

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERAÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* (Ehrenberg,
1835) COM PRODUTOS AGROQUÍMICOS USADOS NA
CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Marilia Assunção Mendonça
Bacharel em Química**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* (EHRENBERG, 1835) COM
PRODUTOS AGROQUÍMICOS USADOS NA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Marilia Assunção Mendonça

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Coorientadora: Prof. Dra. Osania Emerenciano Ferreira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2025

M539i Mendonça, Marília Assunção
Interação de cepas de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) com produtos agroquímicos usados na cultura de cana-de-açúcar / Marília Assunção Mendonça. -- Jaboticabal, 2026
125 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Everlon Cid Rigobelo
Coorientadora: Osania Emerenciano Ferreira

1. Microbiota do solo. 2. Agroquímicos. 3. Atividade enzimática. 4. Metabolômica. 5. Sustentabilidade agrícola. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa: A pesquisa sobre a interação entre *Bacillus subtilis* e agroquímicos no cultivo de cana-de-açúcar destaca seu potencial impacto na agricultura sustentável. Os resultados mostram que a coinoculação com *B. subtilis* pode melhorar a atividade metabólica microbiana, aumentar a retenção de umidade e promover a ciclagem de nutrientes, favorecendo condições ideais para o crescimento das plantas. Porém, algumas combinações também apresentaram efeitos inibitórios sobre a microbiota, evidenciando a importância de selecionar cuidadosamente os insumos utilizados. As descobertas sugerem que práticas agrícolas integradas, que considerem tanto o uso de microrganismos benéficos quanto insumos químicos, podem contribuir para um manejo mais eficiente e sustentável da cana-de-açúcar, mas necessitam de validação em condições reais de cultivo.

Potential impact of this research: The study on the interaction between *Bacillus subtilis* and agrochemicals in sugarcane cultivation highlights its potential impact on sustainable agriculture. The results show that co-inoculation with *B. subtilis* can enhance microbial metabolic activity, increase moisture retention, and promote nutrient cycling, creating ideal conditions for plant growth. However, some combinations also exhibited inhibitory effects on the microbiota, underscoring the importance of carefully selecting the inputs used. The findings suggest that integrated farming practices, which consider both the use of beneficial microorganisms and chemical inputs, can contribute to more efficient and sustainable sugarcane management, but they require validation under real cultivation conditions.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INTERAÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) COM PRODUTOS AGROQUÍMICOS USADOS NA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR

AUTORA: MARILIA ASSUNÇÃO MENDONÇA

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO COORIENTADORA: OSANIA EMERENCIANO FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 OSANIA EMERENCIANO FERREIRA
Data: 05/01/2026 21:10:42-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. OSANIA EMERENCIANO FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Agrária e Biológicas / Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) - Frutal/MG

Documento assinado digitalmente
 TATIANE CARLA SILVA
Data: 08/01/2026 09:46:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pós-doutoranda TATIANE CARLA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Genética / FCFRP USP Ribeirão Preto/SP

Documento assinado digitalmente
 CRISTHYANE MILLENA DE FREITA
Data: 08/01/2026 09:01:59-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. CRISTHYANE MILLENA DE FREITA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Agrárias e Naturais / Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) - Ituiutaba/MG

Documento assinado digitalmente
 ALAN RODRIGUES TEIXEIRA MACHADO
Data: 05/01/2026 21:18:39-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. ALAN RODRIGUES TEIXEIRA MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Exatas / Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) - João Monlevade/MG

Documento assinado digitalmente
 EDUARDO DA SILVA MARTINS
Data: 07/01/2026 23:33:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. EDUARDO DA SILVA MARTINS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas / Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) - Frutal/MG



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



Jaboticabal, 10 de dezembro de 2025.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Marília Assunção Mendonça, nascida em Frutal (MG) em 04 de março de 1984, é filha de Maria José Assunção Mendonça e Magno Berg Mendonça. Graduiu-se em Licenciatura e Bacharelado em Química pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB) em 2006. Em 2008, concluiu a especialização Lato Sensu em Gestão Ambiental pelas Faculdades Integradas de Jacarepaguá (FIJ). Em 2013, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), câmpus de Jaboticabal (SP), sob orientação do Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira, concluindo-o em 2016. Em 2022, ingressou no curso de Doutorado na mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo e coorientação da Prof.^a Dr.^a Osania Emerenciano Ferreira, concluindo-o em 2025. Atualmente, é professora efetiva da educação básica, atuando no ensino fundamental I da rede municipal de Itapagipe (MG) e no ensino médio da rede estadual de Minas Gerais.

DEDICATÓRIA

À Deus, por minha família.

À minha mãe, por ser meu maior exemplo de vida, coragem e superação.

Aos meus filhos, Heitor e Otávio — que era apenas um recém-nascido quando iniciei esta jornada — agradeço por serem minha maior fonte de amor, força e inspiração.

Peço desculpas pelos momentos em que precisei me ausentar, dedicando-me ao doutorado, e por cada minuto em que a pesquisa falou mais alto do que a presença.

Ao meu marido, agradeço profundamente pela compreensão, paciência e apoio incondicional em todos os momentos desta caminhada. Sem vocês, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo, pela orientação dedicada e competente ao longo de todo o doutorado. Agradeço pela parceria, apoio constante, exemplo de humanidade, ética e humildade. Sua postura inspiradora representa o verdadeiro papel de um orientador comprometido com a formação científica e pessoal de seu orientando.

À Prof. Dra. Osania Emerenciano Ferreira, minha coorientadora, pela confiança depositada, pela orientação segura e pelas valiosas contribuições ao longo desta caminhada. Agradeço pela disponibilidade, paciência e por ser um exemplo de profissionalismo, competência e dedicação à ciência e à formação humana.

À Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG, Unidade Frutal, pela estrutura e espaço cedidos para a realização dos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório Fernanda Guidastre, Heytor Lemos e Pedro Gomes Peixoto, pela valiosa ajuda, companheirismo e amizade construída ao longo dessa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal (SP), pela valiosa oportunidade de aprendizado, crescimento acadêmico e profissional, e pelo ambiente de excelência que contribuiu de forma significativa para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alan Rodrigues Teixeira Machado, pela execução das análises metabômicas.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação pessoal e profissional, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para que a realização deste trabalho fosse possível.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Microrganismos promotores de crescimento e sua aplicação na agricultura	4
2.2. Cultura da cana-de-açúcar	8
2.3. Agroquímicos utilizados na cultura de cana-de-açúcar	9
2.3.1. Biozyme®	10
2.3.2. Comet®	10
2.3.3. Gamit®	11
2.3.4. Trichodermil®	12
2.4. <i>Bacillus subtilis</i> como agente de biocontrole	13
2.5. Qualidade Biológica do Solo	13
2.6. Microcosmos	16
2.7. Análise Metabolômica	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Coleta, caracterização e preparo das amostras de solo	20
3.2. Caracterização físico-químicas do solo utilizado no experimento	20
3.2.1. Potencial Hidrogeniônico (pH)	20
3.2.2. Análise de umidade do solo	20
3.2.3. Análise granulométrica	21
3.2.4. Capacidade de retenção de água (CRA)	25
3.3. Montagem dos microcosmos para avaliação <i>in vitro</i> da interação de <i>Bacillus subtilis</i> com os agroquímicos	26
3.3.1. Preparo dos tratamentos com agroquímicos e inoculação bacteriana	26
3.3.2. Montagem e incubação dos microcosmos	28
3.4. Caracterização microbiológica dos solos	29
3.4.1. Atividade Respiratória	30
3.4.2. Atividade hidrolítica microbiana do solo	31
3.4.3. Contagem de microrganismos do solo: diluição e preparo das amostras para contagem de microrganismos	31
3.4.4. Microrganismos totais	32

