

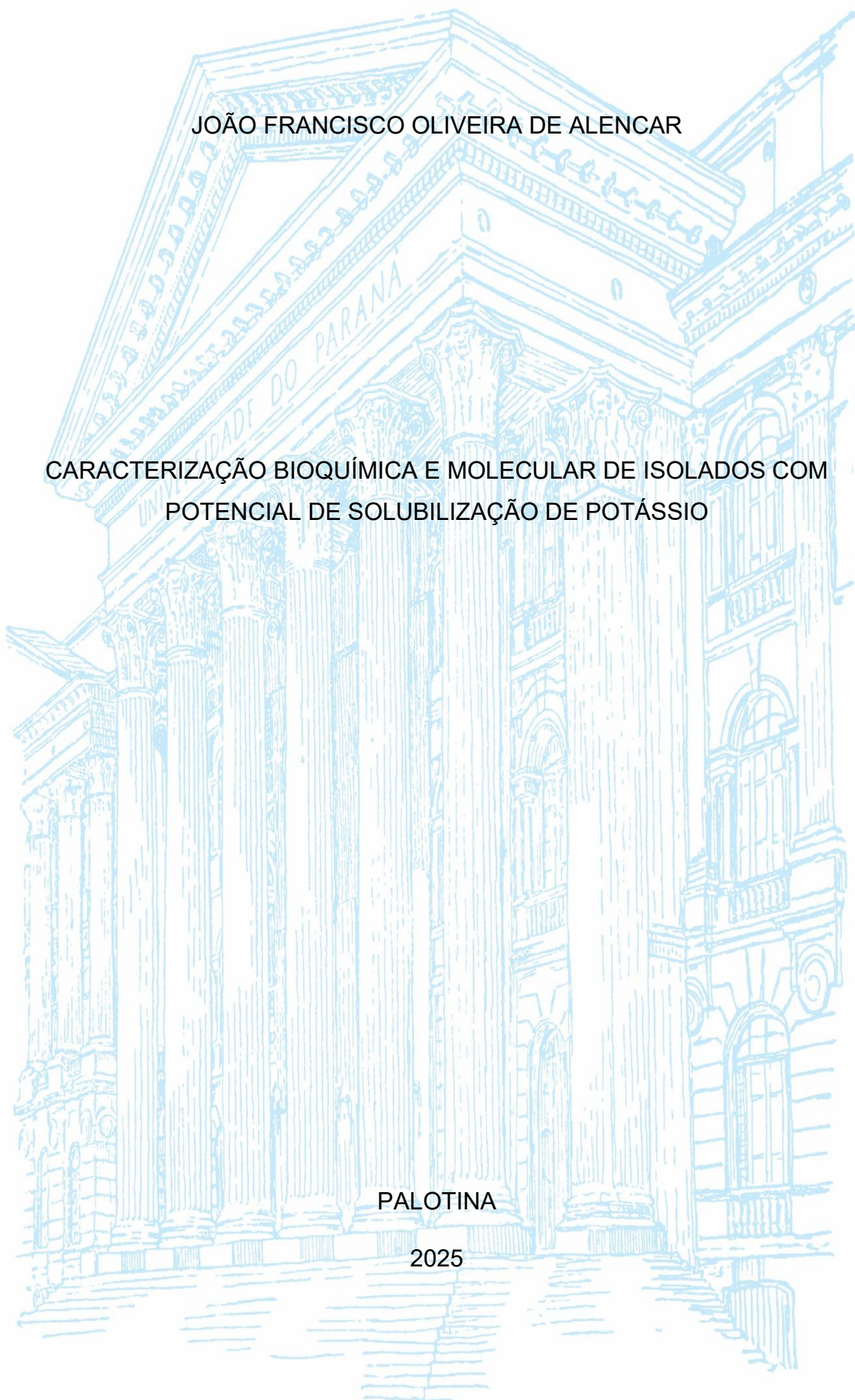
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO FRANCISCO OLIVEIRA DE ALENCAR

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS COM
POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO

PALOTINA

2025



JOÃO FRANCISCO OLIVEIRA DE ALENCAR

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS COM
POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como exigência parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Cristina Gruszka Vendruscolo.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marise Fonseca dos Santos.

PALOTINA

2025



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

ATA DE REUNIÃO

ATA DE REUNIÃO

Aos dois dias do mês de julho de dois mil e vinte e cinco, às dezesesseis horas, na sala 15-Seminário, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Caracterização Bioquímica e Molecular de Isolados com Potencial de Solubilização de Potássio" apresentado pelo discente João Francisco de Oliveira Alencar, 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 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: Profa. Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, nota: 100 (cem), Prof. Dr. Augusto Luchese, nota: 100 (cem), e Prof. Dr. Robson Missio, nota: 100 (cem). A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 100 (cem). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelo discente sob acompanhamento da 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 03/07/2025, às 10:27, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **AUGUSTO VAGHETTI LUCHESE, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/07/2025, às 16:16, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ROBSON FERNANDO MISSIO, CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRONOMICAS**, em 07/07/2025, às 16:43, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **7918389** e o código CRC **16D76C31**.

RESUMO

A dependência brasileira da importação de fertilizantes potássicos representa um desafio estratégico para a agricultura nacional, especialmente diante da crescente demanda por soluções sustentáveis. Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar isolados bacterianos com potencial de solubilização de potássio, enfatizando a atuação sobre fontes minerais e solúveis, além da produção de enzimas hidrolíticas. Foram avaliados 14 isolados provenientes de diferentes coleções microbianas do Labiogen/UFPR, com destaque para o isolado UFPRENII36, identificado como *Bacillus velezensis* por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA. A triagem qualitativa revelou alta atividade enzimática (amilase, celulase, protease, caseinase e lipase), além da capacidade de solubilização de potássio em meio sólido. Os ensaios quantitativos incluíram análises da curva de crescimento, quantificação de glicose por Somogyi-Nelson, produção de ácidos orgânicos por CLAE e determinação de potássio solubilizado (espectrofotometria com cobaltonitrito). Os resultados indicaram que o isolado UFPRENII36 foi capaz de solubilizar potássio em ambas as formas testadas: até 5,8 ppm em meio contendo pó de rocha e 184 ppm em meio com silicato de potássio. A produção de ácidos cítrico, málico e acético demonstrou papel relevante na liberação de potássio, sendo o ácido cítrico o principal agente identificado. Conclui-se que *Bacillus velezensis* apresenta elevado potencial como bioinoculante agrícola, podendo contribuir para a substituição parcial de fertilizantes químicos potássicos, promovendo maior sustentabilidade e eficiência na agricultura tropical.

Palavras-chave: *Bacillus velezensis*, Ácido Cítrico, Enzimas hidrolíticas, Bioinoculantes, Agricultura sustentável.

ABSTRACT

Brazil's dependency on the importation of potassium-based fertilizers poses a strategic challenge to national agriculture, particularly in the face of increasing demand for sustainable solutions. This study aimed to identify and characterize bacterial isolates with the potential for potassium solubilization, focusing on their activity on both mineral and soluble sources, as well as their production of hydrolytic enzymes. A total of 14 isolates from different microbial collections of Labiogen/UFPR were evaluated, with emphasis on the UFPRENII36 isolate, identified as *Bacillus velezensis* through 16S rDNA gene sequencing. Qualitative screening revealed high enzymatic activity (amylase, cellulase, protease, caseinase, and lipase), in addition to potassium solubilization capacity in solid medium. Quantitative assays included growth curve analysis, glucose quantification by the Somogyi-Nelson method, organic acid production via HPLC, and potassium quantification through spectrophotometry using cobaltinitrite. Results indicated that the UFPRENII36 isolate was capable of solubilizing potassium in both tested forms: up to 5.8 ppm in medium containing rock powder and 184 ppm in medium with potassium silicate. The production of citric, malic, and acetic acids played a significant role in potassium release, with citric acid being identified as the main solubilizing agent. It is concluded that *Bacillus velezensis* demonstrates high potential as an agricultural bioinoculant, potentially contributing to the partial replacement of chemical potassium fertilizers and promoting greater sustainability and efficiency in tropical agriculture.

Keywords: *Bacillus velezensis*, Citric Acid, Hydrolytic enzymes, Bioinoculants, Sustainable agriculture.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	9
2.1.1	Extração de DNA genômico	9
2.1.2	Avaliação de capacidade enzimática por método qualitativo	10
2.2	AVALIAÇÕES QUANTITATIVAS DE PARÂMETROS ENZIMÁTICOS	12
2.2.1	Preparo do inóculo de <i>Bacillus velezensis</i>	12
2.2.2	Crescimento bacteriano em meio Aleksandrov com adição de diferentes fontes de potássio (mineral e solúvel)	12
2.2.3	Quantificação da glicose presente no meio de cultura	12
2.2.4	Avaliação da produção de ácidos orgânicos	13
2.2.5	Análises de quantificação de K pelo método de espectrofotometria	13
3	RESULTADOS	14
3.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	14
3.2	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ENZIMÁTICA POR MÉTODO QUALITATIVOS	15
3.3	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE PARÂMETROS ENZIMÁTICOS	16
3.3.1	Curva de crescimentos e poder redutor	16
3.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DIFERENTES ÁCIDOS SOLUBILIZADORES PELA <i>Bacillus velezensis</i>	19
3.5	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE K NO MEIO DE CULTIVO COM <i>Bacillus velezensis</i>	23
4	DISCUSSÃO	23
5	CONCLUSÕES	26
	REFERÊNCIAS	27
	ANEXO 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA, POR ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X E ANÁLISES DE TAMANHO DE PARTÍCULAS POR PENEIRAMENTO DO PÓ DE ROCHA USADO NO EXPERIMENTO	32

Caracterização bioquímica e molecular de isolados bacterianos com potencial de solubilização de potássio

João Francisco de Oliveira Alencar ^a,
Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo ^{b*}
e Marise Fonseca dos Santos ^b

^a Programa de Graduação de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jd Dallas, Palotina, Paraná, Brasil.

^b Departamento de Biociências, Laboratório de Bioquímica e Genética Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jd Dallas, Palotina, Paraná, Brasil.

RESUMO

Objetivos: Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar bactérias com potencial biotecnológico quanto à capacidade enzimática e solubilização de potássio, com foco na atuação sobre fontes minerais e solúveis.

Desenho do Estudo: Estudo experimental de caráter exploratório e quantitativo.

Local e Duração do Estudo: Laboratório de Genética e Bioquímica (Labiogen), Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, durante o ano de 2025.

Metodologia: Foram avaliados 14 isolados bacterianos oriundos de diferentes coleções microbianas. Após triagem qualitativa das atividades enzimáticas (amilase, celulase, protease, caseinase e lipase), o isolado UFPRENII36, identificado como *Bacillus velezensis*, foi selecionado para análise quantitativa de solubilização de potássio. As avaliações envolveram a extração de DNA, identificação molecular via sequenciamento do gene 16S rDNA, ensaios enzimáticos qualitativos, curva de crescimento bacteriano, quantificação de glicose, ácidos orgânicos (via CLAE) e potássio (via espectrofotometria).

