

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA

**EFICIÊNCIA DO SISTEMA HIDROPÔNICO COMO
METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE CEPAS
SOLUBILIZADORAS DE CaHPO_4 , UTILIZANDO
GLYCINE MAX COMO MODELO**

Autor: Mateus Neri Oliveira Reis
Orientadora: Profa. Dra. Layara Alexandre Bessa

Rio Verde - GO
Agosto – 2021

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA

**EFICIÊNCIA DO SISTEMA HIDROPÔNICO COMO
METODOLOGIA PARA A SELEÇÃO DE CEPAS
SOLUBILIZADORAS DE CaHPO_4 , UTILIZANDO
GLYCINE MAX COMO MODELO**

Autor: Mateus Neri Oliveira Reis
Orientadora: Profa. Dra. Layara Alexandre Bessa

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia, ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Área de concentração fisiologia, bioquímica e pós-colheita de produtos vegetais.

Rio Verde - GO
Agosto - 2021

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

NR375e Neri Oliveira Reis, Mateus
EFICIÊNCIA DO SISTEMA HIDROPÔNICO COMO METODOLOGIA
PARA A SELEÇÃO DE CEPAS SOLUBILIZADORAS DE CaHPO_4 ,
UTILIZANDO GLYCINE MAX COMO MODELO / Mateus Neri
Oliveira Reis; orientadora Layara Alexandre Bessa;
co-orientadora Luciana Cristina Vitorino. -- Rio
Verde, 2021.
73 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias -
Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2021.

1. Fungos. 2. Bactérias. 3. Fósforo. 4. Micro-
organismos. 5. Nutrientes. I. Alexandre Bessa,
Layara, orient. II. Cristina Vitorino, Luciana, co-
orient. III. Título.



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor:
Matrícula:
Título do Trabalho:

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: O arquivo precisa ficar como documento confidencial devido a ser publicado em um periódico de alto fator de impacto.

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01/02/2024

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 28/09/2021.
Local Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 85/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**EFICIÊNCIA DO SISTEMA HIDROPÔNICO COMO METODOLOGIA PARA A
SELEÇÃO DE CEPAS SOLUBILIZADORAS DE CaHPO_4 , UTILIZANDO *GLYCINE
MAX* COMO MODELO.**

Autor: Mateus Neri Oliveira Reis
Orientadora: Prof.^a Dra. Layara Alexandre Bessa

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração em
Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADO em, 24 de agosto de 2021.

Prof.^a Dra. Layara Alexandre Bessa (Presidente)
Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva (Avaliador interno)
Prof.^a Dra. Marialva Alvarenga Moreira (Avaliadora externa)
Prof.^a Dra. Marilene Silva Oliveira (Avaliadora externa)
Prof.^a Dra. Luciana Cristina Vitorino (Avaliadora externa)

Documento assinado eletronicamente por:

- Layara Alexandre Bessa, ASSISTENTE EM ADMINISTRACAO, em 24/08/2021 11:41:23.
- Fabiano Guimaraes Silva, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 24/08/2021 11:39:07.
- Marilene Silva Oliveira, 2019103310340111 - Discente, em 24/08/2021 11:35:58.
- Luciana Cristina Vitorino, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 24/08/2021 11:35:10.
- Marialva Alvarenga Moreira, Marialva Alvarenga Moreira - Outros - Embrapa (00348003000110), em 24/08/2021 11:16:32.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 18/08/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 300822
Código de Autenticação: 5caa18aec0



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Layara Alexandre Bessa, pela orientação, encorajamento, aconselhamento e paciência durante todo o meu tempo como aluno. Eu tive muita sorte de ter uma orientadora que se importasse tanto com o meu trabalho e que respondesse às minhas perguntas e consultas tão prontamente.

Devo expressar minha gratidão à Profa. Dra. Luciana Cristina Vitorino, por seu contínuo apoio e incentivo.

Aos meus pais Alaisa Francisca Neri de Oliveira e Elias Oliveira Reis, pelo apoio quase inacreditável. Eles são as pessoas mais importantes do meu mundo e eu dedico esta dissertação a eles.

Finalmente, gostaria de agradecer ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, não apenas por fornecer a estrutura que me permitiu realizar essa pesquisa, mas também por me dar a oportunidade de participar de conferências e conhecer tantas pessoas interessantes.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Mateus Neri Oliveira Reis, filho de Alaisa Francisca Neri de Oliveira e Elias Oliveira Reis, nasceu dia 4 de setembro de 1998, na cidade de Caçu-GO.

Em janeiro de 2016, ingressou no curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – Go, concluindo em agosto de 2019.

Em agosto de 2019, ingressou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – Go, sob orientação da Professora Dra. Layara Alexandre Bessa, concluindo em agosto de 2021.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	v
RESUMO	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO GERAL	6
1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. CAPÍTULO I	13
RESUMO	13
ABSTRACT	14
3.1 INTRODUÇÃO	15
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.2.1 Isolados microbianos	17
3.2.2 Avaliação qualitativa da capacidade de solubilização de CaHPO ₄ em meio sólido	18
3.2.3 Avaliação quantitativa da solubilização de CaHPO ₄ em meio líquido.....	19
3.2.4 Avaliação do potencial solubilizador de CaHPO ₄ <i>in vivo</i> utilizando sistema hidropônico	19
3.2.4.1 Preparo dos inóculos	19

3.2.4.2 Colonização radicular e exame microscópico	20
3.2.4.3 Experimento em sistema hidropônico.....	21
3.2.4.4 Avaliações biométricas e do teor tecidual de P	21
3.2.4.5 Avaliação anatômica da raiz	22
3.2.4.6 Trocas gasosas	22
3.2.4.7 Pigmentos fotossintéticos	22
3.2.4.8 Fluorescência da clorofila a	23
3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas	24
3.3 RESULTADOS.....	24
3.3.1 Experimento <i>in vitro</i> : meio de cultura sólido	24
3.3.2 Experimento <i>in vitro</i> : meio de cultura líquido.....	25
3.3.3 Colonização radicular	26
3.3.4 Experimento <i>in vivo</i> : cultivo hidropônico	29
3.3.4.1 Avaliação da promoção de crescimento	29
3.3.4.2 Avaliação do desempenho na absorção de P: Teor tecidual de P.....	32
3.3.4.3 Avaliação do desempenho fotossintético: Trocas gasosas	33
3.3.4.4 Avaliação do desempenho fotossintético: Pigmentos fotossintéticos.....	34
3.3.4.5 Avaliação do desempenho fotossintético: Fluorescência da clorofila <i>a</i>	35
3.3.4.6 Avaliação do desempenho anatômico: Anatomia da raíz.....	40
3.3.4.7 Análise de componentes principais (PCA) e correlação entre as variáveis.....	42
3.4 DISCUSSÃO.....	43
3.4.1 Os resultados de solubilização obtidos utilizando as metodologias <i>in vitro</i> não são consonantes com os resultados obtidos utilizando o sistema hidropônico como método	43
3.4.2 O sistema hidropônico permite associar a solubilização de fosfato com a promoção do crescimento e a melhoria no desempenho fotossintético e anatômico	44
3.4.3 O sistema hidropônico permite separar ação de promoção do crescimento de indução de estresse biótico por meio do desempenho fotossintético.....	45

3.4.4 O sistema hidropônico comprovou efeito positivo da inoculação microbiana na absorção de P e no desempenho fotossintético de <i>Glycine max</i>	47
3.5 CONCLUSÃO	47
3.6 AGRADECIMENTOS.....	48
3.7 REFERÊNCIAS	48
4. CONCLUSÃO GERAL	58

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados microbianos utilizados na comparação de metodologias experimentais empregadas na avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4). Nos códigos dos isolados: HSCR e HPAR = isolados de *Hymenaea courbaril*; BP = isolados de *Butia purpurascens*, E=endofítico; R=rizoférico. 18
- Tabela 2.** Avaliação da solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4) em meio sólido (GELP) por isolados bacterianos e fúngicos rizoféricos, ou endofíticos de *Hymenaea courbaril* ou ainda endofíticos de *Butia purpurascens*..... 25
- Tabela 3.** Avaliação da solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4) em meio líquido (GL) por isolados bacterianos e fúngicos, rizoféricos ou endofíticos de *Hymenaea courbaril* ou ainda endofíticos de *Butia purpurascens*..... 26

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspectos microscópicos da colonização radicular em plantas de soja (*Glycine max*) tratadas com 04 isolados bacterianos e Biomaphos®. SC5 = *Bacillus cereus* (A e B), SC10 = *Bacillus thuringiensis* (C e D), PA12 = *Paenibacillus alvei* (E e F), PA26 = *Lysinibacillus fusiformis* (G e H) e Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* (I e J). As setas vermelhas indicam presença de cristal proteico (D) e esporo (H). 28
- Figura 2.** Aspectos microscópicos da colonização radicular em plantas de soja (*Glycine max*) tratadas com 04 isolados bacterianos e Biomaphos®. SC15 = *Penicillium sheari* (A e B), SC4 = *Epicoccum keratinophilum* (C e D), 33EF = *Hamigera insecticola* (E e F), 328EF = *Codinaeopsis* sp. (G e H). As setas vermelhas indicam presença de esporos (G e H). 29
- Figura 3.** Altura de planta (A), comprimento de raiz (B), diâmetro do caule (C) e número de folhas (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 30
- Figura 4.** Massa seca das folhas (A), massa seca do caule (B), massa seca da raiz (C) e massa seca total (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 31
- Figura 5.** Teor tecidual de P nas folhas (A), caule (B), raízes (C) e total (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 33
- Figura 6.** Taxa fotossintética (A) (A), concentração interna de CO₂ (C_i) (B), condutância estomática (G_{sw}) (C) e taxa de transpiração (E) (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04

- isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 34
- Figura 7.** Teor de clorofila *a* (A), teor de clorofila *b* (B), teor de carotenoides (C) e clorofila total (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 35
- Figura 8.** Fluxo de absorção por RC (ABS/RC) (A), fluxo de energia capturado por RC em t = 0 (TR0/RC) (B), fluxo de transporte de elétrons por RC em t = 0 (ET0/RC) (C) e fluxo específico de dissipação da energia (DIO/RC) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 36
- Figura 9.** Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHI_Po) (A), probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (Qa) (PSI_O) (B), rendimento quântico do transporte de elétrons (PHI_Eo) (C) e índice de desempenho fotossintético (Pi_Abs) (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 38
- Figura 10.** Imagens de fluorescência da clorofila *a* obtidas para o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII (ΦII), observado em folhas de (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. SC5 = *Bacillus cereus*, SC10 = *Bacillus thuringiensis*, PA12 = *Paenibacillus alvei*, PA26 = *Lysinibacillus fusiformis*, SC15 = *Penicillium sheari*, SC4 = *Epicoccum keratinophilum*, 33EF = *Hamigera insecticola*, 328EF = *Codinaeopsis* sp., Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, WM = without microorganisms, PF = phosphorus free. 39
- Figura 11.** Diâmetro dos elementos de vasos das raízes (RVE) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade. 40
- Figura 12.** Cortes transversais evidenciando diferentes regiões anatômicas (Xy = Xilema; Ph = Floema; Fi = Fibras) da raiz de plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. SC5 = *Bacillus cereus*, SC10 = *Bacillus thuringiensis*, PA12 = *Paenibacillus alvei*, PA26 = *Lysinibacillus fusiformis*, SC15 = *Penicillium sheari*, SC4 = *Epicoccum keratinophilum*, 33EF = *Hamigera insecticola*, 328EF = *Codinaeopsis* sp.,

Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, WM = without microorganisms, PF = phosphorus free. 41

Figura 13. Análise dos componentes principais das variáveis crescimento, pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas, parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e desenvolvimento anatômico dos elementos de vasos das raízes (A) e correlações entre as médias observadas para estas variáveis (B) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. SC5 = *Bacillus cereus*, SC10 = *Bacillus thuringiensis*, PA12 = *Paenibacillus alvei*, PA26 = *Lysinibacillus fusiformis*, SC15 = *Penicillium sheari*, SC4 = *Epicoccum keratinophilum*, 33EF = *Hamigera insecticola*, 328EF = *Codinaeopsis* sp., Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, WM = without microorganisms, PF = phosphorus free. 42

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>A</i>	Taxa fotossintética	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
ABS/RC	Fluxo de absorção de elétrons por centro de reação	-
BP	Isolados de <i>Butia purpurascens</i>	-
<i>Chl_a</i>	Teor de clorofila <i>a</i>	$\mu\text{g cm}^{-2}$
<i>Chl_b</i>	Teor de clorofila <i>b</i>	$\mu\text{g cm}^{-2}$
<i>C_i</i>	Concentração interna de carbono	$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
DIo/RC	fluxo específico de dissipação da energia	-
<i>E</i>	Taxa transpiratória	$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
ET0/RC	fluxo de transporte de elétrons por centro de reação em $t = 0$	-
Fi	Fibras	-
Gsw	Condutância estomática	$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
HSCR	Isolados de <i>Hymenaea courbaril</i>	-
PCA	Análise de componentes principais	-
Ph	Floema	-
PHI_Eo	Rendimento quântico do transporte de elétrons	-
PHI_Po	Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária	-
Pi_Abs	Índice de desempenho fotossintético	-
PSI_O	Probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (Qa)	-
PSII	Fotossistema II	-
RC	Centro de reação	-
<i>TChl</i>	Teor de clorofila total	$\mu\text{g cm}^{-2}$
TR0/RC	fluxo de energia capturado por centro de reação em $t = 0$	-
UFCs	Unidades formadoras de colônias	-
Xy	Xilema	-

RESUMO

Reis, M. N. O. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2021. **Eficiência do sistema hidropônico como metodologia para a seleção de cepas solubilizadoras de CaHPO_4 , utilizando Glycine max como modelo.** Orientadora: Layara Alexandre Bessa; Coorientadores: Luciana Cristina Vitorino, Roniel Geraldo Ávila.

Atualmente poucas cepas solubilizadoras de fosfato ocupam o mercado mundial de inoculantes, em parte, isso se deve a mecanismos falhos na seleção de cepas que mostram alto potencial em sistemas *in vitro*, mais potencial reduzido em sistemas de campo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a efetividade do sistema hidropônico como metodologia para a seleção de cepas microbianas solubilizadoras de fosfato, utilizando a soja como modelo para absorção do fósforo disponibilizado. Os experimentos de solubilização *in vitro* foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, considerando 09 tratamentos com micro-organismos (08 isolados + Biomaphos®) e um tratamento controle (sem inoculação). As médias observadas para solubilização de CaHPO_4 e pH foram submetidos à ANOVA one-way para avaliação apenas do efeito de tratamento. Quando significativos, os efeitos foram avaliados por teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Já o experimento *in vivo* foi conduzido em blocos ao acaso, sendo 09 tratamentos com micro-organismos (08 isolados + Biomaphos®) e dois tratamentos controle (plantas cultivadas em solução nutritiva sem micro-organismos e plantas cultivadas em solução nutritiva sem P). Todos os tratamentos foram avaliados em 05 repetições, sendo cada repetição constituída de 2 plantas por vaso. Os dados obtidos para as análises biométricas, teor tecidual de P e análises fisiológicas e anatômicas foram submetidos à ANOVA one-way para avaliação do efeito de tratamento. Quando significativos, os efeitos foram avaliados pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Posteriormente, todas as variáveis foram avaliadas conjuntamente por uma matriz de correlação e combinadas em uma análise de

componentes principais (PCA). Como estas variáveis tinham diferentes unidades de medidas, foi realizada uma PCA de correlação, construída utilizando os dados padronizados para ter média 0 e desvio padrão 1. O número de componentes foi escolhido em função dos autovalores (>1.0) e a variância explicada acima de 80%. As variáveis foram também avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson, sendo a força da relação analisada por meio dos valores de r e da significância da interação a 5% de probabilidade. Todos os testes estatísticos foram realizados em ambiente R 4.0.4 (R Core Team, 2021). Os testes conduzidos em meio sólido atestaram o potencial solubilizador para *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Bacillus cereus* (SC5) e Biomaphos®, enquanto em meio líquido, a capacidade ficou evidenciada para *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Bacillus cereus* (SC5). O sistema hidropônico mostrou que a inoculação dos isolados *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) na solução nutritiva incorreu em maior absorção de P e melhora do desempenho fotossintético e anatômico por parte das plantas de *G. max*, enquanto as plantas crescidas em solução sem fósforo e inoculadas com os micro-organismos *Codinaeopsis* sp. (328EF), *Hamigera insecticola* (33EF), Biomaphos® e *Epicoccum keratinophilum* (SC4) apresentaram aumento nos parâmetros ABS/RC e DIO/RC. A temperatura de crescimento, o pH e a constituição nutricional do meio de cultura sólido podem afetar o crescimento e o metabolismo, enquanto no meio líquido o Pi livre pode ser quantificado e o acesso de ácidos orgânicos e enzimas fosfatases à fonte fosfatada ocorre de forma mais direta, mas a ausência de um hospedeiro e a impossibilidade de quantificar o fósforo realmente absorvido pela planta tornam essa metodologia questionável. O sistema hidropônico permitiu associar a solubilização de fosfato à promoção do crescimento e à melhoria do desempenho fotossintético e anatômico, além de permitir separar a ação de promoção de crescimento da indução de estresse biótico por meio do desempenho fotossintético. Os resultados de solubilização de CaHPO_4 , obtidos pela utilização de sistema hidropônico, foram inconsistentes com os observados em meio sólido e meio líquido, contudo os testes em meio líquido atestaram o péssimo desempenho de *Codinaeopsis* sp. (328EF) e *Hamigera insecticola* (33EF) em reduzir o pH e solubilizar fosfatos, o que corrobora os efeitos de estresse biótico observados em plantas de *G. max* inoculadas com estes isolados. O sistema hidropônico permitiu caracterizar *Paenibacillus alvei* (PA12), eficiente também em solubilizar CaHPO_4 em meio líquido, mas também a bactéria *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) como as mais

efetivas na solubilização de CaHPO_4 , em razão dos melhores efeitos na absorção de fósforo, promoção do crescimento e desempenho fisiológico.

PALAVRAS-CHAVE: micro-organismos, bactérias, fungos, promotores do crescimento, fósforo, nutrientes.

