

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES
COMO BIOINOCULATE PARA CANA-DE-AÇÚCAR EM SISTEMAS DE
CULTIVO COM VINHAÇA**

Suélen Vieira Signorini

**Jaboticabal, SP
2025**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

POTENCIAL DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES
COMO BIOINOCULANTE PARA CANA-DE-AÇÚCAR EM SISTEMAS DE
CULTIVO COM VINHAÇA

SUÉLEN VIEIRA SIGNORINI

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antonio Marcondes de Souza

Trabalho apresentado à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias
- UNESP, Câmpus de Jaboticabal,
para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Jaboticabal, SP
1º Semestre/2025

S578p

Signorini, Suélen Vieira

Potencial de bactérias nitrificantes e desnitrificantes como bioinoculante para cana-de-açúcar em sistemas de cultivo com vinhaça / Suélen Vieira Signorini. -- Jaboticabal, 2025

80 p. : il., tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza

1. Sustentabilidade. 2. Vinhaça. 3. Microbiologia do solo. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS JABOTICABAL



NOME COMPLETO DO AUTOR
SUÉLEN VIEIRA SIGNORINI

TÍTULO DO TRABALHO ACADÊMICO:
POTENCIAL DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES E DESNITRIFICANTES COMO
BIOINOCULANTE PARA CANA-DE-ACÚCAR EM SISTEMAS DE CULTIVOS
COM VINHAÇA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

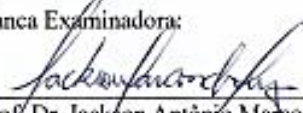
Área de Concentração: Biotecnologia

Data da defesa: 07/07/2025

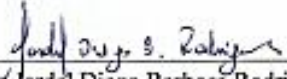
(X) Aprovado

() Reprovado

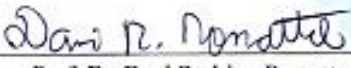
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal


Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal


Dr. Jardel Diego Barbosa Rodrigues
Pós-doutorado no Departamento de Biologia
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Aprovado em Reunião Departamental em: 15/07/2025


Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossatto
Chefe do Departamento

"Não importa quão estreito seja o portão,
Quão repleta de castigos a sentença,
Eu sou o mestre do meu destino,
Eu sou o capitão da minha alma."
— William Ernest Henley

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer em momentos de dúvidas, exaustão e dificuldades adversas. Pela proteção, pois o Senhor sempre esteve caminhando ao meu lado durante a ida e a volta para casa à noite, mantendo-me segura da maldade ao meu redor.

À minha família, especialmente à minha mãe, Ângela Vieira, e ao meu pai, Mauro Signorini, por acreditarem em mim e apoiarem a minha caminhada. Mesmo sem terem tido a oportunidade de estudar, sempre me ensinaram que o estudo é importante. Obrigada por todo o carinho e por nunca medirem esforços para que eu pudesse concluir a graduação.

Ao meu companheiro, Alex Klassen, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e nas conquistas. Você me fez enxergar o quanto já percorri e o quanto ainda posso alcançar. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio e amor.

À minha amiga e irmã de coração, Patricia Maciel, que me amparou de inúmeras formas e sempre fez questão de estar presente na minha vida. Sem sua amizade, eu não seria quem sou hoje.

Às minhas amigas e irmãs de coração, Priscila Souza e Poliana Souza, agradeço por me apoiarem em todas as fases da minha vida, desde a infância até aqui, e pela amizade de sempre.

À minha afilhada, Olívia Maciel, e ao seu irmão, Felipe Maciel, por tornarem dias mais leves com brincadeiras e festas de aniversário. Vocês me lembram que a vida é bonita nas coisas simples e que para ser feliz não é preciso muito.

À minha amiga Ana Clara do Nascimento, por todo o companheirismo ao longo dos anos em que dividimos o apartamento. Obrigada por cada gesto de apoio e pela amizade verdadeira.

À minha amiga Gleiciane Rocha, minha madrinha da faculdade, por tantos conselhos, por dividir materiais, por me ouvir e me acolher, mesmo quando você mesma tinha problemas para resolver. Você me ajudou mais do que imagina.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jackson Marcondes, pela oportunidade de participar do laboratório como aluna de iniciação científica. Obrigada por

estar sempre disposto a ouvir, por orientar com atenção e por confiar no meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pela colaboração, boas conversas e por tornarem o ambiente mais leve e acolhedor.

Ao Laboratório de Plantas Daninhas, pelo fornecimento das mudas e pela disponibilização da casa de vegetação. Agradecimento especial ao Prof. Dr. Pedro Alves e à Gabi, que intermediou o contato e tornou todo o processo mais simples.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Biologia, em especial ao Prof. Dr. Davi Rossatto, por ceder a estufa utilizada no experimento, e à Sra. Márcia Macri, pela organização e prontidão em esclarecer dúvidas.

Ao Sr. Japão, caseiro do sítio, pela ajuda durante o experimento em campo. Sua colaboração foi essencial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP, pelo fomento à pesquisa, o qual viabilizou a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Importância econômica e aspectos gerais da cana-de-açúcar	19
3.2 Contexto Histórico do Estudo de Microrganismos	21
3.3 O microbioma do solo e sua relação com as plantas	22
3.4 Mecanismos de Ação das Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs).....	23
3.5 Importância do nitrogênio, fósforo e potássio para as plantas	25
3.6 Inoculantes e aplicações comerciais	26
3.7 Vinhaça da cana-de-açúcar	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Áreas de estudo	28
4.1.1 Laboratório.....	28
4.1.2 Casa de vegetação	28
4.1.3 Campo	28
4.2 Origem dos isolados bacterianos.....	30
4.2.1 Coleta de solo e montagem das colunas de Winogradsky	30
4.1.3 Estoque de laboratório	30
4.3 Análise química do solo	30
4.4 Isolamento e manutenção dos isolados do solo.....	31
4.5 Bioensaios de nitrificação e desnitrificação	32
4.6 Caracterização morfológica dos isolados	32
4.7 Coloração de GRAM.....	33
4.8 Curva de crescimento e UFC/ml	33
4.9 Extração de DNA genômico	34
4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rRNA dos isolados selecionados e purificação	34
4.10 Sequenciamento e análise das sequências do gene 16S rRNA	35
4.11 Avaliação de crescimento bacteriano em vinhaça <i>in natura</i>	35
4.12 Delineamento experimental dos bioensaios em plantas.....	36
4.13 Experimento em casa de vegetação	36

4.13.1 Plantio das mudas.....	36
4.13.2 Inoculação bacteriana e controle.....	36
4.13.3 Determinação de comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz.....	37
4.14 Experimento em campo	37
4.14.1 Plantio de cana-de-açúcar	37
4.14.2 Inoculação bacteriana e controle.....	37
4.14.3 Determinação de comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz.....	38
4.15 Análise dos dados	38
5. RESULTADOS	38
5.1 Propriedades químicas dos solos amostrados	39
5.2 Colunas de Winogradsky	40
5.3 Bioensaios de nitrificação e desnitrificação	40
5.4 Caracterização fenotípica dos isolados da coluna	42
5.5 Percentual de identidade dos isolados bacterianos	43
5.6 Curva de crescimento e determinação da UFC/mL.....	44
5.7 Avaliação de crescimento bacteriano em vinhaça <i>in natura</i>.....	45
5.7.1 Avaliação em meio ácido.....	45
5.7.3 Avaliação em meio neutro.....	47
5.8 Experimento em casa de vegetação.....	49
5.8.1 Massa fresca e massa seca da parte aérea.....	49
5.8.2 Massa fresca e massa seca da raiz	50
5.8.2 Comprimento da parte aérea e da raiz.....	51
5.9 Experimento em campo.....	54
5.9.1 Massa fresca e massa seca da parte aérea.....	54
5.9.2 Massa fresca e massa seca da raiz	55
5.9.3 Comprimento da parte aérea e da raiz.....	56
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
BPCPs	Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas
DM	Meio Desnitrificante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
M.O	Matéria Orgânica
N	Nitrogênio
N₂	Nitrogênio atmosférico
N₂O	Óxido nitroso
NH₃	Amônia
NH₄⁺	Amônio
NM	Meio Nitrificante
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Nitrito
Nox	Óxidos de nitrogênio
NPK	Nitrogênio, fósforo e potássio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
Ph	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotação por minute
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estádios do desenvolvimento da cana-de-açúcar	20
Figura 2 – Localização do departamento de Biologia e casa de vegetação ...	29
Figura 3 – Localização da área experimental em campo	29
Figura 4 – Colunas de Winogradsky	40
Figura 5 – Representação gráfica da curva de crescimento de três bactérias.....	44
Figura 6 – Avaliação do crescimento bacteriano em diferentes concentrações de vinhaça in natura	46
Figura 7 – Avaliação do crescimento bacteriano em diferentes percentuais de vinhaça.....	47
Figura 8 – Halo médio de isolados bacterianos em diferentes concentrações de vinhaça (pH 7).....	49
Figura 9 – Massa fresca e massa seca da parte aérea de plantas em casa de vegetação	50
Figura 10 – Massa fresca e seca da raiz de plantas em casa de vegetação	51
Figura 11 – Plantas 30 dias após inoculação com <i>P. alvei</i> . A: parte aérea; B: raiz	52
Figura 12 – Plantas 30 dias após inoculação com <i>B. nitrificans</i> . A: parte aérea; B: raiz.....	52
Figura 13 – Plantas 30 dias após inoculação com <i>Sinomonas echigonensis</i> . A: parte aérea; B: sistema radicular	53
Figura 14 – Plantas não submetidas à inoculação bacteriana (controle), aos 30 dias após a inoculação. A: parte aérea; B: sistema radicular.....	53
Figura 15 – Massa fresca e seca da parte aérea de plantas em campo	55
Figura 16 – Massa fresca e seca da raiz de plantas em campo.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise química dos solos amostrados.....	39
Tabela 2 – pH dos meios desnitrificante e nitrificante de solos coletados em áreas distintas	41
Tabela 3 – Densidade óptica a 540 nm dos meios nitrificante e desnitrificante com consórcios bacterianos.....	41
Tabela 4 – Determinação do perfil de cultivo em fonte de nitrogênio e detecção de nitrito	42
Tabela 5 – Caracterização morfológica dos isolados bacterianos selecionados	43
Tabela 6 – Percentual de identidade dos isolados selecionados para os bioensaios.....	43
Tabela 7 – Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no quinto dia	45

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs) em *Saccharum* spp., com foco na atividade dos isolados nos processos de nitrificação, desnitrificação e na tolerância à vinhaça *in natura*. As BPCPs representam uma alternativa promissora, pois favorecem o crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos e indiretos. Para o isolamento dos microrganismos, utilizou-se a coluna de Winogradsky, visando selecionar bactérias adaptadas a gradientes físico-químicos do solo. A maioria dos isolados apresentou características típicas do gênero *Bacillus*, com colônias brancas, circulares, de borda lisa e Gram-positivas. Ensaio laboratoriais revelaram curvas de crescimento semelhantes entre os isolados, com destaque para *Bacillus widmannii* (BioAdd 5), cuja viabilidade celular se aproximou dos valores ideais para formulação de bioinoculantes. Isolados adicionais, como *Paenibacillus alvei* (AgN31) e *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8), demonstraram tolerância ao cultivo em vinhaça *in natura*. Ambos apresentaram crescimento em até 25% de vinhaça sob pH ácido e 50% sob pH neutro, evidenciando o potencial desse subproduto como meio alternativo de cultivo. Em casa de vegetação, *P. alvei* (AgN31) apresentou os maiores valores de massa fresca e seca da parte aérea, enquanto *B. nitrificans* (EV0-8) destacou-se na massa fresca da raiz. Em campo, *B. nitrificans* (EV0-8) obteve os maiores valores de massa seca e fresca da parte aérea. Os resultados reforçam o potencial desses microrganismos como bioinoculantes para a cultura da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: sustentabilidade; PGPR; bioinoculante; vinhaça

ABSTRACT

This study aimed to isolate, characterize and evaluate Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in *Saccharum* spp., with a focus on the activity of the isolates in the processes of nitrification, denitrification and tolerance to raw vinasse. PGPR represent a promising alternative, as they promote plant growth through both direct and indirect mechanisms. For the isolation of microorganisms, the Winogradsky column was used to select bacteria adapted to the soil's physicochemical gradients. Most isolates exhibited typical characteristics of the *Bacillus* genus, with white, circular, smooth-edged, Gram-positive colonies. Laboratory assays revealed similar growth curves among the isolates, with emphasis on *Bacillus widmannii* (BioAdd 5), whose cell viability approached ideal values for bioinoculant formulation. Additional isolates, such as *Paenibacillus alvei* (AgN31) and *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8), demonstrated tolerance to cultivation in raw vinasse. Both showed growth in up to 25% vinasse under acidic pH and 50% under neutral pH, highlighting the potential of this byproduct as an alternative growth medium. In greenhouse conditions, *P. alvei* (AgN31) showed the highest values for shoot fresh and dry biomass, while *B. nitrificans* (EV0-8) stood out in root fresh biomass. In the field, *B. nitrificans* (EV0-8) achieved the highest values for shoot dry and fresh biomass. The results reinforce the potential of these microorganisms as bioinoculants for sugarcane cultivation.

Keywords: sustainability; PGPR; bioinoculant; vinasse

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional estimado para os próximos anos, em conjunto com as mudanças climáticas globais, impõe novos desafios à agricultura, especialmente no que diz respeito à produção de recursos renováveis destinados à geração de energia e ao uso industrial. Nesse sentido, a biomassa lignocelulósica, como a gerada pelo cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), apresenta grande potencial para reduzir o uso de insumos de origem fóssil (SULIS et al., 2025).

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma cultura importante para a matriz energética nacional, pois gera etanol e energia a partir do bagaço, além da produção de açúcar. O país lidera a produção mundial e concentra extensas áreas cultivadas no estado de São Paulo (CONAB, 2025; EMBRAPA, 2023). A vinhaça de cana-de-açúcar, resíduo da indústria sucroalcooleira, é gerada em grandes volumes e, apesar de seu potencial como fertilizante líquido, ainda representa um desafio ambiental devido à presença de compostos potencialmente tóxicos em sua composição (HOARAU et al., 2018).

Dentre os componentes biológicos do solo, o microbioma exerce influência direta sobre a planta. O solo é um ambiente heterogêneo, caracterizado por gradientes físicos, químicos e biológicos que formam diferentes micro-habitats, os quais são compostos por comunidades microbianas altamente dinâmicas (WEST; WHITMAN, 2022).

O nitrogênio (N) é um elemento importante para o metabolismo vegetal e para os consumidores, porém esses organismos não são capazes de assimilá-lo diretamente da atmosfera. Para que as plantas tenham acesso ao nutriente, é preciso que microrganismos convertam o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis pelo vegetal, enquanto os consumidores obtêm nitrogênio pela alimentação. Além disso, por meio das folhas, as plantas também podem absorver amônia (NH₃), dissolvendo-a em uma fina camada de água na epiderme foliar (DENMEAD et al., 2008).

Devido à sua importância, o N tem sido aplicado na forma de

fertilizantes sintéticos, mas seu excesso pode resultar em impactos ambientais significativos, como a acidificação do solo, a contaminação de corpos d'água por nitrato e a emissão de óxido nitroso (N_2O), um potente gás de efeito estufa (HIIS et al., 2024; HU et al., 2015; ISLAM et al., 2025; LIU et al., 2023).

As bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) têm ganhado destaque como alternativas biotecnológicas sustentáveis, pois influenciam o crescimento vegetal por diferentes mecanismos indiretos e diretos. Esses microrganismos estão presentes na superfície ou no interior das raízes, além do solo rizosférico. Eles podem modular rotas hormonais, promover a absorção e solubilização de nutrientes, produzir compostos bioativos e aumentar a tolerância das plantas a condições abióticas (CHHETRI; SHERPA; SHARMA, 2025; EMBRAPA, 2017).