Resultados: O isolado *Bacillus velezensis* (UFPRENII36) apresentou alta atividade enzimática e expressiva capacidade de solubilização de potássio nas formas de pó de rocha (11,45 de IE) e silicato (4,22 de IE). A produção de ácidos orgânicos como cítrico, málico e acético mostrou correlação com a liberação de potássio no meio de cultivo, atingindo até 5,8 ppm em meio com pó de rocha após 18 dias.

Conclusão: O isolado UFPRENII36 demonstrou grande potencial para aplicação como bioinoculante agrícola, promovendo a solubilização de fontes insolúveis de potássio e contribuindo para estratégias mais sustentáveis no uso de fertilizantes.

Palavras-chave: *Bacillus velezensis*, biofertilizantes, ácidos orgânicos, enzimas hidrolíticas, microbiologia agrícola.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, porém depende fortemente da importação de fertilizantes potássicos, com mais de 95% do potássio utilizado sendo importado (IndexBox, 2024). Essa dependência representa um risco estratégico e econômico para a produção nacional. Além disso, o uso excessivo e contínuo de fertilizantes químicos compromete a saúde do solo e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

O potássio (K) é um dos nutrientes mais importante para as plantas e desempenha uma função vital no metabolismo vegetal. No solo, o potássio é encontrado em várias formas: A primeira é a forma mineral (indisponível- corresponde a 90-98% do K do solo), encontra-se atrelado à estrutura de minerais como feldspatos e micas. A sua liberação ocorre lentamente, por intemperismo (decomposição de minerais) ao longo dos anos. Nos solos também podemos ter o potássio não trocável (fixado) pouco disponível às plantas (1 - 9% do K total do solo). Geralmente este K está preso entre as camadas de argilas como é o caso do mineral illita. A terceira forma encontrada nos solos, é o K trocável ou adsorvido na superfície das partículas de argila e matéria orgânica (1 - 2% do K total). Esta forma é disponível para as plantas via troca catiônica podendo ser liberado para a solução do solo ou fixado novamente. E por último, o K em solução do solo (0,1 - 2% do K total do solo) que está imediatamente disponível, esta forma de K está dissolvido na água do solo (forma iônica: K^+), que é diretamente absorvida (Lalitha e Dhakshinamoorthy, 2014 e Meena et al., 2016, Prajapati, 2012).

Bactérias solubilizadoras de potássio (BSP) são bactérias envolvidas na solubilização de potássio mineral (estrutural) pela liberação de ácidos orgânicos (ex: ácido cítrico, oxálico, tartárico), que baixam o pH local, quelam cátions (como Al^{3+} , Ca^{2+}), desagregam a estrutura mineral, liberando íons K^+ para o solo. Podem também solubilizar K pela produção de enzimas e metabólitos, produção de enzimas extracelulares e sideróforos (moléculas que quelam metais), facilitando a liberação de K^+ dos minerais e, gerando CO_2 (pela respiração), que forma H_2CO_3 (ácido carbônico), um agente de intemperismo químico (Meena et al., 2016, Rajawat et al., 2019, Zhang e Kong 2014).

As BSP são vistas como biofertilizantes promissores, especialmente em solos tropicais pobres em K disponível. Estes microrganismos poderiam contribuir para a redução da dependência de fertilizantes químicos e o aumento da eficiência de uso do potássio natural do solo (Bhargavi et al., 2021 e Olaniyan et al., 2022 e Sharma et al., 2024).

A bioprospecção bacteriana pode ser definida como uma ciência que busca desenvolver tecnologia através da biodiversidade, onde se encontra um material de interesse econômico em um ser vivo, sendo esse material responsável por desenvolver um novo produto ou potencializar os resultados de um produto já existente (Orrico Júnior et al., 2010). Para a produção de inoculantes existem várias estratégias, uma

delas é o isolamento bacteriano a partir do solo, de resíduos produzidos pela pecuária, suinocultura e avicultura, entre outros substratos (Maciel et al., 2020).

A caracterização dos mecanismos de solubilização de potássio (K) por bactérias é extremamente importante tanto para a pesquisa científica quanto para aplicações práticas na agricultura sustentável. A completa compreensão do mecanismo de mobilização do K das formas insolúveis para as solúveis permitiria selecionar cepas mais eficientes para uso agrícola e desenvolver bioinoculantes mais eficientes, que funcionem melhor em certos tipos de solo, clima ou cultura agrícola. Também facilitaria a adaptação de estratégias para diferentes condições de solo, pois os mecanismos de solubilização dependem do pH, tipo de argila, matéria orgânica, umidade, etc. Deste modo, conhecendo como cada bactéria atua, seria possível prever sua performance em diferentes contextos agrônômicos (Adwani et al., 2024, Gao et al., 2025, Meena et al., 2016, Nawaz et al., 2023, Raji e Thangavelu, 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar bactérias com potencial de uso biotecnológico da coleção Labiogen, quanto à capacidade enzimática e solubilização de potássio, dando foco no mecanismo bacteriano de solubilização a partir de fontes mineral e solúvel de potássio por métodos quantitativos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O Labiogen (Laboratório de Genética e Bioquímica) da UFPR-Setor Palotina tem 4 coleções bacterianas: coleção de bactérias endofíticas, (UFPRENII) coleção de bactérias isoladas em Cama de Aviário (UFPRCA), a coleção de substrato de Biodigestor (UFPRBD), e a coleção da Filosfera do trigo (UFPRPL), que ao total somam 239 isolados. A maioria destes isolados ainda não foram avaliados quanto ao seu potencial biotecnológico. De resultados preliminares de trabalhos anteriores, foram escolhidos 14 isolados para o screening qualitativo e quantitativo neste trabalho, sendo 03 isolados da coleção de endofíticas (UFPRENII 36, 105 e 135), 03 isolados da coleção de biodigestor (UFPRBD 20,22 e 28) e 8 isolados coleção de cama de aviário (UFPRCA 03,05,08,10,12,48,125 e 131).

2.1. Caracterização Molecular

2.1.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico bacteriano foi extraído seguindo o protocolo de extração de DNA com o kit DNAeasy® PowerSoil® Pro Kit (50) QIAGEN. Para a amplificação do gene 16S rDNA foi utilizada a técnica de PCR utilizando-se um termociclador BIOER (Life Express). Para uma reação de PCR com volume final de 30 µL, foi utilizado 3 µL Tampão da Taq 10x; 2,25 µL de 25 mM de MgCl₂; 1 µL de 10 mM de cada desoxiribonucleotídeo; 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (primer 27F e 1492R na concentração de 4mM); 2 µL de Taq DNA polimerase; 2 µL de DNA (50 a 100 ng) e água milli-Q estéril para completar um volume final de 30 µL. As amostras foram amplificadas de acordo com o seguinte programa: 93°C, por 2

min; 35 ciclos de 93°C por 45 s, 62°C por 30 s, 72°C por 2 min, seguidos de uma extensão final por 5 min, a 72°C. Para confirmação da amplificação, 5 µL da reação + 2 µL do corante IV foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE, juntamente com 3,5 µL do marcador de peso molecular de 100 pb para checar a presença de bandas.

Nas reações de amplificação do gene 16S rDNA foram usados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Senthilraj et al. (2016). O 27F (5' GAGTTT GATCATGGCTCAG3') anela na extremidade 5' do gene 16S rDNA e o 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') na 3', gerando um produto de amplificação que compreende quase todo o gene, de aproximadamente 1,5 Kb.

O sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rDNA dos diferentes isolados foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da UFPR/Setor Politécnico.

As sequências obtidas pelo sequenciador Illumina MiSeq saíram no formato do programa *ab1 sequencing análises*, no formato FASTA – *Fast All* (alinhamentos rápidos para toda a informação biológica, disponível on-line no NCBI), e foram analisadas pelo programa MEGA (Tamura et al., 2007) através do programa BLAST - Basic Local Alignment Search Too (Altschul, 1997) usando o banco de dados do GenBank. O alinhamento das sequências obtidas foi realizado por meio da interface MAFFT online (Katoh & Toh, 2008).

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 & Huelsenbeck, 2003) foi usado para gerar as árvores filogenéticas sob critérios ótimos por partição de dados dentro do software Phylosuite (D. Zhang et al., 2020).

2.1.2. Avaliação da capacidade enzimática por métodos qualitativos

O ensaio qualitativo da atividade da protease foi realizado de acordo com (Lima et al., 2014), o meio de cultura contém: 0,5 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0,2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0,1 g.L⁻¹ ZnSO₄.H₂O, 0,1 g.L⁻¹ NaCl, 15 g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 2,5 g.L⁻¹ de leite em pó, com o pH 7,2. Após 48h de incubação a 37 °C, utilizou-se solução de lugol, para revelação do halo enzimático, onde um halo ao redor da colônia bacteriana indica atividade de protease positiva.

Os ensaios de atividade caseinolítica foram realizados foi realizado de acordo com (Mazzucotelli et al., 2013), a inoculação dos isolados vão ser em meio basal modificado (MM): 1 g.L⁻¹ de glicose, 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 15,0 g.L⁻¹ de ágar-ágar a pH de 6,8-7,2, suplementado com 1% de caseína. Após 48h de incubação a atividade caseinolítica positiva foi detectado pela formação de uma zona de turbidez (halo branco) circundando o poço.

O ensaio qualitativo da atividade da amilolítica foram feitos de acordo com (Abd-Elhalem et al., 2015), o meio de cultura contém: 0,5 g.L⁻¹ de KNO₃, 1,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,2 g.L⁻¹ de MgSO₄ .7H₂O, 0,2 g.L⁻¹ de CaCl₂, 0,1 g.L⁻¹ de FeCl₃, 15 g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 10,0 g.L⁻¹ de amido, com o pH 7,2. Após 48h de incubação a 37 °C, utilizou-se solução de lugol para revelação do halo enzimático, onde um halo ao redor da colônia bacteriana indica atividade de protease positiva.

O ensaio qualitativo da atividade celulolítica foram redigidos de acordo com (Malik & Javed, 2021), o meio de cultura contém: 0,3 g.L⁻¹ de galactose, 0,5 g.L⁻¹ de NaNO₃, 0,75 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,375 g.L⁻¹ de MgSO₄ .7H₂O, 15 g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 10,0 g.L⁻¹ de Carboximetilcelulose (CMC), com o pH 7,0. Após 72h de incubação a 37 °C, utilizou-se solução de Vermelho Congo 1% (m/v) para revelação do halo enzimático, onde um halo ao redor da colônia bacteriana indica atividade de protease positiva.

Para o ensaio qualitativo da atividade da lipase foi avaliado em Agar Meio Tween que contém: 10 g.L⁻¹ de peptona, 0,1 g.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 10 mL de Tween 80 e 15 g.L⁻¹ de ágar-água, ajustado o pH para 7-7,4. Após 15 dias de incubação a formação de um precipitado branco ao redor do poço resultante da deposição de cristais do sal de cálcio formado pelo ácido graxo liberado pela enzima, indica atividade lipolítica positiva.

Foi avaliada também a solubilização qualitativa de fosfato insolúvel em meio NBRIP modificado: 10 g.L⁻¹ de glicose; 2,5 g.L⁻¹ de CaHPO₄, 0,2 g.L⁻¹ de NaCl, 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,2 g.L⁻¹ de KCl, 0,5 g.L⁻¹ de Extrato de levedura, 0,002 g.L⁻¹ de MnSO₄·H₂O, 0,024 g.L⁻¹ de azul de bromofenol, 15 g.L⁻¹ de Ágar-ágar, pH 7,0. As placas foram incubadas por 10 dias a 30 °C, e após esse período foram avaliadas quanto à formação de halo pelo isolado.