REIS, M. N. O. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, August 2021. **Efficiency of the hydroponic system as a methodology for selection of CaHPO₄ solubilizing strains, using Glycine max as a model.** Advisor: Layara Alexandre Bessa; Co-advisor: Luciana Cristina Vitorino, Roniel Geraldo Ávila.

ABSTRACT

Currently, few phosphate solubilizing strains occupy the world market for inoculants, in part, this is due to flawed mechanisms in the strains selection that demonstrate high potential in in vitro systems but reduced potential in field systems. Thus, the objective of this work is to evaluate the effectiveness of the hydroponic system as a methodology for the selection of phosphate solubilizing microbial strains, using soybean as a model for absorption of available phosphorus. The in vitro solubilization experiments were carried out in a completely randomized design, considering 09 treatments with microorganisms (08 isolates + Biomaphos®) and a control treatment (without inoculation). The means observed for CaHPO₄ solubilization and pH were submitted to one-way ANOVA to evaluate only the treatment effect. When significant, the effects were evaluated by Scott Knott test at 5% probability. The in vivo experiment was carried out in randomized blocks, with 09 treatments with microorganisms (08 isolates + Biomaphos®) and two control treatments (plants grown in nutrient solution without microorganisms and plants grown in nutrient solution without P). All treatments were evaluated in 05 replications, each one consisting of 2 plants per pot. The data obtained for biometric analysis, tissue P content, physiological and anatomical analyzes were submitted to one-way ANOVA to evaluate the treatment effect. When significant, the effects were evaluated by Scott Knott test at 5% probability. Subsequently, all variables were evaluated together by a correlation matrix and combined in a principal component analysis (PCA). As these variables had different measurement units, a correlation PCA was performed, constructed using standardized data to have a mean of 0 and standard deviation of 1. The number of components was chosen in function of the eigenvalues (>1.0) and the explained variance (above 80%). The variables were also evaluated using the Pearson correlation coefficient, where the strength of the relationship was analyzed using the r values and the significance of the interaction at 5% probability. All statistical tests were performed in R 4.0.4 environment (R Core Team, 2021). Tests conducted in solid medium attested solubilizing potential for *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Bacillus cereus* (SC5) and Biomaphos®, while in liquid medium, the capacity was evidenced for *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Paenibacillus alvei* (PA12) and *Bacillus cereus* (SC5). The hydroponic system demonstrated that the inoculation of isolates *Paenibacillus alvei* (PA12) and *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) in the nutrient solution resulted in higher P absorption and improved photosynthetic and anatomical performance by the *G. max* plants, while

the plants grown in solution without phosphorus and inoculated with the microorganisms *Codinaeopsis* sp. (328EF), *Hamigera insecticola* (33EF), Biomaphos® and *Epicoccum keratinophilum* (SC4) showed an increase in the ABS/RC and DIO/RC parameters. The growth temperature, pH and nutritional constitution of the solid culture medium can affect growth and metabolism, while in the liquid medium, free Pi can be quantified and the access of organic acids and phosphatase enzymes to the phosphate source occurs more directly. However, the absence of a host and the impossibility of quantifying the phosphorus absorbed by the plant makes this methodology questionable. The hydroponic system allowed to associate phosphate solubilization with growth promotion and improvement of photosynthetic and anatomical performance, besides allowing to separate the growth promotion action from biotic stress induction through photosynthetic performance. The results of CaHPO₄ solubilization obtained through the use of a hydroponic system were inconsistent with those observed in solid medium and liquid medium, however, the tests in liquid medium attest the poor performance of *Codinaeopsis* sp. (328EF) and *Hamigera insecticola* (33EF) in reducing pH and solubilizing phosphates, which corroborates the effects of biotic stress observed in *G. max* plants inoculated with these isolates. The hydroponic system allowed the characterization of *Paenibacillus alvei* (PA12), also efficient in solubilizing CaHPO₄ in liquid medium, but also the bacteria *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) as the most effective in CaHPO₄ solubilization, due to its better effects on phosphorus absorption, growth promotion and physiological performance.

KEYWORDS: microorganisms, bacteria, fungi, growth promoters, phosphorus, nutrients.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max*) é uma cultura importante em sistemas de cultivo rotativo projetados para alto rendimento e eficiência. Por ser uma oleaginosa anual que contém teor de óleo de 18 a 23% (Patil et al., 2018), é usada como alimento ou matéria-prima para derivados como óleo de cozinha, sendo sua farinha utilizada na aquicultura e em rações para gado em razão de seu alto teor de proteína (36-40%) (Ajila et al., 2012; Freiria et al., 2016; Hua et al., 2019).

O fósforo (P) é o segundo nutriente que mais limita o crescimento das plantas após o nitrogênio (N) (Salimpour et al., 2010). O fósforo desempenha funções vitais no metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas. É constituinte importante de ácidos nucleicos, fitinas, fosfolipídios, nucleotídeos, coenzimas e enzimas (Kafle et al., 2019). Por essa razão, desempenha papel importante na respiração, fotossíntese e fixação de N₂ em leguminosas (Kouas et al., 2005; Khan et al 2010; Hussain et al., 2017).

A deficiência de fósforo restringe o crescimento das plantas, e isso faz com que o fósforo seja frequentemente um nutriente limitante nos sistemas agrícolas e sua deficiência diminua a produtividade agrícola, assim, fertilizantes químicos são amplamente utilizados para obter rendimento ideais (Chen et al., 2013; Meng et al., 2013; Henry et al., 2019). Porém o uso de fertilizantes químicos fosfatados solúveis não é o ideal por serem caros e causarem eutrofização de rios e seu uso ser limitado pela baixa capacidade de troca catiônica dos solos tropicais ácidos (Edwards et al., 2016; Reddy et al., 2018).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF) têm grande importância no ciclo natural do fósforo (Kalayu et al., 2019; Tian et al., 2019). Ao longo dos anos, muitos estudos foram realizados sobre as características e mecanismos de MSF em razão do seu grande potencial para serem usadas como bioinsumo para as culturas (Li et al. 2015; Hii et al., 2020; El maaloum et al., 2020). Assim, a dinâmica dessa interação

planta-microrganismos depende de vários fatores, incluindo características fisiológicas das plantas e microrganismos e até mesmo condições climáticas, como tipo de solo, salinidade e pH (Sharma et al., 2013; Haney et al. 2015; Köhl et al. 2016; Mohite, 2013; Pii et al. 2015).

Os MSF associados a plantas podem desempenhar um papel importante no crescimento e na melhoria do estado nutricional (Dash et al., 2017; Billah et al., 2019; Wu et al., 2019; Rafi et al., 2019; Liu et al., 2019). Esses micro-organismos podem adotar diferentes estratégias de solubilização, tornando o fosfato insolúvel numa forma solúvel. Estudos mostram que a principal forma de solubilizar o fosfato desses micro-organismos é a produção de ácidos orgânicos via oxidação direta que ocorre na face externa da membrana citoplasmática, fruto do metabolismo microbiano (Sharma et al., 2013; Pande et al., 2017; Kalayu et al., 2019).

Assim, é necessário criar uma nova metodologia para seleção de cepas solubilizadoras de fosfato, em que a solubilização de P é avaliada pela interação planta-microrganismos, já que atualmente os MSF são avaliados *in vitro* através de meios de culturas sólidos, líquidos ou ambos e somente depois são testados em experimentos em campo. Como essas metodologias apresentam incongruências, como o meio sólido onde micro-organismos solubilizadores não apresentam halos, ou o meio líquido onde o agente redutor, como o ascorbato, produz uma interferência com redução do fosfomolibdato para formar o azul complexo, causando estimativas equivocadas de P solúvel (Anschutz e Deborbe, 2016).

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S. and Valéro, J.R., 2012. Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. *Critical reviews in biotechnology*, 32(4), 382-400. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.659172>.

Anschutz, P. and Deborde, J., 2016. Spectrophotometric determination of phosphate in matrices from sequential leaching of sediments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 14(4), 245-256. <https://doi.org/10.1002/lom3.10085>.

Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T.U., Munir, A. and Gurmani, A.R., 2019. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 36(10), 904-916.

<https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>.

Chen, R., Song, S., Li, X., Liu, H. and Huang, D., 2013. Phosphorus deficiency restricts plant growth but induces pigment formation in the flower stalk of Chinese kale. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(3), 243-248. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0018-x>.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. and Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>.

Dash, N., Pahari, A. and Dangar, T.K., 2017. Functionalities of phosphate-solubilizing bacteria of rice rhizosphere: techniques and perspectives. In *Recent advances in Applied Microbiology* (pp. 151-163). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5275-0_7.

Edwards, C.L., Maguire, R.O., Alley, M.M., Thomason, W.E. and Whitehurst, G.B., 2016. Plant-available phosphorus after application of synthetic chelating agents. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(4), 433-446. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1122796>.

El Maaloum, S., Elabed, A., Alaoui-Talibi, Z.E., Meddich, A., Filali-Maltouf, A., Douira, A., Ibsouda-Koraichi, S., Amir, S. and El Modafar, C., 2020. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria consortia associated with phospho-compost on phosphorus solubilization and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 51(5), 622-634. <https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1729376>.

Freiria, G.H., Lima, W.F., Leite, R.S., Mandarino, J.M.G., Silva, J.B.D. and Prete, C.E.C., 2016. Productivity and chemical composition of food-type soybeans sown on different dates. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38, 371-377. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i3.28632>.

Haney, C.H., Samuel, B.S., Bush, J. and Ausubel, F.M., 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature plants*, 1(6), 1-9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>.

Henry, J.B., Perkins-Veazie, P., McCall, I. and Whipker, B.E., 2019. Restricted phosphorus fertilization increases the betacyanin concentration and red foliage coloration of alternanthera. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144(4), 264-273. <https://doi.org/10.21273/JASHS04702-19>.

Hii, Y.S., San, C.Y., Lau, S.W. and Danquah, M.K., 2020. Isolation and characterisation of phosphate solubilizing microorganisms from peat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101643. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101643>.

Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M.J., Zeng, C., Zenger, K. and Strugnell, J.M., 2019. The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3), 316-329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>.

Hussain, R.M., 2017. The effect of phosphorus on nitrogen fixation in legumes. *J Plant Nutr Soil Sci*, 167(2), 125-137. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.04.555654>.

Kafle, A., Cope, K.R., Raths, R., Krishna Yakha, J., Subramanian, S., Bücking, H. and Garcia, K., 2019. Harnessing soil microbes to improve plant phosphate efficiency in cropping systems. *Agronomy*, 9(3), 127. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030127>.

Kalayu, G., 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.

Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P.A., 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>.

Köhl, J., Kolnaar, R. and Ravensberg, W.J., 2019. Mode of action of microbial

biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 10, 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.

Kouas, S., Labidi, N., Debez, A. and Abdelly, C., 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(3), 389-393. <https://doi.org/10.1051/agro:2005034>.

Li, X., Luo, L., Yang, J., Li, B. and Yuan, H., 2015. Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by an efficient and salinity-tolerant *Aspergillus niger* strain An2. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(5), 2755-2768. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1465-2>.

Liu, X., Jiang, X., He, X., Zhao, W., Cao, Y., Guo, T., Li, T., Ni, H. and Tang, X., 2019. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp. strain P34-L promotes wheat growth by colonizing the wheat rhizosphere and improving the wheat root system and soil phosphorus nutritional status. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), 1314-1324. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09935-8>.

Meng, X., Chen, W.W., Wang, Y.Y., Huang, Z.R., Ye, X., Chen, L.S. and Yang, L.T., 2021. Effects of phosphorus deficiency on the absorption of mineral nutrients, photosynthetic system performance and antioxidant metabolism in *Citrus grandis*. *Plos one*, 16(2), e0246944.

Mohite, B., 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3), 638-649. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>.

Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. and Kaushik, S., 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>.

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. and Crecchio, C., 2015. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-

promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and fertility of soils*, 51(4), 403-415. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-0996-1>.

Rafi, M.M., Krishnaveni, M.S. and Charyulu, P.B.B.N., 2019. Phosphate-solubilizing microorganisms and their emerging role in sustainable agriculture. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 223-233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00017-9>.

Reddy, V.R., Cunha, D.G.F. and Kurian, M., 2018. A water–energy–food nexus perspective on the challenge of eutrophication. *Water*, 10(2), 101. <https://doi.org/10.3390/w10020101>.

Salimpour, S.I., Khavazi, K., Nadian, H., Besharati, H. and Miransari, M., 2010. Enhancing phosphorous availability to canola (*Brassica napus* L.) using P solubilizing and sulfur oxidizing bacteria. *Australian Journal of Crop Science*, 4(5), 330-334.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 1-14.

Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S. and Liu, X., 2021. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. *Biology*, 10(2), 158. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

Wu, F., Li, J., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, S., Shi, X., Li, L. and Liang, J., 2019. Effects of phosphate solubilizing bacteria on the growth, photosynthesis, and nutrient uptake of *Camellia oleifera* Abel. *Forests*, 10(4), 348. <https://doi.org/10.3390/f10040348>.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a efetividade do sistema hidropônico como metodologia para a seleção de cepas microbianas solubilizadoras de fosfato, utilizando a soja como modelo para absorção do fósforo disponibilizado.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar a metodologia de seleção de cepas solubilizadoras de fosfato em sistema hidropônico com metodologias de seleção de solubilizadores em sistema *in vitro*.

Comparar a disponibilização de fósforo pelas cepas testadas com a disponibilização feita pela cepa comercial BiomaPHOS.

3. CAPÍTULO I

Eficiência do sistema hidropônico como metodologia para a seleção de cepas solubilizadoras de CaHPO_4 , utilizando *Glycine max* como modelo

(Normas de acordo com a revista *European Journal of Agronomy*)

RESUMO

O desenvolvimento sustentável da agricultura pode ser estimulado por uma maior disponibilidade mercadológica de bioinsumos, incluindo cepas microbianas solubilizadoras de fosfatos. Contudo, a seleção destas cepas é feita atualmente utilizando metodologias de solubilização em meio sólido ou líquido, imprecisas e questionáveis. Este trabalho testou a hipótese de que o sistema hidropônico pudesse constituir uma metodologia mais eficiente para selecionar cepas solubilizadoras de fosfato, notadamente promotoras do crescimento vegetal. Esta metodologia foi testada utilizando plantas de *Glycine max* como modelo, sendo seu potencial promotor de crescimento dos isolados comparado com o observado para a mistura microbiana comercial Biomaphos®. Os resultados de solubilização de CaHPO_4 obtidos pela utilização de sistema hidropônico foram inconsistentes com os observados em meio sólido e meio líquido, mas os testes em meio líquido atestaram péssimo desempenho de *Codinaeopsis* sp. (328EF) e de *Hamigera insecticola* (33EF) em reduzir o pH e solubilizar CaHPO_4 , confirmando os efeitos de estresse biótico observados em plantas

de *G. max* inoculadas com estes isolados. Por outro lado, o sistema hidropônico permitiu caracterizar *Paenibacillus alvei* (PA12), eficiente também na solubilização em meio líquido, mas também a bactéria *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), ambas as mais efetivas na solubilização de CaHPO_4 em razão dos melhores efeitos na absorção de fósforo, promoção do crescimento e desempenho fisiológico, observados nas plantas inoculadas com estas bactérias. O método hidropônico mostrou-se superior na seleção de cepas solubilizadoras, permitindo avaliar os padrões de teores nutricionais nas plantas, padrões de crescimento e desempenho fotossintético, padrões anatômicos ou mesmo a detecção de respostas de estresse biótico à inoculação, sendo obtidas cepas de potencial superior ao Biomaphos® para promoção de crescimento. Este trabalho propõe uma metodologia menos questionável e mais eficiente para a seleção de solubilizadores, potencialmente destináveis ao mercado de bioinsumos, úteis na disponibilização de P para culturas importantes como a soja.

PALAVRAS-CHAVE: micro-organismos promotores de crescimento vegetal, fósforo, bioinsumo, fisiologia, nutrição.

ABSTRACT

The sustainable development of agriculture can be stimulated by a higher bio-inputs market availability, including phosphate-solubilizing microbial strains. However, these strains selection is currently carried out using imprecise and questionable solubilization methodologies in solid or liquid media. This work tested the hypothesis that the hydroponic system could be a more efficient methodology to select phosphate solubilizing strains, notably plant growth promoters. This methodology was tested using *Glycine max* plants as a model and the potential growth promoter of isolates was compared with that observed for the commercial microbial mixture Biomaphos®. The results of CaHPO_4 solubilization obtained through the use of a hydroponic system were inconsistent with those observed in solid medium and liquid medium, however, the tests in liquid medium attest the poor performance of *Codinaeopsis* sp. (328EF) and *Hamigera insecticola* (33EF) in reducing the pH and solubilizing CaHPO_4 , which corroborates the effects of biotic stress observed in *G. max* plants inoculated with these isolates. On the other hand, the hydroponic system allowed to characterize

Paenibacillus alvei (PA12), as efficient in solubilization in liquid medium, and also the bacteria *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), as the most effective in CaHPO₄ solubilization, due to the best effects on phosphorus absorption, growth promotion and physiological performance observed in plants inoculated with these bacteria. The hydroponic method proved to be superior in the selection of solubilizing strains, allowing the assessment of patterns of nutritional levels in plants, growth patterns and photosynthetic performance, anatomical patterns or even the detection of biotic stress responses to inoculation, obtaining strains with potential higher than Biomaphos® for growth promotion. This work proposes a less questionable and more efficient methodology for solubilizers selection, potentially destined for the bio-input market, useful in the P availability for important crops, such as soybeans.

Keywords: microorganisms that promote plant growth, phosphorus, bio-input, physiology, nutrition.

3.1 INTRODUÇÃO

A estimativa é de que a população mundial atinja cerca de 9,735 bilhões de pessoas até 2050 (Organização das Nações Unidas, 2019). Em associação com a pressão para que a agricultura supra as necessidades do desenvolvimento humano, há necessidade de que isso ocorra pela adoção de práticas agrícolas sustentáveis, que aumentem a produtividade de forma integrada com a conservação (Taveira et al., 2019).

A produtividade atual de culturas importantes como a soja é afetada pela deficiência de fósforo (P) em solos ácidos, já que o P desempenha papel fundamental na capacidade simbiótica de fixação de N₂ (Sulieyman et al., 2017; Jaiswal et al., 2021; Wang et al., 2020). A agricultura atual utiliza fertilizantes para adicionar P ao solo, porém o uso de fertilizantes fosfatados é caro e insustentável (Situmorang et al., 2015). Por outro lado, estes fertilizantes são facilmente precipitados com Al, Fe e Ca, formando complexos de baixa solubilidade, que não são utilizados pelas plantas (Penn et al., 2019).