3.4.5.	Fungos totais	32
3.4.6.	Bactérias Fixadoras de Nitrogênio	32
3.4.7.	Carbono da Biomassa Microbiana	33
3.4.8.	Atividade da desidrogenase	33
3.5.	Estudos em vasos com plantio de cana-de-açúcar.....	34
3.5.1.	Biometria das mudas de cana-de-açúcar	35
3.5.1.1.	Altura da planta.....	35
3.5.1.2.	Comprimento e densidade das raízes	35
3.5.1.3.	Matéria fresca	35
3.5.2.	Determinação de macro e micronutrientes nas plantas	35
3.5.3.	Espectrofotometria de absorção atômica.....	36
3.6.	Perfil metabólico por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	
	(RMN de ¹H).....	36
3.7.	Análise estatística e tratamento dos dados	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1.	Caracterização do solo de estudo	39
4.2.	Interações dos agroquímicos com o solo em microcosmos.....	40
4.3.	Avaliação em Vasos	53
4.4.	Atividade respiratória em microcosmos	65
4.5.	Avaliação biométrica	68
4.6.	Avaliação dos nutrientes foliares.....	70
4.7.	Análise dos elementos acumulados nas folhas	72
4.8.	Perfil Metabólico	77
5.	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89

INTERAÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) COM PRODUTOS AGROQUÍMICOS USADOS NA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - A intensificação do uso de agroquímicos tem provocado alterações significativas na microbiota do solo, o que pode reduzir sua fertilidade e comprometer a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Nesse contexto, a bactéria *Bacillus subtilis* apresenta-se como alternativa promissora, capaz de promover o crescimento vegetal e otimizar o aproveitamento de insumos. Este estudo investigou as interações entre diferentes agroquímicos e *B. subtilis* no cultivo de cana-de-açúcar, por meio de experimentos conduzidos em microcosmos e vasos utilizando Latossolo Vermelho de textura argilosa. O microrganismo foi aplicado de forma isolada ou em combinação com os insumos agrícolas empregados no cultivo de cana-de-açúcar: Biozyme®, Comet®, Gamit®, Trichodermil® e um tratamento composto pela mistura de todos os agroquímicos avaliados. Os experimentos foram conduzidos em microcosmos e em vasos com plantio de cana-de-açúcar, ambos com duração de 50 dias, envolveram a avaliação de diversas variáveis do solo, incluindo pH, umidade, carbono da biomassa microbiana, atividade das enzimas desidrogenase e hidrolítica, bem como as populações de fungos totais, bactérias totais e bactérias fixadoras de nitrogênio. No cultivo em vasos, além dessas variáveis, foram realizadas avaliações de crescimento vegetal, teores de nitrogênio foliar, concentração de macro e micronutrientes e análise do perfil metabólico das folhas após 50 dias de cultivo. Nos experimentos *in vitro* (microcosmos), observou-se que o tratamento que utilizou o insumo Trichodermil® aumentou a umidade do solo, enquanto o tratamento com Comet® elevou a atividade da desidrogenase e o mix de insumos intensificou a atividade hidrolítica, bem como a população de fungos totais. Os teores de pH e o carbono da biomassa microbiana permaneceram estáveis independentemente dos tratamentos. Nos ensaios em vasos, o Trichodermil® promoveu maior atividade hidrolítica e incrementos nas populações de fungos totais e bactérias nitrificantes, enquanto a aplicação isolada de *B. subtilis* resultou em um aumento na atividade da desidrogenase. Além disso, as combinações de Biozyme® + *B. subtilis* e Mix + *B. subtilis* favoreceram o aumento das populações de bactérias totais, melhoraram o crescimento vegetal e resultaram em teores

superiores de macro e micronutrientes nas mudas. A análise do perfil metabólico das folhas revelou que o tratamento com *B. subtilis* isolado, seguido pela aplicação do mix de agroquímicos, proporcionou os maiores valores de metabólitos benéficos ao desenvolvimento vegetal, como sacarose, ácidos orgânicos e trigonelina, indicando uma maior eficiência metabólica e energética das plantas. Em contrapartida, os outros tratamentos apresentaram efeitos negativos, como a inibição da produção de metabólitos vegetais importantes e a diminuição da fixação de nutrientes e minerais. De modo geral, os resultados evidenciam que as interações entre agroquímicos e *B. subtilis* podem ser sinérgicas ou antagônicas, ressaltando o potencial de combinações equilibradas para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar e promover práticas agrícolas mais sustentáveis.

Palavras-chave: Microbiota do solo, Agroquímicos, Atividade enzimática, Metabolômica, Sustentabilidade agrícola.

INTERACTION OF *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) STRAINS WITH AGROCHEMICAL PRODUCTS USED IN SUGAR CANE CULTIVATION

ABSTRACT - The intensified use of agrochemicals has led to significant changes in soil microbiota, which can reduce its fertility and compromise the sustainability of agricultural systems. In this context, the bacterium *Bacillus subtilis* emerges as a promising alternative, capable of promoting plant growth and optimizing the use of inputs. This study investigated the interactions between different agrochemicals and *B. subtilis* in sugarcane cultivation through experiments conducted in microcosms and pots using Red Latosol with a clay texture. The microorganism was applied either alone or in combination with the agricultural inputs used in sugarcane cultivation: Biozyme®, Comet®, Gamit®, Trichodermil®, and a treatment consisting of the mixture of all the agrochemicals evaluated. The experiments conducted in microcosms and in pots with sugar cane planting, both lasting 50 days, involved the evaluation of several soil variables, including pH, humidity, microbial biomass carbon, activity of dehydrogenase and hydrolytic enzymes, as well as populations of total fungi, total bacteria and nitrogen-fixing bacteria. In the pot cultivation, in addition to these variables, plant growth assessments, leaf nitrogen content, macro- and micronutrient concentrations, and metabolic profiling of the leaves were performed after 50 days of cultivation. In the *in vitro* experiments (microcosms), it was observed that the treatment with Trichodermil® increased soil moisture, while the treatment with Comet® raised dehydrogenase activity and the input mix intensified hydrolase activity as well as the population of total fungi. The pH levels and microbial biomass carbon remained stable regardless of the treatments. In the pot trials, Trichodermil® promoted greater hydrolase activity and increases in the populations of total fungi and nitrifying bacteria, while the isolated application of *B. subtilis* resulted in an increase in dehydrogenase activity. Furthermore, the combinations of Biozyme® + *B. subtilis* and Mix + *B. subtilis* favored the increase in total bacterial populations, improved plant growth, and resulted in higher levels of macro- and micronutrients in the seedlings. The analysis of the metabolic profile of the leaves revealed that the treatment with *B. subtilis* alone, followed by the application of the agrochemical mix, provided the highest values of metabolites beneficial to plant development, such as sucrose, organic acids, and

trigonelline, indicating greater metabolic and energetic efficiency of the plants. In contrast, the other treatments showed negative effects, such as inhibition of the production of important plant metabolites and a decrease in the fixation of nutrients and minerals. Overall, the results demonstrate that the interactions between agrochemicals and *B. subtilis* can be synergistic or antagonistic, highlighting the potential of balanced combinations to increase sugarcane productivity and promote more sustainable agricultural practices.