A interação entre plantas e microrganismos é fundamental para o funcionamento dos agroecossistemas. As raízes liberam exsudatos orgânicos que influenciam a composição do microbioma rizosférico. Assim, através de processos como reconhecimento molecular e sinalização bioquímica, as BPCPs auxiliam no estabelecimento e crescimento da planta (TRIVEDI et al., 2020; VANDENKOORNHUYSE et al., 2015).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar bactérias com potencial para promoção do crescimento vegetal em cana-de-açúcar, com foco na tolerância à vinhaça e nos efeitos sobre a planta em casa de vegetação e campo, visando contribuir para o desenvolvimento de bioinsumos como BPCPs.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o isolamento, caracterização e avaliação da dinâmica de bactérias com potencial para promoção do crescimento de plantas, com ênfase em *Saccharum* spp. Além disso, buscou-se investigar a atividade dessas bactérias nos processos de nitrificação e desnitrificação, bem como seu crescimento em diferentes concentrações de vinhaça *in natura* e efeito na promoção do crescimento vegetal sob condições de casa de vegetação e campo.

2.2 Específicos

O objetivo geral foi subdividido nos objetivos específicos a seguir:

1. Realizar a coleta de solos agrícolas com cultivos de *Saccharum* spp., *Zea mays* e *Allium sativum* para montagem das colunas de Winogradsky.
2. Montar colunas de Winogradsky com diferentes extratos contendo nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), uréia e solo puro, visando obter isolados bacterianos presentes em diferentes condições.
3. Caracterizar fenotipicamente os isolados obtidos, incluindo aspectos morfológicos e bioquímicos.
4. Determinar, por métodos colorimétricos, a produção de nitrito e nitrato pelas bactérias isoladas *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus wiedmannii*.
5. Extrair DNA genômico dos isolados bacterianos selecionados, amplificar o gene 16S rRNA por PCR e sequenciar os amplicons obtidos para análise taxonômica.
6. Determinar a curva de crescimento de isolados de *Bacillus* para compreender sua dinâmica em cultura.
7. Avaliar e comparar o perfil de cultivo dos isolados bacterianos em

meio contendo diferentes concentrações de vinhaça *in natura*.

8. Avaliar a massa fresca e seca da parte aérea e das raízes de plantas de *Saccharum* spp. submetidas a diferentes tratamentos bacterianos em casa de vegetação e campo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância econômica e aspectos gerais da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, o qual inclui espécies silvestres, como *Saccharum spontaneum*, *Saccharum barberi* e *Saccharum robustum*, além de espécies domesticadas, como *Saccharum officinarum*, e híbridos comerciais atualmente cultivados (TRIPATHI et al., 2020). A origem da cana-de-açúcar é atribuída a região da Nova Guiné, onde a *Saccharum officinarum* teria sido domesticada a partir da espécie silvestre *S. robustum*, por volta de 8.000 anos atrás (SANTOS et al., 2020).

A parte aérea da cana-de-açúcar é formada por folhas e colmos. Os colmos são segmentados em nós e entrenós, onde se inserem as folhas em disposição alternada. Cada folha é completa e composta por bainha, colar e lâmina foliar. A planta cresce em touceiras, formadas por perfilhos laterais (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

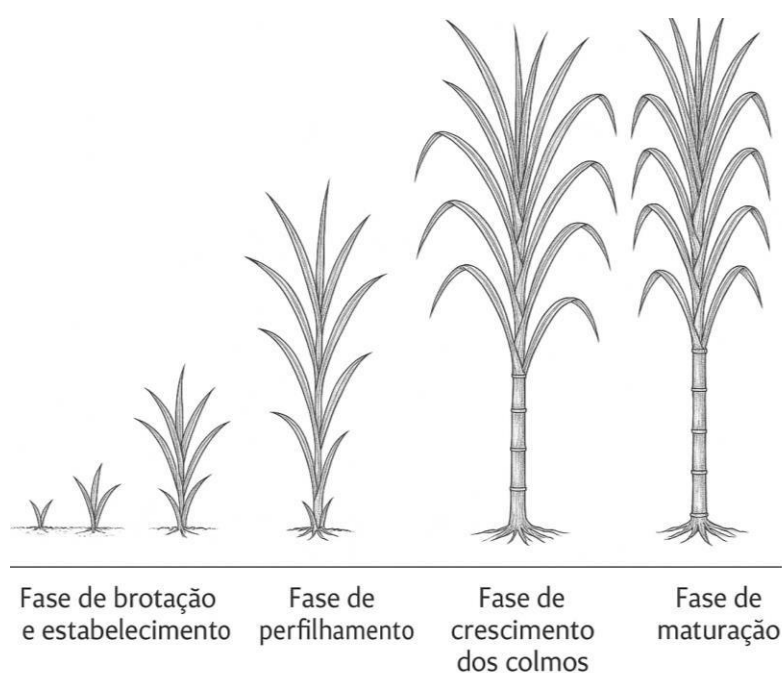
Trata-se de uma cultura com metabolismo fotossintético do tipo C₄, sendo eficiente na conversão de energia sob condições de alta incidência solar e elevadas temperaturas. Entretanto, considerando que grande parte de sua biomassa é composta por água, a oferta hídrica adequada continua sendo essencial para garantir seu desenvolvimento e produtividade (MARAFON, 2012).

Essa cultura possui dois tipos de ciclos, que consistem no ciclo da cana-planta e no ciclo da cana-soca. O ciclo da cana-planta é o primeiro ciclo da cultura, ou seja, quando é plantada e germina. Após a colheita da cana-planta, inicia-se o ciclo da cana-soca, a partir dos brotos laterais emergentes das raízes, que correspondem às safras subsequentes (WANG et al., 2024)

A cana-de-açúcar passa por quatro fases fenológicas principais: brotação, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação (Figura 1). A brotação ocorre nos primeiros 20 a 30 dias e depende da umidade do solo. Em

seguida, inicia-se o perfilhamento, entre 40 e 120 dias após o plantio, marcado pela emissão de brotos laterais. A fase de crescimento dos colmos vai de aproximadamente 120 a 270 dias e representa o maior acúmulo de biomassa da planta. Por fim, a maturação ocorre a partir dos 270 dias, com redução no crescimento e aumento da concentração de sacarose nos colmos (MARAFON, 2012).

Figura 1 – Estádios do desenvolvimento da cana-de-açúcar



Fonte: Adaptado de Gascho e Shih (1993)

Além do açúcar, a cana-de-açúcar é fundamental para a produção de etanol, um biocombustível renovável que contribui para a matriz energética sustentável, reduzindo a dependência de combustíveis fósseis e as emissões de gases do efeito estufa. Também é utilizada como matéria-prima para a indústria de bioenergia, onde o bagaço da cana, resíduo fibroso remanescente após a extração do caldo, é aproveitado na geração de energia nas usinas, assegurando maior eficiência energética (JUNIOR; MIRANDA, 2013).

No contexto brasileiro, o país destaca-se como o maior produtor mundial, com uma colheita de 713,2 milhões de toneladas na safra 2023/24, cuja produtividade média atingiu valores expressivos, notadamente no estado de São Paulo, responsável por mais de 50% da produção nacional (CONAB,

2024).

Portanto, alternativas sustentáveis para otimizar o cultivo dessa cultura são importantes do ponto de vista ambiental e econômico.

3.2 Contexto Histórico do Estudo de Microrganismos

O século XVII foi marcado pela invenção do microscópio, uma ferramenta que permitiu a visualização de microrganismos como bactérias e protozoários, denominados na época “animálculos”. A descoberta de organismos microscópicos permitiu o avanço do estudo da microbiologia. Uma das pesquisas pioneiras importantes foi conduzida pelo cientista francês Louis Pasteur, este realizou um experimento no qual submeteu o vinho a 56°C. Ele observou que ao aquecer o vinho, o sabor natural não era alterado, logo, relacionou a deterioração da bebida com a presença de bactérias. Hoje, esse processo de aquecimento dos líquidos é conhecido como pasteurização (NÓBREGA; BOSSOLAN, 2008).

Além da associação à contaminação de bebidas, na área da saúde, bactérias também foram relacionadas às causas de doenças durante estudos feitos por Robert Koch, em 1876. Ao investigar o carbúnculo, uma doença que afetava rebanhos de gado e ovelhas na Europa, Koch identificou a presença de microrganismos com formato de bastonete no sangue dos animais infectados. Ele demonstrou que, ao injetar esse sangue contaminado em ovelhas saudáveis, estas também desenvolviam a mesma enfermidade (NÓBREGA; BOSSOLAN, 2008).

Em 1978, Kloepper e Schroth propuseram o termo "plant growth promoting rhizobacteria" (PGPRs) para identificar um grupo específico de bactérias benéficas associadas à rizosfera, as quais contribuem para o crescimento de plantas por meio de diferentes mecanismos (KLOEPPER; SCHROTH, 1978). Posteriormente, em 1980, um estudo constatou que as PGPRs, especialmente do gênero *Pseudomonas*, são capazes de produzir sideróforos extracelulares que sequestram o ferro do ambiente, tornando-o

menos disponível para microfloras nativas potencialmente deletérias (KLOEPPER et al., 1980).

Já em 1982, um estudo discutiu como as bactérias PGPRs colonizam raízes e suprimem doenças do solo, ampliando a compreensão de seu papel ecológico e desmistificando a ideia popular de que todas as bactérias são agentes patogênicos (SCHROTH; HANCOCK, 1982).

Nesse sentido, o surgimento da Microbiologia esteve historicamente atrelado ao estudo das doenças infecciosas, o que contribuiu para a associação dos microrganismos como agentes causadores de enfermidades. Como consequência, mesmo no século XXI, persiste uma percepção popular predominantemente negativa em relação à ação desses organismos.

No entanto, é importante ressaltar que diversas bactérias desempenham papéis essenciais e benéficos em setores como a indústria, meio ambiente e agricultura, como as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) destacam-se como organismos-alvo de pesquisas biotecnológicas, devido ao seu potencial para contribuir significativamente para uma agricultura sustentável e eficiente.

3.3 O microbioma do solo e sua relação com as plantas

O solo é um recurso natural valioso e não renovável, pois para a formação de 1 centímetro de solo são necessários cerca de 300 anos. Além de fornecer suporte físico e nutrientes às plantas, o solo abriga uma enorme diversidade microbiana, sendo considerado um verdadeiro reservatório genético, essencial para a ciclagem de nutrientes e a manutenção da fertilidade (RACHWAL, 2015).

O conjunto de microrganismos, denominado microbioma do solo, forma um ecossistema multifuncional que é modulado por fatores abióticos como pH, umidade, temperatura e disponibilidade de matéria orgânica (QUEVEDO; NISHISAKA; MENDES, 2023).

Além disso, as plantas liberam exsudatos radiculares, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, que atraem comunidades microbianas

específicas. Esse processo molda o microbioma rizosférico, influenciando fatores como a aquisição de nutrientes, a proteção contra patógenos e a tolerância a estresses abióticos (BERG et al., 2020; MENDES; RAAIJMAKERS, 2015).

Dessa forma, é evidente que a relação do microbioma do solo e a planta é indispensável para o crescimento vegetal. A ausência das BPCPs no solo prejudicaria a absorção de nutrientes essenciais, bem como a tolerância e proteção aos estresses abióticos, como seca, e bióticos, como patógenos.

3.4 Mecanismos de Ação das Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs)

Os mecanismos de ação das bactérias promotoras do crescimento de plantas abrangem tanto efeitos diretos quanto indiretos, incluindo a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfatos, a produção e modulação de fitormônios, a atuação contra agentes patogênicos e a indução da resistência sistêmica.

A fixação biológica do nitrogênio é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico é fixado no solo pela atividade microbiana, especificamente por microrganismos que possuem a enzima nitrogenase. O nitrogênio está presente na atmosfera na forma gasosa (N_2), então a nitrogenase catalisa a redução do N_2 atmosférico a amônia (NH_3). Os processos subsequentes caracterizam o ciclo do nitrogênio, tendo a nitrificação e a desnitrificação (VIEIRA, 2017).

A nitrificação é uma etapa do ciclo do nitrogênio em que a amônia (NH_3) ou o íon amônio (NH_4^+) é oxidado a nitrito (NO_2^-), posteriormente o nitrito é convertido em nitrato (NO_3^-). Já a desnitrificação consiste na redução do nitrato a formas gasosas, como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e nitrogênio atmosférico (N_2). O grande problema da última etapa é a liberação de gases do efeito estufa, como N_2O (VIEIRA, 2017).

Assim como a fixação de nitrogênio resulta na disponibilização do

elemento indisponível para a planta, a solubilização de fosfatos é o processo pelo qual microrganismos transformam fosfatos insolúveis em fosfatos solúveis, possíveis de serem absorvidos pelas raízes. Os microrganismos do solo liberam ácidos orgânicos, como ácido cítrico, glucônico e málico, os quais reduzem o pH do solo, permitindo a remoção de fósforo inorgânico das partículas do solo por troca direta ou pela quelação de íons metálicos em complexos P-cátions. Dessa forma, o fósforo antes indisponível se torna assimilável (GOMES et al., 2014).

Além da atuação em processos que ofertam elementos importantes como nitrogênio e fósforo para as plantas, existem microrganismos capazes de sintetizar diferentes fitormônios ao mesmo tempo, como giberelinas, citocininas, auxinas, etileno e ácido salicílico. Além de produzirem, também podem controlar a quantidade disponível através da degradação ou modulação dos níveis de fitormônios, o que é importante para manter os níveis ideais para a planta (OROZCO-MOSQUEDA; SANTOYO; GLICK, 2023).

Além disso, a microbiota do solo é frequentemente referida como o sistema imunológico das plantas. Além dos fitormônios que modulam a resposta vegetal, alguns microrganismos liberam compostos que inibem o crescimento de patógenos da planta. Esses compostos podem ser enzimas hidrolíticas, como pectinases, celulasas e hemicelulasas. Para complementar, os procariotos benéficos competem por espaço e recursos na rizosfera, limitando a colonização de fungos e bactérias patogênicos (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

No que se refere a indução da resistência sistêmica, trata-se de um mecanismo pelo qual plantas ativam defesas contra patógenos em toda a planta, não apenas no local da infecção. Todos os processos mencionados são importantes para a nutrição vegetal, o que são fatores importantes para a defesa da planta (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Em resumo, percebe-se que a atuação das bactérias promotoras do crescimento de plantas é multifacetada, envolvendo diversos mecanismos que, em conjunto, favorecem o crescimento e o estabelecimento das plantas frente a condições adversas.

3.5 Importância do nitrogênio, fósforo e potássio para as plantas

O nitrogênio (N) está presente na planta de diversas formas, como na clorofila, em aminoácidos, ácidos nucleicos e em hormônios vegetais, como citocinina e auxina. A clorofila é um pigmento presente nos cloroplastos, responsável pela fotossíntese. Quatro átomos de N estão presentes em sua estrutura, circundando o magnésio localizado no centro do anel porfirínico. Nos aminoácidos, que em conjunto formam as proteínas, o N está presente no grupo amino (FARHAN et al., 2024).

O DNA e o RNA são formados por nucleotídeos que contêm bases nitrogenadas. No DNA, essas bases são adenina, guanina, citosina e timina, enquanto no RNA a timina é substituída pela uracila. Todas essas bases apresentam átomos de nitrogênio em sua estrutura química (FARHAN et al., 2024). Devido a importância do N, muitos pensam que quanto mais melhor, no entanto o excesso desse elemento pode causar problemas à planta, como diminuição da eficiência hídrica, provocando a queima das folhas e crescimento atrofiado. Como consequência, há redução da área foliar disponível para a fotossíntese (MCCAULEY; JONES; JACOBSON, 2009).

Por outro lado, a baixa oferta de N para a planta também é prejudicial. Ocorre a redução da quantidade de clorofila, o que leva à degradação de enzimas essenciais para processos metabólicos, acarretando diminuição da taxa de transpiração e fotossíntese. Consequentemente, a planta terá dificuldade em produzir energia e realizar trocas gasosas, afetando diretamente seu crescimento e sobrevivência (SANAGI et al., 2021).

Assim como o nitrogênio, o fósforo (P) compõe a estrutura de moléculas fundamentais como adenosina trifosfato, adenosina difosfato, DNA e RNA. Na raiz, o P contribui para a formação de pelos radiculares e a expressão de transportadores de fosfato, aumentando a absorção desse nutriente. Dessa forma, mesmo sob condições adversas, plantas com níveis adequados de fósforo apresentam maior resiliência (KHAN et al., 2023).