Neste contexto, torna-se urgente a disseminação de tecnologias mais econômicas e ecologicamente corretas, que melhorem a disponibilidade de P no solo. Atualmente, a utilização de cepas microbianas solubilizadoras de fosfato (MSF) tem sido promissora por desempenharem papel fundamental na dinâmica do P no solo e na

subsequente disponibilidade deste elemento para as plantas (Kafle et al., 2019). Os MSF quebram as formas insolúveis de P em formas solúveis por meio de vários mecanismos biológicos, entre eles, a produção de ácidos orgânicos e enzimas extracelulares, tornando formas insolúveis de P em formas disponíveis para absorção pelas plantas (Baliah et al., 2016; Doilom et al., 2020; Hanif et al., 2015; Gurikar et al., 2016; Li et al., 2015; Sarr et al., 2020; Zúñiga-silgado et al., 2020). Entre os ácidos orgânicos produzidos, são citados o ácido glicólico, 2-cetoglucônico, acético, cítrico, propiônico, succínico, tartárico, fórmico, fumárico, láctico, málico, butírico, glucônico, valérico, oxálico e cítrico (Chen et al., 2006; Hwangbo et al., 2003; Jog et al., 2014; Mehta et al., 2015; Patel et al., 2008; Scervino et al., 2010; Yadav et al., 2015; Zhu et al., 2012).

Contudo, a despeito de sua importância, poucas cepas solubilizadoras de fosfato ocupam hoje o mercado mundial de inoculantes, em parte, isso se deve a mecanismos falhos na seleção de cepas que mostram alto potencial em sistemas *in vitro*, mas potencial reduzido em sistemas de campo. Atualmente, cepas solubilizadoras de fosfatos são selecionadas por meio de triagem em meio sólido contendo fontes fosfatadas como CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 ou FePO_4 . Nestes meios, são feitas medições de halos a fim de determinar a eficiência do isolado em solubilizar a fonte insolúvel de fosfato avaliada. Porém, vários estudos mostram que esse método, considerado qualitativo, é ineficiente para seleção, de forma que cepas potenciais são comumente excluídas por esta triagem (Salcedo et al., 2014; Sousa et al., 2016).

Outra metodologia de seleção é a triagem feita em meio de cultura líquido. Muitos estudos demonstram que certos isolados, para os quais não se verificou formação efetiva de halo de solubilização em meio sólido, apresentam boa capacidade para reduzir o pH do meio e solubilizar fosfatos em meio líquido (Bashan et al., 2013; Nautiyal et al., 1999; Salcedo et al., 2014; Sousa et al., 2016). A metodologia em meio líquido, portanto, é aceita atualmente como a mais confiável, mas também apresenta inconsistências por ser um método colorimétrico. O protocolo mais difundido nos trabalhos de prospecção de cepas solubilizadoras em meio líquido, para a determinação de P livre, é o de Murphy and Riley (1962). Este protocolo é baseado na reação de solução estoque de ácido ascórbico (vitamina C), onde é adicionado molibdato, formando um complexo azul fosfomolibdênio, proporcional à quantidade de fósforo livre na amostra. Este método, entretanto, é altamente suscetível à interferência química de agentes redutores presentes no meio de cultura, como o ascorbato, afetando a formação do complexo azul, podendo levar a sub ou superestimativas da concentração

de P livre (Anschutz and Deborbe, 2016; Jarvie et al., 2002; Kowalenko and Babuin, 2007; Kowalenko 2008; Nagul et al., 2015).

Foi baseado nisso que este trabalho se propôs testar a hipótese de que o sistema hidropônico, por permitir avaliar o P, independentemente de outros nutrientes e também por exigir a presença de sistema radicular, permitindo obter dados relacionados ao efeito dos isolados na promoção de crescimento, desempenho fotoquímico e fotossintético da planta, pudesse ser um sistema mais eficiente para selecionar cepas solubilizadoras de fosfato, notadamente promotoras do crescimento vegetal. Para isso, foram feitos testes utilizando CaHPO_4 como fonte fosfatada, e o método hidropônico foi confrontado com as metodologias clássicas em meio sólido e líquido, além de serem avaliados os efeitos das cepas na promoção de crescimento. A metodologia foi testada utilizando plantas de *Glycine max* como modelo, dadas a facilidade para obtenção de mudas dessa espécie e a necessidade do desenvolvimento atual de biotecnologias aplicadas ao cultivo desta oleaginosa. Além disso, o potencial de promotor de crescimento dos isolados testados foi comparado com o observado para o produto comercial Biomaphos®, constituído por uma mistura das bactérias *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*. Este trabalho tem como objetivo propor uma metodologia menos questionável e mais eficiente para a seleção de cepas com potencial para satisfazer a demanda atual por bioinsumos aplicados à disponibilização de P para culturas importantes como a soja.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolados microbianos

Foi avaliado o potencial de 08 isolados microbianos rizosféricos ou endofíticos, sendo 6 isolados previamente de *Hymenaea courbaril* (H) (Rocha et al., 2020) e 2 de *Butia purpurascens* (BP) (Silva et al., 2018) (Tabela 1). Estas cepas são atualmente pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola do IFGoiano, campus Rio Verde. O potencial destas cepas foi confrontado com o observado para o produto comercial Biomaphos®, constituído de uma mistura das cepas BRM034840 e BRM033112-B de *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*. Os isolados bacterianos foram reativados em meio Agar Nutriente – NA (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 25 g de ágar, e H_2O qs 1 L), durante 48 horas, a 35 °C, em câmara de incubação, enquanto os isolados fúngicos foram reativados em Agar Batata

Dextrose – PDA (infusion of 200 g of potato, 20 g of dextrose and 15 g of agar), durante 07 dias, a 35 °C, em incubadora.

Tabela 1. Isolados microbianos utilizados na comparação de metodologias experimentais empregadas na avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO₄). Nos códigos dos isolados: HSCR e HPAR = isolados de *Hymenaea courbaril*; BP = isolados de *Butia purpurascens*, E=endofítico; R= rizosférico.

Isolado	Tipo	Código do isolado
<i>Penicillium sheari</i>	Fungo	HSCR15-F (SC15)
<i>Epicoccum keratinophilum</i>	Fungo	HSCR4-F (SC4)
<i>Hamigera insecticola</i>	Fungo	BP33EF-F (33EF)
<i>Codinaeopsis</i> sp.	Fungo	BP328EF-F (328EF)
<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria	HSCE5-B (SC5)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bactéria	HSCR10-B (SC10)
<i>Paenibacillus alvei</i>	Bactéria	HPAR12-B (PA12)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Bactéria	HPAR26-B (PA26)
<i>Bacillus megaterium</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Bactérias	BRM034840 e BRM033112-B (Biomaphos®)

3.2.2 Avaliação qualitativa da capacidade de solubilização de CaHPO₄ em meio sólido

Os isolados bacterianos e fúngicos foram inoculados em placas de Petri, contendo meio de cultura GELP (glicose 10g; 5g de peptona; extrato de levedura 0,05g e ágar 15g), acrescido de 25 mL de CaCl₂ (10%) e 12,5 mL de K₂HPO₄ (10%), formando um precipitado de fosfato inorgânico de CaHPO₄ (10%), conforme descrito por Sylvester-Bradley et al. (1982). A capacidade do micro-organismo em solubilizar CaHPO₄ foi confirmada pela observação de um halo transparente ao redor da colônia de bactéria ou fungo, em contraste com o meio opaco (Souchie et al., 2007). Foram utilizadas como controle negativo de solubilização placas contendo meio de cultura GELP acrescido de CaHPO₄ ausente de inóculo.

A capacidade dos isolados em solubilizar CaHPO₄ foi comparada medindo os diâmetros das zonas de solubilização (halos) ao redor das colônias aos 7 dias de incubação, sendo obtido o Índice de Solubilização (SI), calculado utilizando o método proposto por Berraqueiro et al. (1976):

$$SI = \frac{(\text{diâmetro total, incluindo colônia e halo})}{(\text{diâmetro da colônia})}$$

O potencial de solubilização dos isolados foi classificado de acordo com Silva Filho and Vidor (2000) como baixa ($SI < 2$), média ($2 < SI < 3$) ou alta capacidade de solubilização ($SI > 3$). O teste foi conduzido em triplicata para cada isolado testado.

3.2.3 Avaliação quantitativa da solubilização de CaHPO_4 em meio líquido

Para este teste, as amostras bacterianas foram crescidas sob agitação constante com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712), em rotação de 90 rpm, por 24h, a 30 °C, em 7 mL de meio de cultivo líquido GL (10g glicose, 2g extrato de levedura). Posteriormente, foram retirados assepticamente 3 mL de cada cultura para determinar a densidade óptica (DO), a 600 nm. Todas as amostras bacterianas tiveram sua DO ajustada a 0,1 pela diluição com solução salina (0,85%). As amostras fúngicas foram crescidas em meio PDA, por 4 dias, a 30 °C.

A quantificação da solubilização de CaHPO_4 em meio líquido foi feita inoculando 1 mL da cultura bacteriana previamente padronizada em 10 mL de meio GL líquido, acrescido de 1,26 g L⁻¹ da fonte fosfatada CaHPO_4 . Para a avaliação dos fungos, foram retirados discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial, sendo estes também inoculados em 10 mL de meio (um disco por vidro). As culturas permaneceram sob agitação a 90 rpm, a 30 °C, por 72h. O teste foi feito em triplicata, por isolado testado, tendo como controle negativo meio GL ausente de inóculo. Após o crescimento, foram feitas a medição do pH e a determinação da quantidade de P inorgânico pelo método colorimétrico da vitamina C, a 725 nm, conforme Gadagi and Sa (2002).

3.2.4 Avaliação do potencial solubilizador de CaHPO_4 *in vivo* utilizando sistema hidropônico

3.2.4.1 Preparo dos inóculos

Os inóculos bacterianos foram preparados em caldo nutriente por 24 horas a 30 °C sob agitação constante a 90 rpm. A concentração de células de cada cultura foi estimada pela contagem das UFCs, sendo esta concentração padronizada para 10⁴ mL⁻¹, utilizando solução salina a 0,85%. Já os micélios fúngicos foram cultivados em meio PDA por 14 dias a 30 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas superficialmente,

utilizando 10 ml de solução salina a 0,85% por placa, sendo a solução resultante avaliada para a concentração de esporos por contagem em câmara de Neubauer (hemocítmetro), sob microscópio óptico (ampliação de 40-100x). A concentração de esporos das diferentes culturas foi ajustada para 10^5 mL^{-1} .

3.2.4.2 Colonização radicular e exame microscópico

Este teste foi conduzido com o objetivo de verificar o potencial colonizador das cepas a serem testadas em sistema hidropônico. O teste foi conduzido utilizando sementes de *G. max* da cultivar Bônus 8579 RSF IPRO. As sementes foram desinfestadas para a remoção de epifíticos, tendo sido feitas sucessivas lavagens em água corrente, seguidas de agitação em água e detergente neutro (Tween) por 5 minutos. Na sequência, as sementes foram imersas em etanol a 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 1 min e 30 segundos e depois novamente em etanol a 70% por 30 segundos. Finalmente, foram feitas três lavagens em água destilada autoclavada, e as sementes, plantadas em bandejas plásticas contendo areia autoclavada como substrato, onde as plântulas permaneceram por 07 dias. Neste período, as plântulas foram regadas assepticamente, uma vez ao dia, com água esterilizada. As plantas foram então cuidadosamente removidas da areia, as raízes foram destacadas e lavadas por quatro vezes em água destilada esterilizada sob agitação vigorosa. As raízes foram então submersas nas soluções dos inóculos previamente preparadas e depositadas em placas de Petri contendo meio GELP. Como controle negativo, foram utilizadas placas contendo raízes imersas em água destilada autoclavada. As placas foram incubadas a 28° C por 48 h. Posteriormente, as raízes foram prefixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão Na-P 20 mM (pH 6,5) mais dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% por 30 min, sendo lavadas delicadamente com água esterilizada e pós-fixadas com tetraóxido de ósmio dissolvido em tampão Na-P 50 mM (pH 6,5). As raízes foram desidratadas em série etílica (30-100%), com 10 min em cada diluição, transferidas para acetato de amila e secas em ponto crítico em um secador com dióxido de carbono. Em seguida, foram revestidas com ouro usando um jato de íons para avaliação da colonização microbiana sob microscópio eletrônico de varredura.

3.2.4.3 Experimento em sistema hidropônico

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFGoiano, campus Rio Verde, com as coordenadas geográficas 17° 48' 15,9'' S – 50° 54' 19,5'' W, de julho a agosto de 2020, sob temperatura média de 26,85 ° C e umidade relativa de 23,70%. Foram utilizadas sementes de soja da mesma cultivar mencionada previamente, submetidas ao mesmo tratamento de desinfestação e germinação em areia autoclavada, onde as plântulas permaneceram até atingir tamanho médio de 15 cm, quando foram transferidas para vasos de 4 L contendo solução nutritiva de Hoagland and Arnon (1950), com meia força iônica, para adaptação por 15 dias. Após esse período, as plantas foram submetidas a uma solução nutritiva com força iônica completa.

A inoculação dos micro-organismos ocorreu na fase R5 de desenvolvimento da soja. Para tal, 10 ml das soluções dos inóculos previamente preparadas foram adicionados à solução nutritiva, juntamente com 10 g L⁻¹ de glicose asséptica, com o objetivo de estimular o crescimento microbiano na solução nutritiva, e as avaliações biométricas, fisiológicas e anatômicas ocorreram após 10 dias de exposição das plantas às cepas testadas. Como tratamentos controle, foram utilizadas plantas crescidas em solução nutritiva sem a adição de micro-organismos e plantas crescidas em solução nutritiva ausente de P.

3.2.4.4 Avaliações biométricas e do teor tecidual de P

Foram avaliadas as variáveis biométricas Altura das plantas (PH), Diâmetro do caule (SD), Comprimento da raiz (RL), Número de folhas (LN) e biomassa. Para avaliação da biomassa, as plantas foram segmentadas em folhas, caule e raízes, e o material, submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 65°C até massa constante. Logo após, foi determinada a massa seca de cada parte da planta. A soma dos valores correspondentes à biomassa de cada componente estrutural das plantas (LDM + SDM + RDM) possibilitou a determinação da massa seca total (TDM).

Folhas, caule e raízes, após secagem em estufa com circulação forçada de ar (SL-102/1152, SOLAB) a 65°C e trituradas em moinho tipo Willey (R-TE-680, TECNAL), foram analisadas separadamente para o teor de P. As análises foram feitas segundo metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

3.2.4.5 Avaliação anatômica da raiz

Foi avaliado o diâmetro dos elementos de vaso da raiz, como um indicativo de desenvolvimento radicular, isto porque o desenvolvimento da raiz é comumente associado à disponibilidade de fósforo para a planta (Rosolem and Marcello, 1998). Assim, amostras das raízes foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio pH 7,2, acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965). Foram então feitos cortes transversais das raízes, com 5 μm de espessura, corados com azul de toluidina pH 6,8 (O'brien et al., 1964). Nestes cortes, foi mensurado o diâmetro dos elementos de vaso, utilizando o software Anati Quanti 2.0 (Aguiar et al., 2007). As medições foram feitas aplicando 15 medidas por repetição, sendo os tratamentos avaliados em quintuplicata.

3.2.4.6 Trocas gasosas

A avaliação das trocas gasosas foi feita no período de 07 h às 10 h da manhã, na 3ª folha, contada a partir do ápice da planta, com o auxílio de analisador de gás infravermelho IRGA com fluorômetro acoplado (modelo LI-6800xt, LI-COR Inc., Lincoln, USA), usando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (1000 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura de bloco de 27 ° C e umidade relativa de ~ 70%. Foram mensuradas a taxa de fotossíntese líquida (A) (μmol de CO_2 $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a condutância estomática (g_{sw}) (mol de H_2O $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a transpiração (E) (mmol de H_2O $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a concentração interna de carbono (C_i) (mmol $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.2.4.7 Pigmentos fotossintéticos

A concentração dos pigmentos fotossintéticos foi avaliada utilizando discos foliares (três discos de massa da matéria fresca, com 5 mm de diâmetro cada). Estes discos foram cobertos com solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e saturados com CaCO_3 (Santos et al., 2007). Posteriormente, eles foram armazenados em tubos envolvidos em papel alumínio pelo período de 24 horas, sob temperatura de 65°C. Em seguida, a absorbância do extrato obtido foi determinada por espectrofotometria a 664, 649 e 480 nm. As concentrações de clorofila a, b, total e carotenoides foram obtidas de acordo com Wellburn (1997).

3.2.4.8 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência transiente OJIP da clorofila *a* foi determinada com o uso de fluorômetro portátil FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments; Drasov, Czech Republic). A 3ª folha de todas as unidades amostrais foi previamente adaptada ao escuro por 30 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. Posteriormente, foram submetidas a pulsos de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul, medindo-se a fluorescência mínima (F_0) em $50 \mu\text{s}$ quando todos os centros de reação PSII estavam abertos e definido como o passo O, seguida pelo passo J (a 2 ms), pelo passo I (a 30 ms) e pela fluorescência máxima (F_M), quando todos os centros de reação PSII estavam fechados, conhecido como passo P. Estes valores foram utilizados para a estimativa de vários índices bioenergéticos do PSII, conforme Strasser et al. (2000). Foram estimados os valores relativos ao fluxo específico de absorção luminosa por centro de reação (ABS/RC); o fluxo de energia capturado por centro de reação em $t = 0$ (TRo/RC); o fluxo de transporte de elétrons por centro de reação (ETo/RC); o fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas do complexo antena (Dio/RC); o índice de desempenho fotossintético ($P_i\text{-Abs}$), que incorpora os processos da cascata de energia dos primeiros eventos de absorção até a redução de PQ; o rendimento quântico máximo da fotoquímica primária (PHI_{Po}); a probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (PSI_O); e o rendimento quântico do transporte de elétrons (PHI_{Eo}), após adaptação das folhas ao escuro (30 min).