A solubilização de potássio foi avaliada pela inoculação dos isolados em meio Aleksandrov modificado sólido: 5 g.L⁻¹ de glicose, 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,06 g.L⁻¹ de FeCl₃, 0,1 g.L⁻¹ de CaCO₃, 2 g.L⁻¹ de fosfato de cálcio e 20 g.L⁻¹ de ágar, acrescentando 3 g.L⁻¹ de silicato de potássio, pH 7,2, 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 pelo isolado.

A capacidade de solubilização dos isolados foi avaliada visualmente pela formação de halo de solubilização, para o meio Aleksandrov ocorre a aplicação de lugol sobre a placa, que indica resultado positivo.

A quantificação e validação de todas as diferentes atividades enzimáticas foi estimada através do Índice Enzimático (IE), (Oliveira et al., 2006) a partir da seguinte equação $IE = DMH/DMC$, onde DMH = diâmetro total da zona de hidrólise (halo de hidrólise + diâmetro da colônia bacteriana, mensurado em

mm); DMC=diâmetro da colônia bacteriana (mensurado em cm). O diâmetro foi aferido com régua graduada.

Os dados serão submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram analisadas a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (Cruz, 2013).

Neste experimento para cada isolado foram cultivadas 3 placas distintas (repetições), onde cada uma delas foi dividida em quatro partes, e cada quadrante da placa foi inoculado, totalizando doze repetições por isolado.

Dos resultados das análises qualitativas foi escolhido o isolado UFPRENII36 classificado como *Bacillus velezensis* com o maior potencial enzimático para a caracterização do mecanismo de solubilização de K por métodos quantitativos.

2.2. Avaliações Quantitativas De Parâmetros Enzimáticos

2.2.1. Preparo do inóculo de *Bacillus velezensis*

Para o preparo do inóculo, uma colônia de *Bacillus velezensis* (UFPRENII36) foi transferida para a solução contendo 15 mL de meio Alessandrov sem fonte de K líquido em tubo Falcon de 50 mL mantido a temperatura ambiente em uma incubadora do tipo Shaker a 120 rpm, overnight. Decorrido este tempo, foi realizada a inoculação da bactéria em erlenmeyers de 125 mL contendo 45 mL de meio Alessandrov com diferentes fontes de K.

2.2.2. Crescimento bacteriano em meio Aleksandrov com adição de diferentes fontes de potássio (mineral e solúvel)

Erlenmeyers (125 mL) foram preparados com o meio Aleksandrov modificado (item 2.1.2), com 3g.L⁻¹ das seguintes fontes de K : Pó de rocha (4% K₂O) (Dacito- Fórmula Anexo I), Silicato de Potássio (14,5% de K₂O) (Fórmula SiO₂ + K₂O - Diatom™), sem fonte de potássio (controle negativo de K) e com meio mas sem bactéria (controle negativo da bactéria). Foi adicionado do inóculo (item 2.2.1), 1 mL em cada frasco tampado com trouxinha de algodão e gases dispostos em um agitador orbital a 120 rpm em temperatura ambiente. O crescimento bacteriano e os parâmetros quantitativos foram avaliados no período de 0(1h),3,6,9,15,18 e 20 dias, os tratamentos obedeceram a um delineamento casualizado com 3 repetições para cada período de avaliação. Cada Erlenmeyer foi usado para uma determinação: produção de ácidos orgânicos, solubilização de K e curva de crescimento/glicose (poder redutor). Nestas, foram usadas 3 repetições técnicas, isto é, de cada Erlenmeyer retirou-se 3 amostras para as determinações.

2.2.3. Quantificação da glicose presente no meio de cultura

Foi usado o método indireto de quantificação da glicose através da análise do poder redutor de carboidratos, usando o método de Somogy-Nelson (Somogy, 1945 e Nelson, 1944). As amostras

previamente obtidas foram descongeladas, com 0,1 mL da amostra sendo transferido para um tubo falcon (15 mL) onde foi realizada a desproteinização e precipitação de proteínas. Para cada amostra, foram usados 3,5 mL de água destilada, 0,2 mL Hidróxido de Bário (BaOH_2) ($0,3 \text{ mL} \cdot 0\text{L}^{-1}$) por 5 min e em seguida foi adicionado 0,2 mL de sulfato de zinco (Zn_2SO_4) a 5%, as soluções foram agitadas e centrifugadas a 2500 rpm por 10 min. Decorrido este tempo, 0,1 mL do sobrenadante foi acrescido com 0,9 mL de água destilada. Nesta solução, foi adicionado 0,5 mL do reativo Somogyi, e após a agitação, o tubo falcon foi colocado em um banho fervente por 10 min que foi resfriado em temperatura ambiente. Em seguida, acrescentado 0,5 mL do reativo de Nelson e 3mL de água destilada. As amostras foram em seguida submetidas à leitura no espectrofotômetro a 540nm, permitindo a quantificação dos teores de açúcares redutores no meio de cultivo das amostras. Os resultados foram ajustados para a diluição de 400x.

2.2.4. Avaliação da Produção de Ácidos Orgânicos

Foi usada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que permite identificar e quantificar os principais ácidos excretados pelos isolados (Chen et al., 2022; Etesami et al., 2017). Foram quantificados os seguintes ácidos no meio de cultura: o ácido cítrico, DL-málico, láctico e acético. As coletas para as análises foram feitas apenas nos dias 3, 9 e 20 dias tendo em vista apresentarem os limites mínimos de quantificação pelo método de análise e equipamento.

Os diferentes tratamentos em seus respectivos meios de cultivo (erlenmeyers) foram abertos em fluxo laminar e o seu conteúdo foi vertido em um falcon de 50 mL e submetidas à centrifugação (13000 rpm, 10 min). O sobrenadante (cerca de 5 mL), foi filtrado em filtro AC (acetato de celulose-0,22 μm) e, à esta solução foi acrescido ácido fosfórico 1:1 (5 μL) para baixar o pH. Após, as amostras alíquotadas (triplicata) e as mesmas foram acondicionadas em um vial (1,5 mL) para serem lidas no equipamento (20 μL).

Como preparação do equipamento para as leituras, inicialmente, a fase móvel foi estabilizada utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4) e água ultrapura. A solução foi filtrada e desgaseificada por 45 min em um banho de ultrassom. Em seguida, foram preparadas soluções estoque individuais de cada um dos ácidos com concentração de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Para identificar o tempo de retenção de cada ácido orgânico no cromatógrafo, foi utilizado um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ em uma coluna C18 com tempo de corrida de 25 min.

2.2.5. Análises de quantificação de K pelo método de espectrofotometria

A quantificação do K solubilizado por culturas bacterianas será realizada por meio de um método espectrofotométrico baseado na precipitação do potássio utilizando cobaltonitrito de sódio. Segundo protocolo proposto por (Vikram et al., 2014). Primeiramente, foi preparada uma solução de cobalto nitrito de sódio ($\text{CoN}_6\text{Na}_3\text{O}_{12}$) a 12,5%, seguida de filtração. Em paralelo, foi preparada uma solução padrão de cloreto de potássio (KCl) com concentração de 400 ppm, a qual servirá como fonte de potássio (curva de calibração). Para a quantificação das amostras oriundas dos 4 tratamentos (Pó de rocha, Silicato de K,

Controle sem fonte de K e controle sem bactéria) foi usada a proporção 1:1 (amostra / $\text{CoN}_6\text{Na}_3\text{O}_{12}$). A reação foi incubada a 37 °C por 45 min para permitir a completa precipitação do complexo potássio-cobaltonitrito. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 min, permitindo a separação do precipitado do sobrenadante. O precipitado foi lavado 2 vezes com água destilada e uma vez com etanol absoluto. O etanol foi evaporado em banho fervente até a completa secagem do precipitado. Em seguida, foi adicionado ao precipitado 1 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl), com nova incubação a 37 °C por 15 min para o desenvolvimento da coloração.

A intensidade da cor azul-esverdeada formada, atribuída à formação de complexos de cobalto em meio ácido, foi medido por espectrofotometria a 623 nm. A concentração de K nas amostras foi determinada com base em uma curva padrão previamente construída com soluções conhecidas de KCl, conforme (Gundala et al., 2013).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização molecular

Baseado no sequenciamento do gene 16S ribossomal, 11 isolados (79%) foram classificados como pertencentes ao filo Bacillota (*Bacillus*, *Brevibacillus* e *Calidifontibacillus*); 2 isolados (14%) pertencem ao filo Actinomycetota (*Microbacterium*) e 1 isolado (7%) ao filo Pseudomonadota (*Burkholderia cepacea*). Essa análise apresentou valores de identidade variando entre 83,18% e 98,60%, sendo o isolado UFPRBD28 o que apresentou a menor identidade e o isolado UFPRCA10, o maior valor (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação taxonômica provável de isolados usados neste trabalho

Isolado	Nome científico	E-value	Identidade (%)	Tamanho	Acesso no Genbank
UFPRBD20	<i>Microbacterium mangrovi</i>	0.0	93,67	1463	NR_026468.1
UFPRBD22	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	0	93,09	1486	NR_112212.1
UFPRBD28	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	6,00E ⁻⁷⁶	83,18	1463	NR_026468.1
UFPRCA03	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	95,28	1545	NR_118996.1
UFPRCA05	<i>Bacillus subtilis</i>	0	93,19	1550	NR_102783.2
UFPRCA08	<i>Bacillus haynesii</i>	1,00E ⁻¹⁴⁹	98,05	1508	NR_157609.1
UFPRCA10	<i>Bacillus subtilis</i>	1,00E ⁻¹⁷⁹	98,60	1550	NR_112116.2
UFPRCA12	<i>Bacillus velezensis</i>	0	90,50	1550	NR_075005.2
UFPRCA48	<i>Burkholderia cepacia</i>	0	94,16	1458	NR_113645.1
UFPRCA125	<i>Brevibacillus composti</i>	0	89,47	1525	NR_181713.1
UFPRCA131	<i>Bacillus velezensis</i>	0	86,75	1550	NR_075005.2
UFPRENI36	<i>Bacillus velezensis</i>	2,00E ⁻¹⁶²	98,47	1550	NR_075005.2
UFPRENI105	<i>Bacillus velezensis</i>	0	91,95	1445	NR_116240.1

UFPRENI135	<i>Calidifontibacillus erzurumensis</i>	0	94,23	1401	NR_180225.1
------------	---	---	-------	------	-------------

Tamanho: tamanho da sequência em pb. E-Value: probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas sequências. Identidade: porcentagem de identidade entre a sequência do isolado e o organismo relacionado. Acesso no GenBank: número de acesso da sequência do organismo relacionado.

Os resultados filogenéticos demonstram grupos monofiléticos (*Brevibacillus* e *Microbacterium*) e grupo polifilético para o gênero *Bacillus*, apontando para uma maior diversidade genética deste último grupo, embora alguns isolados foram classificados como de mesma espécie (Figura 1).