Já o potássio (K) atua no controle do turgor celular, regulando abertura e fechamento das células-guarda dos estômatos durante as trocas gasosas. Isso ocorre por meio da regulação da pressão osmótica, uma vez que o K^+ é um dos principais solutos celulares. Seu transporte através de canais iônicos específicos permite o ajuste no fluxo de água, influenciando diretamente o turgor. Além disso, o potássio atua na ativação de enzimas e no transporte de compostos orgânicos pelo floema, sendo essencial para diversos processos fisiológicos da planta (AHMAD; MAATHUIS, 2014).

3.6 Inoculantes e aplicações comerciais

Inoculantes são produtos compostos por microrganismos com ação benéfica ao crescimento vegetal, conforme o Decreto nº 4.954/2004, que regulamenta a Lei nº 6.894/1980 (BRASIL, 1980). Além disso, inoculantes são considerados um tipo de bioinsumo, conforme definido pela Lei nº 15.070/2024, que estabelece diretrizes para o uso de produtos biológicos na agropecuária (BRASIL, 2024).

No contexto dos inoculantes voltados à fixação biológica de nitrogênio, pesquisadores da Embrapa Agrobiologia desenvolveram uma formulação contendo cinco espécies bacterianas com capacidade de reduzir a aplicação de fertilizantes nitrogenados na cana-de-açúcar. Os isolados utilizados são *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Burkholderia tropica* e *Herbaspirillum seropedicae*. Esses microrganismos crescem em meios separados e, em seguida, são misturados em um substrato orgânico previamente esterilizado. Antes do plantio, colmos com três gemas são submersos no produto por cerca de uma hora e depois plantados (EMBRAPA, 2008).

Em relação à solubilização de fósforo, foi desenvolvido um inoculante com potencial de reduzir o uso de fertilizantes fosfatados na cultura da cana-de-açúcar. É composto por duas linhagens bacterianas do banco de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, sendo elas *Bacillus subtilis*

(CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119). Por formarem esporos que confere elevada resistência, essas bactérias apresentam estabilidade em diferentes condições ambientais. A ação dessas bactérias envolve a produção de fitormônios e a síntese das enzimas fosfatase e fitase, que promovem maior disponibilidade e absorção de fósforo pelas plantas (EMBRAPA, 2022).

Esses avanços evidenciam o potencial dos inoculantes microbianos como ferramentas eficazes na agricultura.

3.7 Vinhaça da cana-de-açúcar

O processo que gera a vinhaça a partir da cana-de-açúcar ocorre durante a produção de etanol. O caldo da cana é fermentado para produzir etanol, posteriormente passa pelo processo de destilação e retificação. Após a destilação, forma-se a vinhaça, um efluente líquido que contém os sólidos solúveis provenientes do caldo fermentado. Estima-se que para cada litro de etanol produzido, 8 a 20 litros de vinhaça são gerados (CABRERA-DÍAZ et al., 2016).

A composição da vinhaça é principalmente água, que representa entre 93% a 97% de sua composição. Além disso, possui cerca de 5% de matéria orgânica formada por açúcares, glicerol, ácidos e restos de leveduras, e cerca de 2% de sólidos minerais insolúveis. Também apresenta minerais como potássio, cálcio e sulfatos, assim como compostos tóxicos, como fenóis e melanoidinas, que podem impactar negativamente o ambiente (PARSAEE; KIANI DEH KIANI; KARIMI, 2019).

A demanda química e bioquímica de oxigênio da vinhaça da cana-de-açúcar é comumente mais elevada em comparação a vinhaça derivada de outras matérias-primas. Com isso, exige maior gasto de oxigênio para a degradação dos compostos orgânicos presentes (PARSAEE; KIANI DEH KIANI; KARIMI, 2019).

Dessa forma, fica evidente que a vinhaça é um subproduto cujo

reaproveitamento e estratégias de mitigação de impactos representam ações importantes tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de estudo

4.1.1 Laboratório

Os experimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Genética Aplicada, vinculado ao Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. O Departamento de Biologia está localizado nas coordenadas geográficas 21°14'37.41"S e 48°17'54.84"W (Figura 2).

4.1.2 Casa de vegetação

O experimento em condições de casa de vegetação foi conduzido em estrutura pertencente ao Laboratório de Plantas Daninhas, também ligado ao referido departamento (Figura 2).

4.1.3 Campo

O experimento em campo teve caráter exploratório, visando avaliar a resposta das plantas sob condições adversas. Foi desenvolvido em uma propriedade rural localizada na zona rural do município de Bebedouro, interior do estado de São Paulo, cujas coordenadas geográficas são 20°53'06"S e 48°29'31"W (Figura 3). A cultivar de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) utilizada nesse local não foi identificada.

Figura 2 – Localização do departamento de Biologia e casa de vegetação



Fonte: Google Earth

Figura 3 – Localização da área experimental em campo



Fonte: Google Earth

4.2 Origem dos isolados bacterianos

4.2.1 Coleta de solo e montagem das colunas de Winogradsky

Quatro amostras de solo foram coletadas em uma área agrícola com cultivo de cana-de-açúcar no município de Bebedouro, interior do Estado de São Paulo – Brasil. As amostras de solo com cultivo de milho foram coletadas também em regiões agrícolas próximas à cidade de Bebedouro. Os solos sob cultivo de alho foram amostrados no município de Pitangueiras, também no Estado de São Paulo. As coletas foram realizadas na camada superficial do solo, entre 0 e 20 cm de profundidade.

Os isolados BioAdd 1, BioAdd 2, BioAdd 3, BioAdd 4 e BioAdd 5 foram obtidos a partir de colunas de Winogradsky, as quais foram montadas utilizando solos provenientes de áreas cultivadas com cana-de-açúcar, alho e milho. Foram preparadas três colunas, sendo cada uma composta por solo de uma dessas culturas. Cada coluna foi subdividida em três níveis de estratificação, a saber: solo acrescido em ureia (5% p/p), solo acrescido em NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio – 4:14:8) 10% (p/p) e solo sem adições. O experimento teve duração de 60 dias.

4.1.3 Estoque de laboratório

As bactérias *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8), *Novosphingobium* sp. (V05- D), *Cupriavidus* sp. (V20-F), *Chromobacterium vaccinii* (V05-22), *Curtobacterium* sp. (EV0-5), *Sinomonas echigonensis* (V05-D) e *Paenibacillus alvei* (AgN31) são provenientes do estoque pertencente ao “Laboratório de Genética Aplicada”, do Departamento de Biologia, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, unidade de Jaboticabal.

4.3 Análise química do solo

A caracterização química dos solos utilizados na montagem das colunas de Winogradsky incluiu a determinação de pH, teor de matéria orgânica (M.O) e concentração de elementos químicos. As análises foram realizadas pela empresa Athenas Consultoria Agrícola, situada em Jaboticabal, interior do estado de São Paulo, e os resultados obtidos foram posteriormente interpretados no desenvolvimento deste trabalho.

4.4 Isolamento e manutenção dos isolados do solo

Para a extração dos microrganismos presentes nos diferentes extratos das colunas de Winogradsky, foram adicionados 9 mL de solução salina estéril [NaCl 0,1% (p/v)] a 1 g de solo de cada extrato da coluna, totalizando nove tubos. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em agitador orbital (150 rpm, 27 °C) por 10 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 100 µL do meio nitrificante [composto (g/L): 7,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,05 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 10 g de CH_3COONa]. Também 100 µL do meio desnitrificante [composto (g/L): 7,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,986 g de $NaNO_2$, 0,05 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$] a cada tubo contendo solo e solução salina. As amostras foram incubadas por 41 dias em agitador orbital, a 150 rpm e 27 °C.

Após o período de incubação, foi realizada diluição seriada de 100 µL de amostra em 900 µL de solução salina [NaCl 0,1% (p/v)]. Volume de 100 µL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram distribuídas em placas de Petri contendo meio sólido TSB (Trypticasein Soy Broth) [composto por (g/L): K_2HPO_4 (0,6), $MgSO_4$ (0,2), NaCl (0,1), extrato de levedura (1,0), glicose (10,0) e ágar (9,0); pH 6,9], suplementado com cicloheximida (50 µL/mL)] para inibição de fungos. As placas foram incubadas por aproximadamente 72 horas a 27 °C.

Em seguida, colônias distintas foram selecionadas e cultivadas em meio TSB líquido, incubado por 48 horas a 27 °C sob agitação a 150 rpm. Os isolados BioAdd 1, BioAdd 2, BioAdd 3, BioAdd 4 e BioAdd 5 foram então armazenados em microtubos contendo glicerol [40% (v/v)] e conservados em

ultra-freezer a -80°C .

4.5 Bioensaios de nitrificação e desnitrificação

Os isolados bacterianos foram testados quanto à capacidade de nitrificação e desnitrificação. No bioensaio de nitrificação, utilizou-se o meio nitrificante “NM” [composto (g/L): 7,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g de CH_3COONa] (PAL et al., 2015).

Para a avaliação da desnitrificação, foi utilizado o meio “DM” [composto (g/L): 7,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,986 g de NaNO_2 , 0,05 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$] (Adaptado de He et al., 2016).

A detecção de nitrito (NO_2^-) foi realizada por método colorimétrico, adaptado da reação de Griess, utilizando dois corantes. O primeiro composto por [0,125 g de sulfanilamida e 25 mL de HCl 2,4], e o segundo com [0,075 g de naftil- etilenodiamina e 25 mL de HCl 0,12]. A cada amostra foram adicionadas seis gotas de cada reagente.

A formação de coloração rosa a vermelha indicou a presença de NO_2^- , enquanto a ausência de coloração foi interpretada como indicativo de desnitrificação. As amostras com ambos meios de cultivo foram submetidas a leitura por espectrofotometria a 540 nanômetros.

4.6 Caracterização morfológica dos isolados

Após serem cultivados em meio TSB sólido a 27°C , por ± 72 h, os isolados foram caracterizados fenotipicamente de acordo com a forma (circular, puntiforme, fusiforme, filamentosa), coloração da colônia (branca ou amarela), borda (inteira, ondulada, lobulada, irregular, filamentosa e lisa) e elevação (Plana, elevada, convexa, papilada) (Adaptado de AMERICAN SOCIETY, 2016).

4.7 Coloração de GRAM

Para a identificação das bactérias quanto à sua classificação como Gram-positivas ou Gram-negativas, foi empregada a técnica de coloração de Gram (Adaptado de Hucker, 1921). O material utilizado incluiu: lâminas de microscopia, bico de Bunsen, alça de platina, solução de cristal violeta [10 g de cristal violeta em 200 mL de álcool etílico], solução de lugol [2 g de iodo e 4 g de iodeto de potássio em 300 mL de água ultrapura], solução de fucsina [2,5 g de fucsina básica em 1000 mL de álcool etílico], solução alcoólica [250 mL de álcool e 250 mL de acetona] e água destilada.

Iniciou-se dentro do fluxo laminar com o preparo do esfregaço bacteriano sobre a lâmina, seguido pela fixação por contato breve com o fogo. Em seguida, aplicou-se a solução de cristal violeta por 10 minutos. Após a remoção do excesso, foi adicionada a solução de lugol por 5 minutos. Procedeu-se, então, à lavagem da lâmina com água corrente, seguida da aplicação da solução alcoólica para descoloração. Por fim, aplicou-se a solução de fucsina, com posterior lavagem com água para remoção do excesso.

A distinção entre as bactérias ocorreu com base na coloração observada ao microscópio óptico. As Gram-positivas apresentaram coloração violeta ou azulada, em razão da presença de uma parede celular espessa, rica em peptidoglicano, que retém o corante cristal violeta.

Por outro lado, as Gram-negativas exibiram coloração rosa, resultado da parede celular mais delgada e da presença de uma membrana externa, dificultando a retenção do corante primário, o que permite o destaque da fucsina na coloração final.

4.8 Curva de crescimento e UFC/ml

Os isolados BioAdd 1, BioAdd 2 e BioAdd 5 foram cultivados em meio sólido, bem como em meio líquido TSB [composto por (g/L): K_2HPO_4 (0,6), $MgSO_4$ (0,2), NaCl (0,1), extrato de levedura (1,0), glicose (10,0) e ágar (9,0);

pH 6,9], suplementado com cicloheximida (50 $\mu\text{L/mL}$).

O cultivo em meio líquido foi conduzido sob agitação orbital a 150 rpm e 27 °C, por 6 dias. A cada 12 horas, foi realizada a leitura da densidade óptica ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$) em espectrofotômetro para registrar o crescimento bacteriano.

Para o cultivo sólido foi feita diluição seriada, selecionando as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para plaqueamento. As placas de petri foram mantidas em incubadora BOD a 27°C. Após cinco dias, foi feita a contagem de colônias em placa. Para determinar a UFC utilizou-se a seguinte fórmula: $\text{UFC} = \text{Número de colônias na placa} \times \text{fator de diluição} / \text{volume do inóculo}$.

4.9 Extração de DNA genômico

O protocolo de extração de DNA genômico foi adaptado do método descrito por Marmur (1961). As células foram lisadas na presença de lisozima (20 mg/mL) e RNase (50 $\mu\text{g/mL}$), utilizando solução com lauril sulfato de sódio (SDS) a 25% (p/v) e acetato de sódio 3 M, pH 5,2. A extração foi realizada com 650 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v).

As amostras foram centrifugadas a $20817 \times g$, a 4 °C, por 15 minutos em uma centrífuga Eppendorf 5804R. O DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado e lavado com 1,0 mL de etanol 70% gelado. A quantificação foi feita em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), e a integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$).

4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rRNA dos isolados selecionados e purificação

Após a obtenção do DNA genômico, o gene 16S rRNA dos isolados bacterianos foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o uso dos primers universais fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al.,1989). Cada reação foi

composta por 40 ng de DNA molde, 7,5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 2 µL de tampão 10X e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), tendo um volume final de 20 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador modelo PTC-100™ (MJ Research, Inc.), com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 90 segundos, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), e a concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Em seguida, realizou-se a purificação do material com o kit Purelink Quick Gel Extraction e PCR Purification da marca Invitrogen.

4.10 Sequenciamento e análise das sequências do gene 16S rRNA

O produto purificado foi encaminhado para sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Jaboticabal.

As sequências obtidas foram montadas em contigs referentes ao gene 16S rRNA, editadas no software BioEdit e, posteriormente, submetidas à análise de similaridade utilizando a ferramenta BLASTn (nucleotide BLAST), disponível no site do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A busca foi realizada no banco de dados do GenBank.

4.11 Avaliação de crescimento bacteriano em vinhaça *in natura*

Para avaliar o crescimento bacteriano em meio orgânico, foram preparados meios de cultivo contendo ágar e diferentes concentrações de vinhaça *in natura* (10%, 25%, 50%, 75% e 100%). A vinhaça *in natura* usada

no experimento foi obtida da Usina Pitangueiras, localizada no estado de São Paulo.

O meio foi esterilizado utilizando autoclave vertical analógica prismatec. O diâmetro dos halos de crescimento bacteriano foi medido diariamente durante seis dias, utilizando um paquímetro analógico manual de 150 mm. Foram realizados dois experimentos: no primeiro, o pH do meio manteve-se ácido devido à acidez natural da vinhaça; no segundo, o pH foi ajustado para 7.0 por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH).

4.12 Delineamento experimental dos bioensaios em plantas

Os experimentos em casa de vegetação e em campo foram conduzidos utilizando delineamento em blocos casualizados, por ser uma estratégia para controlar a variabilidade dos ambientes de cultivo, conforme Ferreira (2011). Em ambos os casos, o delineamento seguiu um esquema unifatorial, tendo como único fator avaliado a inoculação bacteriana.

4.13 Experimento em casa de vegetação

4.13.1 Plantio das mudas

As mudas de cana-de-açúcar foram doadas pelo Laboratório de Plantas Daninhas, localizado na UNESP, unidade de Jaboticabal. A cultivar utilizada foi RB975033, lote 0836250214. As mudas foram transplantadas para vasos de 5 litros no período da manhã, sendo mantidas em casa de vegetação com irrigação automática por aspersão três vezes ao dia.