A fluorescência da clorofila *a* nas folhas das plantas de *G. max* também foi avaliada com o auxílio de um fluorômetro modulado Imaging-PAM para a obtenção de imagens da fluorescência. Inicialmente, foram determinadas em folhas pré-adaptadas ao escuro por 30 min, a fluorescência inicial (F_0) e a fluorescência máxima (F_m). A partir disso, foi possível calcular o rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) ($FV/FM = (F_m - F_0)/F_m$). Sequencialmente, foram obtidas as variáveis da fase lenta de indução da fluorescência: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e F_m em amostra adaptada à luz (F_m'). Estes dados foram utilizados para obter o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII, $\Phi_{II} = (F_m' - F)/F_m'$.

3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos de solubilização *in vitro* foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, considerando 09 tratamentos com micro-organismos (08 isolados + Biomaphos®) e um tratamento controle (sem inoculação). As médias observadas para solubilização de CaHPO_4 e pH foram submetidas à ANOVA one-way para avaliação apenas do efeito de tratamento. Quando significativos, os efeitos foram avaliados por teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Já o experimento *in vivo* foi conduzido em blocos ao acaso, sendo 09 tratamentos com micro-organismos (08 isolados + Biomaphos®) e dois tratamentos controle (plantas cultivadas em solução nutritiva sem micro-organismos e plantas cultivadas em solução nutritiva sem P). Todos os tratamentos foram avaliados em 05 repetições, sendo cada repetição constituída de 2 plantas por vaso. Os dados obtidos para as análises biométricas, teor tecidual de P, análises fisiológicas e anatômicas, foram submetidos à ANOVA one-way para avaliação do efeito de tratamento. Quando significativos, os efeitos foram avaliados pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

Posteriormente, todas as variáveis foram avaliadas conjuntamente por uma matriz de correlação e combinadas em uma análise de componentes principais (PCA). Como estas variáveis tinham diferentes unidades de medidas, foi feita uma PCA de correlação, construída utilizando os dados padronizados para ter média 0 e desvio padrão 1. O número de componentes foi escolhido em função dos autovalores (>1.0) e da variância explicada (acima de 80%). As variáveis foram também avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson, sendo a força da relação analisada pelos valores de R e da significância da interação a 5% de probabilidade. Todos os testes estatísticos foram feitos em ambiente R 4.0.4 (R Core Team, 2021).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Experimento in vitro: meio de cultura sólido

Em meio sólido, somente as cepas *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* (Biomaphos®) e *Bacillus cereus* (SC5) mostraram potencial para solubilização de CaHPO_4 pela produção de halos de solubilização. A capacidade solubilizadora observada para estes isolados foi classificada como baixa (IS < 2) (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4) em meio sólido (GELP), por isolados bacterianos e fúngicos rizosféricos, ou endofíticos de *Hymenaea courbaril* ou ainda endofíticos de *Butia purpurascens*.

Micro-organismos	Índice de Solubilização	Capacidade de Solubilização
SC10	1,25 a	Baixa
PA12	NS	NS
Biomaphos®	1,27 a	Baixa
SC5	1,14 a	Baixa
SC15	NS	NS
PA26	NS	NS
SC4	NS	NS
33EF	NS	NS
328EF	NS	NS
Controle	NS	NS

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. NS = Não formou halo de solubilização.

3.3.2 Experimento in vitro: meio de cultura líquido

As cepas *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Bacillus cereus* (SC5) apresentaram maior eficiência de solubilização em meio líquido contendo CAHPO_4 como fonte fosfatada. Todos os isolados microbianos reduziram o pH do meio em relação ao controle sem inoculação, excetuando as cepas fúngicas de *Hamigera insecticola* (33EF) e *Codinaeopsis* sp. (328EF), que apresentaram as menores médias observadas para solubilização (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4) em meio líquido (GL), por isolados bacterianos e fúngicos, rizosféricos ou endofíticos de *Hymenaea courbaril* ou ainda endofíticos de *Butia purpurascens*.

Tratamentos	pH	P solúvel (mg L^{-1})
SC10	4,79 c	5,53 a
PA12	4,80 c	5,62 a
Biomaphos®	4,89 c	4,61 b
SC5	4,96 b	5,13 a
SC15	5,28 b	3,15 c
PA26	5,48 b	3,69 b
SC4	5,53 b	3,18 c
33EF	6,37 a	1,82 d
328EF	6,49 a	1,48 d
Controle	6,73 a	0,33 e

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

3.3.3 Colonização radicular

Todas as bactérias e fungos avaliados mostraram capacidade para colonizar efetivamente o sistema radicular, formando grandes agregados superficiais (Figuras 1 e 2). As análises de microscopia eletrônica mostraram formação de cristais proteicos nas colônias de *Bacillus thuringiensis* (SC10) e de esporos bacterianos nas colônias radiculares de *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) e (Figuras 1D e 1H) e também grande concentração de esporos fúngicos nas colônias de *Codinaeopsis* sp. (328E) (Figuras 2G e 2H).

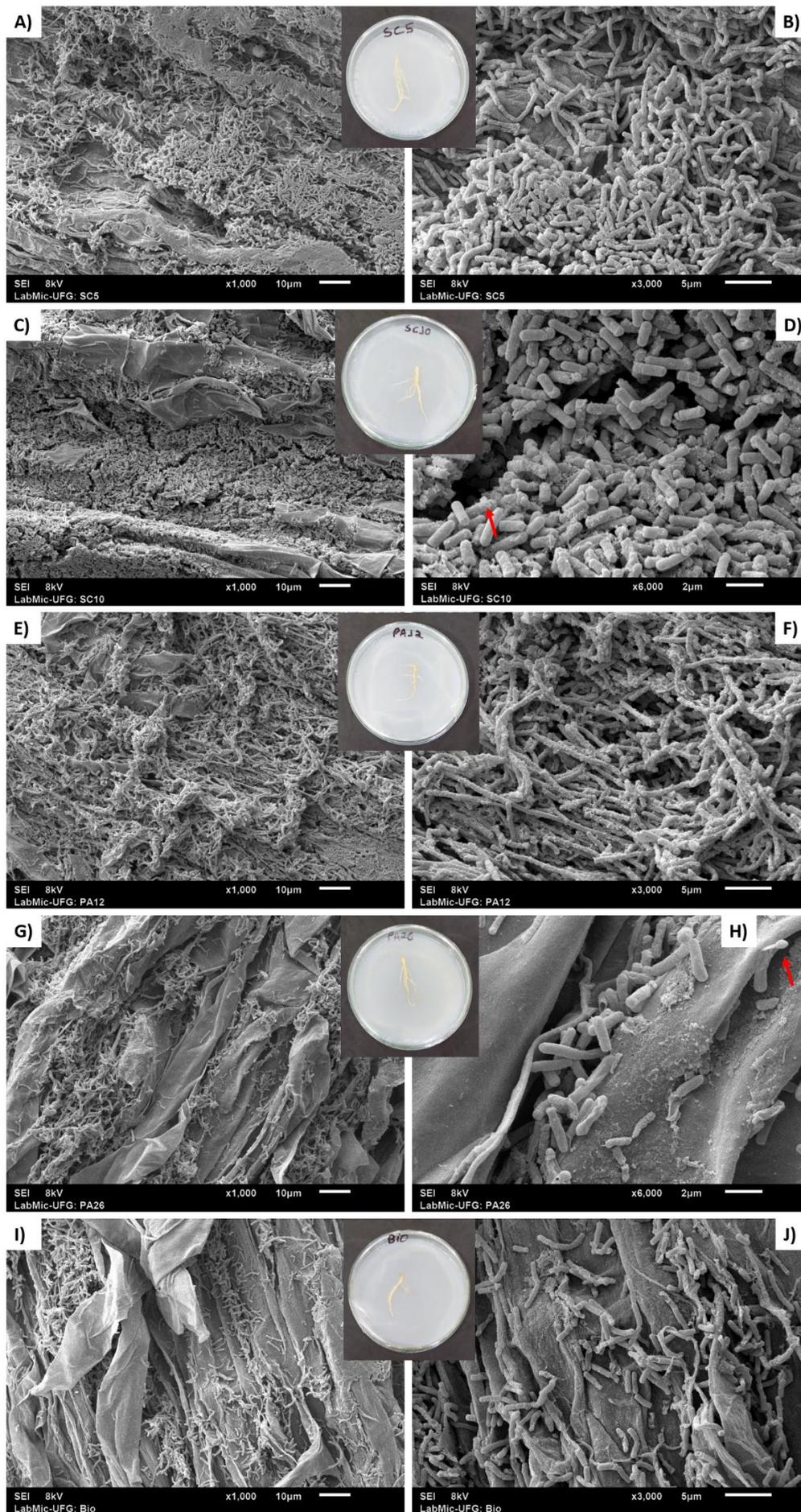


Figura 1. Aspectos microscópicos da colonização radicular em plantas de soja (*Glycine max*) tratadas com 04 isolados bacterianos e Biomaphos®. SC5 = *Bacillus cereus* (A e B), SC10 = *Bacillus thuringiensis* (C e D), PA12 = *Paenibacillus alvei* (E e F), PA26 = *Lysinibacillus fusiformis* (G e H) e Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* (I e J). As setas vermelhas indicam presença de cristal proteico (D) e esporo (H).

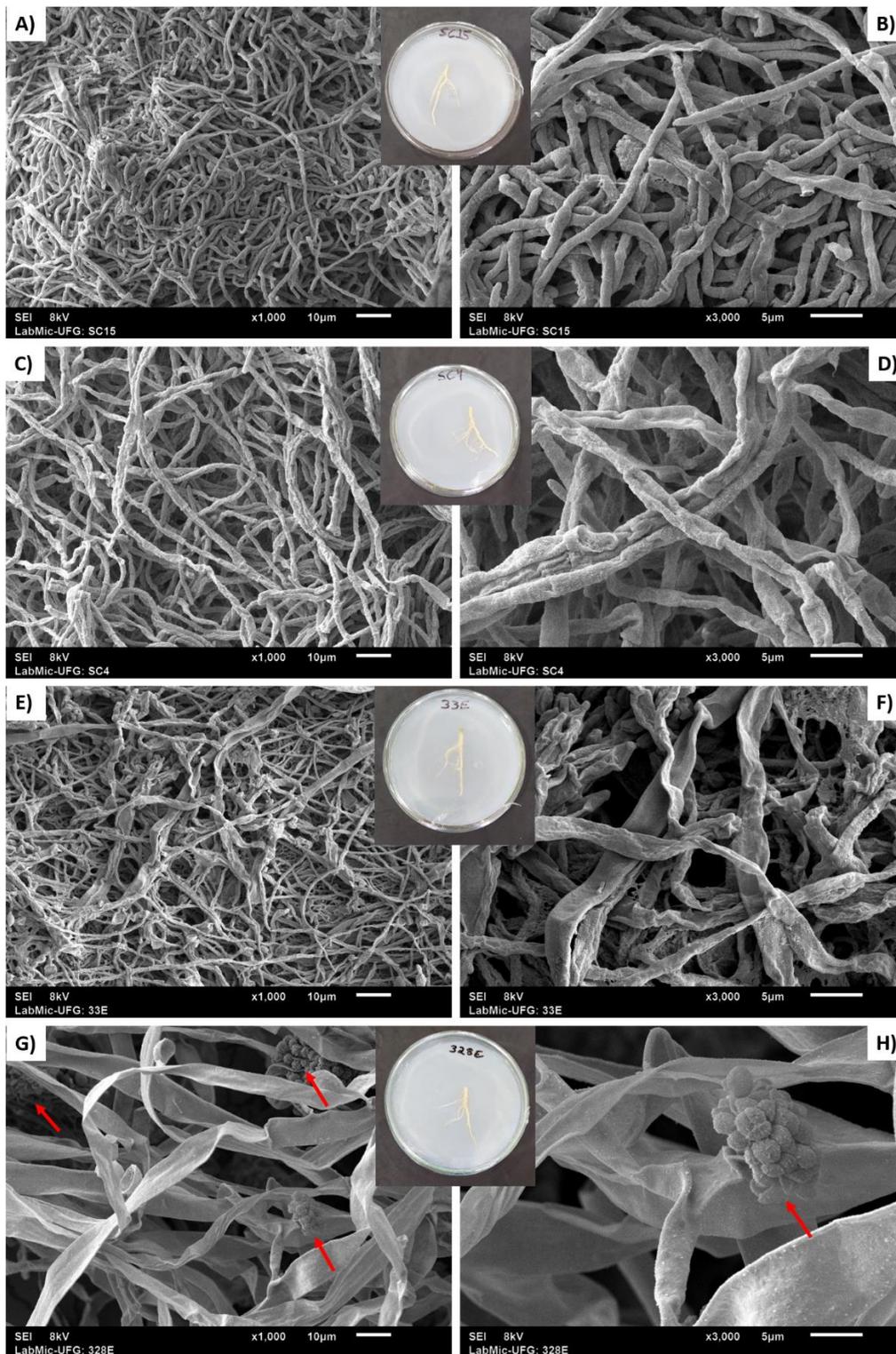


Figura 2. Aspectos microscópicos da colonização radicular em plantas de soja (*Glycine max*) tratadas com 04 isolados fúngicos. SC15 = *Penicillium sheari* (A e B), SC4 = *Epicoccum keratinophilum* (C e D), 33EF = *Hamigera insecticola* (E e F), 328EF = *Codinaeopsis* sp. (G e H). As setas vermelhas indicam presença de esporos (G e H).

3.3.4 Experimento *in vivo*: cultivo hidropônico

3.3.4.1 Avaliação da promoção de crescimento

A exposição das mudas de *G. max* aos micro-organismos testados não afetou a altura das plantas, sendo que as médias variaram entre o mínimo de 84.80 cm nas plantas inoculadas com *Epicoccum keratinophilum* (SC4) e o máximo de 93.80 cm nas plantas tratadas com *Paenibacillus alvei* (PA12). O crescimento das plantas em solução controle sem fósforo, contudo, foi afetado pela indisponibilidade deste elemento, sendo a altura média observada para estas plantas de apenas 64.25 cm (Figura 3A). Resultados semelhantes foram obtidos para comprimento da raiz, que se manteve igual nas plantas inoculadas com os diferentes micro-organismos e sob solução sem micro-organismos, tendo as médias variado entre o mínimo de 46.50 cm nas plantas inoculadas com *Epicoccum keratinophilum* (SC4) e sem micro-organismos e o máximo de 93.80 cm nas plantas tratadas com *Paenibacillus alvei* (PA12). As plantas mantidas em solução nutritiva sem fósforo também tiveram o comprimento radicular afetado, tendo sido verificada média de 34.00 cm (Figura 3B).

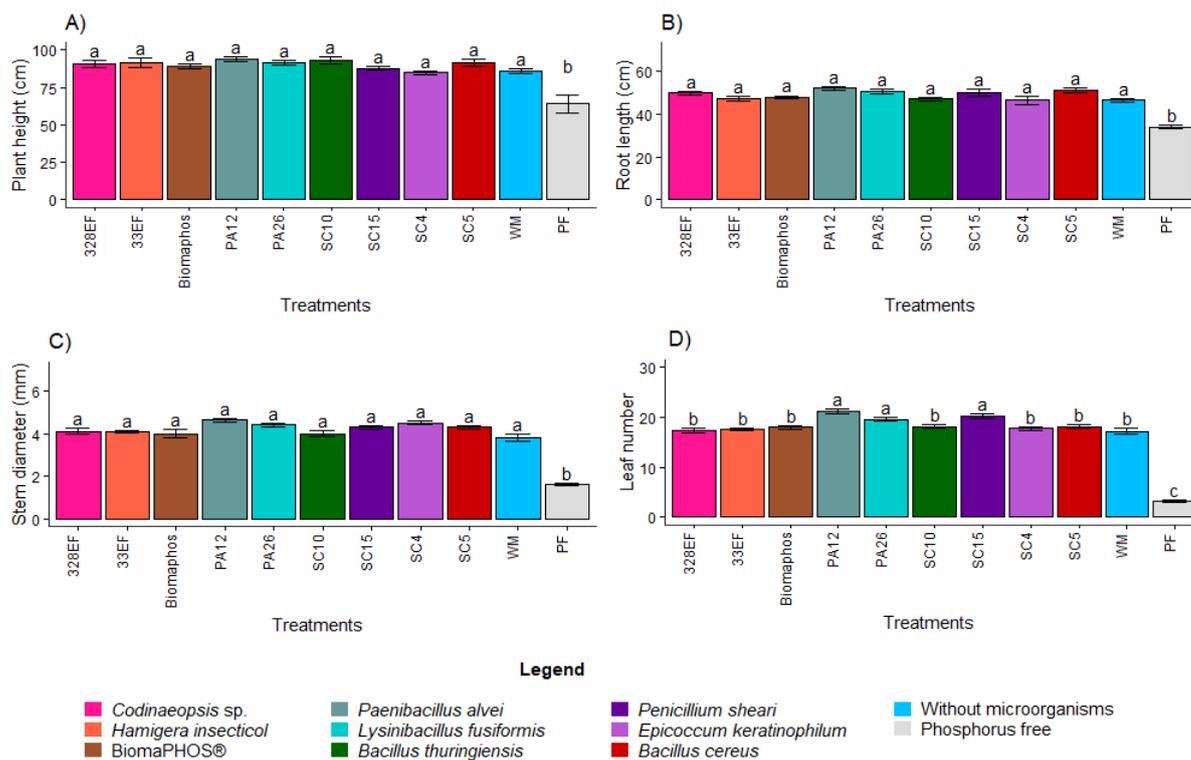


Figura 3. Altura de planta (A), comprimento de raiz (B), diâmetro do caule (C) e número de folhas (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

As médias obtidas para o diâmetro do caule também seguiram o mesmo padrão, não diferiram entre as plantas crescidas em solução sem micro-organismos e plantas inoculadas, variando entre o mínimo de 0.38 mm nas plantas não inoculadas e o máximo de 0.46 mm nas plantas tratadas com *Paenibacillus alvei* (PA12). Tal como descrito para as variáveis anteriores, as plantas submetidas a uma solução nutritiva sem fósforo apresentaram também baixo desenvolvimento do diâmetro do caule (0.16 mm) (Figura 3C). O número de folhas, no entanto, foi significativamente afetado pelos tratamentos de inoculação, sendo os maiores valores verificados para as plantas inoculadas com os micro-organismos *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) e *Penicillium sheari* (SC15), respectivamente, 21,2; 20,2 e 19,6 folhas. A ausência de fósforo na solução também afetou o número de folhas das plantas, sendo a média de apenas 3,25 folhas nas plantas desenvolvidas sob este tratamento (Figura 3D).