Keywords: Soil microbiota; Agrochemicals; Enzymatic activity; Metabolomics; Agricultural sustainability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química do princípio ativo Piraclostrobina componente do Comet®.	11
Figura 2. Estrutura química do princípio ativo do herbicida Clomazone®.	11
Figura 3. Esquema geral das plataformas de estudos “OMICs” e sua relação com estudos de biologia sistêmica.	18
Figura 4. Estrutura geral e montagem dos microcosmos em condições de laboratórios.	28
Figura 5. Design experimental proposto para análise de interação de agroquímicos e <i>B. subtilis</i> .	29
Figura 6. Triângulo, guia de classe textural dos solos.	39
Figura 7. Análise da atividade respiratória em condição de microcosmos ao longo do período experimental.	66
Figura 8. Valores Médios de elementos metálicos avaliados ao final do experimento em condições de vaso.	73
Figura 9. Análise de clusters para a avaliação de macro e micronutrientes metálicos em plantas submetidas a tratamentos químicos e biológicos.	74
Figura 10. Concentração de metabólitos em cana-de-açúcar submetidos a diferentes tratamentos de insumos.	78
Figura 11. Análise de Componentes Principais (PCA) para a condição <i>in vitro</i> (Microcosmos).	84
Figura 12. Análise de Componentes Principais (PCA) para a condição de vasos.	84
Figura 13. Análise de Componentes Principais (PCA) para os tratamentos em condição <i>in vitro</i> (Microcosmos) para os tratamentos individuais.	85
Figura 14. Análise de Componentes Principais (PCA) para os tratamentos em condição de vaso para os tratamentos individuais.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de uso dos produtos com seus princípios ativos e função no manejo de canaviais.....	10
Tabela 2. Tempo de sedimentação calculado para a fração silte ($0,002\text{ mm} < \varnothing < 0,05\text{ mm}$) em função da temperatura da suspensão para a profundidade de 5 cm e para solos com densidade de partículas média de $2,65\text{ kg dm}^{-3}$, em determinação efetuada ao nível do mar.....	23
Tabela 3. Relação dos tratamentos e os procedimentos de preparo.	27
Tabela 4. Medidas granulométricas obtidas para o solo in natura (pré-experimento).	39
Tabela 5. Relação entre as variáveis físico-químicas do solo e os tratamentos para o microcosmos.....	41
Tabela 6. Interação de fatores para a atividade da desidrogenase.....	44
Tabela 7. Interação de fatores para a atividade da hidrolítica.....	47
Tabela 8. Interação de fatores para bactérias totais.	50
Tabela 9. Interação de fatores para fungos totais.	51
Tabela 10. Interação de fatores para bactérias fixadoras de nitrogênio.....	53
Tabela 11. Relação entre as variáveis físico-químicas do solo e os tratamentos para a análise em vasos.	54
Tabela 12. Interação de fatores para a atividade da enzima desidrogenase em condição experimental de vasos.....	55
Tabela 13. Interação de fatores para a atividade hidrolítica em condição experimental de vasos.	57
Tabela 14. Interação de fatores para bactérias totais em condição experimental de vasos.	59
Tabela 15. Interação de fatores para fungos totais em condição experimental de vasos.	61
Tabela 16. Interação de fatores para bactérias fixadoras de nitrogênio em condição experimental de vasos.....	63
Tabela 17. Resultados do teste estatístico para as variáveis biométricas.	69

Tabela 18. Teores de nitrogênio foliar em cana-de-açúcar, submetidas a diferentes tratamentos.....	71
---	----

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional mundial tem impulsionado a intensificação da produção agrícola, exigindo maior rendimento em áreas limitadas e promovendo mudanças nas técnicas utilizadas. Diante dos desafios enfrentados pela agricultura e pelo manejo sustentável do solo, torna-se essencial adotar práticas que minimizem impactos ambientais. Nesse contexto, novas tecnologias vêm sendo estudadas para reduzir o uso excessivo de insumos e tornar o cultivo mais viável e sustentável (Koul et al., 2021).

Entre as principais mudanças nas práticas agrícolas, destaca-se o uso de insumos para controle de pragas, doenças e plantas invasoras, que afetam direta ou indiretamente a microbiota do solo (Sim et al., 2022). O uso contínuo de insumos agrícolas tornou-se um problema alarmante, pois muitos agroquímicos permanecem persistentes no solo, afetando negativamente sua microbiota e funcionalidade (Portilho et al., 2014). Essa aplicação excessiva compromete a fertilidade e pode levar à degradação ambiental, resultando em solos improdutivos e impactos ambientais (Sim et al., 2022).

O insumo agrícola é fundamental para a produção eficiente e sustentável no campo. Trata-se de qualquer produto, substância, material ou recurso empregado com o intuito de melhorar o rendimento, a qualidade ou a eficiência das atividades agrícolas (Baum e Bieńkowski, 2020). Dentre os insumos, destacam-se os herbicidas, fertilizantes, estimulantes e fungicidas. Os fungicidas, por exemplo, são moléculas formuladas especificamente para prevenir, eliminar ou controlar doenças causadas por fungos que afetam plantas e culturas agrícolas. Esses produtos químicos são cruciais para proteger as plantas contra infecções fúngicas, pois podem causar danos significativos à produção, reduzindo tanto a qualidade quanto a quantidade das culturas (Tleuova et al., 2020).

Os herbicidas, igualmente, desempenham um papel importante na agricultura moderna (Ofosu et al., 2023).. Essas substâncias químicas são aplicadas para controlar, suprimir ou eliminar as ervas daninhas que competem com as culturas por recursos essenciais, como água, luz solar e nutrientes. Já os fertilizantes são essenciais para fornecer os nutrientes que as plantas precisam para crescer, e sua

utilização adequada se torna não apenas uma questão econômica, mas também uma necessidade ambiental e de sustentabilidade (Expósito e Velasco, 2020).

Neste contexto, o manejo integrado de doenças em plantas emerge como uma abordagem abrangente, incorporando diversas estratégias para minimizar a severidade das doenças e preservar o potencial produtivo das culturas. Entre essas estratégias, o controle biológico se destaca como uma alternativa promissora (Gabardo et al., 2020). Aqui, a implementação de microrganismos benéficos que promovem o crescimento das plantas e controlam pragas e doenças surge como um meio eficiente de melhorar a eficácia dos insumos agrícolas, ao mesmo tempo em que reduz a quantidade de aplicações necessárias. Essa intersecção entre microbiologia e práticas agrícolas representa um novo desafio e uma oportunidade significativa para transformar a forma como a agricultura é praticada, ressaltando a necessidade de inovação e adaptação na busca por uma produção mais sustentável.

Segundo Basu et al. (2017), esses microrganismos, que habitam qualquer parte da planta (filosfera e tecidos internos) e rizosfera sem ocasionar danos ao seu hospedeiro, atuando por mecanismos diretos e/ou indiretos que promovem seu crescimento e desenvolvimento. Apesar da perspectiva ecológica abundantemente propagada pela sociedade, o sistema agrícola encontra-se iniciante, no que se refere à extensão de técnicas agrícolas alternativas e ecologicamente sustentáveis. Assim, a aplicação de microrganismos na agricultura passa a ser uma alternativa viável tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico (Berg et al., 2019).

Pereira et al. (2013) constataram que algumas variedades, quando inoculadas, chegam a acumular mais matéria seca do que em tratamentos com uso de fertilizante nitrogenado. Segundo Pedraza (2008), além de auxiliar no processo de fixação biológica de nitrogênio, a associação com bactérias promotoras de crescimento (BPC) em cana-de-açúcar pode restringir o uso de fertilizantes na cultura, por solubilizar fosfatos e zinco (Saravanan et al., 2007; Estrada et al., 2013) e produzir sideróforos e reguladores de crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas (Di et al., 2023; Santi et al., 2013). Segundo Santi et al. (2013) alguns gêneros de BPC, como *Azospirillum sp.* e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) contribuem com o crescimento vegetal, especialmente pela síntese de auxinas.

Deste modo, embora a bactéria *B. subtilis*, esteja sendo muito empregada em culturas agrícolas, faz-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas, que investiguem a interação deste microrganismo e ou agroquímicos aplicados junto a essas bactérias. Este estudo permitirá monitorar a presença a atividade microbiana *in vitro* e em campo permitindo compreender os mecanismos de interação dos insumos *B. subtilis*-solo. As informações obtidas neste estudo contribuirão para adoção de métodos naturais de produção vegetal que resultem na melhoria dos processos de aplicação e atividade de microrganismos promotores de crescimento, permitindo reduzir os custos de utilização e melhorar a eficiência do uso destes.