4.13.2 Inoculação bacteriana e controle

O pré-inóculo das três bactérias selecionadas *Sinomonas echigonensis* (V05-D), *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8) e *Paenibacillus alvei*

(AgN31) foi preparado em meio contendo vinhaça *in natura* e TSB, incubado sob agitação (150 rpm) em agitador orbital, por cerca de 72 horas a 27 °C. Posteriormente, os isolados foram inoculados uma vez nas mudas de cana-de-açúcar.

4.13.3 Determinação de comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz

Após 30 dias da inoculação, as plantas foram retiradas dos vasos com preservação do sistema radicular e da parte aérea, posteriormente foram higienizadas. Para isso, foi utilizada uma peneira para solo e um suporte de ferro. O comprimento da parte aérea e das raízes foi obtido com auxílio de uma trena. A massa fresca da parte aérea e da raiz foi determinada por meio de uma balança de precisão. As folhas e raízes foram secas em estufa a 60 °C por três dias, em seguida foram pesadas para obtenção da massa seca.

4.14 Experimento em campo

4.14.1 Plantio de cana-de-açúcar

O plantio de cana-de-açúcar ocorreu no mês de maio, em propriedade rural, localizada em Bebedouro, estado de São Paulo, 60 dias antes da inoculação. Em cada abertura do solo realizada foi plantada uma gema, onde duas linhas de cana foram plantadas a 0,30 centímetros de distância uma da outra, com profundidade de 30 centímetros e espaçamento entrelinha de 1.50 metros (EMBRAPA, 2022). Foram estabelecidos cinco tratamentos bacterianos e um controle. Cada tratamento teve três repetições, totalizando 18 plantas.

4.14.2 Inoculação bacteriana e controle

Em laboratório, preparou-se o pré-inóculos de cinco bactérias *Bacillus thuringiensis* (BioAdd 2), *Bacillus cereus* (BioAdd 3), *Sinomonas echigonensis*

(V05-D), *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8) e *Paenibacillus alvei* (AgN31) em meios de cultivo contendo vinhaça *in natura* e TSB, submetidos à rotação 150 rpm em agitador orbital por cerca de 72h à 27°C. Posteriormente, os isolados foram inoculados uma vez nas plantas selecionadas para cada tratamento. Os isolados BioAdd 2 e 3 obtidos da coluna de Winogradsky foram incluídos para comparação entre gêneros distintos.

4.14.3 Determinação de comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz

Após um mês a partir da inoculação, o comprimento da parte aérea das plantas foi medido com uma trena. Em seguida, as plantas foram coletadas, higienizadas e levadas para o laboratório para pesagem da massa fresca com auxílio de uma balança de precisão. As folhas e raízes foram submetidas a 60°C em estufa durante 3 dias, posteriormente foi feita a pesagem do material vegetal.

4.15 Análise dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada no software RStudio. Para os experimentos com plantas e com vinhaça *in natura*, aplicaram-se os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, adotando-se 5% de significância. As curvas de crescimento bacteriano foram representadas graficamente para comparação visual, sem aplicação de testes estatísticos. Nos bioensaios de nitrificação e desnitrificação, a interpretação foi baseada na coloração do meio e nos valores de densidade óptica. A caracterização morfológica dos isolados foi apresentada de forma descritiva, sem tratamento estatístico.

5. RESULTADOS

5.1 Propriedades químicas dos solos amostrados

Na Tabela 1, observa-se que as amostras provenientes de solo cultivado com cana-de-açúcar (C1–C4) apresentaram pH variando entre 5,0 e 5,2, considerados moderadamente ácidos, enquanto os solos das áreas de alho (A1–A4) apresentaram pH mais elevado, entre 5,9 e 6,5, e os solos de milho (M1–M3) mantiveram pH em torno de 5,0.

Tabela 1 – Análise química dos solos amostrados

Amostra	pH	M.O	P	S	Ca	Mg	K	Al	CTC	Sat. Bases	Sat. Al
	CaCl ₂	g dm ⁻³	Mg dm ⁻³	Mmolc dm ⁻³						V%	m%
A 1	6,0	25	79	4	37	8	5,3	0	72,5	70	0
A 2	5,9	28	103	6	47	9	6,7	0	82,7	76	0
A 3	6,5	24	111	4	49	11	4,1	0	77,1	83	0
A 4	6,4	27	108	4	55	13	4,1	0	87,1	82	0
C 1	5,2	19	17	7	19	7	1,7	0	51,8	53	0
C 2	5,2	17	11	6	17	7	1,4	0	47,9	52	0
C 3	5,0	16	10	7	16	6	1,4	0	47,4	50	0
C 4	5,1	16	11	8	17	7	1,7	0	49,8	52	0
M 1	5,0	14	18	5	18	6	1,7	0	44,8	59	0
M 2	5,0	13	19	5	16	6	1,3	0	39,3	58	0
M 3	5,0	14	21	5	17	7	1,8	0	44,8	58	0

Fonte: Athenas Consultoria Agrícola e Laboratório Ltda (2022)

Nota: pH em CaCl₂; matéria orgânica (M.O., g/dm³); fósforo (P, mg/dm³); enxofre (S, mg/dm³); cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e alumínio (Al), expressos em mmolc/dm³; saturação por bases (V%) e capacidade de troca de cátions (CTC, mmolc/dm³).

A concentração de matéria orgânica (M.O.) foi superior nas amostras da cultura do alho, com valores entre 24 e 28 g/dm³, seguidas pelas amostras de cana-de-açúcar (16–19 g/dm³) e milho (13–14 g/dm³). Os teores de fósforo (P) também foram mais elevados nos solos de alho (79 a 111 mg/dm³), enquanto os valores nas áreas de cana e milho não ultrapassaram 21 mg/dm³.

De forma semelhante, os teores de cálcio, magnésio e potássio foram significativamente mais altos nos solos da cultura do alho. Nenhuma das amostras apresentou alumínio trocável (Al³⁺), e os valores de saturação por bases (V%) foram mais elevados nas amostras de alho (70% a 83%),

indicando maior fertilidade, seguidos pelos solos de cana-de-açúcar (50% a 53%) e milho (58% a 59%).

5.2 Colunas de Winogradsky

As camadas de estratificação das colunas ficaram evidentes ao longo do experimento, porém não houve alteração da coloração, apenas mudanças na umidade do solo (Figura 4).

Figura 4 – Colunas de Winogradsky



Fonte: Autora (2023)

Nota: A: solo sob alho; B: solo sob cana-de-açúcar; C: solo sob milho.

5.3 Bioensaios de nitrificação e desnitrificação

Os valores de pH nos meios nitrificantes e desnitrificantes mantiveram-se em torno da neutralidade (entre 7.08 e 7.15), com variações discretas entre os diferentes extratos, conforme a tabela 2.

No meio nitrificante, os maiores valores de absorbância foram observados nos extratos do solo de cana-de-açúcar, especialmente no extrato III (0,2685), seguido pelos extratos I (0,1672) e II (0,1308). O solo de alho também exibiu crescimento relevante no extrato III (0.2874), embora com desempenho inferior nos extratos I e II. Por outro lado, o solo de milho

apresentou os menores valores de DO no meio nitrificante, sugerindo baixa presença de bactérias nitrificantes nas respectivas camadas (Tabela 3).

No meio desnitrificante, o solo de alho foi o que apresentou os maiores valores de absorvância, com destaque para os extratos II (0,1248) e III (0,1094). O solo sob cana mostrou valores variando de 0,0300 a 0,0802.

Já o solo de milho manteve valores baixos e relativamente semelhantes entre os extratos (Tabela 3).

Tabela 2 – pH dos meios desnitrificante e nitrificante de solos coletados em áreas distintas

Meio de cultivo	Extrato	Cana	Alho	Milho
Nitrificante	1	7.15	7.13	7.10
	2	7.14	7.13	7.10
	3	7.12	7.08	7.12
Desnitrificante	1	7.03	7.03	7.04
	2	6.91	7.06	7.10
	3	6.94	7.05	7.03

Fonte: Autora (2025)

Tabela 3 – Densidade óptica a 540 nm dos meios nitrificante e desnitrificante com consórcios bacterianos

Meio de cultivo	Extrato	Cana	Alho	Milho
Nitrificante	1	0.1672	0.0056	0.0144
	2	0.1308	0.1180	0.0021
	3	0.2685	0.2874	0.0678
Desnitrificante	1	0.0300	0.0416	0.0381
	2	0.0688	0.1248	0.0450
	3	0.0802	0.1094	0.0699

Fonte: Autora (2025)

Conforme a tabela 4, o isolado BioAdd 4 apresentou o menor valor de absorvância a 540 nm, o que indica maior consumo de nitrito e, portanto, possível destaque em atividade desnitrificante em relação aos demais isolados, mesmo com crescimento celular reduzido, conforme evidenciado pelo menor valor de DO₆₀₀ nm registrado.

Por outro lado, o isolado BioAdd 1 apresentou o segundo menor valor de DO_{450} nm e uma das maiores densidades celulares, semelhante à observada para BioAdd 5. O isolado BioAdd 3 apresentou o maior valor de DO_{450} nm, indicando baixa conversão de nitrito, ainda que com densidade celular próxima à dos isolados que se destacaram em crescimento nessas condições. Já o BioAdd 2 apresentou o segundo maior valor de DO_{450} nm e o segundo menor valor de DO_{600} nm.

Tabela 4 – Determinação do perfil de cultivo em fonte de nitrogênio e detecção de nitrito

Isolado	Solo de origem	Meio de Cultivo	Determinação colorimétrica	DO_{600} nm	DO_{450} nm
BioAdd 1	<i>Saccharum</i> spp.	DM	Vermelho	13.693	12.361
BioAdd 2	<i>Zea mays</i>	DM	Vermelho	11.103	13.434
BioAdd 3	<i>Zea mays</i>	DM	Vermelho	13.109	14.349
BioAdd 4	<i>Saccharum</i> spp.	DM	Vermelho	0.1412	11.232
BioAdd 5	<i>Saccharum</i> spp.	NM	Sem alteração	13.693	0.6847

Fonte: Autora (2025)

Nota: DM: meio de cultivo desnitrificante; NM: meio de cultivo nitrificante; DO_{600} nm: densidade óptica a 600 nanômetros; DO_{450} nm: densidade óptica a 540 nanômetros.

5.4 Caracterização fenotípica dos isolados da coluna

Foram obtidos 189 isolados bacterianos, os quais foram caracterizados morfolologicamente (Apêndice 1). Observou-se a predominância de colônias com coloração branca, forma circular, elevação plana e borda lisa.

A partir da técnica de coloração de Gram, verificou-se que 166 isolados são Gram-positivos e 22 são Gram-negativos. Os cinco isolados selecionados com base nos bioensaios de determinação colorimétrica e características morfológicas são gram-positivos, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Caracterização morfológica dos isolados bacterianos selecionados

Isolado	Reação de Gram	Cor da colônia	Forma	Elevação	Borda
BioAdd 1	Gram-positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
BioAdd 2	Gram-positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
BioAdd 3	Gram-positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
BioAdd 4	Gram-positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
BioAdd 5	Gram-positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa

Fonte: Autora (2025)

5.5 Percentual de identidade dos isolados bacterianos

A Tabela 6 apresenta os percentuais de identidade dos isolados bacterianos utilizados nos bioensaios. Os valores de identidade variam entre 97,37% e 100%, indicando alta similaridade entre as sequências analisadas e aquelas depositadas no banco National Center for Biotechnology Information (NCBI). A maioria dos isolados apresentou 100% de identidade.

Tabela 6 – Percentual de identidade dos isolados selecionados para os bioensaios

Isolado	GenBank Blast	Filo	Família	Identidade (%)
BioAdd 1	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	Bacillaceae	100
BioAdd 2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Firmicutes	Bacillaceae	99.86
BioAdd 3	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	Bacillaceae	100
BioAdd 4	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	Bacillaceae	100
BioAdd 5	<i>Bacillus widmannii</i>	Firmicutes	Bacillaceae	100
EV0-8 *	<i>Brevibacillus nitrificans</i>	Firmicutes	Bacillaceae	100
V05-D *	<i>Sinomonas echigonensis</i>	Actinobacteria	Micrococcaceae	100
V05-6 *	<i>Novosphingobium</i> sp.	Proteobacteria	Sphingomonadaceae	100
V20-F *	<i>Cupriavidus</i> sp.	Proteobacteria	Burkholderiaceae	100
V05-22 *	<i>Chromobacterium vaccinii</i>	Proteobacteria	Chromobacteriaceae	100
EV0-5 *	<i>Curtobacterium</i> sp.	Actinobacteria	Microbacteriaceae	100
AgN31 #	<i>Paenibacillus alvei</i>	Firmicutes	Paenibacillaceae	97.37

Fonte: Autora (2025)

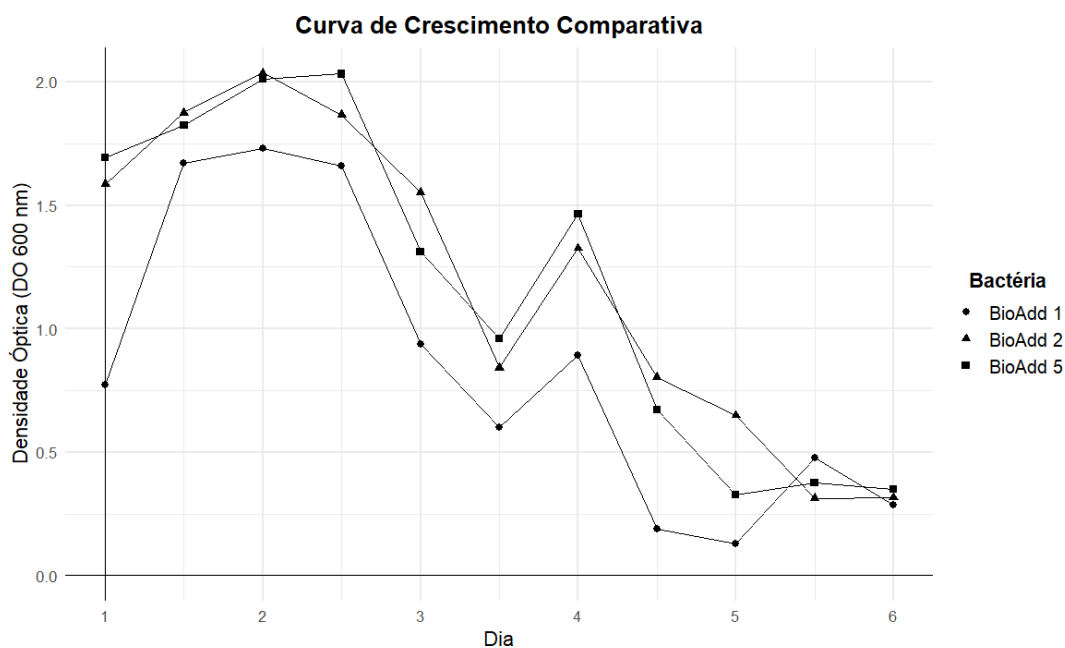
Nota: * Mariana Miranda (2023); # Higor Alves (2025)

5.6 Curva de crescimento e determinação da UFC/mL

Na avaliação da curva de crescimento, os isolados BioAdd 1, BioAdd 2 e BioAdd 5 apresentaram padrão semelhante nos primeiros dias, com aumento da densidade óptica até o segundo dia, seguido por queda no terceiro. No quarto dia, todos os isolados exibiram um segundo pico de crescimento, sendo BioAdd 5 o que atingiu os maiores valores de DO_{600} .

De modo geral, os isolados BioAdd 2 e BioAdd 5 mantiveram valores de densidade óptica mais próximos entre si ao longo do experimento, enquanto BioAdd 1 apresentou valores visivelmente inferiores em comparação aos demais. A partir do quinto dia, observou-se queda progressiva da densidade óptica em todos os isolados, com estabilização em valores baixos e similares ao final do sexto dia (Figura 5).

Figura 5 – Representação gráfica da curva de crescimento de três bactérias



Fonte: Autora (2025)

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) realizada no quinto dia de incubação revelou diferenças na viabilidade celular entre os isolados. O isolado BioAdd 5 (*Bacillus wiedmannii*) apresentou a maior

concentração de células viáveis, seguido por BioAdd 2 (*Bacillus thuringiensis*) e BioAdd 1 (*Bacillus cereus*). Esses dados corroboram o comportamento observado na curva de crescimento, especialmente em relação aos maiores valores de densidade óptica mantidos por BioAdd 5 ao longo do experimento (Tabela 7).