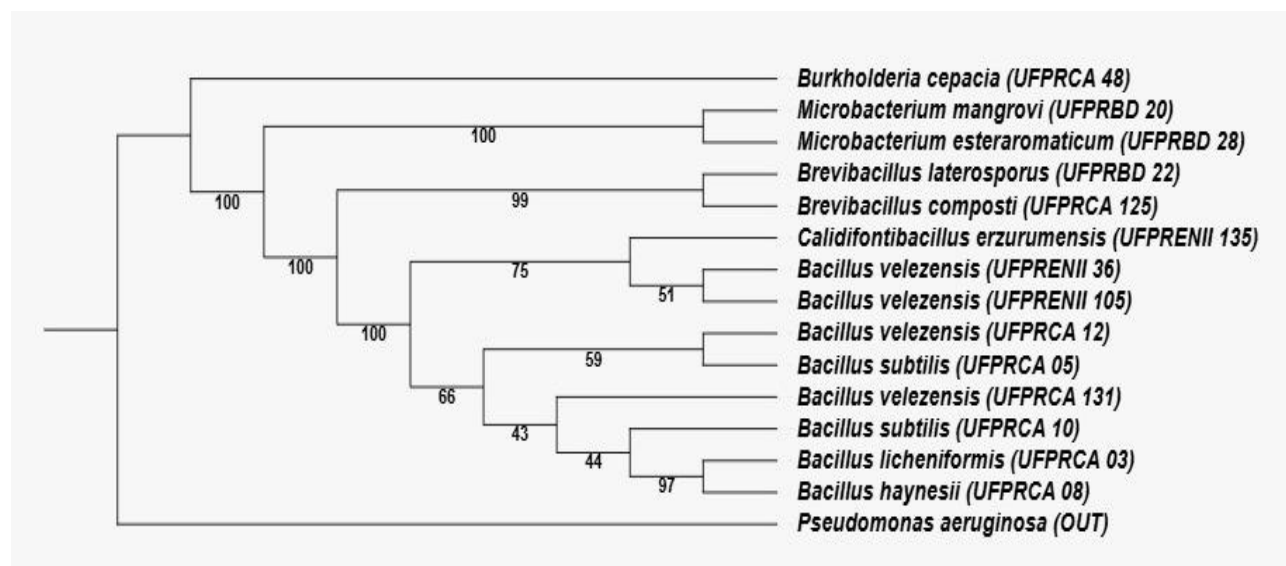


Figura 1. Dendrograma de similaridade dos isolados usados neste trabalho pertencentes às coleções de bactérias endofíticas (UFPREN), cama de aviário (UFPRCA) e biodigestor (UFPRBD) do Labiogen. Os números em cada forquilha representam os valores de Bootstrap.

Diante dos resultados obtidos, foram escolhidos para a caracterização enzimática, apenas 4 isolados, tendo em vista o potencial enzimático do gênero *Bacillus* (isolados UFPRCA08, UFPRENI36 e UFPRENI105) e *Brevibacillus* (isolado UFPRBD22) (Herrmann et al., 2024, Panda et al., 2014).

3.2. Avaliação da capacidade enzimática por métodos qualitativos

Os isolados avaliados tiveram performances distintas quanto à capacidade enzimática (Figura 2). Os isolados do gênero *Bacillus* (*velezensis* e *haynesii*) foram as que apresentaram maiores capacidades de solubilização para a produção de diferentes enzimas como a protease (8,49 - 10,37), amilase (1,97 - 3,29), caseinase (2,01 - 2,72), celulase (2,02 - 2,67) e lipase (0 - 4,38). Também foi o gênero que apresentou maior capacidade de solubilização de K oriundo de pó de rocha (11,45 - 12,43). Apenas o isolado UFPRENI36 foi o que apresentou uma forte solubilização de K provido do silicato de potássio ($4,22 \pm 2,0$). O isolado UFPRBD22 (*Brevibacillus laterosporus*) apresentou apenas a capacidade de solubilizar proteínas ($7,2 \pm 2,82$) e solubilização de K na forma de pó de rocha ($6,43 \pm 1,0$), 50% menor que a

capacidade apresentada pelo gênero *Bacillus*. Nenhum dos isolados apresentou capacidade de solubilização de Fósforo.

No conjunto de dados obtidos destaca-se o isolado UFPRENI36 (*Bacillus velezensis*) que apresentou os melhores índices de solubilização de K nas 2 formas usadas (Pó de rocha e silicato de potássio): IE de 11,45 e 4,22, respectivamente. Por isso, esta espécie/isolado foi usada nos ensaios para caracterização quantitativa do modo de solubilização deste mineral.

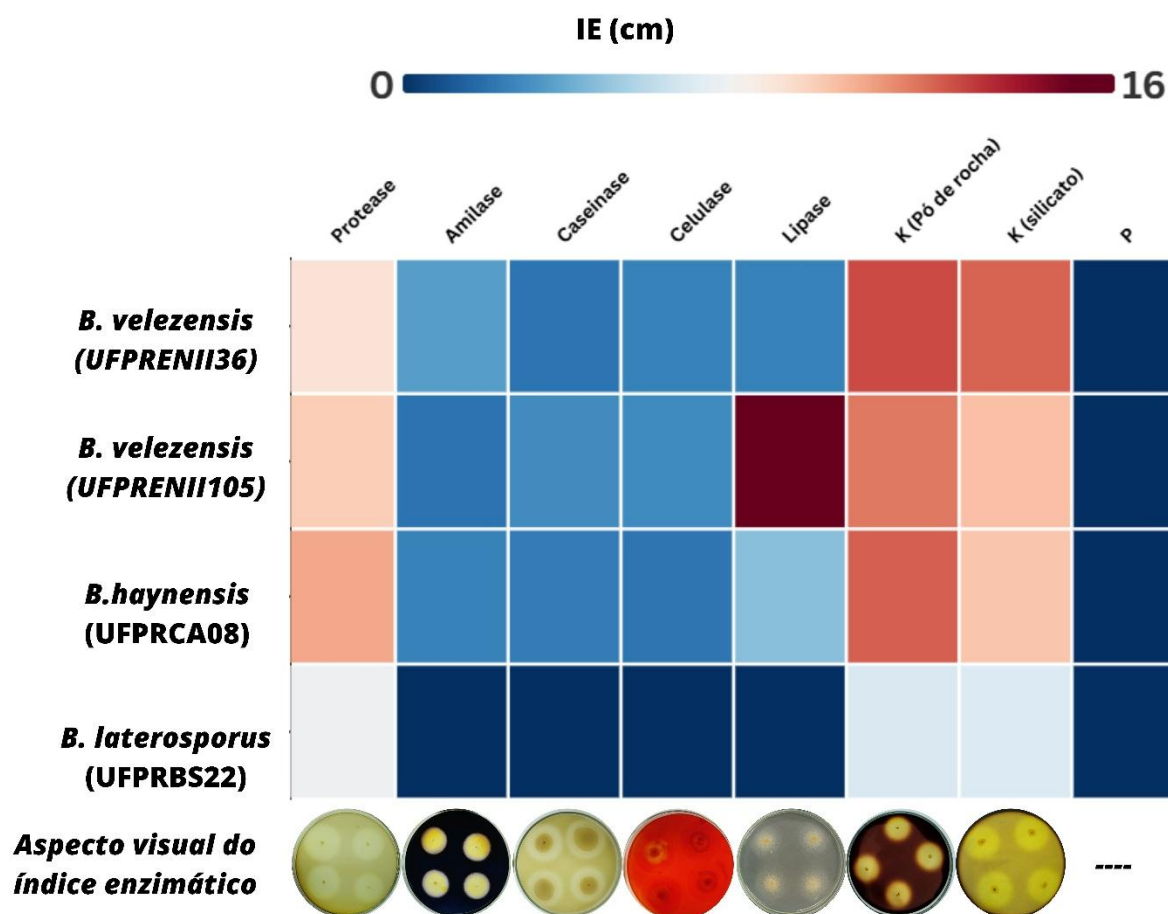


Figura 2. Atividade enzimática, capacidade de solubilização de K em duas formas :Pó de Rocha e Silicato de Potássio e aspecto visual das Placas de Petri demonstrando os halos de solubilização. Escala do Heatmap: A cor azul demonstra baixo poder de solubilização e cor vermelha escura, alto poder de solubilização. (n=12)

3.3. Avaliações Quantitativas De Parâmetros Enzimáticos

3.3.1. Curva de crescimento e poder redutor

No ensaio realizado para se determinar o potencial de solubilização de K pelo isolado UFPRENI36, primeiramente foi a construção da curva de crescimento da bactéria em um período de 20 dias em meio contendo formas complexada de K (Pó de rocha) e livre (silicato de Potássio) para verificar a fase log de crescimento da espécie *Bacillus velezensis*. Na figura 3, estão demonstrados os resultados

obtidos nos diferentes períodos e fontes de K avaliados. Observou-se que houve o crescimento bacteriano até os 20 dias de avaliação e foi considerado para comparação apenas o controle sem fonte de K. A forma livre de K (Silicato de K) no meio de cultivo gerou os menores índices de crescimento (4,5 a 5,5 log UFC). Com pó de rocha (forma complexada) apresentou as maiores UFC (6log UFC) até o 15º dia e o controle (meio sem forma disponível de K- meio Alessandrov) apresentou crescimento bacteriano intermediário (5log UFC) aumentando até o 20º dia (6,5 logUFC). Interessante observar que após o 18º dias, todos os tratamentos observaram um crescimento positivo até o 20º dia.

Em termos de UFC.mL⁻¹, os valores de controle variaram de 1,27.10⁵ (dia 0) e finalizou em 3,78.10⁶ no 20º dia. Quando a fonte suplementar de K foi o pó de rocha, a curva de crescimento iniciou em 1,87.10⁵ UFC.mL⁻¹ e finalizou aos 20º dias com 1,76.10⁶ UFC.mL⁻¹. A partir do 10º dia, a população cresceu 10x (10⁵ para 10⁶). O silicato de K no meio de cultura promoveu um crescimento médio constante (início da inoculação com 4.10⁴ UFC.mL⁻¹ e aos 20º dias com 6,8.10⁵ UFC.mL⁻¹) sendo que foi somente depois do 12º dia que a população cresceu 10x (10⁵ passando a ser 10⁶).

Os dados obtidos para a redução de açúcares (presença de glicose) demonstram que o meio, nos diferentes tratamentos, não esteve exaurido de fontes de glicose (o crescimento bacteriano apresentou no início da inoculação, no tratamento controle, 4 mg.mL⁻¹ e aos 20 dias com valores 3,45 mg.mL⁻¹. Os tratamentos com fonte complexada de K (Pó de rocha): apresentaram variação de 5,1 a 5,79 mg.mL⁻¹ e silicato de K de 3,6 a 4,42 mg.mL⁻¹ para 0 a 20º dias de avaliação, respectivamente. Interessante notar que o meio contendo Pó de rocha apresentou um pico (16 mg.mL⁻¹) aos 9 dias do período de crescimento, no entanto, não foi observada nenhum efeito sobre o crescimento ou fonte de glicose para as bactérias (figura 4).