As massas da matéria seca da folha, caule, raiz não apresentaram diferença entre as plantas inoculadas com os micro-organismos e as plantas crescidas em solução

sem micro-organismos. As médias de matéria seca da folha variaram entre o mínimo de 4,39 g nas plantas não inoculadas e o máximo de 5,20 g nas plantas tratadas com *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) (Figura 4A). As massas de matéria seca do caule seguiram comportamento semelhante, variando entre o mínimo de 4,05 g nas plantas não inoculadas e o máximo de 5,31 g nas plantas tratadas com *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) (Figura 4B). As médias de matéria seca da raiz também seguiram o padrão descrito acima, variando entre o mínimo de 2,91 g nas plantas não inoculadas e o máximo de 4,12 g nas plantas tratadas com *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) (Figura 4C). As plantas crescidas em solução sem fósforo, no entanto, apresentaram os menores valores observados para as massas da matéria seca da folha, caule, raiz, respectivamente 0,196; 1,036 e 0,847 g.

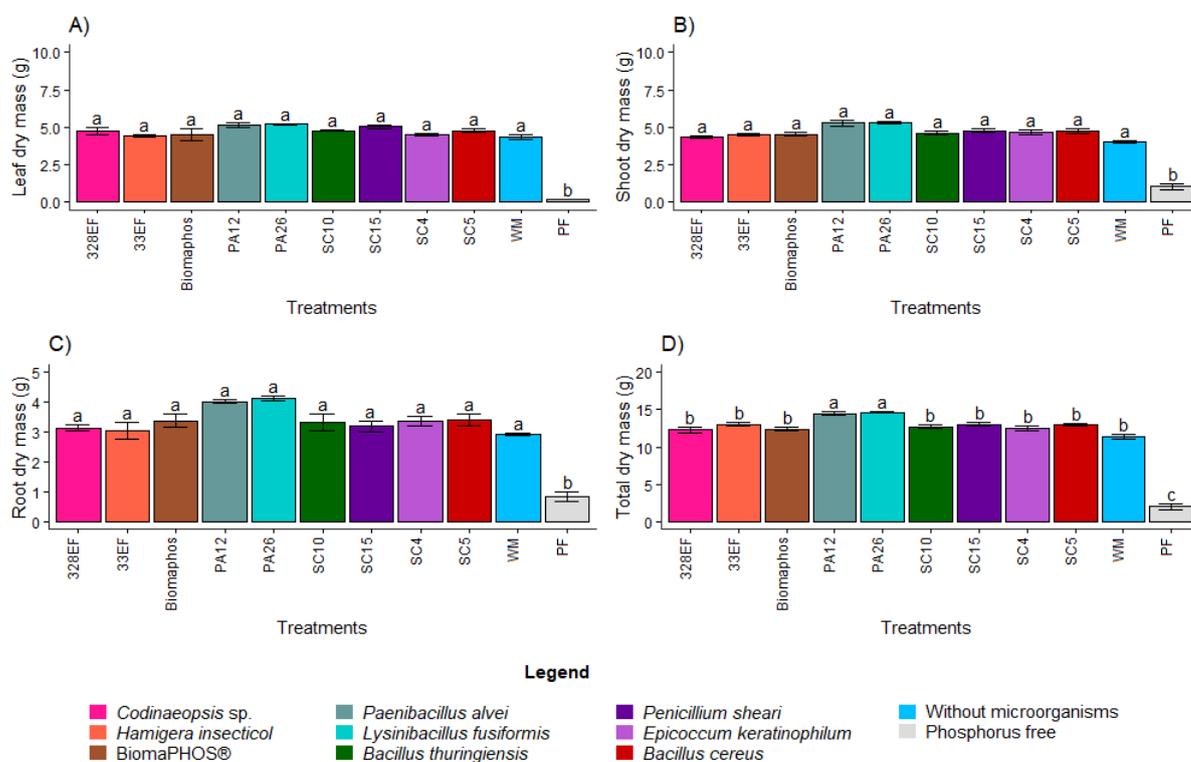


Figura 4. Massa seca das folhas (A), massa seca do caule (B), massa seca da raiz (C) e massa seca total (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

Para massa seca total, os maiores valores foram observados para as plantas inoculadas com as bactérias *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), 14, 63 e 14,43 g, respectivamente. As plantas crescidas em solução sem micro-organismos apresentaram média de 11,35 g de massa seca total, mas as plantas mantidas

em solução sem fósforo apresentaram os menores valores observados, 2,08 g) (Figura 4D).

3.3.4.2 Avaliação do desempenho na absorção de P: Teor tecidual de P

O teor de fósforo não se diferenciou das folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos avaliados, sendo que as médias variaram entre o mínimo de 0,67 g nas plantas crescidas sem P e o máximo de 1,30 g kg⁻¹ nas plantas tratadas com *Paenibacillus alvei* (PA12) (Figura 5A). O teor de P do caule, no entanto, foi afetado pelos tratamentos de inoculação, sendo maior nas plantas inoculadas com os micro-organismos *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), respectivamente, 1,25 e 1,25 g kg⁻¹ (Figura 5B). Nas raízes, o teor de P foi maior para as plantas inoculadas com os micro-organismos *Codinaeopsis* sp. (328EF), *Hamigera insecticola* (33EF), *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Bacillus thuringiensis* (SC10) e *Penicillium sheari* (SC15), respectivamente 1,50; 1,57; 1,40; 1,45; 1,35 e 1,35 g kg⁻¹ (Figura 5C). Quando avaliado o teor de P total, as maiores médias foram observadas nas plantas inoculadas com as bactérias *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), 3,95 e 3,77 g kg⁻¹, respectivamente, enquanto as menores médias foram verificadas nas plantas crescendo em solução sem micro-organismos (2,58 g kg⁻¹) e solução sem fósforo (2,13 g kg⁻¹) (Figura 5D).

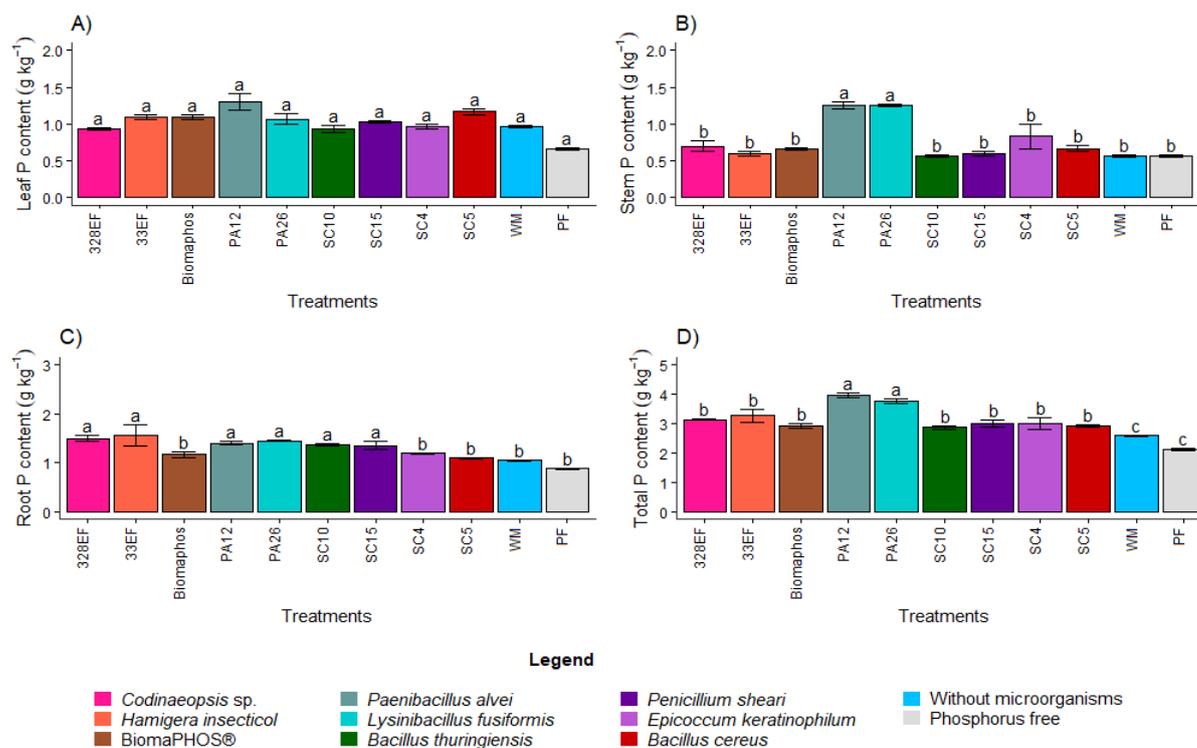


Figura 5. Teor tecidual de P nas folhas (A), caule (B), raízes (C) e total (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

3.3.4.3 Avaliação do desempenho fotossintético: Trocas gasosas

A inoculação microbiana afetou as taxas de trocas gasosas de *G. max*. A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) foi maior nas plantas inoculadas com os isolados *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Bacillus cereus* (SC5) e *Penicillium sheari* (SC15), sendo os valores, respectivamente, de 841, 743, 965 e de 878 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 6A). Nestas plantas, no entanto, foram observadas baixas taxas relativas à concentração interna de CO_2 (C_i), respectivamente, 235,6; 219,90; 230,85 e 230,24 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto as maiores médias foram verificadas nas plantas crescidas em solução sem fósforo (280,32 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e inoculadas com os micro-organismos *Codinaeopsis* sp. (328EF) e Biomaphos®, 256, 96 e 251, 16 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Figura 6B). Comportamento semelhante ao observado para A foi verificado para condutância estomática (G_{sw}), sendo as maiores médias obtidas para os tratamentos de inoculação com os isolados *Codinaeopsis* sp. (328EF), *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Penicillium sheari* (SC15) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente, 0,072; 0,099; 0,077; 0,098 e 0,109 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e para as plantas sob solução sem micro-organismos, foi de 0,070 $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 6C). A taxa de transpiração (E), por sua vez, foi superior nas plantas crescidas sob solução sem micro-organismos (0,0016) e inoculadas com os micro-organismos *Codinaeopsis* sp. (328EF), Biomaphos®, *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Penicillium sheari* (SC15) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente, 0,0021; 0,0018; 0,0024; 0,0018; 0,0023 e 0,0026 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 6D).

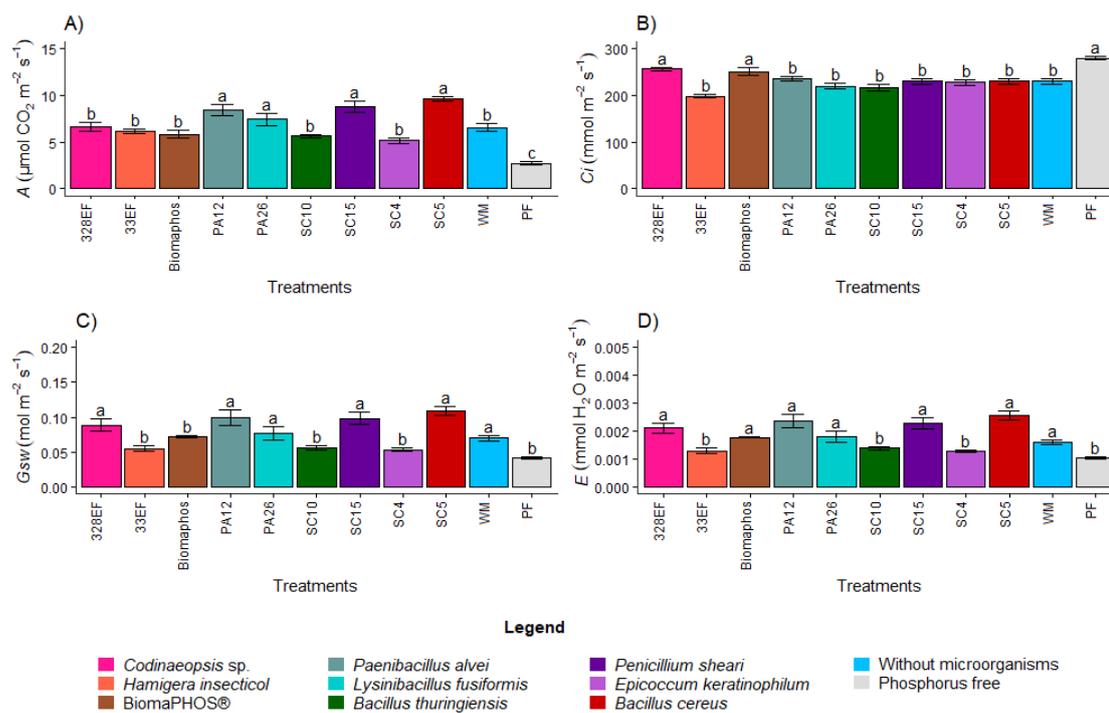


Figura 6. Taxa fotossintética (A) (A), concentração interna de CO₂ (Ci) (B), condutância estomática (Gsw) (C) e taxa de transpiração (E) (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

3.3.4.4 Avaliação do desempenho fotossintético: Pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofila *a* aumentaram nas plantas inoculadas com os microorganismos *Hamigera insecticola* (33EF), *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Penicillium sheari* (SC15), *Epicoccum keratinophilum* (SC4) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente 42.437, 49.240, 47.717, 47.571, 41.469 e 46.,052 μmol m⁻² (Figura 7A). Os teores de clorofila *b* também aumentaram seguindo padrão semelhante ao observado para clorofila *a*, sendo maiores nas plantas submetidas à inoculação dos isolados *Codinaeopsis* sp. (328EF), *Hamigera insecticola* (33EF), *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Penicillium sheari* (SC15), *Epicoccum keratinophilum* (SC4) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente 11.644, 13.723, 13.069, 13.726, 12.231, 12.269 e 12.704 μmol m⁻² (Figura 7B).

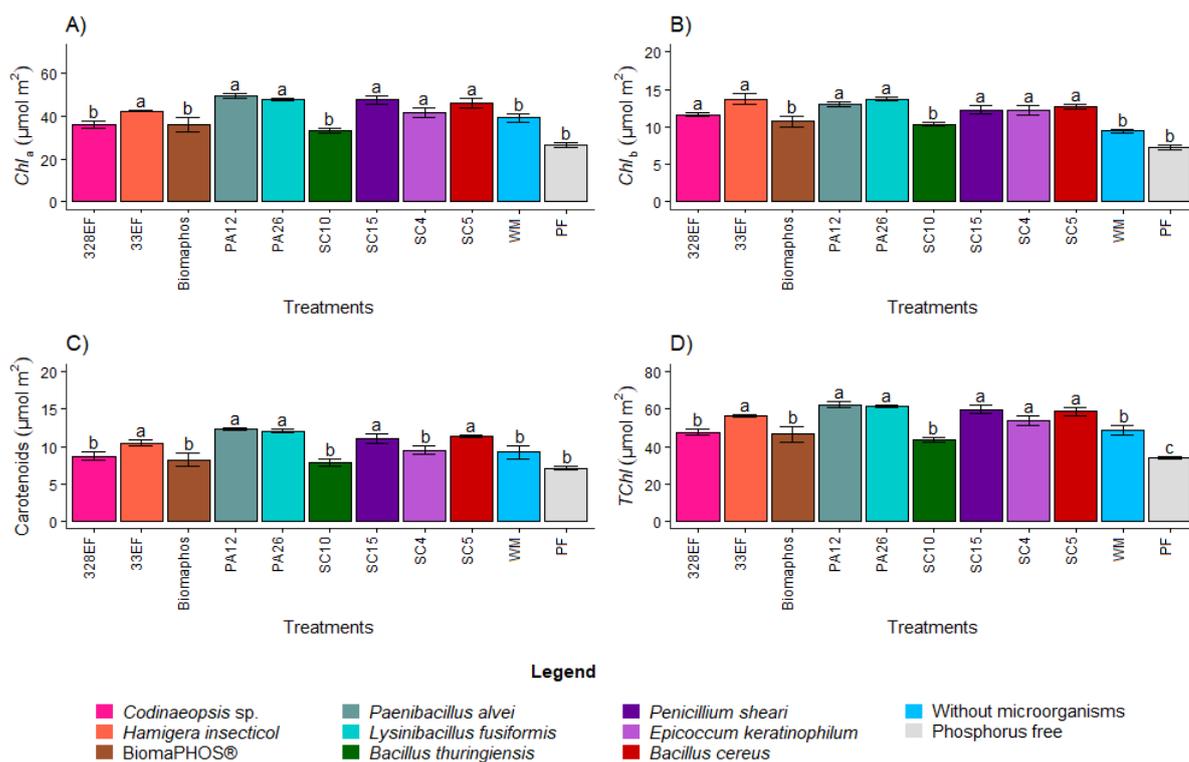


Figura 7. Teor de clorofila *a* (A), teor de clorofila *b* (B), teor de carotenoides (C) e clorofila total (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

A inoculação microbiana também afetou o teor de carotenoides, que foi superior nas plantas inoculadas com os micro-organismos *Hamigera insecticola* (33EF), *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Penicillium sheari* (SC15) e *Bacillus cereus* (SC5), sendo as médias observadas, respectivamente, 10.458, 12.275, 12.084, 11.034 e 11.382 μmol m⁻² (Figura 7C). O teor de clorofila total variou conforme o observado para as outras clorofilas, sendo as médias superiores obtidas nas plantas tratadas com os micro-organismos *Hamigera insecticola* (33EF), *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Penicillium sheari* (SC15), *Epicoccum keratinophilum* (SC4) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente, 56.161, 62.309, 61.444, 59.802, 53.738 e 58.756 μmol m⁻², contudo, médias muito inferiores foram observadas nas plantas crescidas em solução sem fósforo (33.832 μmol m⁻²) (Figura 7D).