Assim, este trabalho tem como objetivo fornecer dados para melhor compreensão entre a interação de agroquímicos utilizados tradicionalmente no cultivo de cana-de-açúcar e a interação destes com a bactéria promotora de crescimento *B. subtilis*, e melhorar a eficiência destes microrganismos e reduzir os custos de utilização no manejo sustentável dessas culturas. Deste modo busca verificar como as práticas agrícolas de uso de agroquímicos aplicados no plantio da cultura de cana-de-açúcar se comportam em relação ao possível efeito de toxicidade em *B. subtilis*.

Além disso, verificar os efeitos do uso de agroquímicos (fertilizante, fungicida químico e biológico e herbicida) na cultura de cana-de-açúcar e sua interação com *B. subtilis* avaliados em condições de vaso e microcosmos. Monitorar a atividade microbiana no solo e os mecanismos de interação entre os insumos, *B. subtilis* e o solo, além de avaliar a compatibilidade entre os ativos biológicos bacterianos e os produtos utilizados em mudas pré-brotadas no sistema de produção de cana-de-açúcar. Avaliar os efeitos na aplicação de *B. subtilis*, no crescimento e na metabolômica de mudas de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Microrganismos promotores de crescimento e sua aplicação na agricultura

A utilização de agroquímicos é uma prática para controle de pragas, doenças, além de alterar parâmetros de fertilidade do solo (Christofolletti et al., 2017). Os fertilizantes são qualquer tipo de substância empregada no solo, ou tecidos vegetais, com a finalidade de disponibilizar nutrientes para o solo e que são importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Porém, o uso de fertilizantes de modo inadequado pode provocar problemas relacionados a acidificação do solo, degradação ambiental e tornando a área inutilizável para certas culturas (Reetz, 2017).

Neste sentido a diminuição da aplicação de fertilizantes e melhoria da eficiência de uso destes, torna-se além de uma questão econômica, uma necessidade ambiental e de sustentabilidade. O uso de microrganismos que promovem o crescimento das plantas é uma alternativa para aumentar a eficiência do uso de fertilizantes (Spolaor et al., 2016).

Algumas bactérias benéficas podem trazer avanços importantes para a agroindústria, gerando ganhos econômicos e ambientais. Por exemplo, as bactérias fixadoras de nitrogênio interagem com os vegetais, especialmente quando combinadas em um grupo com várias espécies (Halfeld-Vieira e Santos, 2018), produzindo hormônios e auxiliando na solubilização de nutrientes. Assim, os microrganismos desempenham papel fundamental no fluxo de energia e na ciclagem dos elementos no ambiente. No solo, atuam como fixadores, produtores, transportadores e consumidores, contribuindo para a transformação e disponibilização de minerais essenciais às plantas (McLeod et al., 2016).

Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) são os principais macronutrientes indispensáveis às plantas (Silva et al., 2017). Para Pires (2016) dentre os processos biológicos mais importantes pode-se destacar a fixação do N_2 atmosférico, perdendo apenas para a fotossíntese. Conforme James e Baldani (2012) as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas apresentam sinergia com a fixação simbiótica de nitrogênio, além de solubilizar fosfatos minerais e outros nutrientes.

Segundo Khan et al. (2007), depois do nitrogênio, o fósforo é o elemento nutriente que mais limita a planta, restringindo a produção da cultura, caso haja deficiência. Organismos solubilizadores de fosfato destacam-se como alternativa economicamente viável, pois são capazes de disponibilizar grandes quantidades desse nutriente, promovendo o crescimento da planta, através da conversão de fósforo insolúvel para as formas solúveis (Coutinho, 2012).

As bactérias são mencionadas como principais responsáveis pelos processos de biossolubilização e capacidade de formar biofilmes. Sua fixação no substrato produz microambientes que as protegem de situações como estresse ambiental (Cara et al., 2012).

Atualmente, as BPC, também chamadas de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV), desempenham um papel essencial nas interações microbianas do solo agrícola, atuando como biofertilizantes, agentes de biocontrole e importantes fitoestimulantes (Beneduzi et al., 2012). Além disso, várias cepas de bactérias estão disponíveis no mercado, sendo comercializadas como biofertilizantes e agentes de biocontrole (Backer et al., 2018).

No entanto, a ação de patógenos prejudica diversas culturas, afetando sua produtividade e qualidade, e ocasionando, muitas vezes, perdas econômicas significativas para os agricultores. Para lidar com esses desafios, o método de controle mais amplamente utilizado é o químico, o que não apenas eleva os custos de produção, mas também pode trazer efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (Es-Soufi et al., 2020). Essa situação destaca a importância de explorar alternativas sustentáveis, como o uso de BPC, para mitigar os impactos negativos dos patógenos e reduzir a dependência de produtos químicos (Es-Soufi et al., 2020).

A produção de inoculantes de baixo custo com microrganismos que ajudam no crescimento das plantas pode ser uma solução para reduzir os problemas ambientais causados pelo uso excessivo de insumos e agrotóxicos (Es-Soufi et al., 2020). Esses microrganismos ajudam a aumentar a produção agrícola, tornando os produtos mais competitivos e diferenciados, além de diminuir os gastos dos agricultores (Diaz, 2018).

Diante das vantagens de usar BPC para combater patógenos, vale ressaltar a sua ocorrência natural no solo, sua resistência e sua capacidade de fornecer nutrientes fundamentais às plantas (Melo, 2015). Dentre as BPC mais empregadas

para fins agronômicos as mais conhecidas são *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Azospirillum brasiliense*, *Serratia marcescens*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, *Bacillus subtilis* e *B. megaterium* (Lanna-Filho et al., 2010; Melo, 2015).

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam diversas vantagens em comparação a outros microrganismos, destacando-se pela resistência à dessecação, pela produção de endósporos e pela capacidade de sobrevivência quando formuladas com polímeros e inertes. Além disso, elas possuem mecanismos antagônicos contra patógenos (Lanna-Filho et al., 2010; Melo, 2015). Este gênero compreende 191 espécies e quatro subespécies, que estão presentes naturalmente no ambiente (Lanna-Filho et al., 2010). Vários estudos têm evidenciado o seu potencial promotor de crescimento e de biocontrole (Marulanda et al., 2009; Lanna-Filho et al., 2010; Harthmann et al., 2010; Melo, 2015). De natureza gram-positiva, aeróbica e formadora de esporos, o *Bacillus* se destaca não apenas na agricultura, mas também em aplicações como tratamento de efluentes, biorremediação, limpeza e desodorização, tratamento séptico, na produção de enzimas e produtos químicos (Government of Canada, 2018).

Entre as diversas espécies, algumas, como *B. subtilis*, têm mostrado um efeito benéfico significativo sobre a nodulação e, indiretamente, restringem doenças, além de favorecerem a produção de raízes e sideróforos (Di et al., 2023). Elas também alteram a produção e os níveis de hormônios vegetais, aumentam a fixação de nitrogênio e solubilizam fosfatos inorgânicos, contribuindo para a disponibilidade de outros nutrientes do solo (Jensen et al., 2024). Diante desse contexto, o uso de *Bacillus* pode promover um incremento na produtividade das culturas (Jensen et al., 2024), especialmente quando associado a práticas de manejo como a fertilização (Lima, 2011; Braga-Junior et al., 2017). Assim, a aplicação de espécies de *Bacillus* como promotoras de crescimento e agentes de controle biológico em diferentes culturas agrícolas emerge como uma estratégia atrativa, eficiente e ambientalmente menos agressiva em relação ao uso de defensivos e fertilizantes químicos. Essa abordagem torna-se, portanto, uma opção mais sustentável tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental (Shafi et al., 2017).