Tabela 7 – Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no quinto dia

Isolado	Linhagem	UFC/mL
BioAdd 1	<i>Bacillus cereus</i>	1.485×10^8
BioAdd 2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1.895×10^8
BioAdd 5	<i>Bacillus wiedmannii</i>	2.355×10^8

Fonte: Autora (2025)

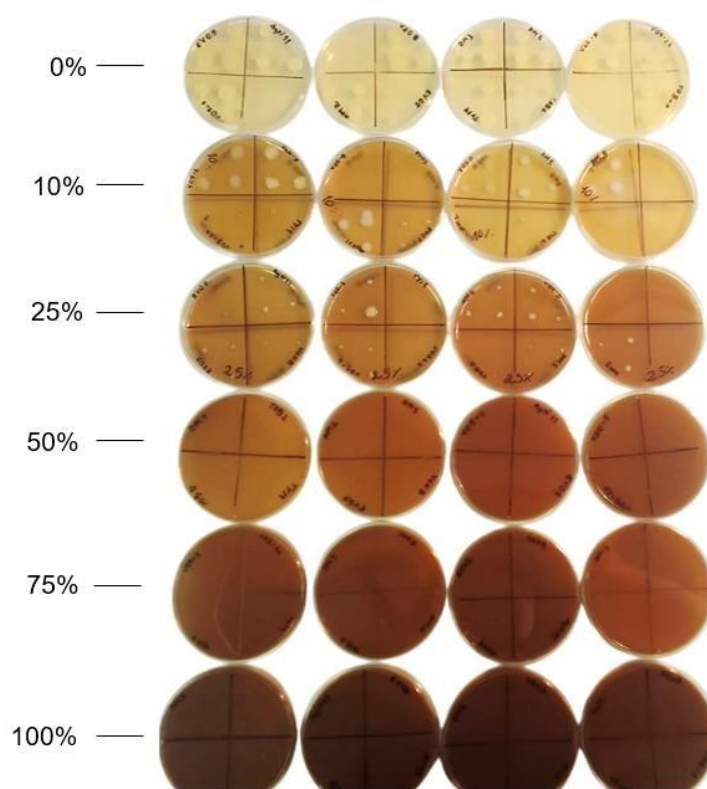
5.7 Avaliação de crescimento bacteriano em vinhaça *in natura*

5.7.1 Avaliação em meio ácido

A Figura 6 destaca a influência da concentração de vinhaça no meio de cultivo sobre o crescimento bacteriano. Observa-se uma redução progressiva no número de colônias à medida que a concentração de vinhaça aumenta.

Além disso, por apresentar pH naturalmente ácido, o aumento da concentração de vinhaça diminui o pH do meio, o que dificulta o crescimento bacteriano. Como resultado, nas placas com 50%, 75% e 100% de vinhaça, não foram observadas colônias.

Figura 6 – Avaliação do crescimento bacteriano em diferentes concentrações de vinhaça



Fonte: Autora (2025)

A figura 7 evidencia efeitos distintos entre os isolados submetidos as diferentes concentrações de vinhaça, sem ajuste do pH. Observa-se que as menores concentrações de vinhaça (0%, 10% e 25%) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si para a maioria dos isolados, sugerindo que até 25% de vinhaça não compromete significativamente o crescimento das bactérias testadas. Em contraste, as concentrações de 50%, 75% e 100% resultaram em ausência de crescimento, sendo agrupadas com letras “b”.

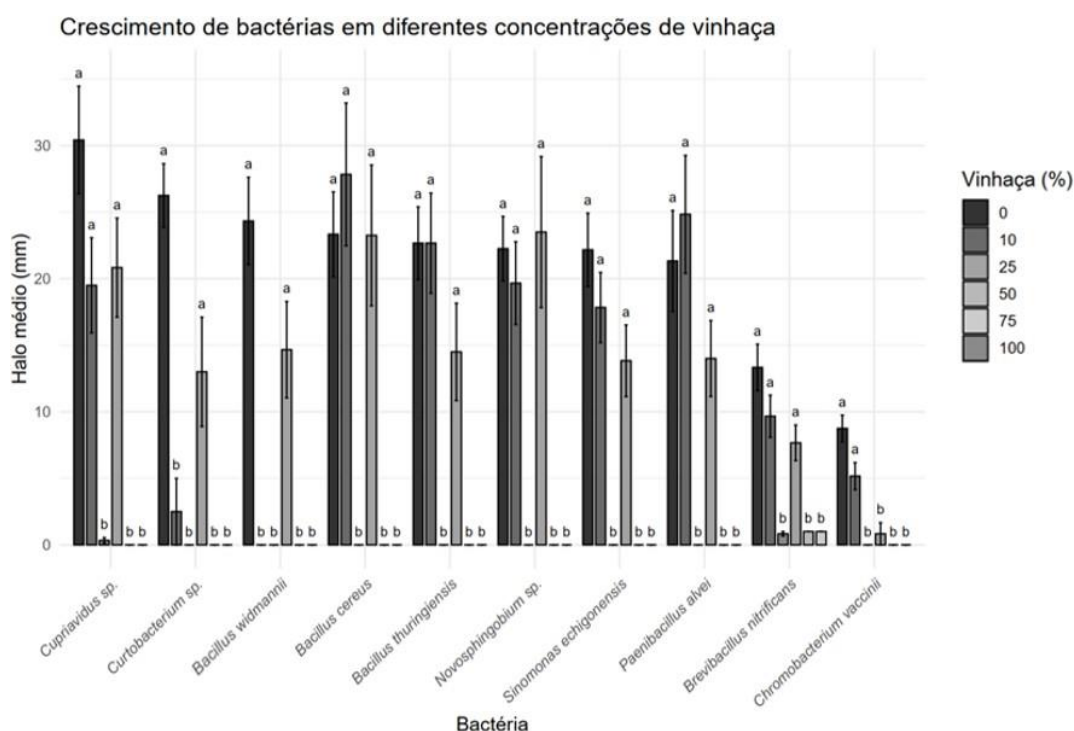
As bactérias *Sinomonas echigonensis*, *Brevibacillus nitrificans* e *Bacillus thuringiensis* demonstraram crescimento significativo nas concentrações de 0%, 10% e 25% de vinhaça, sem diferença estatística entre elas (grupo “a”). A partir de 50%, o crescimento foi inibido completamente, sendo essas concentrações agrupadas no grupo “b”.

Já *Bacillus cereus* (BioAdd 3) e *Paenibacillus alvei* destacaram-se

pela maior tolerância à vinhaça, com valores médios superiores aos observados nas demais bactérias nas concentrações de 10% e 25%. Apesar disso, a exposição a 50%, 75% e 100% também resultou em reduções significativas no crescimento.

Em contrapartida, *Bacillus widmannii*, *Curtobacterium sp.* e *Chromobacterium vaccinii* demonstraram alta sensibilidade, com crescimento comprometido mesmo em concentrações baixas de vinhaça. Essas bactérias apresentaram halos pequenos ou ausentes já a partir de 10%, o que foi refletido em diferenças estatísticas significativas quando comparadas ao grupo controle. *Novosphingobium sp.* e *Cupriavidus sp.* mostraram um padrão intermediário, com crescimento reduzido em 10% e 25%, seguido de total inibição nas concentrações mais elevadas.

Figura 7 – Avaliação do crescimento bacteriano em diferentes percentuais de vinhaça



Fonte: Autora (2025)

5.7.3 Avaliação em meio neutro

A Figura 8 apresenta o crescimento médio (mm) dos isolados bacterianos em meio contendo diferentes concentrações de vinhaça com pH ajustado para 7. As análises revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), evidenciadas por letras distintas obtidas pelo teste de Dunn.

De forma geral, a neutralização do pH da vinhaça favoreceu o crescimento bacteriano em comparação ao experimento anterior com vinhaça *in natura*, onde o pH era ácido. Observou-se que várias bactérias mantiveram halos significativos de crescimento até 50% ou 75% de vinhaça, o que não foi observado sob pH não ajustado.

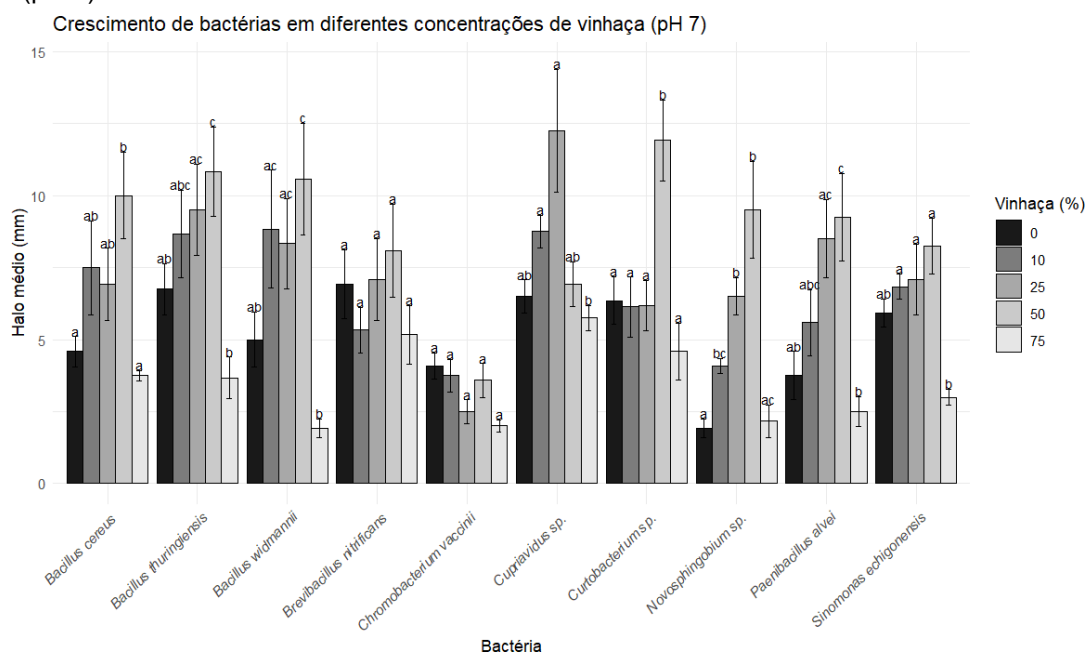
Os isolados *Bacillus cereus* (BioAdd 3), *Bacillus thuringiensis* e *Cupriavidus* sp. apresentaram os maiores halos médios, com destaque para o tratamento com 50% de vinhaça, onde atingiram os valores mais elevados de crescimento e diferiram estatisticamente dos demais. Esses isolados demonstraram alta tolerância à vinhaça ajustada, sendo promissores para aplicações agrícolas em ambientes onde o resíduo é reaproveitado.

Bacillus widmannii, *Brevibacillus nitrificans* e *Curtobacterium* sp. mostraram crescimento satisfatório até 50%, com reduções mais acentuadas apenas em 75%, o que representa uma melhora significativa em relação ao ensaio com pH inalterado, no qual essas bactérias foram severamente inibidas já em concentrações mais baixas.

Paenibacillus alvei e *Novosphingobium* sp. também responderam positivamente à neutralização do pH, apresentando maior halo médio nas concentrações intermediárias (25% e 50%), com crescimento estatisticamente superior ao controle (0%).

Por fim, *Chromobacterium vaccinii* e *Sinomonas echigonensis* mantiveram crescimento moderado até 50%, porém com redução significativa em 75%, sugerindo que mesmo com o ajuste de pH, a alta carga orgânica e salina da vinhaça ainda representa um fator limitante para alguns isolados.

Figura 8 – Halo médio de isolados bacterianos em diferentes concentrações de vinhaça (pH 7)



Fonte: Autora (2025)

5.8 Experimento em casa de vegetação

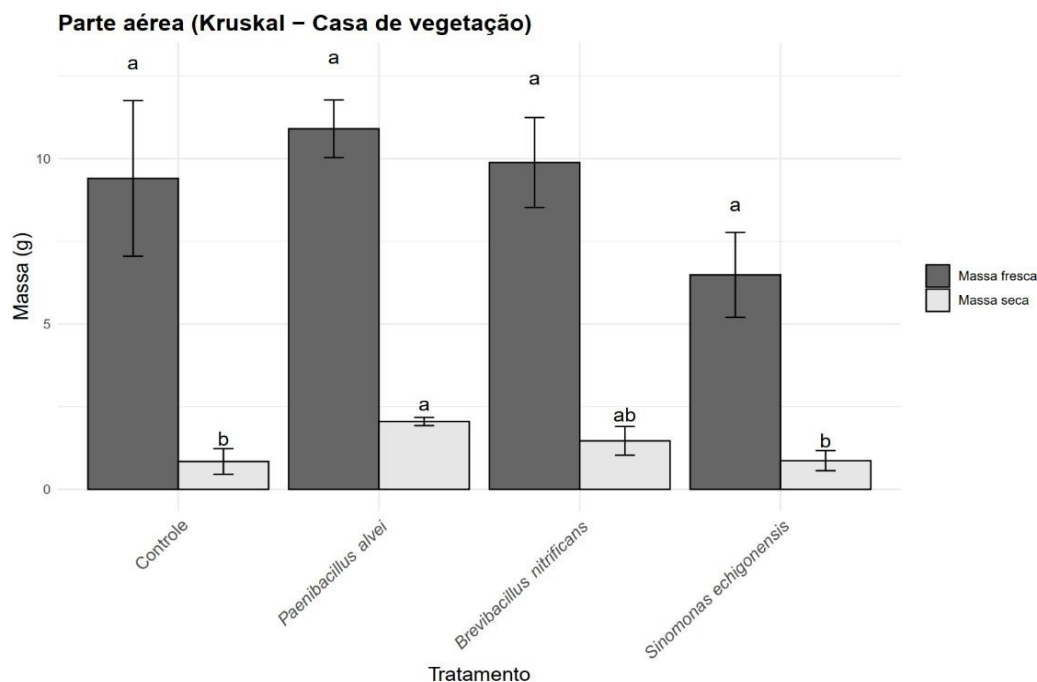
5.8.1 Massa fresca e massa seca da parte aérea

Conforme a figura 9, o tratamento com *Paenibacillus alvei* (grupo “a”), resultou nos maiores valores médios de massa seca e fresca da parte aérea, em comparação aos demais tratamentos e ao controle. No entanto, a massa fresca da parte aérea não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos.

Por outro lado, a massa seca apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), com destaque para *Paenibacillus alvei* (grupo “a”) e *Brevibacillus nitrificans* (grupo “ab”), que obtiveram valores médios superiores ao controle e ao tratamento com *Sinomonas echigonensis*, ambos pertencentes ao grupo “b”. O controle apresentou os menores valores de biomassa, evidenciando o efeito positivo da inoculação bacteriana no

crescimento da parte aérea.