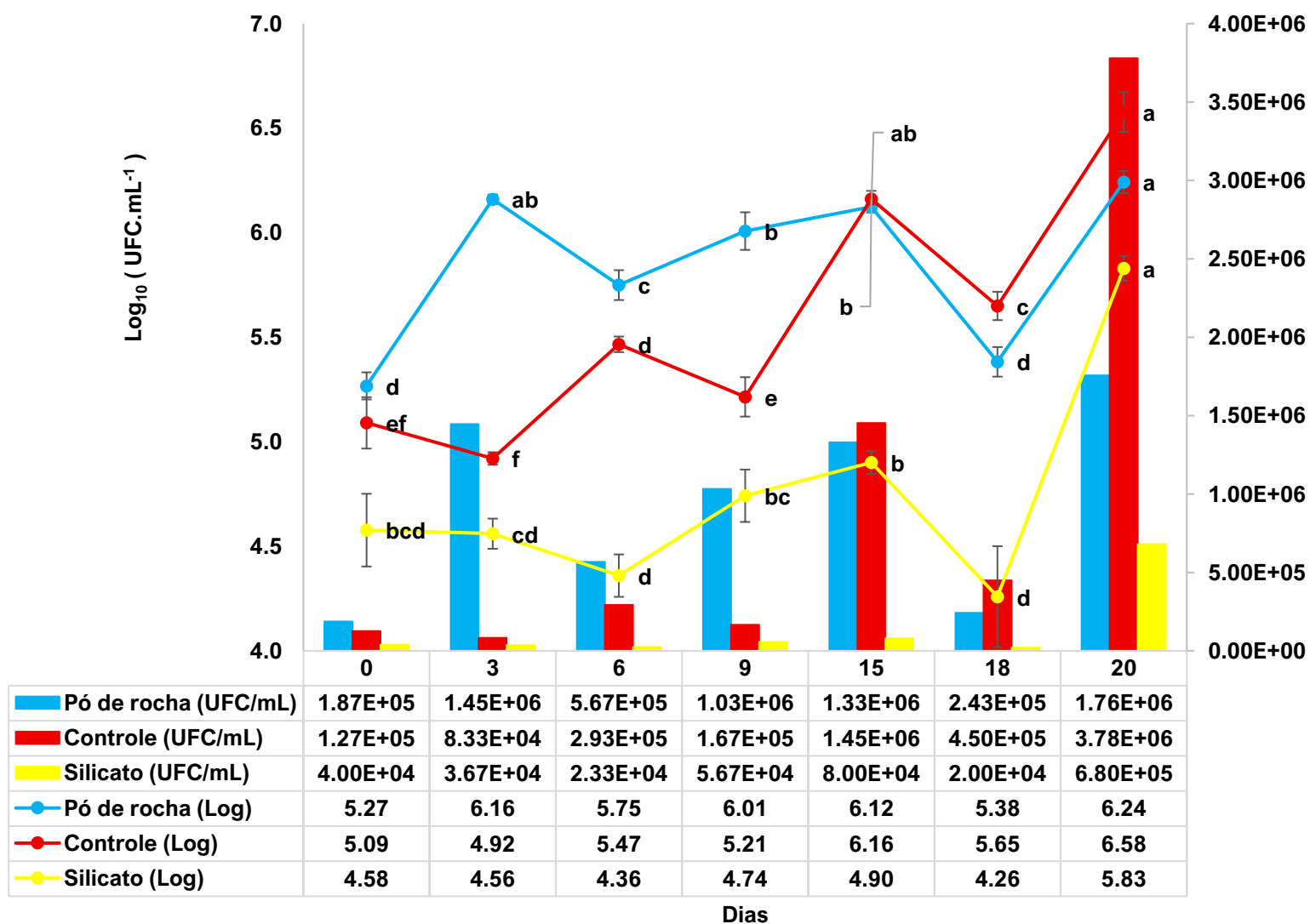


Figura 3. Crescimento bacteriano (*Bacillus velezensis*) nos diferentes períodos de avaliação e diferentes fontes de K aplicadas. Letras diferentes diferem estatisticamente nos diferentes períodos avaliados dentro da mesma fonte de K. (N= 3).

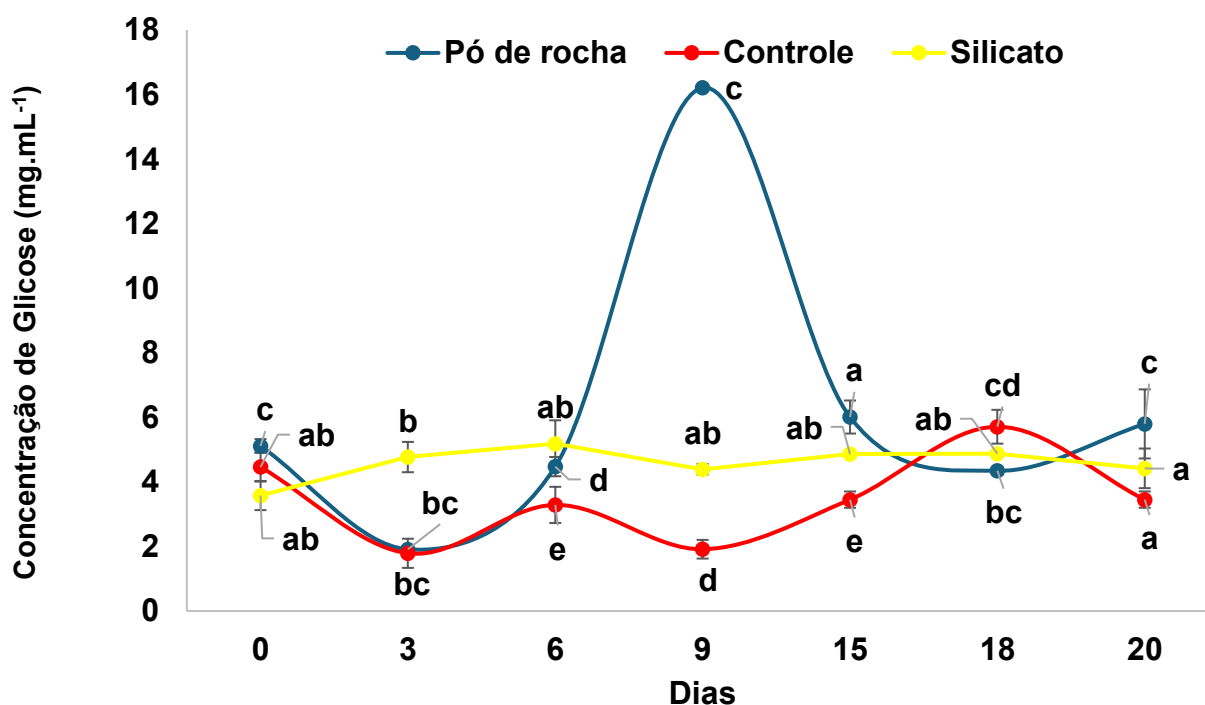


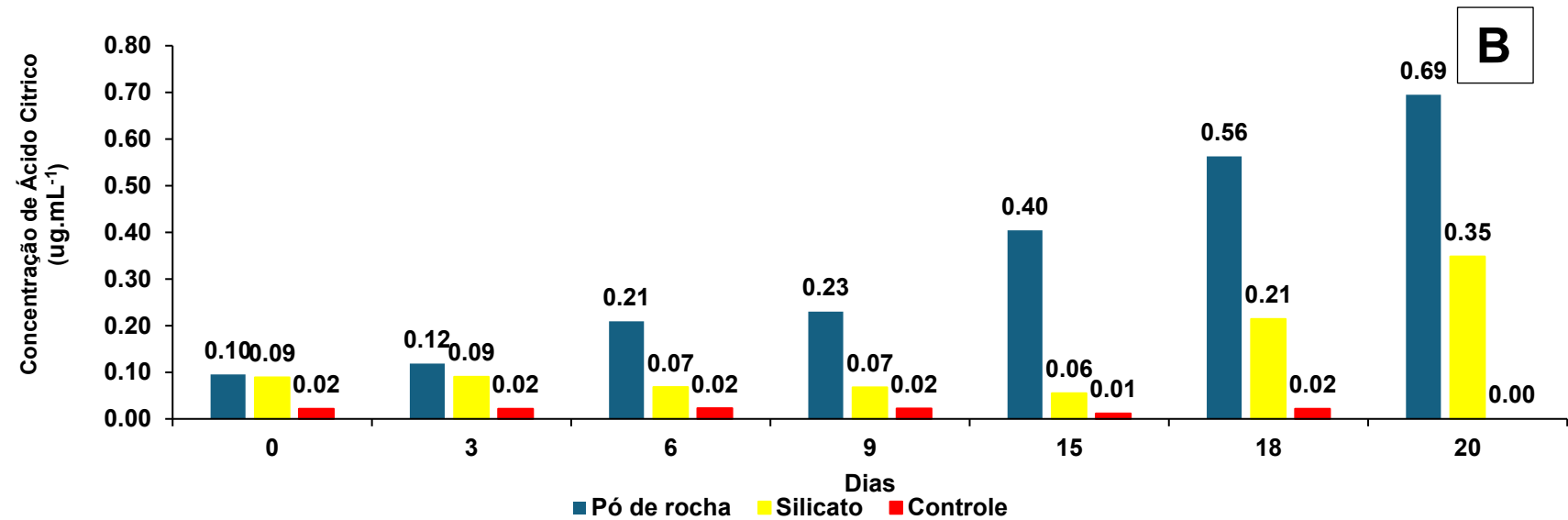
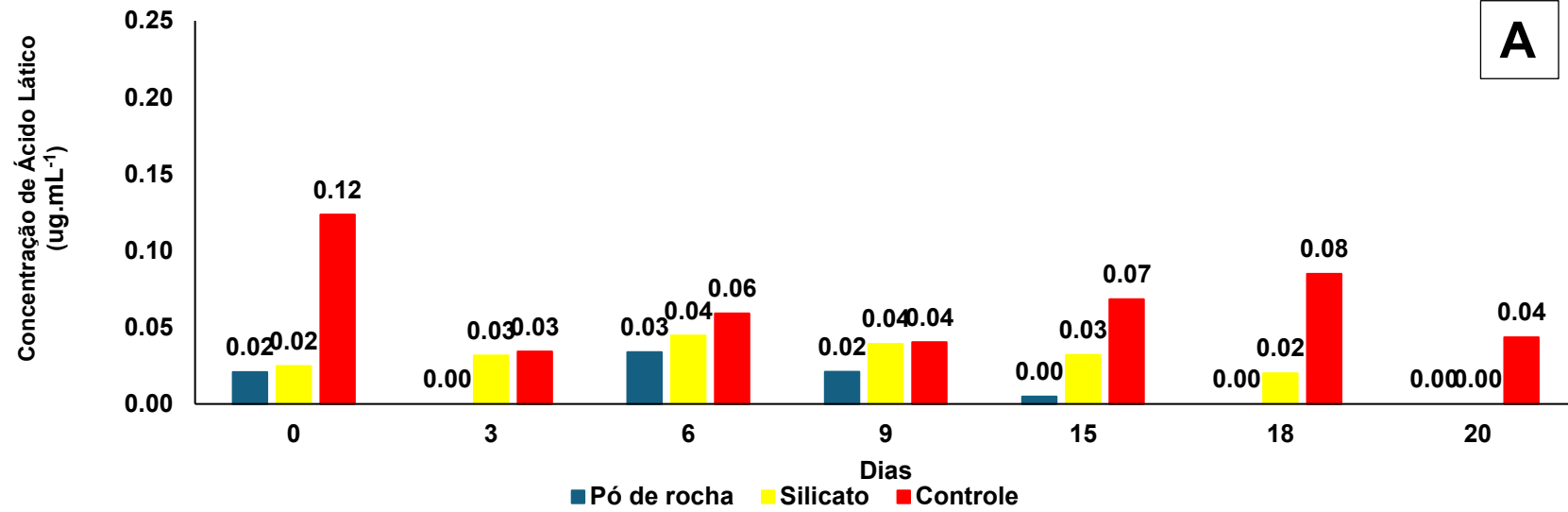
Figura 4. Quantificação do Poder Redutor (Presença de Glicose) no meio de cultivo bacterianos com diferentes fontes de K. Letras diferentes diferem estatisticamente nos diferentes períodos avaliados dentro da mesma fonte de K. (N= 3).