Assim, ao considerar a importância das práticas sustentáveis na agricultura, destaca-se também o uso da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cana-de-açúcar,

uma técnica progressivamente e adotada por produtores (Pang et al., 2022). Essa abordagem é especialmente relevante em regiões, onde a cana é uma das culturas mais importantes, enfrentando desafios como fertilização inadequada e o uso excessivo de fertilizantes químicos (Pang et al., 2022).

A cana-de-açúcar requer uma quantidade significativa de fertilizantes durante seu crescimento, sendo que para produzir uma tonelada da cultura, é necessário absorver de 1,5 a 2 kg de nitrogênio (N), 1 a 1,5 kg de fósforo (P_2O_5) e 2 a 2,5 kg de potássio (K_2O) do solo (Fen, 2001). A aplicação excessiva de fertilizantes químicos não só eleva os custos para os agricultores, mas também acarreta riscos ambientais e à saúde pública (Iqbal et al., 2020). Assim, a busca por alternativas ambientalmente sustentáveis aos fertilizantes químicos, como a FBN, torna-se uma prioridade na pesquisa científica contemporânea. No Brasil, por exemplo, as pesquisas têm priorizado a redução da dependência de insumos minerais, com propostas de redução de metade da aplicação de fertilizantes nitrogenados, estimando uma economia de aproximadamente US\$ 62,5 milhões anuais para os produtores devido à adoção dessa técnica (Oliveira et al., 2006). Em conjunto, estas abordagens sustentáveis podem contribuir significativamente para a redução dos insumos químicos e promover práticas agrícolas mais responsáveis (Thomas e Costa, 2010). Essa prática não apenas é simples e economicamente acessível, mas também se revela altamente eficiente na fixação de nitrogênio, permitindo assim a redução dos custos com adubação (Thomas e Costa, 2010).

Sabendo-se que, a fixação biológica de nitrogênio é um dos fatores econômico de maior expressão nas lavouras (Oliveira et al., 2006), e que alguns produtos fitossanitários, tanto de natureza química como de natureza biológica podem afetar este processo, é de suma importância que estudos sejam conduzidos com o objetivo de avaliar o comportamento das bactérias na fixação do nitrogênio.

A utilização de agroquímicos e microrganismos vem provocando questionamentos em relação à ação dos agroquímicos na sobrevivência das bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Nesse contexto, estudos de interação entre agroquímicos e fixação biológica de nitrogênio atmosférico têm-se mostrado efetivos e obrigatórios, pois, além da preocupação com o controle de insetos praga e doenças, as tecnologias que objetivam elevar o rendimento da cultura devem, sobretudo,

preservar a qualidade ambiental (Sim et al., 2022), altamente beneficiada pelo processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

2.2. Cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea da família Poaceae com a espécie de cultivo *Saccharum officinarum* L. Trata-se de uma planta com amplas capacidades adaptativas à luminosidade e à temperatura, que requer grandes quantidades de água (Segato et al.; 2006). Assim, suas culturas estão amplamente presentes em países tropicais e subtropicais de vários países entre eles o Brasil, que possui sua história intimamente relacionada a esta planta (Stolf e Oliveira, 2020). A cultura da cana-de-açúcar no Brasil impactou diretamente a população para além de aspectos sociais e econômicos. No período do Brasil colonial, grandes áreas de florestas nativas de Mata Atlântica foram suprimidas para estabelecimento de áreas destinadas ao plantio da cana-de-açúcar. Os donos dessas áreas detinham poder decisório sobre a vida e a dinâmica das comunidades locais, fazendo com que aspectos socioculturais fossem moldados desde este período até os dias atuais (Morini et al., 2017).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e principal exportador dos seus derivados, etanol e açúcar. O setor sucroalcooleiro é uma atividade crescente e se destaca principalmente pelo aspecto da autossuficiência energética da mesma maneira que seus subprodutos (SUGARCANE.ORG, 2019), palhada, bagaço, vinhaça, torta de filtro e melaço. A cultura contribui significativamente para a geração de empregos diretos e indiretos. Na safra 2025/2026, sua produção foi de aproximadamente 668.820,05 mil toneladas, cultivada em cerca de 8.849,76 milhões de hectares no Brasil, apresentando produtividade média de 75.574,96 kg ha⁻¹. Todos esses indicadores registraram redução em comparação à safra anterior (CONAB, 2025). Um fator de grande destaque na produção de cana-de-açúcar é a utilização de agroquímicos, sendo o Brasil um grande utilizador (Carneiro et al., 2015). Os resíduos de fitoquímicos tendem a permanecer no solo por períodos longos, ocasionando impactos a diferentes ecossistemas.

No ano de 2021, o Brasil utilizou cerca de 49,9 milhões de toneladas de fertilizantes, com 75% desse valor oriundo de importações (Benício, 2022). Esses

dados indicam uma ampla dependência do Brasil no que tange a necessidade de fertilizantes para manutenção da produção de áreas de agricultura, especialmente.

A produção de cana-de-açúcar tem se expandido nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais (Região do Triângulo Mineiro), São Paulo e Paraná (UnicaData, 2025). No sistema de produção de cana-de-açúcar, a utilização de agroquímicos é amplamente adotada pelos produtores (AGROFIT, 2025; Siqueira, 2016). A interação entre esses compostos e ativos biológicos, como inoculantes, é crítica para a eficiência agrícola. Isso ocorre porque a combinação inadequada pode inibir o desenvolvimento de bactérias benéficas, comprometendo os resultados esperados (Halfeld-Vieira e Santos, 2018). Portanto, a análise dessas interações se torna fundamental para integrar eficazmente os ativos biológicos ao sistema produtivo.

2.3. Agroquímicos utilizados na cultura de cana-de-açúcar

Os agroquímicos desempenham um papel fundamental na produção de cana-de-açúcar, sendo essenciais para o manejo eficiente e a maximização dos rendimentos das lavouras (Oliveira et al., 2025). A utilização de produtos químicos, como fungicidas, herbicidas e fertilizantes, ajuda a combater pragas e doenças, bem como a otimizar a nutrição das plantas. Na cultura da cana-de-açúcar, são empregados diversos agroquímicos com diferentes princípios ativos, cada um com uma função específica no manejo dos canaviais. Por exemplo, produtos como o Comet®, que contém piraclostrobina, atuam como fungicidas, enquanto o Gamit®, com clomazone, é utilizado como herbicida. Além disso, o controle biológico é promovido através do uso de microrganismos como o *Trichoderma harzianum*, e a fertilização mineral é garantida por produtos como o Biozyme®, que combina diferentes sais minerais. O uso estratégico desses agroquímicos é essencial para garantir a saúde e a produtividade dos canaviais, contribuindo para a sustentabilidade e a competitividade do setor sucroenergético (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de uso dos produtos com seus princípios ativos e função no manejo de canaviais.

Tratamentos	Princípio ativo	Aplicação
Comet®	Piraclostrobina $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	Fungicida
Gamit®	Clomazone $C_{12}H_{14}ClNO_2$	Herbicida
Trichodermil®	<i>Trichoderma harzianum</i>	Controle biológico
Biozyme®	Nitrogênio (N) 1%; Óxido de potássio (K_2O) 5%; Boro (B) 0,08%; Ferro (Fe) 0,40%; Manganês (Mn) 0,1%; Enxofre (S) 1%; Zinco (Zn) 2% e Carbono Orgânico 3,5%	Fertilizante mineral misto

Fonte: Agrofite, 2025.

2.3.1. Biozyme®

O Biozyme® é um bioativador utilizado na cana-de-açúcar para promover o crescimento e a produtividade da planta (UPL, 2025). Ele atua principalmente na melhora da absorção de nutrientes e no aumento da resistência das plantas a estresses ambientais. O produto Biozyme® é um fertilizante mineral misto a base de Nitrogênio (N) 1%; Óxido de potássio (K_2O) 5%; Boro (B) 0,08%; Ferro (Fe) 0,40%; Manganês (Mn) 0,1%; Enxofre (S) 1%; Zinco (Zn) 2% e Carbono Orgânico 3,5% (UPL, 2021). Contém em sua formulação macro e micronutrientes combinados com extratos vegetais hidrolisados, que proporcionam uma melhoria em diversos processos metabólicos e fisiológicos das plantas como a divisão e o alongamento celular, translocação de nutrientes, síntese de clorofila, tuberização e bulbificação, diferenciação de gemas, fixação de frutos, mantendo o equilíbrio nutricional e fisiológico das plantas, sendo importante para uma maior produção, da sua cultura (UPL, 2021).