Figura 9 – Massa fresca e massa seca da parte aérea de plantas em casa de vegetação



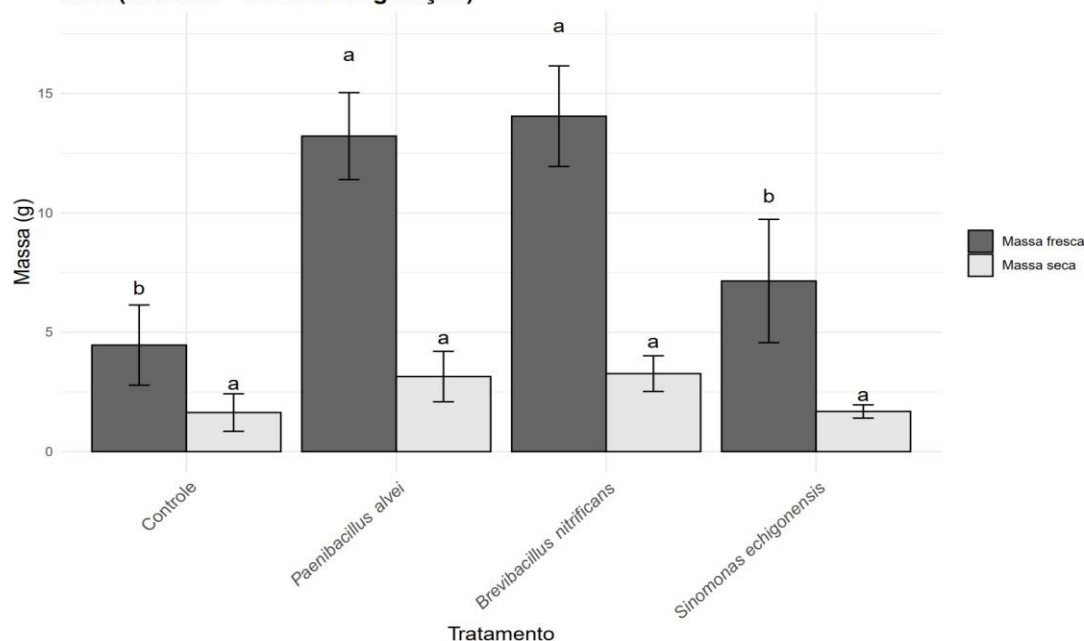
Fonte: Autora (2025)

5.8.2 Massa fresca e massa seca da raiz

Na figura 10 são apresentados os valores médios de massa fresca e massa seca da raiz em casa de vegetação, sob diferentes tratamentos bacterianos. Nota-se que a massa fresca da raiz variou significativamente entre os tratamentos. As bactérias *Paenibacillus alvei* e *Brevibacillus nitrificans* (grupo “a”) apresentaram os maiores valores médios de massa fresca, significativamente superiores ao controle e ao tratamento com *Sinomonas echigonensis* (grupo “b”). O controle e *Sinomonas echigonensis* indicaram os menores valores.

Para a massa seca da raiz, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, uma vez que todos foram agrupados na mesma letra (“a”). Embora não tenha sido identificada diferença estatística significativa na massa seca da raiz, os tratamentos com *Paenibacillus alvei* e *Brevibacillus nitrificans* apresentaram valores médios numericamente superiores aos demais.

Figura 10 – Massa fresca e seca da raiz de plantas em casa de vegetação
Raiz (Kruskal – Casa de vegetação)



Fonte: Autora (2025)

5.8.2 Comprimento da parte aérea e da raiz

Visualmente, a aplicação dos inoculantes à base de *Paenibacillus alvei* (AgN31) e *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8) promoveu maior crescimento da parte aérea (96,9 cm e 87,2 cm, respectivamente) e do sistema radicular (66,8 cm e 58,0 cm, respectivamente) conforme mostra as Figuras 11 e 12.

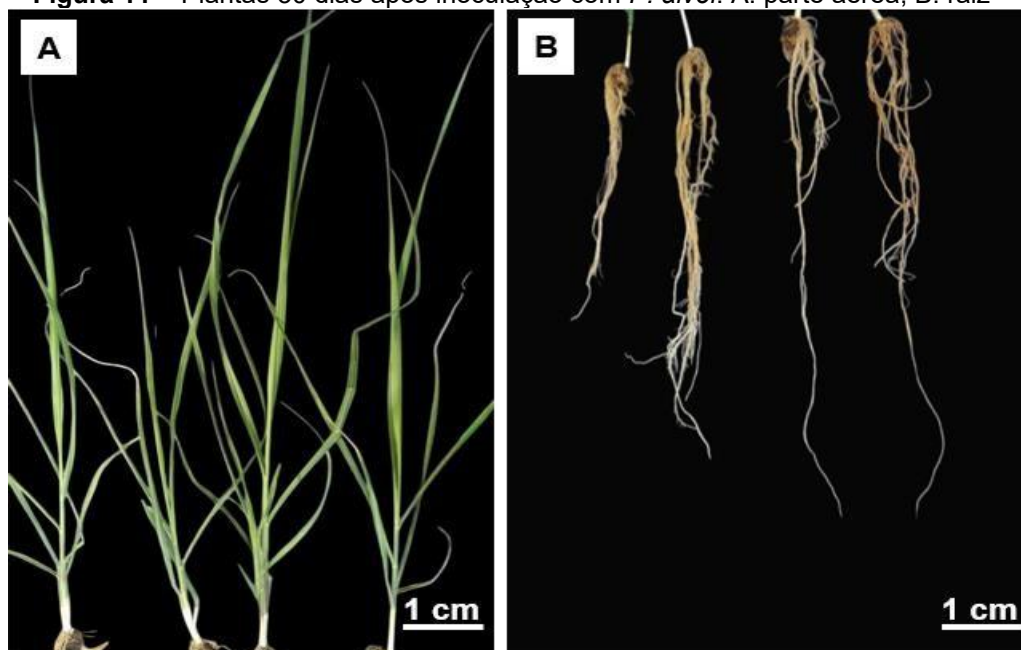
Por outro lado, o fenótipo visual das plantas inoculadas com *Sinomonas echigonensis* (V05-D) apresentou comprimento médio da parte aérea de 84,2 cm e da raiz de 37,5 cm (Figura 13), valores próximos aos observados no controle, cuja parte aérea e raiz apresentaram médias de 72,3 cm e 45,2 cm, respectivamente (Figura 14).

Os testes estatísticos confirmaram as observações visuais. Houve diferença significativa entre os tratamentos para a massa seca da parte aérea, com destaque para *Paenibacillus alvei* (AgN31) e *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8), que apresentaram os maiores valores médios.

Na massa seca da raiz, esses mesmos isolados também tiveram os

melhores resultados, embora sem diferença estatística expressiva. Para a massa fresca da parte aérea e da raiz, não houve diferença significativa entre os tratamentos. *Sinomonas echigonensis* (V05-D) não diferiu do controle em nenhuma variável.

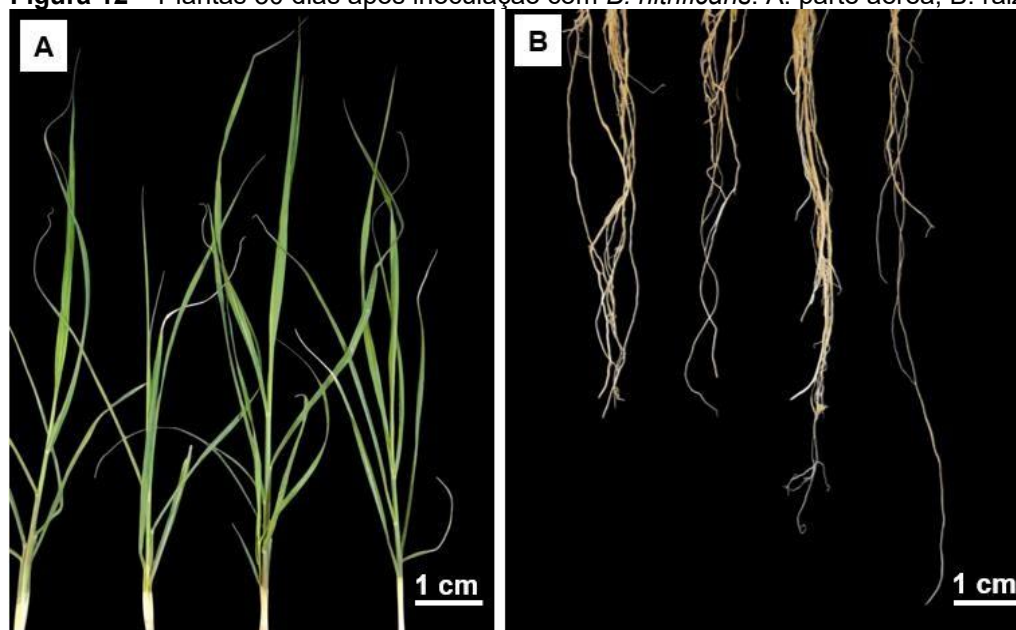
Figura 11 – Plantas 30 dias após inoculação com *P. alvei*. A: parte aérea; B: raiz



Fonte: Autora (2025)

Nota: Comprimento médio da parte aérea: 96,9 cm; comprimento médio da raiz: 66,8 cm.

Figura 12 – Plantas 30 dias após inoculação com *B. nitrificans*. A: parte aérea; B: raiz



Fonte: Autora (2025)

Nota: Comprimento médio da parte aérea: 87,2 cm; comprimento médio da raiz: 58 cm.

Figura 13 – Plantas 30 dias após inoculação com *Sinomonas echigonensis*. A: parte aérea; B: sistema radicular



Fonte: Autora (2025)

Nota: Comprimento médio da parte aérea: 84,2 cm; comprimento médio da raiz: 37,5 cm

Figura 14 – Plantas não submetidas à inoculação bacteriana (controle), aos 30 dias após a inoculação. A: parte aérea; B: sistema radicular



Fonte: Autora (2025)

Nota: Comprimento médio da parte aérea: 72,3 cm; comprimento médio da raiz: 45,2 cm.

5.9 Experimento em campo

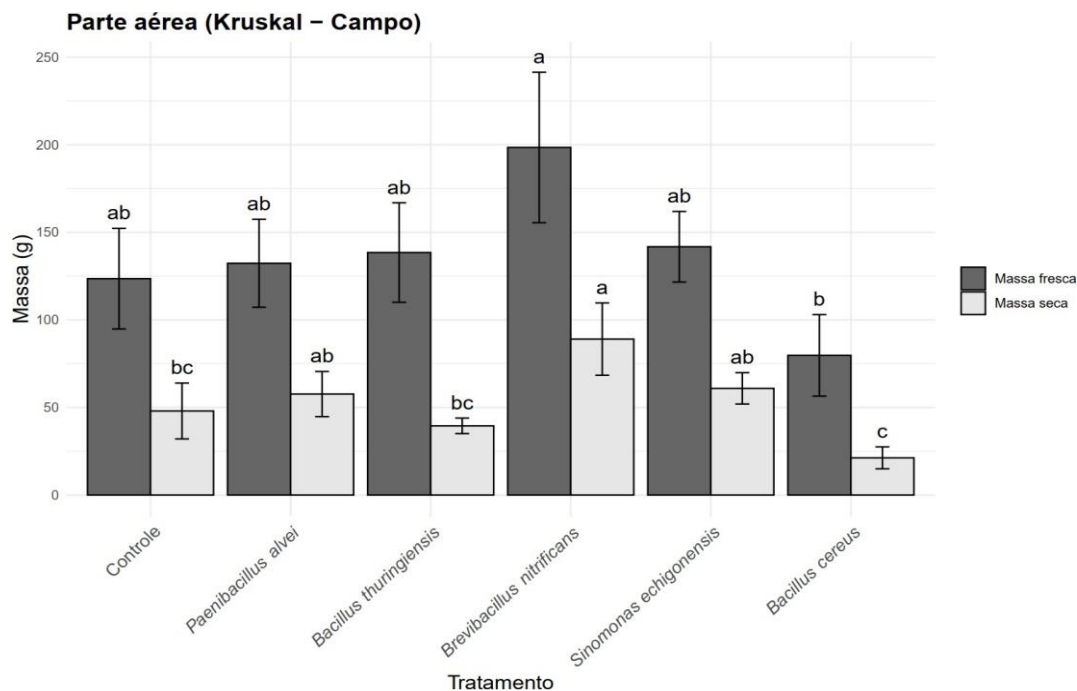
5.9.1 Massa fresca e massa seca da parte aérea

Na Figura 15, são apresentados os valores médios de massa fresca e massa seca da parte aérea de plantas de *Saccharum* spp. cultivadas em condições de campo, submetidas à inoculação com diferentes bactérias. Observa-se que a massa fresca variou significativamente entre os tratamentos.

A bactéria *Brevibacillus nitrificans* (grupo “a”) destacou-se com os maiores valores médios, diferindo significativamente de *Bacillus cereus* (BioAdd 3) agrupado em “b” e dos tratamentos com menores médias (grupo “bc”). Os demais tratamentos, que incluíram *Paenibacillus alvei*, *Bacillus thuringiensis*, *Sinomonas echigonensis* e o controle, obtiveram resultados intermediários, enquadrando-se nos grupos “ab” ou “b”.

Quanto à massa seca da parte aérea, também foram observadas diferenças significativas. *Brevibacillus nitrificans* (grupo “a”) mais uma vez se destacou, tendo os maiores valores médios, seguido por *Sinomonas echigonensis* (grupo “ab”).

O tratamento com *Bacillus cereus* ficou no grupo “c”, com os menores valores médios, diferindo estatisticamente de todos os demais. O controle, juntamente com *Paenibacillus alvei* e *Bacillus thuringiensis* compõem os grupos intermediários (“ab” e “bc”), sem diferença significativa entre si.

Figura 15 – Massa fresca e seca da parte aérea de plantas em campo

Fonte: Autora (2025)

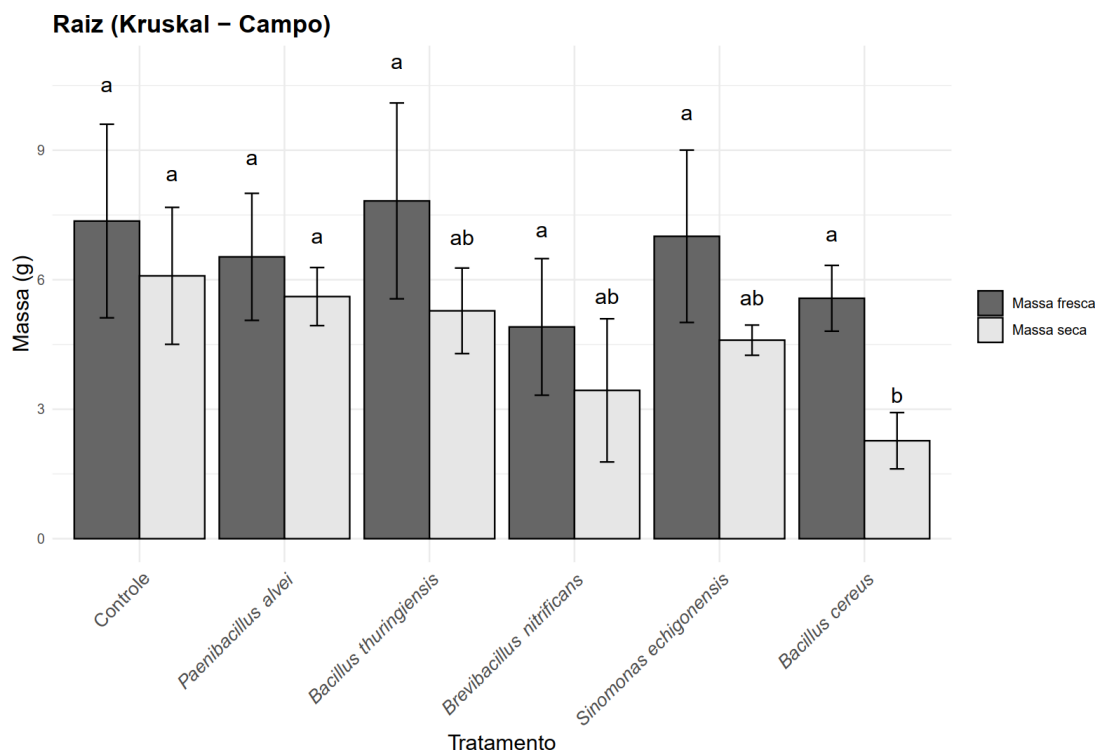
5.9.2 Massa fresca e massa seca da raiz

A figura 16 mostra que não houve diferença significativa entre a maioria dos tratamentos para a massa fresca. Todos os tratamentos foram classificados no grupo “a”, exceto *Brevibacillus nitrificans*, *Sinomonas echigonensis* e *Bacillus cereus* (BioAdd 3), que compõem um grupo intermediário (“ab”). Ainda assim, apenas *Bacillus cereus* apresentou valor médio visivelmente inferior em relação aos demais, embora sem diferença estatística isolada para a massa fresca.

Em relação à massa seca da raiz, *Bacillus cereus* apresentou o menor valor médio, sendo significativamente inferior (letra “b”) aos demais tratamentos. *Brevibacillus nitrificans*, *Sinomonas echigonensis* e o controle compõem um grupo intermediário (“ab”), enquanto *Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus alvei* demonstraram os melhores desempenhos, sendo classificados no grupo “a”. Embora os tratamentos bacterianos não tenham promovido um aumento expressivo na biomassa radicular, também não

apresentaram desempenho reduzido como o observado para *Bacillus cereus*.

