuangming; JIANG, Ziyang; YANG, Hui; LIU, Xiao Dan; JIANG, Qun; ZHANG, Xiaojun. Characterization of a *Bacillus velezensis* with antibacterial activity and inhibitory effect on common aquatic pathogens. **Aquaculture**, [S. l.], v. 523, n. February, p. 735165, 2020. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735165. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735165>.

MAZZUCOTELLI, Cintia Anabela; PONCE, Alejandra Graciela; KOTLAR, Catalina Elena; MOREIRA, María del Rosario. Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 295–303, 2013. DOI: 10.1590/S0101-20612013005000038.

MEENA, Vijay Singh; MAURYA, B. R.; VERMA, Jay Prakash. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? **Microbiological Research**, [S. l.], v. 169, n. 5–6, p. 337–347, 2014. DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>.

MOSELA, Mirela et al. *Bacillus velezensis* strain Ag75 as a new multifunctional agent for biocontrol, phosphate solubilization and growth promotion in maize and soybean crops. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–12, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-19515-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19515-8>.

NAUTIYAL, C. Shekhar. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999. DOI: 10.1016/S0378-1097(98)00555-2.

NEHRA, Vibha; CHOUDHARY, Madhu. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. **Journal of Applied and Natural Science**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 540–556, 2015. DOI: 10.31018/jans.v7i1.642.

NYLANDER, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Uppsala.

ROBERTSON, Jeannie; LEVY, Avram; SAGRIPANTI, Jose Luis; INGLIS, Timothy J. J. The survival of Burkholderia pseudomallei in liquid media. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 88–94, 2010. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0226.

RONQUIST F, H.J., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. 19, 1572–4.

SANTANA, E. B.; MARQUES, E. L. S.; DIAS, J. C. T. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, native microorganisms, and rock dust on Jatropha curcas L. growth. **Genetics and Molecular Research**, [S. l.], v. 15, n. 4, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15048729.

SANTANA, Sheilla Rios Assis et al. Inoculation of plant growth-promoting bacteria attenuates the negative effects of drought on sorghum. **Archives of Microbiology**, [S. l.], v. 202, n. 5, p. 1015–1024, 2020. DOI: 10.1007/s00203-020-01810-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01810-5>.

SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0932-0.

SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; BORZANI, Walter; AQUARONE, Eugênio. **Biotecnologia Industrial - Vol. 2 Engenharia Bioquímica**. [s.l.: s.n.].

SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 425–435, 2005. DOI: 10.1007/s00253-005-0003-0.

SETIAWATI, Tri Candra; ERWIN, Dwi; MANDALA, Marga; HIDAYATULAH, Anisa. Use of Bacillus as a Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Improve Phosphate and Potassium Availability in Acidic and Saline Soils. **KnE Life Sciences**, [S. l.], v. 2022, p. 541–558, 2022. DOI: 10.18502/kls.v7i3.11160.

SHAHID, Mohammad; KHAN, Mohd Saghir. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing Burkholderia cepacia PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities. **3 Biotech**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 1–17, 2018. DOI: 10.1007/s13205-018-1145-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1145-y>.

SIDDIQUE, Raffia; GUL, Alvina; OZTURK, Munir; ALTAY, Volkan. Phosphate Solubilizing Bacteria for Soil Sustainability. *In: handbook of assisted and amendment-enhanced sustainable remediation technology*. [s.l.: s.n.]. p.

425–435.

SINGH, Dhananjaya Pratap; SINGH, Harikesh Bahadur; PRABHA, Ratna. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Vol. 1: Research perspectives. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives**, [S. l.], p. 1–343, 2016. DOI: 10.1007/978-81-322-2647-5.

SNAK, Aline; VENDRUSCOLO, Eliane Cristina Gruszka; DOS SANTOS, Marise Fonseca; FIORINI, Adriana; MESA, Dany. Genome sequencing and analysis of plant growth-promoting attributes from *leclercia adecarboxylata*. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2020-0130.