2.3.2. Comet®

O Comet®, um antifúngico químico que através do seu ativo Piraclostrobina (Figura 1), possui, comprovadamente, várias ações fisiológicas nas plantas, além de

sua ação fungicida (Köehle et al., 2002). Atua na redução do estresse das plantas, pela redução da produção de etileno (Köehle et al., 2002).

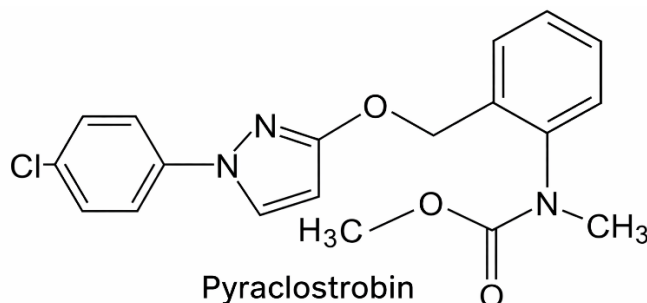


Figura 1. Fórmula química do princípio ativo Piraclostrobina componente do Comet®.

Fonte: Agrofite (2025).

Apresenta excelente ação protetiva, devido a sua atuação na inibição da germinação dos esporos, desenvolvimento e penetração dos tubos germinativos e proporciona maior atividade metabólica da planta, aumento da atividade da enzima nitrato redutase, resultando em melhor sanidade da planta (Reddy et al., 2013).

2.3.3. Gamit®

O Gamit® é um herbicida de ação sistêmica, com efeito pré e pós-emergente, sendo seletivo sob condições específicas e indicado para o controle eficaz de plantas infestantes (Andres e Machado, 2004). O Gamit® pode ser aplicado por via terrestre, através de pulverizadores manuais e tratorizados. Seu princípio ativo é clomazone{2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinona}}, comercializado com os nomes de Gamit Star®, Gamit 500 EC® e Gamit 360 CS® (Andres e Machado, 2004) (Figura 2).

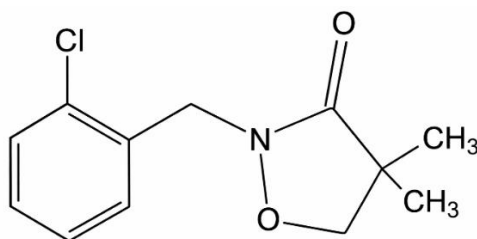


Figura 2. Estrutura química do princípio ativo do herbicida Clomazone®.

Fonte: Silva et al., 2010.

Trata-se de um herbicida com princípio ativo da classe de isoxazolidinona, foi sintetizado em 1980 para controle de plantas daninhas de folhas largas e gramíneas (Karpouzas et al., 2014), com tempo de dissipação variando entre 9 a 195 dias, que pode levar a danos em organismos não-alvo (Peters et al., 2014), além disso sua degradação ocorre especialmente através da ação de microrganismos e mais rápida através da fermentação anaeróbia (Brankatschk et al., 2011), e também por ação fotolítica dos raios solares (Rodrigues e Almeida, 2005).

O Gamit®, devido as suas características físico-químicas, apresenta considerável pressão de vapor (Senseman, 2007) e potencial de volatilização (Rodrigues e Almeida, 2005). Esse herbicida pertence ao grupo químico das isoxazolidinonas, atuando indiretamente no processo da fotossíntese, inibindo a enzima deoxixilulose fosfato sintase (DXP sintase), responsável pela síntese de isoterpenoides, precursores básicos dos carotenoides os quais possuem a função de proteção da clorofila à foto-oxidação. O sintoma visual dá-se nas folhas das plantas sensíveis que perdem a coloração verde, tornando-se brancas, gerando o sintoma característico desse grupo de herbicidas (Senseman, 2007).

2.3.4. Trichodermil®

O fungicida e nematicida microbiológico Trichodermil SC 1306 é composto por *Trichoderma harzianum* Rifai, cepa ESALQ-1306, sendo um micoparasita necrotrófico de ocorrência natural em solos, eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, incluindo os fungos *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pratylenchus zeae* e *Thielaviopsis paradoxa* (Agrofit, 2025).

Os mecanismos de interação antagônica mais comuns entre o gênero *Trichoderma* consistem em micoparasitismo, antibiose e competição (Dalzoto, 2017). O micoparasitismo consiste na ação que o antagonista desencadeia, detectando um substrato biológico adequado, como um patógeno, por exemplo, existente na área e se desenvolvendo em sua direção (Berg et al., 2019). Assim, quando se encontram, o *Trichoderma* se desenvolve no microrganismo, através de suas hifas, penetrando na parede celular e utilizando o conteúdo das células como fonte de alimento. Este

mecanismo é realizado através das enzimas hidrolíticas: quitanases, gluteases e proteases. Já a ação realizada por meio da antibiose envolve a capacidade do fungo biocontrolador de produzir substâncias voláteis e não voláteis capazes de inibir o desenvolvimento de determinados patógenos (Lobo-Júnior et al. 2019).

A competição exercida pelo *Trichoderma* é classificada com um mecanismo complementar no combate aos patógenos. Neste caso, o fungo usado no biocontrole ocupa a rizosfera do vegetal infectado, disputando pelos nutrientes, promovendo a redução da população de microrganismos indesejáveis (Gomes, 2014).

2.4. *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole

B. subtilis é comercializado como agente de biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para ampliar a produção nas culturas (Ngugia et al., 2005; Yao et al., 2006; Jan et al., 2023). A interação de *B. subtilis* com as raízes das plantas está diretamente relacionada à tolerância a estresses bióticos e abióticos e ao estímulo do crescimento vegetal (Hashem et al., 2019). Isso ocorre por meio da síntese de metabólitos secundários, hormônios, antibióticos, antioxidantes, enzimas citolíticas, além da fixação de nitrogênio e da solubilização de fósforo, resultando em efeitos benéficos tanto diretos quanto indiretos para as plantas (Hashem et al., 2019).

Sua ação é ampla, inclusive auxiliando no controle de nematóides, agindo sobre vários estágios de desenvolvimento e/ou indiretamente (Ferreira et al., 2007; Machado e Costa, 2017) por meio do comportamento, alimentação e reprodução, o que reduz a incidência de fitonematoides e garante o desenvolvimento saudável (Machado e Costa, 2017). Os efeitos *in situ* da exposição a células vivas de *B. subtilis* podem resultar em aumento do crescimento e/ou controle biológico (Jan et al., 2023). A oposição prática contra fitopatógenos é baseado em mecanismos antibióticos bem conhecidos, como síntese antimicrobiana, competição espacial por nutrientes e síntese de compostos voláteis (Jan et al., 2023).

2.5. Qualidade Biológica do Solo

A qualidade do solo é de extrema importância para o desenvolvimento das espécies que ali habitam e todo o ecossistema, assim como para manutenção sustentável das culturas e a garantia de alimentos para a população global (Silva, 2021; Oliveira et al., 2025). Neste sentido, faz-se necessário seu uso sustentável e seu monitoramento, verificando sua real situação, bem como sua capacidade de resiliência e a tomada de decisão para sua reestruturação (Oliveira et al., 2025). O monitoramento pode ser feito através de indicadores físicos, químicos e biológicos, sendo possível mensurar as condições do solo e assim possibilitar a manutenção da sustentabilidade produtiva dos ambientes (Oliveira et al., 2025).