3.3.4.5 Avaliação do desempenho fotossintético: Fluorescência da clorofila *a*

Como esperado, os fluxos de energia específica dos centros de reação ativos ABS/RC e DIo/RC foram afetados de maneira semelhante pela inoculação microbiana, de forma que os menores valores médios de ABS/RC foram observados nas plantas crescidas com os micro-organismos *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Penicillium sheari* (SC15) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente, 2.986, 2.962, 3.127, 2.989 e 2.859, bem como nas plantas crescidas em solução sem micro-organismos (2.935) (Figura 8A). Os menores valores médios de DIo/RC foram obtidos nas plantas submetidas à mesma sequência de tratamentos acima, respectivamente, 0.714; 0,686; 0,842; 0,796; 0,660 e 0.667 (Figura 8D). As médias observadas para TR0/RC e ET0/RC, no entanto, não foram afetadas por nenhum dos tratamentos avaliados. Os valores de TR0/RC variaram entre o mínimo de 2.193 nas plantas inoculadas com *Penicillium sheari* (SC15) e o máximo de 2.546 nas plantas tratadas com *Hamigera insecticola* (33EF) (Figura 8B), enquanto as médias para ET0/RC variaram entre o mínimo de 985 nas plantas crescidas em solução nutritiva sem P e o máximo de 1.384 nas plantas tratadas com o fungo *Hamigera insecticola* (33EF) (Figura 8C).

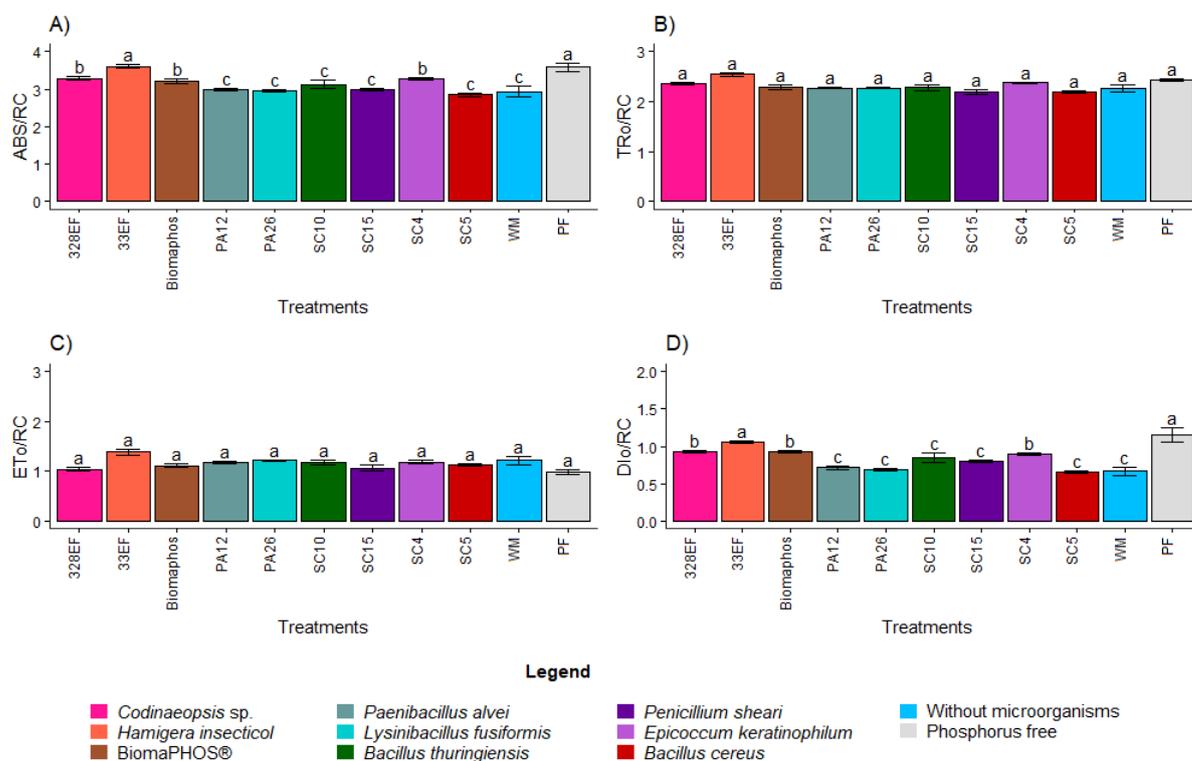


Figura 8. Fluxo de absorção por RC (ABS/RC) (A), fluxo de energia capturado por RC em $t = 0$ (TR0/RC) (B), fluxo de transporte de elétrons por RC em $t = 0$ (ET0/RC) (C) e fluxo específico de dissipação da energia (DIo/RC) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias

seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

Os parâmetros cinéticos da fluorescência da Chl *a* também foram significativamente afetados pela inoculação de micro-organismos. O rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (Phi_Po) foi maior para as plantas inoculadas com os micro-organismos *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente, 0,763; 0,769 e 0,769, bem como nas plantas crescidas em solução sem micro-organismos (0,752) (Figura 9A). A probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (Qa) (Psi_o), no entanto, foi reduzida nas plantas inoculadas com o isolado *Codinaeopsis* sp. (328EF) (0,443) e sob solução sem P (0,406) (Figura 9B). As médias observadas para o rendimento quântico do transporte de elétrons (Phi_Eo) seguiram o mesmo padrão relatado anteriormente para Psi_o, sendo os valores reduzidos sob *Codinaeopsis* sp. (328EF) (0,323) e solução sem P (0,277) (Figura 9C). O índice de desempenho fotossintético (Pi_ABS), no entanto, foi superior nas plantas inoculadas com os micro-organismos *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente, 1,244; 1,289 e 1,255, sugerindo melhor desempenho destas plantas na conversão de energia luminosa em energia química (Figura 9D).

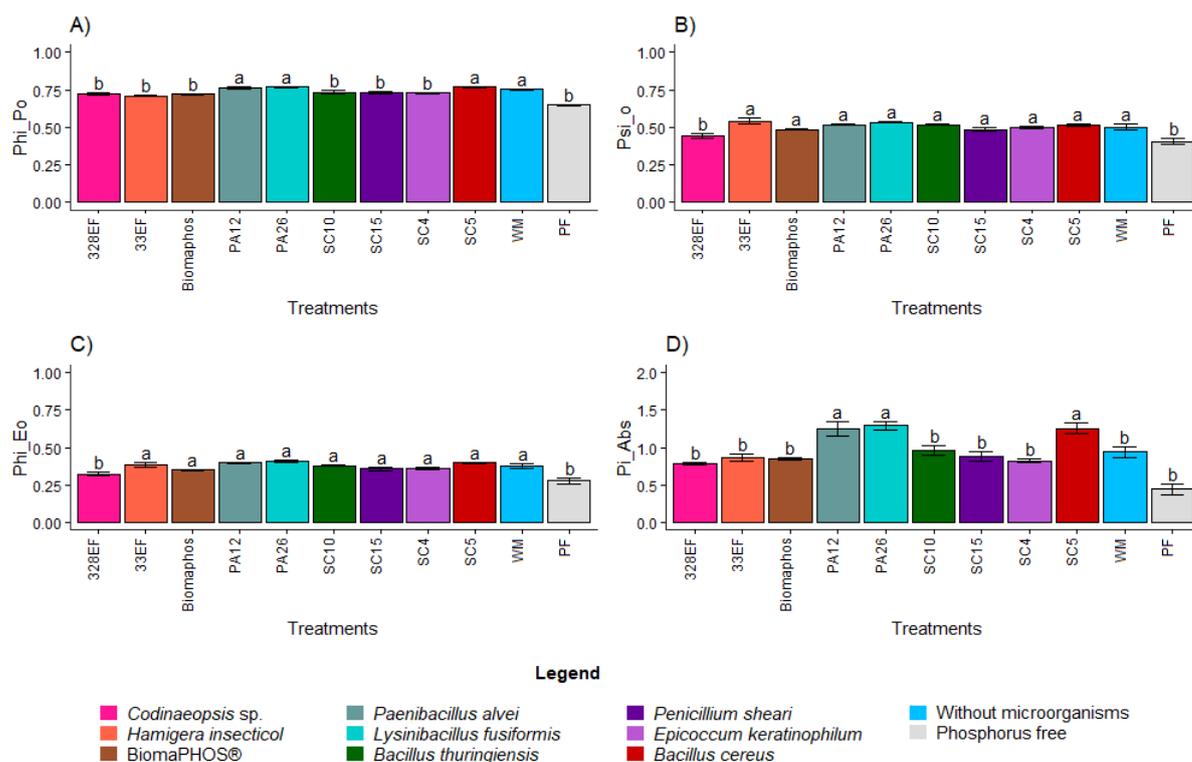


Figura 9. Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (PHI_{Po}) (A), probabilidade de um éxciton mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após a Quinona (Qa) (PSI_O) (B), rendimento quântico do transporte de elétrons (PHI_{Eo}) (C) e índice de desempenho fotossintético (Pi_{Abs}) (D) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO₄) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

As análises de fluorescência de imagem confirmaram a superioridade do padrão comportamental da fluorescência da clorofila *a* observado nas plantas inoculadas com *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) e *Bacillus cereus* (SC5) e a inferioridade do padrão observado nas plantas crescidas em solução sem P, bem como nas plantas inoculadas com *Epicoccum keratinophilum* (SC4), *Codinaeopsis* sp. (328EF) e *Hamigera insecticola* (33EF) (Figura 10).

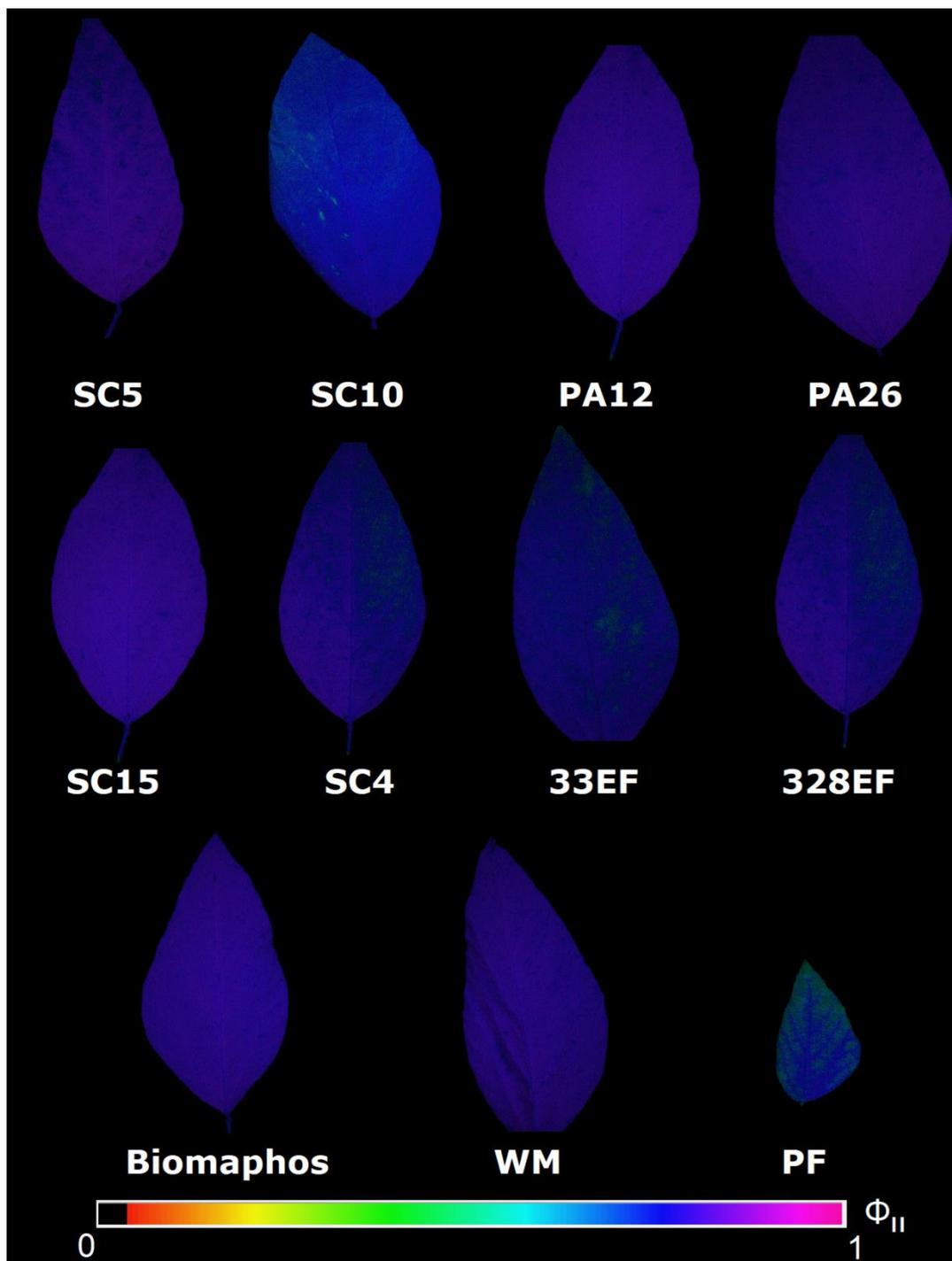


Figura 10. Imagens de fluorescência da clorofila a obtidas para o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII (Φ_{II}), observado em folhas de (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. SC5 = *Bacillus cereus*, SC10 = *Bacillus thuringiensis*, PA12 = *Paenibacillus alvei*, PA26 = *Lysinibacillus fusiformis*, SC15 = *Penicillium sheari*, SC4 = *Epicoccum keratinophilum*, 33EF = *Hamigera insecticola*, 328EF = *Codinaeopsis* sp., Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, WM = without microorganisms, PF = phosphorus free.

3.3.4.6 Avaliação do desempenho anatômico: Anatomia da raiz

Os tratamentos de inoculação afetaram o diâmetro dos elementos de vasos das raízes, de forma que as maiores médias foram observadas nas plantas inoculadas com *Paenibacillus alvei* (PA12), *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), *Penicillium sheari* (SC15), *Epicoccum keratinophilum* (SC4) e *Bacillus cereus* (SC5), respectivamente, 55.383, 52.223, 49.943, 49.867 e 49.320 μm . Por outro lado, as menores médias foram verificadas nas plantas crescidas em solução sem P (28.787 μm), seguidas de solução sem micro-organismos (39.910 μm) (Figura 11).

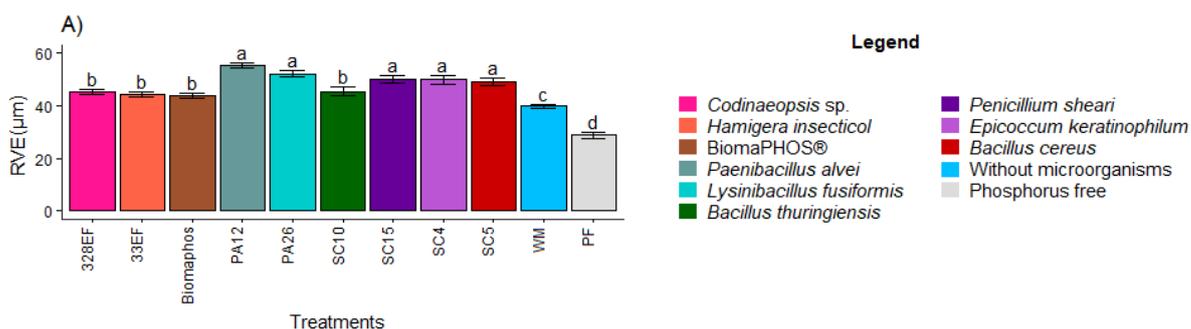


Figura 11. Diâmetro dos elementos de vasos das raízes (RVE) em plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte fosfatada e inoculadas com 05 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 0,05% de probabilidade.

De fato, as análises anatômicas evidenciaram superioridade no desenvolvimento dos elementos de vasos e também no calibre radicular das plantas tratadas com os isolados *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26). Por outro lado, o desenvolvimento radicular se tornou comprometido nas plantas crescidas em solução sem P, bem como nas plantas não submetidas à ação microbiana (Figura 12).

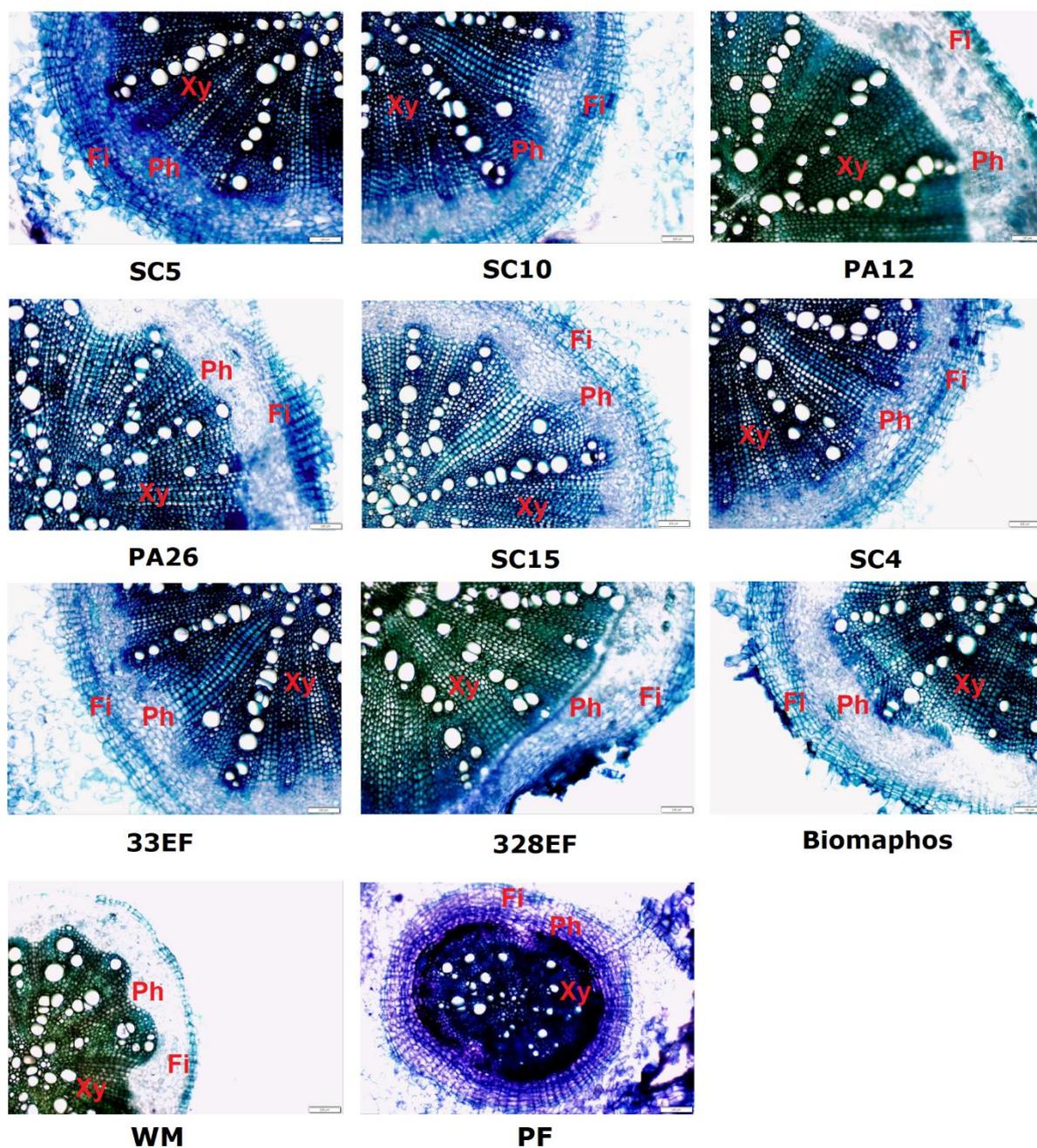


Figura 12. Cortes transversais evidenciando diferentes regiões anatômicas (Xy = Xilema; Ph = Floema; Fi = Fibras) da raiz de plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas em solução nutritiva, fornecendo fosfato de cálcio (CaHPO_4) como fonte fosfatada e inoculadas com 04 isolados bacterianos e 04 isolados fúngicos. SC5 = *Bacillus cereus*, SC10 = *Bacillus thuringiensis*, PA12 = *Paenibacillus alvei*, PA26 = *Lysinibacillus fusiformis*, SC15 = *Penicillium sheari*, SC4 = *Epicoccum keratinophilum*, 33EF = *Hamigera insecticola*, 328EF = *Codinaeopsis* sp., Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, WM = without microorganisms, PF = phosphorus free.