Figura 16 – Massa fresca e seca da raiz de plantas em campo



Fonte: Autora (2025)

5.9.3 Comprimento da parte aérea e da raiz

O teste de Kruskal-Wallis indicou ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos quanto ao comprimento da parte aérea no experimento de campo. Apesar disso, observou-se que os tratamentos com *Brevibacillus nitrificans* e *Paenibacillus alvei* apresentaram as maiores médias, com 184,0 cm e 143,8 cm, respectivamente.

Em seguida, destacaram-se os tratamentos com *Bacillus thuringiensis* (143,8 cm), *Sinomonas echigonensis* (101,8 cm) e *Bacillus cereus* (78,0 cm), enquanto o tratamento controle apresentou a menor média, de 50,3 cm.

6. DISCUSSÃO

De forma análoga ao solo, que apresenta uma estrutura heterogênea e descontínua, favorecendo a formação de diversos micro-habitats, a coluna de Winogradsky constituiu em uma etapa preliminar do estudo, permitindo o estabelecimento de um ecossistema microbiano interdependente, tendo camadas de estratificação com diferentes condições físico-químicas.

O resultado da determinação colorimétrica representa a comunidade bacteriana de cada extrato da coluna, mostrando o potencial nitrificante e desnitrificante dos solos. Como os processos de nitrificação e desnitrificação são influenciados pelas propriedades edáficas, fatores como a presença de matéria orgânica, o pH neutro dos meios de cultivo, a amônia no meio nitrificante e o nitrito no meio desnitrificante podem ter contribuído para a modulação da atividade microbiana dos consórcios avaliados.

Nesse contexto, como o meio desnitrificante contém nitrito em sua composição, valores mais baixos de densidade óptica a 540 nm indicam maior capacidade de desnitrificação, pois refletem a conversão do nitrito em gases nitrogenados, como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) e N₂. Esse padrão foi observado nos extratos dos solos cultivados com cana-de-açúcar e milho, que apresentaram os menores valores de absorvância nesse meio, sugerindo maior atividade desnitrificante.

Por outro lado, no meio nitrificante, que contém amônia, a coloração avermelhada após a adição dos reagentes depende da formação de nitrito. Assim, valores baixos de densidade óptica a 540 nm indicam que o processo de nitrificação não ocorreu de forma suficiente para acumular nitrito no meio de cultivo. Essa condição foi evidenciada principalmente nos extratos do solo cultivado com milho, que apresentou os menores valores da leitura.

Em conjunto, estes dados revelaram que os solos sob cana-de-açúcar e milho mostraram elevada atividade desnitrificante, sugerindo capacidade eficiente na conversão de nitrito/nitrato em gases nitrogenados. Dependendo do potencial desnitrificador, gases nitrogenados de efeito estufa pode ser gerados. Adicionalmente, extratos de solo com milho indicam baixa atividade nitrificante, ou seja, menor acúmulo de nitrito. Comparando os solos de ambas culturas agrícolas, pode-se sugerir que o solo com cultivo de milho é menos agressivo que o de cana-de-açúcar quanto ao potencial efeito de gerar gases

de efeito estufa que contribuem para o aquecimento global.

Em relação ao teste de determinação colorimétrica com os isolados bacterianos obtidos dos consórcios, foi possível identificar perfis metabólicos distintos entre as cepas, mesmo sendo todas pertencentes ao gênero *Bacillus*. Enquanto a etapa anterior avaliou a atividade funcional de consórcios microbianos oriundos dos extratos de solo, esta abordagem individual possibilitou a caracterização específica da resposta dos isolados selecionados à disponibilidade de compostos nitrogenados como nitrito e amônia. Os resultados reforçam a importância de análises funcionais direcionadas, uma vez que a classificação taxonômica por si só não reflete necessariamente o potencial metabólico de cada linhagem.

O isolado BioAdd 4 (*Bacillus cereus*) apresentou atividade compatível com desnitrificação, comportamento que está em consonância com estudos anteriores que descrevem cepas da mesma espécie, como a linhagem J1, com capacidade de remover nitrato e amônio por meio de desnitrificação aeróbica e heterotrófica (ZHANG et al., 2020).

Por outro lado, o isolado BioAdd 5 (*Bacillus widmannii*) apresentou crescimento no meio nitrificante, mas sem acúmulo de nitrito detectável, indicando ausência de atividade nitrificante sob as condições testadas. Esse resultado evidencia a variabilidade funcional intraespecífica dentro do gênero *Bacillus*, visto que nem todas as linhagens expressam os genes necessários para a oxidação da amônia, como os genes da enzima amônia mono-oxigenase (*amoA*) ou outras vias alternativas descritas em nitrificantes heterotróficos (LI et al., 2024).

Os elevados valores de DO a 540 nm obtidos para as cepas BioAdd 1, 2 e 3 indicam baixa conversão do nitrito, evidenciando uma atividade desnitrificante reduzida ou ausente nessas bactérias sob as condições testadas. Esse comportamento está em conformidade com o entendimento de que a eficiência da desnitrificação depende da expressão de genes específicos, os quais provavelmente não foram expressos, como *nirK*, *norB* e *nosZ*, que codificam as enzimas responsáveis pela redução de nitrito, óxido nítrico e óxido nítrico, respectivamente, etapas fundamentais da via desnitrificante. Essa relação foi evidenciada em estudo com *Bacillus sp.* L2,

que demonstrou elevada capacidade de remoção de nitrito associada à expressão ativa desses genes (LI et al., 2024).

Do ponto de vista biotecnológico, nota-se que BioAdd 4 (*Bacillus cereus*) pode contribuir para diminuir acúmulo de nitrato/nitrito em solos e águas residuárias, e mitigar gases de efeito estufa derivados de uma desnitrificação incompleta. Adicionalmente, pode ser indicado para formulação de bioinsumos com vista na utilização eficiente do nitrogênio.

A aplicação de BioAdd 5 (*Bacillus wiedmannii*) pode ser indicada em ambientes onde a retenção de amônio é desejável, como solos onde se busca reduzir a nitrificação e as perdas por lixiviação de nitrato. Considerando a diversidade do metabolismo do N entre os isolados, os mesmos podem ser úteis na aplicação de estudos genéticos e bioquímicos em que etapas do ciclo do nitrogênio devem ser consideradas no gênero *Bacillus*.

Os isolados BioAdd 1, 2, 3, 4 e 5 são todos gram-positivos, inclusive, a maioria dos 189 isolados retirados dos consórcios das colunas são gram-positivos. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que bactérias gram-positivas tendem a utilizar preferencialmente o carbono derivado da matéria orgânica do solo, caracterizada por compostos estáveis e de difícil degradação.

Em contraste, bactérias gram-negativas têm maior afinidade por fontes de carbono recente, como os exsudatos radiculares e resíduos vegetais frescos, como observado por Kramer e Gleixner (2006). Os solos utilizados apresentaram teores de matéria orgânica entre baixos e médios (13 a 28 g/dm³), que, embora não elevados, podem ter contribuído, em conjunto com outros fatores, para a predominância de bactérias gram-positivas entre os isolados obtidos.

Além disso, bactérias gram-positivas possuem uma parede celular espessa e rica em peptidoglicano, o que lhes confere maior resistência a condições abióticas adversas, como variações de pH, baixa umidade e presença de compostos tóxicos. Essas características favorecem sua permanência e colonização no microbioma do solo (JOOS; DE TENDER, 2022).

Por outro lado, bactérias gram-negativas tendem a ser mais sensíveis

a essas variações, especialmente à redução da umidade, devido à parede celular mais delgada e à ausência de esporulação em muitas linhagens. Em períodos prolongados de seca, observa-se uma redução na densidade de gram-negativas e um aumento na abundância de gram-positivas, como as pertencentes ao filo Firmicutes, grupo ao qual pertencem todos os isolados da coluna sequenciados neste trabalho (GHOLIZADEH et al., 2024).

O padrão morfológico observado com coloração branca, forma circular, elevação plana e borda lisa nos isolados da coluna (Apêndice 1) é frequentemente descrito para cepas do gênero *Bacillus*, especialmente em isolados com potencial agrícola, como promotores de crescimento vegetal ou agentes de biocontrole (EL- KHAYAT; RAHMAN, 2022; KHAN et al., 2020; WILEY, 2025).

Embora a maioria dos isolados tenha apresentado 100% de identidade com espécies do gênero *Bacillus*, é importante destacar que esse gênero compreende espécies filogeneticamente muito próximas, o que limita a acurácia da identificação quando se utiliza apenas o sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*. Isso ocorre porque este gene é altamente conservado nesse grupo, resultando em baixa resolução taxonômica entre espécies próximas, como *Bacillus cereus* e *B. thuringiensis*.

Assim, apesar dos isolados BioAdd 1, 3 e 4 terem sido identificados como *Bacillus. cereus*, essa classificação deve ser analisada com cautela. Carroll et al. (2020) analisaram 224 cepas e concluíram que o sequenciamento do gene *16S rRNA* não é suficiente para diferenciar essas bactérias, devido à baixa variabilidade desse gene dentro do grupo, o que dificulta a distinção entre espécies próximas.

A dinâmica comparativa entre os isolados BioAdd 1, 2 e 5 revela estratégias distintas, mas compartilhadas, do gênero *Bacillus*, tendo as quatro fases clássicas de crescimento: lag, log, estacionária e declínio. A fase lag curta indica rápida adaptação ao meio, seguida de uma fase log até o segundo dia, compatível com o crescimento exponencial característico do gênero *Bacillus* em meios ricos (SETLOW, 2014).

A partir do terceiro dia, observou-se a entrada na fase estacionária, durante a qual ocorreu um segundo pico de crescimento, o qual pode ter

ocorrido devido a germinação de esporos, como descrito por Setlow (2003), que demonstra a possibilidade de esporos dormentes de *Bacillus* retornar ao estado vegetativo mediante condições adequadas. Tal resposta é típica do gênero *Bacillus*, cujos esporos permanecem metabolicamente viáveis e aptos a germinar mesmo após períodos prolongados de dormência (MOELLER et al., 2014).

A fase de declínio, iniciada após o quinto dia, apresentou comportamento variável entre os isolados. BioAdd 1 (*Bacillus cereus*) teve uma queda mais acentuada, coerente com a tendência dessa espécie de iniciar esporulação precocemente em resposta à escassez de nutrientes (EHLING et al., 2019); Por outro lado, BioAdd 2 (*Bacillus thuringiensis*) e BioAdd 5 (*Bacillus wiedmannii*) mantiveram maior viabilidade celular. No caso de BioAdd 5, esse desempenho está alinhado à descrição de *B. wiedmannii* como uma espécie psicotolerante, esporuladora e adaptada a condições ambientais adversas, o que reforça sua capacidade de persistência mesmo nas fases tardias do cultivo (MILLER et al., 2016).

A literatura recomenda que inoculantes líquidos à base de *Bacillus* contenham, no mínimo, 10^9 UFC/mL para assegurar eficácia, competitividade no solo e estabilidade durante o armazenamento (EMBRAPA, 2020; NGUYEN et al., 2020). No presente trabalho, o isolado BioAdd 5 (*Bacillus wiedmannii*) apresentou a maior concentração ($2,355 \times 10^8$ UFC/mL), seguido por BioAdd 2 e BioAdd 1, todos abaixo do valor mínimo recomendado. Esses resultados indicam que é necessária a otimização das condições de cultivo.

No que se refere aos bioensaios com diferentes concentrações de vinhaça *in natura* em meio de cultivo, foi possível observar a influência direta do pH no crescimento das bactérias avaliadas. O primeiro experimento, conduzido com vinhaça em seu estado original, simulou sua condição natural de acidez com pH entre 3,5 e 5,0, resultando na inibição total do crescimento bacteriano a partir de 50% de concentração.

Por outro lado, no experimento com pH ajustado para 7, eliminou-se a variável acidez, permitindo um crescimento mais expressivo em concentrações de 10% a 50%. No entanto, mesmo com o pH neutro,

observou-se uma redução no crescimento bacteriano em 75% de vinhaça, indicando que outros fatores continuam a exercer efeito limitante.

Esses efeitos que limitam o crescimento microbiano podem estar relacionados aos compostos presentes na vinhaça, como ácidos orgânicos, metais pesados, melanoidinas, corantes e compostos fenólicos, principalmente a luteolina, tricina, apigenina e naringenina (RODRIGUES et al., 2020).

Além disso, a alta concentração de matéria orgânica exige grande demanda bioquímica de oxigênio para sua degradação aeróbia, o que reduz o oxigênio dissolvido disponível (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Contudo, devido à grande geração de vinhaça como subproduto da indústria sucroalcooleira, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias sustentáveis que possibilitem seu reaproveitamento de forma eficiente e segura.

Uma abordagem promissora consiste na utilização de concentrações adequadas de vinhaça *in natura* como meio de cultivo para bactérias às plantas, ou seja, em níveis nos quais os microrganismos sejam capazes de crescerem. Além de aproveitar esse efluente, também reduz o custo de produção, consequentemente pode tornar o bioinoculante mais barato.

Essa prática não apenas viabiliza a produção de bioinoculantes microbianos, como também contribui para a redução da toxicidade da vinhaça, conforme demonstrado por Torres *et al.* (2023). Nesse sentido, no bioensaio com vinhaça *in natura* (sem ajuste de pH), concentrações entre 10% e 25% apresentaram menor inibição ao crescimento da maioria dos isolados testados, embora o desempenho geral tenha sido inferior ao observado sob pH neutro.

No que se refere aos resultados obtidos nos experimentos em plantas, em casa de vegetação *Paenibacillus alvei* apresentou o melhor resultado da massa fresca e seca da parte aérea, comparando-se aos demais tratamentos. Já *Brevibacillus nitrificans* mostrou maior massa fresca da raiz em casa de vegetação. Em campo, *B. nitrificans* também se destacou, uma vez que as plantas inoculadas com essa bactéria mostraram maior média da massa fresca e seca da parte aérea. Esses resultados evidenciam o potencial que

esses isolados possuem para promoção do crescimento de plantas.

É possível que *P. alvei* atue ativando mecanismos de defesa na planta, uma vez que estudos anteriores demonstraram que a cepa *P. alvei* K165 pode induzir resistência sistêmica por meio das vias hormonais do ácido salicílico, jasmonato e etileno (GKIZI *et al.*, 2016). Os dados obtidos neste trabalho são ainda corroborados por Mohammad *et al.* (2023), que observaram, após a inoculação do solo com *P. alvei*, um aumento significativo na altura, biomassa radicular e área foliar em *Cucumis melo*, associado à produção de ácido indolacético (AIA).

O isolado *B. nitrificans* pode estar envolvido na melhoria da nutrição da planta, especialmente em relação ao nitrogênio. Essa hipótese é sustentada pelo estudo de Takebe *et al.* (2012), que descreveram a espécie *B. nitrificans* como capaz de realizar nitrificação heterotrófica, ou seja, converter compostos nitrogenados, como o amônio, em nitrito mesmo na presença de matéria orgânica. Tal capacidade pode favorecer a disponibilidade de formas assimiláveis de nitrogênio na rizosfera, beneficiando o crescimento das plantas.

Os isolados *Paenibacillus alvei* (AgN31) e *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8) demonstraram resultados consistentes em relação à tolerância à vinhaça e aos efeitos positivos observados em *Saccharum spp.*, sugerindo potencial promotor de crescimento de plantas. Ambos mantiveram crescimento bacteriano em até 25% de vinhaça *in natura* (pH ácido) e 50% com pH neutro. A combinação desses resultados reforça a viabilidade dos isolados como candidatos ao desenvolvimento de bioinoculantes, especialmente voltados à agricultura e ao reaproveitamento de resíduos orgânicos como a vinhaça da cana-de-açúcar.

7. CONCLUSÃO

Considerando-se as metodologias adotadas e as condições

experimentais, conclui-se que este trabalho foi desenvolvido com base em uma abordagem holística, abrangendo desde a prospecção de consórcios microbianos do solo até a validação de isolados bacterianos em casa de vegetação e em campo.