Atualmente, diversas pesquisas almejam compreender o protagonismo dos organismos vivos habitantes deste ambiente na construção e manutenção de sua qualidade. Neste sentido cada vez mais estão sendo empregadas metodologias para a avaliação de indicadores biológicos da qualidade, especialmente pelo fato que sua biota desempenha papel fundamental nos inúmeros processos ecossistêmicos (ciclagem de nutrientes, fluxo de energia) que ocorrem no solo (Sobucki et al., 2019).

Os principais atributos utilizados para observar e mensurar a dinâmica da matéria orgânica do solo são a biomassa microbiana, a respiração basal (Taylor e Ball, 1994), o quociente metabólico, os processos enzimáticos, bem como a macrofauna e os processos que envolvem o ciclo do carbono e do nitrogênio (Oliveira et al., 2025).

A existência de microrganismos no solo é determinada pelas variantes ambientais predominantes e pelos limites de sua composição genética (Berg et al., 2019). Sua persistência obedece a taxa de respostas fisiológicas às condições ambientais (Berg et al., 2019). Alguns microrganismos podem sobreviver em condições extremas de salinidade, pH, pressão e temperatura. A adaptabilidade microbiana significa que as limitações físicas (aeração, água, adesão, porosidade etc.) e químicas (disponibilidade de nutrientes, toxicidade etc.) são superadas (Berg et al., 2019).

A determinação da biomassa microbiana do solo é um dos atributos utilizados para a avaliação de sua dinâmica, visto que é um componente essencial da matéria orgânica que, regula a ciclagem de nutrientes (Fernandes et al., 2013). É considerada um excelente indicador da qualidade do solo, sendo responsável por regular as transformações e acúmulo de nutrientes, sendo uma fração lábil da matéria orgânica

do solo, podendo refletir mudanças na matéria orgânica e no desenvolvimento do solo, já que os microrganismos do solo mediam vários processos que afetam o ecossistema e estão associados com a ciclagem de nutrientes, fertilidade do solo, mudanças nos estoques de carbono e na dinâmica da matéria orgânica (Hoffmann et al., 2018). Deste modo, funcionando como compartimento reserva de carbono, nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S) no solo, elementos essenciais para o desenvolvimento vegetal e como catalisador na decomposição da matéria orgânica (Souza et al., 2009).

Outro parâmetro muito utilizado para mensurar a dinâmica do solo é a Respiração Microbiana do Solo ou Respiração Basal do Solo (RBS), sendo um dos mais antigos para quantificar a atividade microbiana (Alef, 1995). Representa a oxidação da matéria orgânica por organismos aeróbios do solo, que usam o gás oxigênio (O_2) comoceptor final de elétrons, até a obtenção de gás carbônico (CO_2) (Alef, 1995).

Podemos destacar que as enzimas, que são biomoléculas da classe das proteínas que atuam como catalisadores, sendo elas específicas para cada composto a ser quebrado, existindo, assim, uma variabilidade enorme de enzimas (Pandey et al., 2014). No solo, as enzimas são de suma importância para a conversão e ciclagem de nutrientes, já que agem exatamente na quebra e catalise de reação com compostos de cadeia longa, propiciando, assim, a base primária para a absorção das plantas (Kandeler, 2024).

Além de atuarem na redução de toxicidade das moléculas fenólicas e de íons metálicos e ajudarem na defesa antimicrobiana (Panigrahy et al., 2022). As enzimas desempenham importante papel para os ciclos biogeoquímicos, participando da formação da matéria orgânica e estrutura do solo, estando diretamente ligadas à fertilidade e diversidade de organismos no solo. Essas, podem se manterem ativas na ausência de microrganismos (Ferreira et al., 2007). Para Dick et al. (2000), a atividade enzimática tem influência direta pela temperatura e pH, podendo ser reduzida quando os valores de pH são muito altos ou muito baixos (Dick et al., 2000). Entretanto, a atividade antrópica e os processos naturais do solo podem influenciar em maior ou menor atividade enzimática.

A enzima desidrogenase está relacionada à respiração na atividade metabólica. As proteases atuam quebrando cadeias proteicas em peptídeos menores, que, em

seguida, são processados pelas peptidases. A arilsulfatase, por sua vez, desempenha um papel importante na ciclagem do enxofre no solo. Além disso, o conjunto de enzimas arilsulfatase e β -glicosidase configura o BioAS, uma metodologia desenvolvida pela Empresa Agropecuária Brasileira (EMBRAPA). Essa abordagem visa integrar análises físico-químicas e biológicas para monitorar a saúde do solo de uma forma mais sensível do que os métodos convencionais (Mendes et al., 2020).

A atividade hidrolítica é usada como indicador geral da atividade hidrolítica do solo, como medida da protease, lipase e esterase que são capazes de clivar compostos fluorogênicos (Taylor et al., 2002; Khosrozadeh e Nourbakhsh, 2023). Desta forma, essa ação catalítica pode ser considerada uma medida da atividade microbiana total, embora as enzimas envolvidas nesta reação apresentem atividade externa à célula, podendo se encontrar complexadas com os colóides do solo (Swisher e Carroll, 1980; Khosrozadeh e Nourbakhsh, 2023).

Portanto a quantificação da atividade enzimática e da respiração microbiana são parâmetros fundamentais para fornecer indicações sobre os níveis de atividade das comunidades de microrganismos do solo (Khosrozadeh e Nourbakhsh, 2023).

2.6. Microcosmos

Os ecossistemas ao ar livre são muito complexos e difíceis de serem delimitados fazendo com que as pesquisas científicas fiquem cada vez mais difíceis de serem estudadas (Hu et al., 2017). Diante disso vários testes científicos estão sendo realizados dentro do próprio laboratório em sistemas denominados microcosmos, onde as condições de campo com limites definidos são imitadas e cuja manipulação e repetição pode ser feito da maneira que se deseja (Odum e Barrett, 2007; Hu et al., 2017).

O microcosmo é uma unidade de estudo de pequenos sistemas multiespecíficos que se constitui de um subconjunto da comunidade biótica e das propriedades abióticas de um ecossistema maior, incluindo cadeia trófica ou ciclos de produção e consumo, que contribui para compreensão de processos naturais (Hu et al., 2017). Os artificiais são confeccionados em laboratório e ficam total ou parcialmente isolados do mundo externo (Matheson, 2008). O experimento de

microcosmo pode oferecer critérios de efeito que consideram a interação entre espécies. Os microcosmos são derivados diretamente da natureza, que simula um ecossistema natural específico utilizando espécies e seus componentes (Clément et al., 2014).

Tratam-se em geral de recipientes que recebem o nome de micro ecossistema e utiliza o microssistema (o mundo natural) como base de referência. Dois tipos de microcosmos de laboratório podem ser diferenciados: 1. ecossistema derivados diretamente da natureza por semeadura múltipla de meios de cultura com amostras ambientais; 2. Sistemas construídos adicionando-se espécies de culturas puras ou não contaminadas até que se obtenha as combinações desejadas (Hu et al., 2017). O primeiro sistema representa a natureza simplificada para organismos que sobrevivem por longos períodos no limite dos recipientes, do ambiente de luz e temperatura imposto (Odum e Barret, 2007). No segundo sistema adicionando componentes previamente isolados e estudados, tem se o estudo da interação entre as espécies (Odum e Barrett, 2007). O sistema microcosmos pode sugerir hipóteses e mecanismos que podem ser testados em manipulações de campo a longos prazos (Krebs, 2014).

2.7. Análise Metabolômica

O Metaboloma pode ser definido como a composição de todas as moléculas presentes em um organismo (Adeniji et al., 2020). Essa tecnologia fornece uma visão geral compreensiva qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo, sendo denominada Metabolômica (Hall, 2006). Para ilustrar essa abordagem, A figura a seguir indica uma visão geral das plataformas de estudos ômicos ou “OMICS” (Figura 3).