3.4. Avaliação da produção de diferentes ácidos solubilizadores pela *Bacillus velezensis*

Foram avaliados a produção de 4 ácidos: Lático, Acético, Cítrico e DL-málico. A presença de fontes de K diminuiu a produção de ácido lático nos diferentes períodos avaliados (Figura 5A) e o controle sem fonte de K mas com a presença da bactéria foi o tratamento com os maiores índices de produção, comprovando que não é o biossíntese de ácido lático, a principal via de solubilização por esta espécie bacteriana.

As fontes de K apresentaram diferenças significativas na produção de ácido cítrico nos diferentes períodos avaliados (Figura 5B). O pó de rocha, contendo K mineral foi a que promoveu as maiores concentrações de ácido cítrico (0,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ aos 20 dias de crescimento). O silicato de K (fonte mais solúvel de K) promoveu acréscimos menores na concentração de ácido cítrico, porém maiores que o controle sem fonte de K e com a presença de bactérias. A produção de ácido DL-málico apresentou picos (0,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de concentração no 18º dia, mas os valores foram maiores que os demais tratamentos também aos 3, 6, e 20 dias de crescimento quando a fonte de K foi o pó de rocha. A presença de silicato de K diminuiu a produção deste ácido na maioria dos períodos avaliados, sendo menores que o controle (sem fonte de K, mas com a inoculação da bactéria) como visto nos períodos de 6 e 15 dias de crescimento bacteriano (Figura 5C). De modo similar ao ácido lático, a produção de ácido acético pela *B. velezensis* parece ter sido prejudicada pela presença de fonte insolúvel de K, principalmente nos 3º e 6º dias de avaliação. A

presença de silicato de K ou só da bactéria promoveram os maiores incrementos na concentração deste ácido (6º, 18º e 20º dias de avaliação) porém os valores de concentração variaram de 0 – 0,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5D).



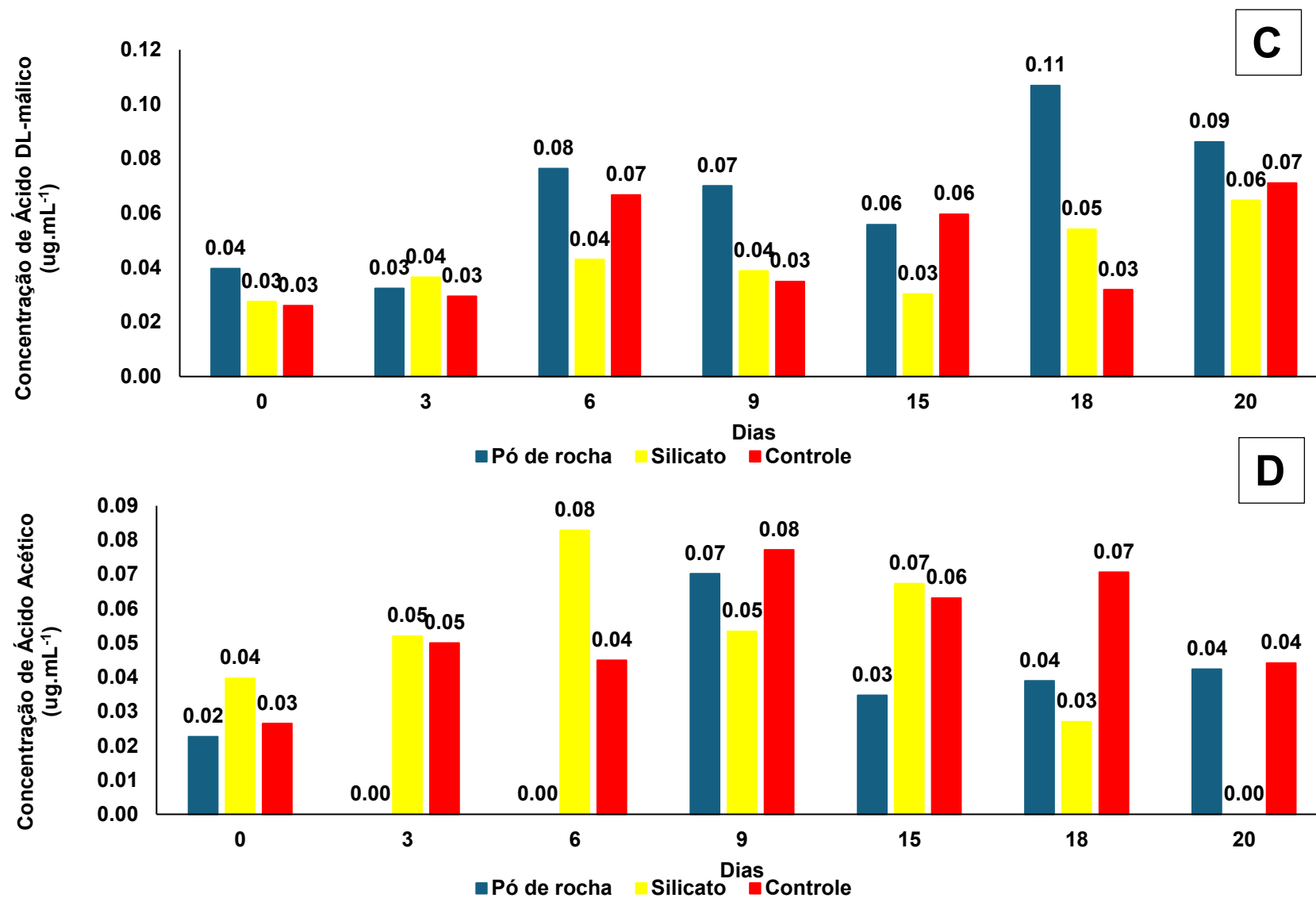


Figura 5. Concentração de ácidos orgânicos no meio de cultivo pela presença de diferentes fontes de K e inoculação com *B. velezensis*.
 A. Produção de Ácido Lático B. Produção de Ácido Cítrico C- Produção de Ácido Málico e D. Produção de Ácido Acético. (n=3).

3.5. Avaliação da concentração de K no meio de cultivo com *Bacillus velezensis*

A concentração de K quando a fonte -Pó de Rocha foi usada, decresceu á medida do tempo de avaliação. Os dados do controle (sem bactéria, mas com mineral), mostram que no início (tempo 0) a concentração de K disponível era 0. Os valores de K aumentaram com a presença da bactéria, alcançando os maiores valores (4,3 - 5,8 ppm) no maior tempo de avaliação (tabela 2).

Quando a fonte adicionada foi o silicato de K, os valores permaneceram similares, variando de 159 a 184 ppm, alcançado no último dia de avaliação. Estes resultados apontam para a pronta disponibilidade de K .

Como era esperado, os controles (sem bactéria e sem fonte de K), não apresentaram a presença de K no meio de cultivo, demonstrando a importância da *B. velezensis* no processo de solubilização de K a partir de fonte não disponibilizada.

Tabela 2. Resultados da quantificação da concentração de K no meio de cultivo com diferentes fontes de K e em diferentes períodos de cultivo bacteriano

Período de crescimento (dias)	Pó de Rocha	Silicato de Potássio	Controle (sem Fonte)	Pó de rocha (sem bactéria)
Concentração de K (ppm)				
0	0,0 ± 0,000 e	166,9 ± 13,34 ab	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
3	2,9 ± 0,41 cd	182,8 ± 3,20 a	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
6	0,0 ± 0,00 e	173,9 ± 13,33 ab	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
9	1,7 ± 0,84 cde	159,1 ± 12,14 b	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
15	0,5 ± 0,27 de	178,5 ± 3,69 ab	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
18	5,8 ± 2,22 a	179,2 ± 3,69 ab	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
20	4,3 ± 1,52 bc	184,0 ± 2,89 a	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

ppm = parte por milhão.

4. DISCUSSÃO

A bioprospecção, ou a identificação, avaliação e exploração sistemáticas da diversidade microbiana tem se tornado prática fundamental para o desenvolvimento da biotecnologia e criação de novos produtos. Os microrganismos (especialmente bactérias e fungos) podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos antibióticos, enzimas, fontes de alimentos e fontes de energia, todos de interesse industrial principalmente nas áreas agrícola, nutracêutica, farmacêutica, biomédica e bioenergética com o desenvolvimento de abordagens mais sustentáveis (Aware e Jadhav, 2022, Díaz-Rodríguez et al., 2024).

O primeiro passo é o isolamento e screening da capacidade enzimática e solubilizadora principalmente para bactérias com potencial para compor bioinoculantes agrícolas. Dos 14 isolados previamente escolhidos para este trabalho, foram usados apenas 4 para as análises qualitativas de produção de enzimas hidrolíticas de diferentes substratos. Isto se deve ao fato de que 79% dos isolados pertenciam ao gênero *Bacillus* (Figura 1/Tabela1), gênero conhecido por sua capacidade hidrolisadora (Ren et al., 2022).

A análise de enzimas hidrolíticas serve para caracterizar a versatilidade metabólica dos microrganismos. As enzimas como amilase, celulase, protease, caseinase e lipase estão envolvidas na degradação de compostos orgânicos fibrosos complexos do solo, contribuindo para a ciclagem de nutrientes e promoção do crescimento vegetal (Jussara et al., 2006) além de poder controlar patógenos aumentando a sanidade vegetal. Quanto maior a capacidade hidrolítica de uma espécie bacteriana, maior será a sua importância no reaproveitamento de recursos naturais como biofertilizantes agrícolas (cama de aviário, torta vegetal, insumos orgânicos, chorume, etc) (Luo et al., 2017, Wilkerson e Olapade, 2020).

Os resultados obtidos demonstram uma maior capacidade enzimática do gênero *Bacillus* em relação a *Brevibacillus laterosporus*. O gênero *Bacillus* é conhecido como de grande potencial hidrolítico (Barros et al., 2013, Srivastava et al., 2023). Embora *B. laterosporus* não tenha apresentado atividade para a maioria das enzimas avaliadas em nosso estudo, foi relatado na literatura a atividade deste gênero para caseinase e α -amilase (Battisti et al., 2024, Yao et al., 2022). Notavelmente, isolados do mesmo gênero nem sempre apresentaram os mesmos perfis enzimáticos (Figura 1) como é o caso das duas estirpes *B. velezensis*, principalmente para a lipase. Essa variação pode ser devida ao ganho ou perda de genes via transferência horizontal de genes, o que supostamente contribui para a plasticidade do genoma bacteriano (Lee et al., 2022).