Observou-se que os isolados obtidos a partir da coluna de Winogradsky apresentaram diversidade funcional quanto ao metabolismo do nitrogênio. *Bacillus widmannii* (BioAdd 5) destacou-se pela maior viabilidade celular entre os testados, enquanto *Paenibacillus alvei* (AgN31) e *Brevibacillus nitrificans* (EV0-8) sobressaíram na promoção do crescimento vegetal e demonstraram tolerância ao cultivo em vinhaça *in natura*, sob pH ácido e neutro. Portanto, os resultados reforçam o potencial dos microrganismos estudados como bioinoculantes para a cultura da cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Izhar; MAATHUIS, Frans J. M. **Cellular and tissue distribution of potassium: physiological relevance, mechanisms and regulation.** *Journal of Plant Physiology*, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.016>.

AKHTAR, S. S. et al. **Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects.** *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 1777, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **Colony Morphology Protocol.** Washington, D.C., 2016. Disponível em: <https://asm.org/asm/media/protocol-images/colony-morphology-protocol.pdf>.

ARKHIPOVA, T. N. et al. **Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil.** *Plant and Soil*, v. 292, p. 305–315, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9233-5>.

BERG, G. et al. **Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges.** *Microbiome*, v. 8, p. 103, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.

BRASIL. **Lei nº 15.070, de 23 de dezembro de 2024.** Dispõe sobre os bioinsumos para uso na agricultura, na pecuária, na aquicultura e em sistemas florestais; e altera as Leis nºs 6.894/1980, 10.603/2002 e 14.785/2023. Brasília, DF: *Diário Oficial da União*, 2024.

BRASIL. **Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980.** Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes destinados à agricultura. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 17 dez. 1980.

CABRERA DÍAZ, A. et al. **Combined treatment of vinasse by an upflow**

anaerobic filter reactor and ozonation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 33, n. 4, p. 753–762, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160334S20150268>.

CARROLL, L. M. et al. **Eight decades of genome evolution in the genus *Bacillus*.** *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00708>.

CHHETRI, S.; SHERPA, M. T.; SHARMA, L. **Characterization of plant growth promoting bacteria isolated from rhizosphere of tomato cultivated in Sikkim Himalaya and their potential use as biofertilizer.** *Scientific Reports*, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-98953-6>.

CHRISTOFOLETTI, R. A. et al. **Environmental implications of sugarcane vinasse use: Study of characteristics, transformation and potential disposal strategies.** *Journal of Environmental Management*, v. 129, p. 10–21, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.05.020>.

COLLUM, Tamara D.; CULVER, James N. **The impact of phytohormones on virus infection and disease.** *Current Opinion in Virology*, v. 17, p. 25–31, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.11.003>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **1º Levantamento da Safra de Cana de açúcar 2025/26.** 2025.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção de cana de açúcar na safra 2023/24 chega a 713,2 milhões de toneladas, a maior da série histórica.** Brasília, 18 abr. 2024.

DENMEAD, O. T.; FRENEY, J. R.; DUNIN, F. X. **Gas exchange between plant canopies and the atmosphere: Case-studies for ammonia.** *Atmosphere and Environment*, v. 42, n. 14, p. 3394–3406, 2008.

EHILING, M. et al. **Rapid and increased spore formation in *Bacillus cereus* as a response to nutrient limitation**. *Journal of Bacteriology*, v. 200, n. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.00100-19>.

EL-KHAYAT, A.; RAHMAN, M. S. A. **Biochemical and morphological characterization of plant-growth promoting *Bacillus* isolates**. *Journal of Advanced Research*, v. 30, p. 101–113, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.005>.

EMBRAPA. **Novo bioinsumo aumenta em até 20% a produtividade da cana-de-açúcar**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2022.

EMBRAPA. **Produto inédito reduz fertilizantes na produção de cana de açúcar**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agrobiologia, Seropédica, 2008.

FARHAN, Muhammad et al. **Plant nitrogen metabolism: balancing resilience to nutritional stress and abiotic challenges**. *Phyton – International Journal of Experimental Botany*, v. 93, n. 3, p. 581–609, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.32604/phyton.2024.046857>.

FAROOQ, N.; GHEEWALA, S. H. **Assessing the impact of climate change on sugarcane and adaptation actions in Pakistan**. *Acta Geophysica*, v. 68, n. 5, p. 1489–1503, 2020.

FERREIRA, D. F. **Estatística experimental**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2011. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/497631074/Estatistica-Experimental-Aplicada>.

GHOLIZADEH, Y. et al. **Microbial community dynamics in soil under prolonged drought conditions: Increase in Firmicutes abundance**. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 174, p. 108787, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2023.108787>.

GKIZI, D. et al. **The innate immune signaling system as a regulator of**

disease resistance and induced systemic resistance activity against *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 29, n. 4, p. 313–323, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-15-0261-R>.

GOMES, Eliane Aparecida et al. **Potencial de microrganismos para a solubilização de fosfatos de rocha.** Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 97). 31 p. ISSN 1679-0154.

GROßKINSKY, D. K. et al. **Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*.** *Scientific Reports*, v. 6, p. 23310, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep23310>.

HE, T.; LI, Z.; SUN, Q.; XU, Y.; YE, Q. **Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion.** *Bioresource Technology*, v. 200, p. 493–499, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.064>.

HIIS, Elisabeth G. et al. **Unlocking bacterial potential to reduce farmland N₂O emissions.** *Nature*, v. 630, p. 421–428, 2024. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-024-07464-3>.

HOARAU, J. et al. **Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource.** *Journal of Water Process Engineering*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.05.003>.

HU, H. W.; CHEN, D.; HE, J. Z. **Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: understanding the biological pathways for prediction of emission rates.** *FEMS Microbiology Reviews*, 2015.

HUCKER, G. J. **A new modification and application of the Gram stain.** *Journal of Bacteriology*, v. 6, n. 4, p. 395–397, 1921. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.6.4.395-397.1921>.

ISLAM, A.; SARKAR, B.; SHIT, P. K.; GAZI, H. A. R. **Groundwater nitrate contamination in agroecosystems: A comprehensive review of detection methods, pollution mechanisms, and policy implications.** *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, v. 49, n. 3, 2025. <https://doi.org/10.1177/03091333251337298>.

JOOS, L.; DE TENDER, C. **Soil under stress: The importance of soil life and how it is influenced by microplastic pollution.** *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 20, p. 1554–1566, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.041>.

JUNIOR, V. R. A.; MIRANDA, J. R. **Combustão do bagaço da cana de açúcar: autossuficiência energética e carbono neutro.** In: *Workshop Agroenergia*, Anais, Ribeirão Preto: Embrapa Territorial, 2013.

KHAN, A. L. et al. **Potential of *Bacillus* spp. as plant growth promoters and biocontrol agents: A comprehensive review.** *Agronomy*, v. 10, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy10020199>.

KHAN, F. et al. **Phosphorus plays key roles in regulating plants' physiological responses to abiotic stresses.** *Plants (Basel)*, v. 12, n. 15, p. 2861, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12152861>.

KLOEPPER, J. W. et al. **Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria.** *Nature*, v. 286, p. 885–886, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1038/286885a0>.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes.** In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA*, 1978.

KRAMER, Christiane; GLEIXNER, Gerd. **Variable use of plant-and soil-derived carbon by microorganisms in agricultural soils.** *Soil Biology & Biochemistry*, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.0617>.

LI, Y. et al. **Functional genomics reveals heterogeneity in nitrifying and denitrifying pathways among *Bacillus* isolates.** *Microbial Ecology*, v. 87, n. 3, p. 456–472, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02255-z>.

LIU, Y. et al. **Influence of nitrogen fertilizer application on soil acidification characteristics of tea plantations in Karst areas of Southwest China.** *Agriculture*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture13040849>.

MARAFON, Anderson Carlos. **Análise Quantitativa de Crescimento em Cana-de-açúcar: uma Introdução ao Procedimento Prático.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. (Documentos, n. 168). 32 p. ISSN 1678-1953.

MARMUR, J. **A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms.** *Journal of Molecular Biology*, v. 3, n. 2, p. 208–218, 1961. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8).

MCCAULEY, A.; JONES, C.; JACOBSON, J. **Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms.** *Nutrient Management Module 9*. Montana State University, 2009.

MILLER, R. A. et al. ***Bacillus wiedmannii* sp. nov.: psychrotolerant spore-forming bacterium isolated from cold soils.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 2059–2068, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000945>.

MOELLER, R. et al. **Resistance of bacterial endospores to outer space.** *Extremophiles*, v. 18, n. 5, p. 661–675, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0643-0>.

NEAL, A. L. et al. **Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere.** *PLoS ONE*, v. 7, e35498, 2012.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035498>.

NGUYEN, T. H. et al. **Formulation and survival of liquid *Bacillus* inoculants for agricultural applications**. *Applied Soil Ecology*, v. 149, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103470>.

NÓBREGA, Francisco Gorgonio da; BOSSOLAN, Nelma Regina Segnini. **Invisíveis, hóspedes e bem-vindos: os microrganismos**. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Org.). *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; SANTOYO, G.; GLICK, B. R. **Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth**. *Plants (Basel)*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12030606>.

PAL, R. R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. **Identification and monitoring of nitrification and denitrification genes in *Klebsiella pneumoniae* EGD-HP19- C for its ability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification**. *Functional & Integrative Genomics*, v. 15, n. 1, 2015.

PARSAEE, Mostafa; KIANI DEH KIANI, Mostafa; KARIMI, Keikhosro. **A review of biogas production from sugarcane vinasse**. *Biomass and Bioenergy*, v. 122, p. 117–125, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>.

QUEVEDO, Helio Danilo; NISHISAKA, Caroline Sayuri; MENDES, Rodrigo. **Entendendo a matéria orgânica do solo em ambientes tropical e subtropical**. 2023.

RACHWAL, Marcos Fernando Gluck. **O Solo**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2015.

RODRIGUES REIS, V. et al. **Phenolic compounds in vinasse and their toxic effects on microbial communities**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 39, n. 4, p. 673–684, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/etc.4684>.

RYALS, J. A. et al. **Systemic acquired resistance**. *The Plant Cell*, v. 8, p. 1809– 1819, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809>.

SANAGI, M. et al. **Low nitrogen conditions accelerate flowering by modulating the phosphorylation state of FLOWERING BHLH 4 in Arabidopsis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2022942118>.

SANTOS, Fernando et al. **Sugarcane biorefinery, technology and perspectives**. Amsterdam: Elsevier, 2020.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. **Anatomia e botânica**. In: DINARDO- MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. *Cana-de-açúcar*. Instituto Agronômico de Campinas, 2008.

SCHROTH, Milton N.; HANCOCK, Joseph G. **Bactérias do solo supressoras de doenças e colonizadoras de raízes**. *Science*, v. 216, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.216.4553.1376>.

SETLOW, P. **Spore germination**. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 550–556, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.002>.

SETLOW, P. **Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, n. 5, p. 1146–1155, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12505>.

SILVEIRA, Adriana Parada Dias da; FREITAS, Sueli dos Santos (orgs.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas (SP): Instituto Agronômico, 2007.

SULIS, D. B. et al. **Advances in lignocellulosic feedstocks for bioenergy and bioproducts**. *Nature Communications*, v. 16, art. 1244, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56472-y>.

TAKEBE, F.; HIROTA, K.; NODASAKA, Y.; YUMOTO, I. **Brevibacillus nitrificans sp. nov., a nitrifying bacterium isolated from a microbiological agent for enhancing microbial digestion in sewage treatment tanks.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032342-0>.

TORRES, Mariela Analía et al. **Vinasse as a substrate for inoculant culture and soil fertigation: advancing the circular and green economy.** *Science of The Total Environment*, v. 887, p. 164014, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164014>.

TRIPATHI, Durgesh Kumar et al. (Org.). **Plant Life Under Changing Environment.** Cambridge: Academic Press, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2018-1-02300-8>.

TRIPATHI, Durgesh Kumar et al. **Plant life under changing environment: responses and management.** Cambridge: Academic Press, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2018-1-02300-8>.

TRIVEDI, P. et al. **Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, p. 607–621, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>.

VANDENKOORNHUYSE, P. et al. **The importance of the microbiome of the plant holobiont.** *New Phytologist*, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.13312>.

VIEIRA, Rosana Faria. **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas.** Brasília, DF: Embrapa Meio Ambiente, 2017. 163 p. ISBN 978-85-7035-780-9.

WANG, X. et al. **Correlação estreita entre o declínio da soca da cana de açúcar e fatores ecológicos da rizosfera.** *Scientific Reports*, v. 14, art. 20738, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70613-1>.

WEISBURG, W. G. et al. **16S ribosomal DNA amplification for**

phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 2, p. 697–703, 1989.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.697-703.1989>.

WEST, J. R.; WHITMAN, T. **Disturbance by soil mixing decreases microbial richness and supports homogenizing community assembly processes.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 98, n. 9, fiac089, 2022.

ZHANG, Q. et al. **Removal of ammonium and nitrate by aerobic denitrifying *Bacillus cereus* J1 under microaerobic conditions.** *Journal of Environmental Sciences*, v. 92, p. 209–219, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020>.

APÊNDICE – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Tabela 8 – Caracterização morfológica dos 189 isolados

Identificação	Gram	Coloração	Forma	Elevação	Borda
1DFNI-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNI-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNI-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
1DFNI-4	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-4	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-5	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-6	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-7	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-9	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lobada
2DFNI-10	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lobada

2DFNI-12	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-13	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-14	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
2DFNI-16	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-17	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-18	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-19	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-24	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
2DFNI-25	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-26	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-27	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-28	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-29	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-30	Negativa	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
2DFNI-31	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-32	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-33	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-34	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
2DFNI-36	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-38	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-39	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
2DFNI-40	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-41	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-42	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-43	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
2DFNI-44	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
2DFNI-45	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-47	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-48	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNI-50	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNI-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNI-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa

3DFNI-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNI-4	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-4	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-5	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-7	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-8	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-9	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-10	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-11	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-12	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-13	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-15	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-16	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-18	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-19	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-20	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-21	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-22	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-23	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-24	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-25	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-26	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-27	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-28	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-29	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-30	Negativa	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1DFNII-31	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-33	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-34	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-35	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-36	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa

1DFNII-37	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-38	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-39	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-40	Negativa	Branca	Circular	Plana	Ondulada
1DFNII-41	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
1DFNII-42	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1DFNII-43	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-44	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNII-45	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNII-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNII-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-3	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-4	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-5	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-6	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-7	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-8	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-9	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-10	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-11	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-12	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-13	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-14	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNII-15	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
3DFNII-16	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNY-17	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
3DFNII-18	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
3DFNII-19	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
3DFNII-20	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNIII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNIII-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa

1DFNIII-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNIII-4	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1DFNIII-5	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNIII-5	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNIII-7	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
2DFNIII-9	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
2DFNIII-10	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
2DFNIII-12	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
2DFNIII-15	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
2DFNIII-16	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
2DFNIII-17	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNIII-18	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2DFNIII-19	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3DFNIII-1	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMI-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMI-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2NFMI-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2NFMI-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMI-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMI-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMI-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMI-4	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
3NFMI-5	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
3NFMI-6	Negativa	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMI-7	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMI-8	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMI-9	Negativa	Branca	Circular	Plana	Ondulada
3NFMI-10	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMI-11	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMI-12	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMI-13	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMI-14	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMI-15	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa

3NFMII-16	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-17	Negativa	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMII-18	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-19	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-20	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lobada
3NFMII-21	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-22	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-23	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-24	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-25	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-26	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-27	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-28	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMII-2	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
1NFMII-4	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMII-5	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-7	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-8	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada
1NFMII-9	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMII-10	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-11	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-12	Positiva	Branca	Circular	Elevada	Lisa
1NFMII-13	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-14	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
1NFMII-15	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMII-16	Positiva	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-17	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMII-18	Negativa	Branca	Puntiforme	Plana	Irregular
1NFMII-19	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
1NFMII-20	Negativa	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
1NFMII-21	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa

1NFMII-22	Negativa	Branca	Circular	Plana	Irregular
2NFMII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2NFMII-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Irregular
3NFMII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMII-2	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
1NFMIII-1	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
2NFMIII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
2NFMIII-2	Negativa	Branca	Puntiforme	Plana	Lisa
3NFMIII-1	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMIII-2	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMIII-3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Lisa
3NFMIII-4	Negativa	Branca	Circular	Plana	Lisa