Bacillus cereus, SC10 = *Bacillus thuringiensis*, PA12 = *Paenibacillus alvei*, PA26 = *Lysinibacillus fusiformis*, SC15 = *Penicillium sheari*, SC4 = *Epicoccum keratinophilum*, 33EF = *Hamigera insecticola*, 328EF = *Codinaeopsis* sp., Biomaphos® = *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, WM = without microorganisms, PF = phosphorus free.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Os resultados de solubilização obtidos utilizando as metodologias *in vitro* não são consonantes com os resultados obtidos utilizando o sistema hidropônico como método

Os testes conduzidos em meio sólido atestaram potencial solubilizador para *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Bacillus cereus* (SC5) e Biomaphos®, enquanto em meio líquido, a capacidade ficou evidenciada para *Bacillus thuringiensis* (SC10), *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Bacillus cereus* (SC5). A sobreposição de dois isolados nestes resultados sugere uma pequena coerência entre estas duas metodologias, contudo, as análises *in vivo*, por meio do sistema hidropônico, atestam que *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), um isolado que não se mostrou solubilizador de CaHPO₄ em nenhum dos testes *in vitro*, são mais eficientes em promover o crescimento e disponibilizar fósforo livre para a planta, o que foi demonstrado pelo maior teor de P total nos tecidos de *G. max*. De fato, as avaliações do potencial solubilizador conduzidas *in vitro*, por modificarem expressivamente as condições de vida do micro-organismo, são passíveis da influência de muitos fatores. A temperatura de crescimento, pH e constituição nutricional do meio de cultura podem afetar o crescimento e o metabolismo (Gibson and Mitchell, 2004; Tan et al., 2000; Walpolá et al., 2012; Yang et al., 2018), incluindo a capacidade de os isolados produzirem ácidos orgânicos ou enzimas fosfatases, diretamente associadas ao potencial do micro-organismo para liberar P a partir das formas CaHPO₄, Ca₃(PO₄)₂, AlPO₄ e FePO₄, nas quais ele se encontra imobilizado

De forma geral, a solubilização em meio de cultura líquido, por se tratar de uma metodologia quantitativa, é considerada mais confiável (Sousa et al., 2016). Nesta metodologia, o Pi livre pode ser quantificado e o acesso de ácidos orgânicos e enzimas fosfatases à fonte fosfatada ocorre de forma mais direta, mas a ausência de um hospedeiro e a impossibilidade de quantificar o fósforo realmente absorvido pela planta tornam essa metodologia questionável. Sendo assim, utilizando *G. max* como modelo, por meio de avaliações de crescimento, teor tecidual, desempenho fotossintético e

anatômico, as cepas *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) demonstraram ser mais efetivas na solubilização de CaHPO_4 em razão de seus efeitos gerais na promoção do crescimento geral.

3.4.2 O sistema hidropônico permite associar a solubilização de fosfato com a promoção do crescimento e a melhoria no desempenho fotossintético e anatômico

A inoculação dos isolados *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) na solução nutritiva incorreu em maior absorção de P por parte das plantas de *G. max*, sendo que a melhora deste aspecto nutricional aprimorou aspectos do crescimento, como aumento no número de folhas e massa seca total. Trabalhos têm confirmado que cepas solubilizadoras melhoram o estado nutricional das plantas, o que resulta em aumento na concentração de clorofila e melhora nos parâmetros de troca gasosa (Borowiak et al., 2021; Liu et al., 2020; Linu et al., 2019; Singh et al., 2018).

As plantas inoculadas com os isolados *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) também melhoraram sua taxa fotossintética em relação às plantas crescidas em solução sem micro-organismos. Altos valores de *A* estão intimamente relacionados com uma alta atividade da rubisco (Bowes, 2001). Trabalhos têm sugerido que sob suprimento ideal de P, a concentração e a atividade da rubisco são aumentada nas folhas (e.g., Alori et al., 2017; Lin et al., 2009; Wang et al., 2018; Warren et al., 2002). Chu et al. (2018) demonstraram que, em *G. max*, diminuições nas taxas fotossintéticas podem ser provocadas pelo estresse causado pela baixa disponibilidade de P, visto que este participa da regulação estrutural da folha, da síntese de adenosina trifosfato (ATP), da absorção e transporte de CO_2 , do transporte fotossintético de elétrons e dos níveis de enzimas relacionadas ao ciclo de Calvin. Sendo assim, micro-organismos solubilizadores de fosfatos, por aumentarem a disponibilidade de fósforo para as plantas, podem desempenhar importantes papéis no desempenho fotossintético (Anbi et al., 2019; Wu et al., 2019).

A inoculação de *G. max* com as bactérias *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) também incorreu em aumento na concentração dos pigmentos fotossintéticos, quando as plantas foram comparadas com plantas que cresceram sem inoculação microbiana ou sem administração de P. De fato, estas cepas solubilizadoras, por terem aumentado a liberação e consequente absorção de P pelas plantas, garantiram suprimento necessário à síntese de pigmentos. Estudos mostram que

a deficiência de fósforo diminui a síntese de clorofila (Choi et al., 2012; Viégas et al., 2018) e que a colonização radicular por micro-organismos promotores do crescimento como os solubilizadores de fosfato pode promover a síntese de carotenoides (Chen et al., 2017; Vafadar et al., 2014), aumentando a resistência das plantas a fatores bióticos e abióticos de estresse (Vafadar et al. 2014) pela proteção do aparelho fotossintético, diminuindo os efeitos da fotodestruição e fotoinibição (Sharma et al., 2015; Uarrota et al., 2018). Além disso, os micro-organismos podem afetar o processo de fixação de N₂ e a síntese de substâncias promotoras de crescimento e outros compostos como a auxina, que também tem efeito positivo na produção de pigmentos fotossintéticos (Ahemad et al., 2014; Bashan et al., 2010; Santos et al., 2019). É bem conhecido que micro-organismos solubilizadores de fosfatos influenciam alguns compostos associados ao crescimento, como as citocininas (Abbamondi et al., 2016; Kudoyarova et al., 2017), que têm efeito positivo na biossíntese da clorofila, no retardo da senescência e no processo de morte programada (Danilova et al., 2020; Kunikowska et al., 2013; Zhang et al., 2021; Zwack et al., 2013).

De forma geral, as plantas tratadas com as bactérias *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) absorveram mais P, o que constituiu um reflexo adaptativo do aumento observado no diâmetro dos elementos de vaso da raiz. As raízes foram eficientemente colonizadas por estas bactérias. A colonização microbiana é comumente relacionada a aumentos no tamanho e densidade da raiz primária, bem como dos pelos radiculares (Verbon et al., 2016), já que os pelos radiculares são importantes para aumentar a absorção de P (Gahoonia et al., 2001). Contudo, as condições de cultivo *in vitro* parecem ser estressantes para *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), de forma que foi evidenciada formação de esporos em colônias radiculares constituídas por este isolado. Isso ocorre porque muitas espécies da ordem Bacillales submetidas a estresse abiótico tendem a esporular, como mecanismo de resistência (Paredes-Sabja et al., 2011; Tan and Ramamurthi, 2014). A inatividade do esporo talvez explique a ineficiência deste isolado em solubilizar CaHPO₄ em meio líquido.

3.4.3 O sistema hidropônico permite separar ação de promoção do crescimento de indução de estresse biótico por meio do desempenho fotossintético

A inoculação microbiana afetou os parâmetros ABS/RC e DIO/RC. O aumento de ABS/RC indica que as plantas crescidas em solução sem fósforo bem como as

plantas inoculadas com os micro-organismos *Codinaeopsis* sp. (328EF), *Hamigera insecticola* (33EF), Biomaphos® e *Epicoccum keratinophilum* (SC4) apresentaram maior densidade de fótons absorvidos pelo centro de reação do PSII, possivelmente pela inativação de alguns centros de reações ou pelo aumento no tamanho da antena para compensar a perda de energia como calor (Schöttler et al., 2014; Urban et al., 2017). Esta observação sugere ocorrência de competição entre as plantas e estes isolados testados, o que afetou negativamente o desempenho (Pi_Abs). Estudos mostram que micro-organismos simbióticos podem se tornar patógenos oportunistas em condições de excesso de água, como em sistemas hidropônicos (Aung et al., 2017). Assim, as plantas diminuem seu número de centros de reação ativos, o que é considerado um mecanismo utilizado por folhas sob estresse, contra o dano foto-oxidativo e excessos de energia luminosa absorvidos (Kalaji et al., 2014; Kalaji et al., 2018). A fluorescência de imagem comprovou reduções no desempenho fotoquímico das plantas inoculadas com *Epicoccum keratinophilum* (SC4), *Codinaeopsis* sp. (328EF) e *Hamigera insecticola* (33EF), atestando condição de estresse fisiológico.

O oportunismo fitopatogênico de *Codinaeopsis* sp. (328EF), ao interagir com raízes de *G. max*, foi comprovado também pela alta esporulação observada via microscopia eletrônica durante a colonização por este isolado. Fungos fitopatogênicos frequentemente esporulam na presença de tecidos hospedeiros (Su et al., 2012), sendo este um mecanismo utilizado para estimular a esporulação dessa classe de fungos *in vitro* (e.g., Crous et al., 2006; Li et al., 2007; Liu et al., 2010). É possível que a biotina presente nos tecidos vegetais altere a síntese de polissacarídeos de parede e ácido oleico, desencadeando a expressão seletiva de genes envolvidos na esporulação (Su et al., 2012).

As plantas inoculadas com *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26), no entanto, mostraram valores baixos de ABS/RC e DIO/RC, compatíveis com as plantas não inoculadas, o que indica ausência de promoção de estresse biótico por estas cepas, visto que não houve redução no potencial dessas plantas de capturar fótons. Sob estresse, as plantas geralmente tentam melhorar sua adaptabilidade pelo ajuste da distribuição de energia, assim, valores mais altos de DIO/RC indicam mudança de centros fotoquimicamente ativos para centros do PSII fotoquimicamente inativos (Guidi et al., 2019; Malnoë, 2018). Da mesma forma, os valores altos de Pi_Abs observados nas plantas tratadas com *Paenibacillus alvei* (PA12)

e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) indicam alta vitalidade, o que, no geral, se deve a aumentos significativos da densidade de centros de reação por clorofila. O valor de Pi_Abs reflete a funcionalidade de ambos os fotossistemas I e II e representa informações quantitativas sobre o estado atual do desempenho da planta sob condições de estresse (Strasser et al., 2004), e esses altos valores se refletiram em um efeito positivo da inoculação com *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) sobre Phi_Po, indicando uma melhora na funcionalidade fotossintética (Dalal et al., 2018; Ivanov et al., 2017).

3.4.4 O sistema hidropônico comprovou efeito positivo da inoculação microbiana na absorção de P e no desempenho fotossintético de *Glycine max*

As plantas crescidas sem a inoculação de micro-organismos apresentaram teores de P tecidual compatíveis com os observados em plantas crescidas em solução sem P, o que afetou negativamente a síntese de pigmentos, o desempenho fotossintético (Pi_Abs) e o desenvolvimento dos elementos de vaso das raízes. De fato, rizobactérias ou fungos promotores do crescimento podem induzir processos metabólicos que culminam em melhores rendimentos fotossintéticos e de desenvolvimento (Andrade et al., 2019; Bakhshandeh et al., 2020; Jabborova et al., 2021; Kartik et al., 2020; Moretti et al., 2020). Trabalhos têm demonstrado que, sob condições estressantes, a inoculação pode ser importante para melhorar a resiliência, o desenvolvimento ou mesmo a produtividade de diferentes espécies vegetais (Batool et al., 2020; Bruno et al., 2020; Forouzi et al., 2020; Prittesh et al., 2020).

Na análise de componentes, as plantas não inoculadas não se relacionaram com fatores negativos da fluorescência, mas também não se relacionaram com fatores positivos de crescimento e desempenho fisiológico. As plantas sob solução sem fósforo e inoculadas com os micro-organismos *Codinaeopsis* sp. (328EF), *Hamigera insecticola* (33EF), Biomaphos® e *Epicoccum keratinophilum* (SC4) estão fortemente correlacionados com DIO/RC, ABS/RC, TRO/RC e Ci, parâmetros que se relacionam negativamente com os padrões positivos biométricos e fisiológicos, reforçando a hipótese de que estes padrões constituem respostas a estresse biótico em *G. max*.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados de solubilização de CaHPO_4 obtidos pela utilização de sistema hidropônico foram inconsistentes com os observados em meio sólido e meio líquido, contudo, os testes em meio líquido atestam o péssimo desempenho de *Codinaeopsis* sp. (328EF) e *Hamigera insecticola* (33EF) em reduzir o pH e solubilizar fosfatos, o que corrobora os efeitos de estresse biótico observados em plantas de *G. max*, inoculadas com estes isolados. Por outro lado, o sistema hidropônico permitiu caracterizar *Paenibacillus alvei* (PA12) como eficiente também em solubilizar CaHPO_4 em meio líquido, mas também a bactéria *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) como a mais efetiva na solubilização de CaHPO_4 em razão dos melhores efeitos na absorção de fósforo, promoção do crescimento e desempenho fisiológico, observados nas plantas inoculadas com estas bactérias. A utilização de sistema hidropônico indicou, portanto, cepas de potencial superior ao Biomaphos® para promoção de crescimento. Estes resultados demonstram a superioridade deste método na seleção de cepas solubilizadoras, visto que permite a avaliação de padrões de teores nutricionais teciduais, padrões de crescimento e desempenho fotossintético, padrões anatômicos ou mesmo a detecção de respostas de estresse biótico à inoculação, sendo que o último inviabiliza a utilização de cepas.

3.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de mestrado do estudante Mateus Neri Oliveira Reis, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Fapeg) e ao IFGoiano, Rio Verde Campus, pela infraestrutura, e aos estudantes envolvidos no trabalho. Agradecem também ao Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) por oportunizar as fotos em MEV (microscopia eletrônica de varredura) e a empresa Vitale Corp Agrosience pelo apoio e insumos cedidos.

3.7 REFERÊNCIAS

- Abbamondi, G.R., Tommonaro, G., Weyens, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorezis, P., Iodice, C., de Melo Rangel, W., Nicolaus, B. and Vangronsveld, J., 2016. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0051-3>.
- Aguiar, T.V., Sant'anna-Santos, B.F., Azevedo, A.A. and Ferreira, R.S., 2007. Anati Quanti: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta daninha*, 25, 649-659. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000400001>.

Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.

Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.

Anbi, A.A., Mirshekari, B., Eivazi, A., Yarnia, M. and Behrouzfar, E.K., 2020. PGPRs affected photosynthetic capacity and nutrient uptake in different *Salvia* species. *Journal of Plant Nutrition*, 43(1), 108-121. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659342>.

Anschutz, P., Deborde, J., 2016. Spectrophotometric determination of phosphate in matrices from sequential leaching of sediments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 14(4), 245-256. <https://doi.org/10.1002/lom3.10085>.

Aung, K., Jiang, Y. and He, S.Y., 2018. The role of water in plant–microbe interactions. *The Plant Journal*, 93(4), 771-780. <https://doi.org/10.1111/tpj.13795>.

Bakhshandeh, E., Pirdashti, H., Shahsavarpour Lendeh, K., Gilani, Z., Yaghoubi Khanghahi, M., Crecchio, C., 2020. Effects of plant growth promoting microorganisms inoculums on mineral nutrition, growth and productivity of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 43(11), 1643-1660. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1739297>.

Baliah, N.T., Pandiarajan, G., Kumar, B.M., 2016. Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Tropical Ecology*, 57(3), 465-474.

Bashan, Y., De-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy*, 108, 77-136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8).

Bashan, Y., Kamnev, A.A., de-Bashan, L.E., 2013. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 49(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0756-4>.

Batool, T., Ali, S., Seleiman, M.F., Naveed, N.H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M.R., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., 2020. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10(1), 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>.

Berraquero, F.R., Baya, A.M., Cormenzana, A.R., 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharm*, 17, 399-406.

Borowiak, K., Wolna-Maruwka, A., Niewiadomska, A., Budka, A., Schroeter-Zakrzewska, A., Stasik, R., 2021. The Effects of Various Doses and Types of Effective Microorganism Applications on Microbial and Enzyme Activity of Medium and the Photosynthetic Activity of Scarlet Sage. *Agronomy*, 11(3), 603. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030603>.

Bowes, G., 1991. Growth at elevated CO₂: photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant, Cell & Environment*, 14(8), 795-806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01443.x>.