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 et al., 2016). Na solubilização e mineralização de nutrientes essenciais para as plantas, as bactérias solubilizadoras de K (BSP) possuem como principal mecanismo de solubilização, a acidificação do pH do solo, principalmente pela produção de ácidos orgânicos, produtos da respiração celular e da via glicolítica (Alves et al., 2021, Etesami et al., 2017, T. Nikitha et al., 2017, Yaghoubi Khanghahi et al., 2018). Além do mecanismo de acidificação do solo, os ácidos orgânicos produzidos pela BSP podem liberar íons K do mineral por quelatação (formação do complexo) Si^{4+} , íons Al^{3+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} associados aos minerais (Meena et al., 2016).

Bacillus velezensis é uma bactéria aeróbica, gram-positiva, formadora de esporos (Rabbee et al., 2019). Na literatura, diversos autores relataram o potencial enzimático, solubilizador e promotor de crescimento vegetal da espécie *Bacillus velezensis*. (Srivastava et al., 2023) demonstraram a capacidade

desta espécie em hidrolizar polissacarídeos pela oxidação aumentando a disponibilidade de nutrientes para as plantas. A análise genômica revelou que *B. velezensis* possui grupos de genes específicos em diferentes estirpes, relacionados à biossíntese de metabólitos secundários, que desempenham papéis significativos tanto na supressão de patógenos quanto na promoção do crescimento vegetal (Ercole et al., 2024, Su et al., 2024). Mais especificamente, *B. velezensis* exibe alta capacidade genética para sintetizar lipopeptídeos cíclicos (por exemplo, surfactina, bacilomicina-D, fenicicina e bacilibactina) e policetídeos (por exemplo, macrolactina, bacileno e difficidina) responsáveis pelo controle de patógenos (Rabbee et al., 2019) e solubilização de P (Mosela et al., 2022). Embora nas avaliações realizadas neste trabalho, nenhum isolado apresentou solubilização de P, todavia os resultados apontam para uma média a alta capacidade de solubilização de K pelos isolados da espécie *Bacillus velezensis* (Wita et al., 2025).

Os resultados da curva de crescimento e concentração de glicose demonstram um crescimento bacteriano vigoroso até 20º dia de avaliação, o que permite concluir que o meio não estava exaurido em relação à fonte energética. A população bacteriana de *B. velezensis* apresentou um pico de crescimento aos 15 dias e aos 20 dias, independente da fonte de K usada. Quando no meio de cultivo foi usado o silicato de K., a população bacteriana apresentou uma diminuição de 10x (10^4 UFC.mL⁻¹) em relação ao controle e ao pó de rocha. Como possível explicação para este fenômeno seria a presença de outros compostos na formulação do silicato que seriam tóxicos às bactérias, porém, estudos posteriores deverão ser conduzidos para comprovação.

Na literatura diversos autores relataram uma grande variedade de ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias solubilizadoras liberando o K dos minerais onde o K está complexado numa forma indisponível à solução do solo. Entre os ácidos citados estão: oxálico, tartárico, glucônico, 2-cetogluconico, cítrico, málico, succínico, láctico, propiônico, glicólico, malônico, fumárico (Ahmad et al., 2016, Etesami et al., 2017, Gundala et al., 2013). O papel do ácido seria de acidificação do meio, com a liberação de prótons (H⁺), que diminuiriam o pH do ambiente ao redor dos minerais, desestabilizando a estrutura cristalina dos minerais que contêm K, facilitando a liberação do íon K⁺ para a solução do solo. Outro mecanismo, seria a quelatação de cátions onde alguns ácidos orgânicos formam complexos com íons metálicos (como Fe³⁺, Al³⁺ e Ca²⁺) que estão associados aos minerais, o que romperia as ligações entre o potássio e os minerais, promovendo a sua liberação (Babar et al., 2024, Olaniyan et al., 2022).

Neste trabalho foram avaliados apenas a presença de 4 ácidos: cítrico, acético, láctico e málico. Como resultados obtidos, foi observado que o ácido com as maiores concentrações foi o ácido cítrico sendo acumulado com o maior tempo de cultivo bacteriano. A fonte de K também influenciou com os maiores incrementos na presença de fonte insolúvel de K (pó de rocha). Por outro lado, a presença de silicato de K (fonte solúvel) promoveu os maiores incrementos na concentração deste ácido acético apesar de serem aproximadamente 10x menores (0,06 ug.mL⁻¹) que à concentração de ácido cítrico (0,7 ug.mL⁻¹).

¹⁾ (Figura 5). (C. Zhang & Kong, 2014) afirmam que a produção de ácido acético, seria relevante para a solubilização de minerais e regulação do pH no ambiente ao redor das raízes.

(Pereira et al., 2019) observaram que a presença de ácido cítrico conseguiu extrair 2.3 % da concentração total de K na forma mineral (rocha do tipo Glaucionita) se tornando uma forma disponível de K de longa duração nos solos. A presença de ácido cítrico (2%) promoveu as maiores concentrações de K solubilizado na rocha sienito nefelínico (também nefelina sienito), rocha da classe dos feldspatos (rica em K complexado) (Pessoa et al., 2015).

Os dados obtidos nesse experimento para fonte solúvel (silicato de K) variaram de 159 a 184 ppm. Embora, não seja possível a comparação pela fonte de K ser aluminosilicato de K, os valores foram muito maiores do que os obtidos por (Vikram et al., 2014). Estes autores avaliaram diferentes espécies de *Bacillus* e relataram valores de K solubilizado pelo método de cobaltonitrato variando entre 42,4 a 77,4 ppm de K (*Bacillus firmus* e *cereus*, respectivamente) tendo como concentração da fonte disponível de K, 2 g.L⁻¹.

Os dados obtidos para a concentração de K no meio de cultivo (Tabela 2) em conjunto com os dados da produção de ácidos orgânicos pela espécie *B.velezensis*, demonstram claramente que esta espécie tem uma grande capacidade de solubilizar K de fontes complexadas como o Pó de Rocha. Este dado corrobora os resultados encontrados método qualitativo de plaqueamento (Figura 2). O provável mecanismo de solubilização seria a acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos em especial o Ácido Cítrico e o Málico. Outro ponto é que a solubilização ocorreu ao longo do período avaliado, onde os maiores níveis foram obtidos a partir do 18º dia de avaliação.

5. CONCLUSÕES

Como conclusões foi observado que o gênero *Bacillus* apresenta um agrupamento polifilético, indicando uma variabilidade genômica entre os isolados selecionados neste trabalho. Entre os isolados testados, os pertencentes ao gênero *Bacillus*, especialmente *B. velezensis*, apresentaram os maiores índices de atividade enzimática para amilase, protease, caseinase, celulase e lipase, além da maior capacidade de solubilização de K em pó de rocha e silicato de K. A principal via observada para a solubilização de K foi a produção de ácidos orgânicos, especialmente ácido cítrico e DL-málico, com destaque para o papel do ácido cítrico na liberação de K a partir da fonte insolúvel (pó de rocha). Comprovando o mecanismo de acidificação como o proeminente usado pela *B. velezensis*. A produção de ácido láctico e acético foi menos relevante nesse processo. A fonte de potássio afetou tanto o crescimento bacteriano quanto a produção de ácidos. O pó de rocha (fonte complexada) promoveu maior liberação de K (5,83 ppm) aos 18 dias, enquanto o silicato de K resultou em concentrações bem maiores (184 ppm). Os resultados indicam que *B. velezensis* (UFPRENII36) possui potencial para uso como bioinoculante

agrícola, especialmente em estratégias de aproveitamento de fontes minerais naturais de K, contribuindo para práticas mais sustentáveis e redução do uso de fertilizantes químicos convencionais.

REFERÊNCIAS

- Abd-Elhalem, B. T., El-Sawy, M., Gamal, R. F., & Abou-Taleb, K. A. (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2015.06.001>
- Adwani, M. S., Pillai, T. S., Isokar, S., & Rokade, G. (2024). Evaluation and characterization of potassium solubilizing bacteria. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 8(5S), 245–248. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i5Sd.1174>
- Ahmad, M., Nadeem, S. M., Naveed, M., & Zahir, Z. A. (2016). Potassium-solubilizing bacteria and their application in agriculture. Em *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* (p. 293–313). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_21
- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Alves, V. M. C., Gomes, E. A., Resende, Á. V. de, Paiva, C. A. de O., Marriel, I. E., Sousa, S. M., & Lana, U. G. de. (2021). *Solubilização de potássio presente em minerais por microrganismos e efeitos no desenvolvimento de culturas agrícolas* (1º ed). Embrapa Milho e Sorgo.
- Aware, C., & Jadhav, J. (2022). Bioprospecting potential of microbes for the therapeutic application. Em *Bioprospecting of Microbial Diversity* (p. 223–255). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90958-7.00023-6>
- Babar, S., Baloch, A., Qasim, M., Wang, J., Wang, X., Li, Y., Khalid, S., & Jiang, C. (2024). Unearthing the soil-bacteria nexus to enhance potassium bioavailability for global sustainable agriculture: A mechanistic preview. *Microbiological Research*, 288, 127885. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127885>
- Barros, F. F. C., Simiqueli, A. P. R., de Andrade, C. J., & Pastore, G. M. (2013). Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/103960>
- Battisti, R., Junkerfuerbom, A., Machado, K. N., Mesa, D., Santos, M. F. dos, & Vendruscolo, E. C. G. (2024). Determination of biotechnological potential of poultry litter isolated bacteria. *Bioscience Journal*, 40, e40030. <https://doi.org/10.14393/BJ-v40n0a2024-69345>
- Chen, Y., Yang, H., Shen, Z., & Ye, J. (2022). Whole-Genome Sequencing and Potassium-Solubilizing Mechanism of *Bacillus aryabhattai* SK1-7. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722379>
- Cruz, C. D. (2013). GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(3). <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>