SONG, Ok Ryul; LEE, Seung Jin; LEE, Yong Seok; LEE, Sang Cheol; KIM, Keun Ki; CHOI, Yong Lark. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 151–156, 2008. DOI: 10.1590/S1517-83822008000100030.

SULEMAN, Muhammad; YASMIN, Sumera; RASUL, Maria; YAHYA, Mahreen; ATTA, Babar Manzoor; MIRZA, Muhammad Sajjad. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1–28, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0204408.

SUN, Feng; OU, Qiaojing; WANG, Nan; GUO, Zi xuan; OU, Yuyi; LI, Na; PENG, Changlian. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. **Global Ecology and Conservation**, [S. l.], v. 23, 2020. DOI: 10.1016/j.gecco.2020.e01141.

SUYAL, Deep Chandra; SONI, Ravindra; SAI, Santosh; GOEL; REETA. Microbial Inoculants as Biofertilizer. *In*: **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**. [s.l: s.n.]. p. 311–318.

T. NIKITHA, M. Satyaprakash; B. SADHANA, E. U. B. Reddi; VANI, S. Satya. Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 2133–2144, 2017. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.604.251.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; S, Kumar. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 24, p. 1596–1599, 2007.

TRUJILLO-ROLDÁN, Mauricio A. et al. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 22, p. 9665–9674, 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-5199-9.

UROZ, S.; CALVARUSO, C.; TURPAULT, M. P.; PIERRAT, J. C.; MUSTIN, C.; FREY-KLETT, P. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 73, n. 9, p. 3019–3027, 2007. DOI: 10.1128/AEM.00121-07.

VASSILEV, Nikolay; VASSILEVA, Maria; MARTOS, Vanessa; GARCIA DEL MORAL, Luis F.; KOWALSKA, Jolanta; TYLKOWSKI, Bartosz; MALUSÁ, Eligio. Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 11, n. March, p. 1–9, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00270.

VIDEIRA, Sandy Sampaio; ARAÚJO, Jean Luiz Simões; BALDANI, Lúcia Divan. Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas. **Documentos**, [S. l.], p. 74, 2007.

WANG-NGARM, Supunnipa; CHAREONSUDJAI, Sorujsiri; CHAREONSUDJAI, Pisit. Physicochemical factors affecting the growth of Burkholderia pseudomallei in soil microcosm. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 480–485, 2014. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0446.

WANG, Juanjuan; LI, Ruochen; ZHANG, Hui; WEI, Gehong; LI, Zhefei. Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1186/s12866-020-1708-z.

WEKESA, Tofick B.; WEKESA, Vitalis W.; ONGUSO, Justus M.; WAFULA, Eliud N.; KAVESU, Ndinda. Isolation and Characterization of Bacillus velezensis from Lake Bogoria as a Potential Biocontrol of Fusarium solani in Phaseolus vulgaris L. **Bacteria 2022, Vol. 1, Pages 279-293**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 279–293, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1951576>.

YAGHOUBI KHANGHAHI, Mohammad; PIRDASHTI, Hemmatollah; RAHIMIAN, Heshmatollah; NEMATZADEH, Ghorbanali; GHAJAR SEPANLOU, Mehdi. Potassium solubilising bacteria (KSB) isolated from rice paddy soil: from isolation, identification to K use efficiency. **Symbiosis**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 13–23, 2018. DOI: 10.1007/s13199-017-0533-0.

YOU, Man; FANG, Shumei; MACDONALD, Jacqueline; XU, Jianping; YUAN, Ze Chun. Isolation and characterization of Burkholderia cenocepacia CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 233, p. 126395, 2020. DOI: 10.1016/j.micres.2019.126395. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126395>.

ZHANG, Chengsheng; KONG, Fanyu. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. **Applied Soil Ecology**, [S. l.], v. 82, p. 18–25, 2014. DOI: 10.1016/j.apsoil.2014.05.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.002>.