Bruno, L.B., Karthik, C., Ma, Y., Kadirvelu, K., Freitas, H., Rajkumar, M., 2020. Amelioration of chromium and heat stresses in *Sorghum bicolor* by Cr⁶⁺ reducing-thermotolerant plant growth promoting bacteria. *Chemosphere*, 244, 125521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125521>.

Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Jiang, Y., Liu, A., Zhao, P., Wang, M., Ahammed, G.J., 2017. Combined inoculation with multiple arbuscular mycorrhizal fungi improves growth, nutrient uptake and photosynthesis in cucumber seedlings. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2516. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02516>.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>.

Choi, J.M., Lee, C.W., 2012. Influence of elevated phosphorus levels on nutrient solution on micronutrient uptake and deficiency symptom development in strawberry cultured with fertigation system. *Journal of plant nutrition*, 35(9), 1349-1358. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.684127>.

Chu, S., Li, H., Zhang, X., Yu, K., Chao, M., Han, S., Zhang, D., 2018. Physiological and proteomics analyses reveal low-phosphorus stress affected the regulation of photosynthesis in soybean. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1688. <https://doi.org/10.3390/ijms19061688>.

Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F., Philips, A.J., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J.Z., 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in mycology*, 55, 235-253. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>.

da Silva, C.F., Vitorino, L.C., Soares, M.A., Souchie, E.L., 2018. Multifunctional potential of endophytic and rhizospheric microbial isolates associated with *Butia purpurascens* roots for promoting plant growth. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(11), 2157-2174. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1108-7>.

Dalal, V.K., Tripathy, B.C., 2018. Water-stress induced downsizing of light-harvesting antenna complex protects developing rice seedlings from photo-oxidative damage. *Scientific reports*, 8(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14419-4>.

Danilova, M.N., Doroshenko, A.S., Kudryakova, N.V., Klepikova, A.V., Shtratnikova, V.Y., Kusnetsov, V.V., 2020. The Crosstalk between Cytokinin and Auxin Signaling Pathways in the Control of Natural Senescence of *Arabidopsis thaliana* Leaves. Russian Journal of Plant Physiology, 67(6), 1028-1035. <https://doi.org/10.1134/S1021443720060035>.

de Andrade, F.M., de Assis Pereira, T., Souza, T.P., Guimarães, P.H.S., Martins, A.D., Schwan, R.F., Pasqual, M., Dória, J., 2019. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. Microbiological research, 223, 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.005>.

Doilom, M., Guo, J.W., Phookamsak, R., Mortimer, P.E., Karunarathna, S.C., Dong, W., Liao, C.F., Yan, K., Pem, D., Suwannarach, N., Promputtha, I., 2020. Screening of Phosphate-Solubilizing Fungi From Air and Soil in Yunnan, China: Four Novel Species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. Frontiers in microbiology, 11, 2443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585215>.

Forouzi, A., Ghasemnezhad, A., Nasrabad, R.G., 2020. Phytochemical response of Stevia plant to growth promoting microorganisms under salinity stress. South African Journal of Botany, 134, 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.001>.

Gadagi, R.S., Sa, T., 2002. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. Soil Science and Plant Nutrition, 48(4), 615-618. <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409246>.

Guidi, L., Lo Piccolo, E., Landi, M., 2019. Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and abiotic stress: does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species?. Frontiers in plant science, 10, 174. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00174>.

Gurikar, C., Naik, M.K., Sreenivasa, M.Y., 2016. Azotobacter: PGPR activities with special reference to effect of pesticides and biodegradation. In Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. Springer, New Delhi, pp. 229-244. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_13.

Hanif, K., Hameed, S., Imran, A., Naqqash, T., Shahid, M., Van Elsas, J.D., 2015. Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.). Frontiers in Microbiology, 6, 583. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00583>.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil, second ed. Circular. California agricultural experiment station, 347.

Hwangbo, H., Park, R.D., Kim, Y.W., Rim, Y.S., Park, K.H., Kim, T.H., Suh, J.S., Kim, K.Y., 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. Current microbiology, 47(2), 0087-0092. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3951-y>.

Ivanov, A.G., Velitchkova, M.Y., Allakhverdiev, S.I., Huner, N.P., 2017. Heat stress-induced effects of photosystem I: an overview of structural and functional responses. Photosynthesis research, 133(1-3), 17-30. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0383-x>.

Jabborova, D., Enakiev, Y., Sulaymanov, K., Kadirova, D., Ali, A., Annapurna, K., 2021. Plant growth promoting bacteria *Bacillus subtilis* promote growth and physiological parameters of *Zingiber officinale* Roscoe. *Plant Science Today*, 8(1), 66-71. <http://orcid.org/0000-0001-6353-6206>.

Jaiswal, S.K., Mohammed, M., Ibny, F.Y., Dakora, F.D., 2021. Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 311. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.619676>.

Jarvie, H.P., Withers, J.A., Neal, C., 2002. Review of robust measurement of phosphorus in river water: sampling, storage, fractionation and sensitivity. *Hydrology and Earth System Sciences*, 6(1), 113-131. <https://doi.org/10.5194/hess-6-113-2002>.

Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G., Rajkumar, S., 2014. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*, 160(4), 778-788. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074146-0>.

Kafle, A., Cope, K.R., Raths, R., Krishna Yakha, J., Subramanian, S., Bücking, H., Garcia, K., 2019. Harnessing soil microbes to improve plant phosphate efficiency in cropping systems. *Agronomy*, 9(3), 127. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030127>.

Kalaji, H.M., Bąba, W., Gediga, K., Goltsev, V., Samborska, I.A., Cetner, M.D., Dimitrova, S., Piszcz, U., Bielecki, K., Karmowska, K., Dankov, K., 2018. Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants. *Photosynthesis research*, 136(3), 329-343. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0467-7>.

Kalaji, H.M., Schansker, G., Ladle, R.J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S.I., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Dąbrowski, P., Elsheery, N.I., 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis research*, 122(2), 121-158. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>.

Kartik, V.P., Jinal, H.N., Amaresan, N., 2020. Inoculation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings with salt-tolerant plant growth promoting bacteria improves nutrient uptake, plant attributes and physiological profiles. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10226-w>.

Kowalenko, C.G., 2008. Extraction times and analysis methods influence soil test measurements of phosphorus and sulphur. *Canadian Journal of Soil Science*, 88(5), 733-747. <https://doi.org/10.4141/CJSS08008>.

Kowalenko, C.G., Babuin, D., 2007. Interference problems with phosphoantimonymolybdenum colorimetric measurement of phosphorus in soil and plant materials. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(9-10), 1299-1316. <https://doi.org/10.1080/00103620701328594>.

Kudoyarova, G.R., Vysotskaya, L.B., Arkhipova, T.N., Kuzmina, L.Y., Galimsyanova, N.F., Sidorova, L.V., Gabbasova, I.M., Melentiev, A.I., Veselov, S.Y., 2017. Effect of

auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta physiologiae plantarum*, 39(11), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9>.

Kunikowska, A., Byczkowska, A., Doniak, M., Kaźmierczak, A., 2013. Cytokinins résumé: their signaling and role in programmed cell death in plants. *Plant cell reports*, 32(6), 771-780. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1436-z>.

Li, W.C., Zhou, J., Guo, S.Y., Guo, L.D., 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Divers*, 25, 69-80.

Li, X., Luo, L., Yang, J., Li, B., Yuan, H., 2015. Mechanisms for solubilization of various insoluble phosphates and activation of immobilized phosphates in different soils by an efficient and salinity-tolerant *Aspergillus niger* strain An2. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(5), 2755-2768. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1465-2>.

Lin, Z.H., Chen, L.S., Chen, R.B., Zhang, F.Z., Jiang, H.X., Tang, N., 2009. CO₂ assimilation, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-43>.

Linu, M.S., Asok, A.K., Thampi, M., Sreekumar, J., Jisha, M.S., 2019. Plant growth promoting traits of indigenous phosphate solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chilli (*Capsicum annuum* L.) rhizosphere. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(4), 444-457. <https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1566469>.

Liu, A.R., Chen, S.C., Wu, S.Y., Xu, T., Guo, L.D., Jeewon, R., Wei, J.G., 2010. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 528-535. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.07.017>.

Liu, J., Qi, W., Li, Q., Wang, S.G., Song, C., Yuan, X.Z., 2020. Exogenous phosphorus-solubilizing bacteria changed the rhizosphere microbial community indirectly. *3 Biotech*, 10(4), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2099-4>.

Malavolta, E., 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira.—second ed., ver. e atual. Piracicaba: Potafos.

Malnoë, A., 2018. Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environmental and Experimental Botany*, 154, 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.005>.

Mehta, P., Walia, A., Shirkot, C.K., 2015. Functional diversity of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacteria isolated from apple trees in the trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(4), 265-288. <https://doi.org/10.1080/01448765.2015.1014420>.

Morris, J.K., 1965. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. cell Biol*, 27, 1A-149A.

Moretti, L.G., Crusciol, C.A., Kuramae, E.E., Bossolani, J.W., Moreira, A., Costa, N.R., Alves, C.J., Pascoaloto, I.M., Rondina, A.B. and Hungria, M., 2020. Effects of growth promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield. *Agronomy Journal*, 112(1), 418-428.

Murphy, J.A.M.E.S., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).

Nagul, E.A., McKelvie, I.D., Worsfold, P., Kolev, S.D., 2015. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica chimica acta*, 890, 60-82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.030>.

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.

O'Brien, T., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59(2), 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>.

Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2011. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends in microbiology*, 19(2), 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.10.004>.

Patel, D.K., Archana, G., Kumar, G.N., 2008. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Current microbiology*, 56(2), 168-174. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9053-0>.

Penn, C.J., Camberato, J.J., 2019. A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants. *Agriculture*, 9(6), 120. <https://doi.org/10.3390/agriculture9060120>.

Prittesh, P., Avnika, P., Kinjal, P., Jinal, H.N., Sakthivel, K., Amaresan, N., 2020. Amelioration effect of salt-tolerant plant growth-promoting bacteria on growth and physiological properties of rice (*Oryza sativa*) under salt-stressed conditions. *Archives of Microbiology*, 202(9), 2419-2428. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01962-4>.

Team, R.C. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, 2021 [cited 2021 Feb 20]. Available from: <https://www.R-project.org/>.

Rosolem, C.A., Marcello, C.S., 1998. Soybean root growth and nutrition as affected by liming and phosphorus application. *Scientia Agricola*, 55(3), 448-455. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161998000300013>.

Salcedo, L.D.P., Prieto, C., Correa, M.F., 2014. Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 734-742. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5940>.

Santos, M.S., Nogueira, M.A., Hungria, M., 2019. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.

Santos, R.P., da Cruz, A.C.F., Iarema, L., Fernandes, K.R.G., Kuki, K.N., Otoni, W.C., 2007. Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* propagadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S2), 888-890.

Sarr, P.S., Tibiri, E.B., Fukuda, M., Zongo, A.N., Nakamura, S., 2020. Phosphate-solubilizing fungi and alkaline phosphatase trigger the P solubilization during the co-composting of sorghum straw residues with Burkina Faso phosphate rock. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 174. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.559195>.

Scervino, J.M., Mesa, M.P., Della Mónica, I., Recchi, M., Moreno, N.S., Godeas, A., 2010. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and fertility of soils*, 46(7), 755-763. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0482-8>.

Schöttler, M.A., Tóth, S.Z., 2014. Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and photosynthetic flux control. *Frontiers in Plant Science*, 5, 188. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00188>.

Sharma, N., Yadav, K., Cheema, J., Badda, N., Aggarwal, A., 2015. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis and Water Stress: A Critical Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 38(4).

Silva Filho, G.N., Vidor, C., 2000. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24(2), 311-319. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000200008>.

Singh, A.V., Prasad, B., Goel, R., 2018. Plant growth promoting efficiency of phosphate solubilizing *Chryseobacterium* sp. PSR 10 with different doses of N and P fertilizers on lentil (*Lens culinaris* var. PL-5) growth and yield. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 7(05), 2280-2289. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.265>.

Situmorang, E.C., Prameswara, A., Sinthya, H.C., Toruan-Mathius, N., Liwang, T., 2015. Indigenous phosphate solubilizing bacteria from peat soil for an eco-friendly biofertilizer in oil palm plantation. *KnE Energy*, 65-72. <https://doi.org/10.18502/ken.v1i1.324>.

Souchie, E.L., de Souza Abboud, A.C., Caproni, A.L., 2007. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. *Bioscience Journal*, 23(2).

Sousa, C.A., Junior, M.D.A.L., Fracetto, G.G.M., Freire, F.J., Sobral, J.K., 2016. Evaluation methods used for phosphate-solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 15(34), 1796-1805. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.15020>.

Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A., 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In *Chlorophyll a fluorescence*. Springer, Dordrecht. pp. 321-362. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, 445-483.

Su, Y.Y., Qi, Y.L., Cai, L., 2012. Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. *Mycology*, 3(3), 195-200. <https://doi.org/10.1080/21501203.2012.719042>.

Suliman, S., Tran, L.S.P (eds.), 2017. *Legume nitrogen fixation in soils with low phosphorus availability: adaptation and regulatory implication*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-55729-8>.

Sylvester-Bradley, R., Asakawa, N., Torraca, S. L., Magalhães, F. M., Oliveira, L. A., Pereira, R. M., 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, 12(1), 15-22. <https://doi.org/10.1590/1809-43921982121015>.

Tan, I.S., Ramamurthi, K.S., 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology reports*, 6(3), 212-225. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130>.

Taveira, L.R.S., Carvalho, T.S.D., Teixeira, A.F.D.S., Curi, N., 2019. Sustainable productive intensification for family farming in developing tropical countries. *Ciência e Agrotecnologia*, 43. <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943012819>.

Uarrota, V.G., Stefen, D.L.V., Leolato, L.S., Gindri, D.M. and Nerling, D. (Eds.), 2018. Revisiting carotenoids and their role in plant stress responses: From biosynthesis to plant signaling mechanisms during stress. In *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Springer, Cham, pp. 207-232. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_10.

United Nations. Selected results of the 2019 UN world population projections. *Popul Dev Rev* 45:689–694. 2019. <https://doi.org/10.1111/padr.12288>.

Urban, L., Aarouf, J., Bidel, L.P., 2017. Assessing the effects of water deficit on photosynthesis using parameters derived from measurements of leaf gas exchange and of chlorophyll a fluorescence. *Frontiers in plant science*, 8, 2068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02068>.

Vafadar, F., Amooaghaie, R., Otrushy, M., 2014. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 128-136. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.779035>.

Viégas, I.D.J.M., Cordeiro, R.A.M., de Almeida, G.M., Silva, D.A.S., da Silva, B.C., Okumura, R.S., da Silva Júnior, M.L., da Silva, S.P., de Freitas, J.M.N., 2018. Growth and visual symptoms of nutrients deficiency in mangosteens (*Garcinia mangostana* L.). *American Journal of Plant Sciences*, 9(5), 1014-1028. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.95078>.

Wang, J., Chen, Y., Wang, P., Li, Y.S., Wang, G., Liu, P., Khan, A., 2018. Leaf gas exchange, phosphorus uptake, growth and yield responses of cotton cultivars to different phosphorus rates. *Photosynthetica*, 56(4), 1414-1421. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0845-1>.

Wang, Y., Yang, Z., Kong, Y., Li, X., Li, W., Du, H., Zhang, C., 2020. GmPAP12 is required for nodule development and nitrogen fixation under phosphorus starvation in soybean. *Frontiers in plant science*, 11, 450. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00450>.

Warren, C.R., Adams, M.A., 2002. Phosphorus affects growth and partitioning of nitrogen to Rubisco in *Pinus pinaster*. *Tree Physiology*, 22(1), 11-19. <https://doi.org/10.1093/treephys/22.1.11>.

Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).

Wu, F., Li, J., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, S., Shi, X., Li, L., Liang, J., 2019. Effects of phosphate solubilizing bacteria on the growth, photosynthesis, and nutrient uptake of *Camellia oleifera* Abel. *Forests*, 10(4), 348. <https://doi.org/10.3390/f10040348>.

Yadav, H., Gothwal, R.K., Solanki, P.S., Nehra, S., Sinha-Roy, S., Ghosh, P., 2015. Isolation and characterization of thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacteria from a phosphate mine and their rock phosphate solubilizing abilities. *Geomicrobiology Journal*, 32(6), 475-481. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.943856>.

Zhang, W., Peng, K., Cui, F., Wang, D., Zhao, J., Zhang, Y., Yu, N., Wang, Y., Zeng, D., Wang, Y., Cheng, Z., 2021. Cytokinin oxidase/dehydrogenase OsCKX11 coordinates source and sink relationship in rice by simultaneous regulation of leaf senescence and grain number. *Plant biotechnology journal*, 19(2), 335-350. <https://doi.org/10.1111/pbi.13467>.

Zhu, H.J., Sun, L.F., Zhang, Y.F., Zhang, X.L., Qiao, J.J., 2012. Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Pichia farinosa* FL7. *Bioresource technology*, 111, 410-416. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.042>.

Zúñiga-Silgado, D., Rivera-Leyva, J.C., Coleman, J.J., Sánchez-Reyez, A., Valencia-Díaz, S., Serrano, M., de-Bashan, L.E., Folch-Mallol, J.L., 2020. Soil type affects organic acid production and phosphorus solubilization efficiency mediated by several native fungal strains from Mexico. *Microorganisms*, 8(9), 1337. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091337>.

Zwack, P.J., Rashotte, A.M., 2013. Cytokinin inhibition of leaf senescence. *Plant signaling & behavior*, 8(7), e24737. <https://doi.org/10.4161/psb.24737>.

4. CONCLUSÃO GERAL

A solubilização pela utilização de sistema hidropônico comprovou superioridade em relação aos testes de meio sólido e meio líquido, mostrando que todos os micro-organismos foram capazes de solubilizar o CaHPO_4 , possibilitando a identificação de *Paenibacillus alvei* (PA12) e *Lysinibacillus fusiformis* (PA26) como os micro-organismos que mais solubilizaram fosfato e melhoraram parâmetros de crescimento e desempenho fotossintético, permitindo ainda identificar a competição dos isolados *Epicoccum keratinophilum* (SC4), *Codinaeopsis* sp. (328EF) e *Hamigera insecticola* (33EF) com as plantas, causando estresse.