- Díaz-Rodríguez, A. M., Chávez-Luzanía, R. A., Rojas Anaya, E., & Villalobos, S. de los S. (2024). Bioprospection of beneficial bacteria for bioproducts innovation in agriculture. Em *New Insights, Trends, and Challenges in the Development and Applications of Microbial Inoculants in Agriculture* (p. 53–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18855-8.00006-0>
- Ercole, T. G., Kava, V. M., Petters-Vandresen, D. A. L., Nassif Gomes, M. E., Aluizio, R., Ribeiro, R. A., Hungria, M., & Galli, L. V. (2024). Unlocking the growth-promoting and antagonistic power: A comprehensive whole genome study on *Bacillus velezensis* strains. *Gene*, 927, 148669. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148669>
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017a). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects-a review. Em *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 17, Número 4).
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017b). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects-a review. Em *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 17, Número 4).
- Fei, Z., Xiafang, S., Zhi, H., & Linyan, H. (2008). Isolation of mineral potassium-solubilizing bacterial strains from agri-cultural soils in Shandong Province. *Biodiversity Science*, 16(6), 593. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1003.2008.08121>
- Gao, J., Xu, M., & Uwiringiyimana, E. (2025). Isolation of highly efficient potassium solubilizing bacteria and their effects on nutrient acquisition and growth promotion in tobacco seedlings. *BMC Plant Biology*, 25(1), 745. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06760-y>
- Gundala, P. B., Chinthala, P., & Sreenivasulu, B. (2013). A New Facultative Alkaliphilic, Potassium Solubilizing, *Bacillus* Sp. SVUNM9 Isolated from Mica Cores of Nellore District, Andhra Pradesh, India. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(1).
- Gundala, P., Chinthala, P., & Sreenivasulu, B. (2013). A new facultative alkaliphilic, potassium solubilizing, *Bacillus* Sp. SVUNM9 isolated from mica cores of Nellore District, Andhra Pradesh, India. *Research and Reviews. J Microbiol Biotechnol*, 2, 1–7.
- Herrmann, L. W., Letti, L. A. J., Penha, R. de O., Soccol, V. T., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. (2024). *Bacillus* genus industrial applications and innovation: First steps towards a circular bioeconomy. *Biotechnology Advances*, 70, 108300. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108300>
- IndexBox. (2024, outubro 7). *Brazil - Potassic Fertilizers (Mineral And Chemical) - Market Analysis, Forecast, Size, Trends and Insights Please mention the Source*. IndexBox.
- Jussara, A., Carrim, I., Barbosa, C., Daniel, J., & Vieira, G. (2006). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 353–359.
- Katoh, K., & Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 286–298. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn013>

- Lalitha, M., & Dhakshinamoorthy, M. (2014). Forms of soil potassium-A review. *Agricultural Reviews*, 35(1), 64. <https://doi.org/10.5958/j.0976-0741.35.1.008>
- Lee, I. P. A., Eldakar, O. T., Gogarten, J. P., & Andam, C. P. (2022). Bacterial cooperation through horizontal gene transfer. *Trends in Ecology & Evolution*, 37(3), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.11.006>
- Lima, L. A., Cruz Filho, R. F., Santos, J. G. dos, & Silva, W. C. (2014). Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. *Acta Amazonica*, 44(4), 403–410. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201305074>
- Luo, L., Meng, H., & Gu, J.-D. (2017). Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems. *Journal of Environmental Management*, 197, 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.023>
- Maciel, F. L., Souza, C. B. S. de, Vieira, C. B. R. C., Salbego, É. L. da S., Balzan, G. D., Ré, Í. Da, & Sávio, V. M. (2020). *Microrganismos com Potencial Biotecnológico* (A. M. dos S. Marques, Org.; 1º ed).
- Malik, W. A., & Javed, S. (2021). Biochemical Characterization of Cellulase From *Bacillus subtilis* Strain and its Effect on Digestibility and Structural Modifications of Lignocellulose Rich Biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.800265>
- Mazzucotelli, C. A., Ponce, A. G., Kotlar, C. E., & Moreira, M. del R. (2013). 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*, 33(2), 295–303. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000038>
- Meena, V. S., Bahadur, I., Maurya, B. R., Kumar, A., Meena, R. K., Meena, S. K., & Verma, J. P. (2016). Potassium-Solubilizing Microorganism in Evergreen Agriculture: An Overview. Em *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture* (p. 1–20). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_1
- Mosela, M., Andrade, G., Massucato, L. R., de Araújo Almeida, S. R., Nogueira, A. F., de Lima Filho, R. B., Zeffa, D. M., Mian, S., Higashi, A. Y., Shimizu, G. D., Teixeira, G. M., Branco, K. S., Faria, M. V., Giacomini, R. M., Scapim, C. A., & Gonçalves, L. S. A. (2022). *Bacillus velezensis* strain Ag75 as a new multifunctional agent for biocontrol, phosphate solubilization and growth promotion in maize and soybean crops. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19515-8>
- Nawaz, A., Qamar, Z. U., Marghoob, M. U., Imtiaz, M., Imran, A., & Mubeen, F. (2023). Contribution of potassium solubilizing bacteria in improved potassium assimilation and cytosolic K⁺/Na⁺ ratio in rice (*Oryza sativa* L.) under saline-sodic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1196024>
- Nelson, N. (1944). A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE. www.jbc.org

- Nylander, J. (2004). MrModeltest V2. Program Distributed by the Author. *Bioinformatics*, 24, 581–583.
- Olaniyan, F. T., Alori, E. T., Adekiya, A. O., Ayorinde, B. B., Daramola, F. Y., Osemwegie, O. O., & Babalola, O. O. (2022). The use of soil microbial potassium solubilizers in potassium nutrient availability in soil and its dynamics. *Annals of Microbiology*, 72(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01701-8>
- Oliveira, A. N. de, Oliveira, L. A. de, Andrade, J. S., & Chagas Júnior, A. F. (2006). Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 204–210. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100032>
- Orrico Júnior, M. A. P., Orrico, A. C. A., De, J., & Júnior, L. (2010). *COMPOSTAGEM DOS RESÍDUOS DA PRODUÇÃO AVÍCOLA: CAMA DE FRANGOS E CARCAÇAS DE AVES*.
- Panda, A. K., Bisht, S. S., DeMondal, S., Senthil Kumar, N., Gurusubramanian, G., & Panigrahi, A. K. (2014). *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 623–639. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0099-7>
- Pereira, A. C., Gomes, M. R. S., & Rocha, S. D. F. (2019). GLAUCONITA COMO FONTE ALTERNATIVA DE POTÁSSIO PARA PRODUÇÃO DE FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO LENTA. *Geonomos*, 32–37. <https://doi.org/10.18285/geonomos.v27i1.21851>
- Pessoa, R. S., Silva, C. A., Moretti, B. S., Furtini Neto, A. E., Inda, A. V., & Curi, N. (2015). SOLUBILIZATION OF POTASSIUM FROM ALTERNATIVE ROCKS BY HUMIC AND CITRIC ACIDS AND COFFEE HUSK. *Ciência e Agrotecnologia*, 39(6), 553–564. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000600002>
- Potassium Solubilizing Bacteria (KSB) A Viable Option For Sustainable Agriculture, 2 AGRIBLOSSOM 57 (2021). www.agriblossom.net
- Prajapati, K. (2012). THE IMPORTANCE OF POTASSIUM IN PLANT GROWTH – A REVIEW. *Indian Journal of Plant Sciences*, 1, 177–186.
- Prasada Babu Gundala. ([s.d.]).
- Rabbee, M. F., Ali, Md. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rajawat, M. V. S., Ansari, W. A., Singh, D., & Singh, R. (2019). Potassium Solubilizing Bacteria (KSB). Em *Microbial Interventions in Agriculture and Environment* (p. 189–209). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9084-6_9
- Raji, M., & Thangavelu, M. (2021). Isolation and screening of potassium solubilizing bacteria from saxicolous habitat and their impact on tomato growth in different soil types. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3147–3161. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02284-9>

- Ren, W., Li, P., Wang, X., Che, Y., Long, H., Zhang, X., Cai, X., Huang, A., Zeng, Y., & Xie, Z. (2022). Cross-habitat distribution pattern of *Bacillus* communities and their capacities of producing industrial hydrolytic enzymes in Paracel Islands: Habitat-dependent differential contributions of the environment. *Journal of Environmental Management*, 323, 116252. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116252>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Sharma, R., Sindhu, S. S., & Glick, B. R. (2024). Potassium Solubilizing Microorganisms as Potential Biofertilizer: A Sustainable Climate-Resilient Approach to Improve Soil Fertility and Crop Production in Agriculture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 43(8), 2503–2535. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11297-9>
- Somogy, M. (1945). Determination of blood sugar. *Journal Biological Chemistry*, 160, 69–73.
- Srivastava, S., Bombaywala, S., Jakhesara, S. J., Patil, N. V., Joshi, C. G., Purohit, H. J., & Dafale, N. A. (2023). Potential of camel rumen derived *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* strains for application in plant biomass hydrolysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 298(2), 361–374. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01987-y>
- Su, T., Shen, B., Hu, X., Teng, Y., Weng, P., Wu, Z., & Liu, L. (2024). Research advance of *Bacillus velezensis* : bioinformatics, characteristics, and applications. *Food Science and Human Wellness*, 13(4), 1756–1766. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250148>
- Sun, F., Ou, Q., Wang, N., Guo, Z. xuan, Ou, Y., Li, N., & Peng, C. (2020). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. *Global Ecology and Conservation*, 23, e01141. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01141>
- T. Nikitha, M. S., B. Sadhana, E. U. B. R., & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2133–2144. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Pierrat, J. C., Mustin, C., & Frey-Klett, P. (2007). 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*, 73(9), 3019–3027. <https://doi.org/10.1128/AEM.00121-07>
- Vikram, M., Rajawat, S., & Singh, S. (2014). A new spectrophotometric method for quantification of potassium solubilized by bacterial cultures. *Em Article in Indian Journal of Experimental Biology*. <https://www.researchgate.net/publication/261136890>

- Wilkerson, A., & Olapade, O. A. (2020). Relationships Between Organic Matter Contents and Bacterial Hydrolytic Enzyme Activities in Soils: Comparisons Between Seasons. *Current Microbiology*, 77(12), 3937–3944. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02223-9>
- Wita, A., Biataś, W., Czaczyk, K., Drożdżyńska, A., Sobiech, Ł., Grzanka, M., Danielewicz, J., Jajor, E., Horoszkiewicz, J., & Marecik, R. (2025). Biocontrol of *Cercospora* leaf spot in sugar beet by a novel *Bacillus velezensis* KT27 strain: Enhanced antifungal activity and growth promotion in laboratory and field conditions. *PLOS One*, 20(5), e0323889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0323889>
- Yaghoubi Khanghahi, M., Pirdashti, H., Rahimian, H., Nematzadeh, G., & Ghajar Sepanlou, M. (2018). Potassium solubilising bacteria (KSB) isolated from rice paddy soil: from isolation, identification to K use efficiency. *Symbiosis*, 76(1), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0533-0>
- Yao, D., Zhang, K., Zhu, X., Su, L., & Wu, J. (2022). Enhanced extracellular α -amylase production in *Brevibacillus choshinensis* by optimizing extracellular degradation and folding environment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(1). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab061>
- Zhang, C., & Kong, F. (2014). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*, 82, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.002>
- Zhang, D., Gao, F., Jakovlić, I., Zou, H., Zhang, J., Li, W. X., & Wang, G. T. (2020). PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Molecular Ecology Resources*, 20(1), 348–355. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13096>

ANEXO 1

Composição química, por espectrometria de fluorescência de raios X e análises de tamanho de partículas por peneiramento do pó de rocha usado no experimento.

Óxidos	Pó de rocha
SiO ₂ (%)	67,86
Al ₂ O ₃ (%)	12,83
Fe ₂ O ₃ (%)	6,41
CaO (%)	3,17
MgO (%)	0,81
K ₂ O (%)	4,23
Na ₂ O (%)	2,71
TiO ₂ (%)	0,86
MnO (%)	0,11
P ₂ O ₅ (%)	0,22
LOI (%)	0,56
Soma	99,76
Abertura	Contém (%)
2,00	0,0
0,85	22,6
0,30	45,6
< 0,30	31,8