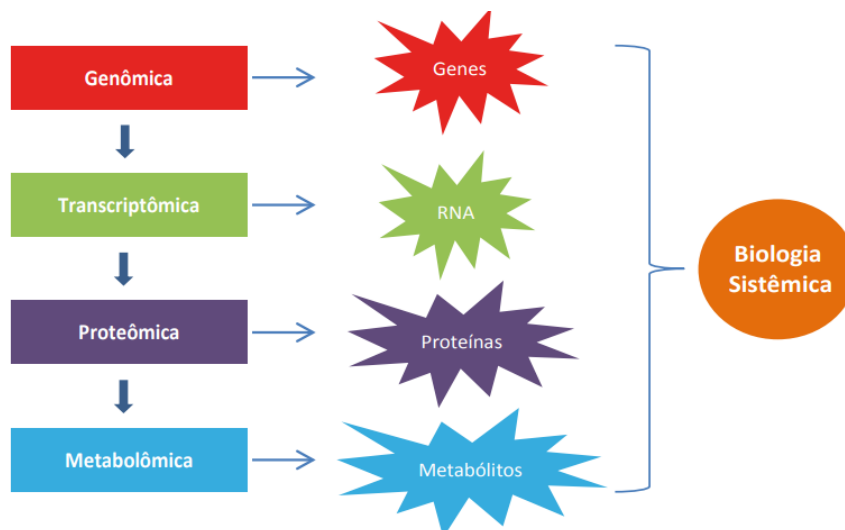


Figura 3. Esquema geral das plataformas de estudos “OMICS” e sua relação com estudos de biologia sistêmica.

Fonte: Abdelnur, 2011.

Experimentos de metabolômica provêm respostas únicas que aprimoram nossa compreensão de informações biológicas relevantes ao metaboloma e a genômica funcional em geral (Abdelnur, 2011). A caracterização e quantificação desses compostos requer a utilização de métodos e equipamentos específicos, de acordo com as propriedades de cada classe. Logo, a metabolômica envolve diversas técnicas analíticas que devem ser selecionadas dependendo do metabólito ou via metabólica de interesse ou da questão biológica que deve ser respondida (Abdelnur, 2011). Particularmente, a metabolômica é o estudo dos metabólitos de um organismo (metaboloma), que oferecem informações sobre processos bioquímicos fisiológicos e ecológicos (Adeniji et al., 2020). Espera-se que os organismos contenham entre 5.000 e 30.000 metabólitos diferentes, que se caracterizam por uma diversidade estrutural, polaridade, tamanho molecular e até mesmo concentrações diferentes (Ruiz, 2021).

As moléculas orgânicas que não se incluem no crescimento e desenvolvimento de um organismo são conhecidas por metabólitos secundários (Adeniji et al., 2020). Apesar dos metabólitos primários realizarem um papel fundamental na sobrevivência da espécie e terem um papel ativo na fotossíntese e na respiração, a longo prazo a falta de metabólitos secundários prejudica a viabilidade do organismo e geralmente é importante na defesa (Agostini-Costa et al., 2012).

As aplicações potenciais desses estudos são variadas. Por exemplo, eles podem ser utilizados na detecção de componentes botânicos para a descoberta de novos medicamentos (Salem et al., 2020). Além disso, há a possibilidade de incremento nutricional em frutos por meio do melhoramento de cultivos convencionais (Emon, 2020) e a utilização como ferramenta em estudos de interação entre plantas e patógenos (Castro-Moretti et al., 2020).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta, caracterização e preparo das amostras de solo

Para a realização dos experimentos, iniciou-se com a caracterização do solo, seguindo os procedimentos descritos a seguir. O solo foi coletado na profundidade de 0 a 20 cm (Horizonte A) em uma área anteriormente não cultivada e sem qualquer tipo de correção química, localizada na Área Experimental da CANATECH, no município de Frutal, Minas Gerais. Antes da coleta, a área foi devidamente preparada, com a remoção de todo o material vegetal presente na superfície. O solo foi classificado de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos como Latossolo Vermelho, com classe textural argilosa (Santos et al., 2025).

A análise granulométrica categorizou-o como argilossolo, com capacidade de campo de 49,5 %. O solo foi submetido a secagem a 22 ± 5 °C por 5 dias e peneirado utilizando uma peneira de malha de 2 mm, conforme descrito por Colla et al. (2014), para remover resíduos como pedregulhos, capim seco, e material vegetal. Após homogeneização, este solo foi empregado na montagem dos vasos e microcosmos.

3.2. Caracterização físico-químicas do solo utilizado no experimento

3.2.1. Potencial Hidrogeniônico (pH)

Para a determinação do pH, seguiu-se o protocolo descrito por Raij et al. (2001) onde foram utilizadas 10 g de solo seco ao ar (TSFA), a esse foi adicionado 25 mL de H₂O, aguardou-se 15 minutos para molhar a amostra. A solução após o período de espera foi agitada por 10 minutos em mesa giratória, posteriormente a solução ficou em repouso por 30 minutos. Foi realizada a leitura sem agitar introduzindo-se a ponta do eletrodo na parte do solo. Anotou-se o valor.

3.2.2. Análise de umidade do solo

A determinação da umidade foi feita utilizando-se cápsulas de porcelana, onde foram pesados em balança analítica de precisão, 30 g de solo úmido e colocados em estufa a 105 °C por 24 h. Depois de retiradas da estufa, as cápsulas foram inseridas em dessecador com sílica indicadora de umidade, até que atingissem a temperatura ambiente. Após resfriadas, as cápsulas contendo os solos secos foram novamente pesadas na mesma balança de precisão analítica. O cálculo da umidade atual gravimétrica (kg kg⁻¹) foi determinado conforme equação abaixo (Equação 1).

Equação 1. Cálculo da umidade atual gravimétrica.

$$Ug = \left(\frac{a - b}{b} \right)$$

Em que: Ug = Umidade gravimétrica (kg kg⁻¹), a = Massa amostra úmida (kg), b = Massa amostra seca (kg).

3.2.3. Análise granulométrica

Após a determinação da umidade gravimétrica do solo, conforme descrito por Teixeira et al. (2017), amostras de 10 g de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA) foram pesados em cápsulas de porcelana previamente secas e taradas, e submetidas à secagem em estufa a 105 °C por 24 h. A partir desses dados, procederam-se os cálculos da umidade residual e do fator de correção da massa do solo, conforme apresentado na Equação 2:

Equação 2. Cálculo de umidade residual.

$$Ur = \left(\frac{a-b}{b} \right) \quad f = \frac{a}{b}$$

Em que: Ur = Umidade residual em kg kg⁻¹. f = fator usado para correção da massa de solo, utilizado para a massa de solo seca nas determinações em laboratório

com a utilização de TFSA (Fator "f"). a = massa da amostra seca ao ar, em g. b = massa da amostra seca em estufa a 105 °C, em g.

Para a análise granulométrica, foram pesados 20 g de TFSA de cada amostra. Com auxílio de um funil de vidro, os solos foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL, utilizando para essa transferência 100 mL de água destilada. Onde foi adicionado à mistura 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹. Todos os frascos erlenmeyers foram colocados em mesa agitadora, submetidos à rotação de 50 rpm por 16 h.

Após o término rotacional, as amostras passaram por peneiras de malha 0,053 mm, as quais foram acopladas com o auxílio de funis, às provetas de 1000 mL. Todo o material retido foi lavado com água destilada, com cuidado para se evitar respingos, observando sempre o limite de volume das provetas. Após lavagem total do material retido nas peneiras, o volume de 1L em cada proveta, foi completado utilizando água destilada.

As areias retidas nas peneiras foram transferidas para béqueres previamente secos e com sua massa aferida, sendo submetidas à secagem em estufa por 24 h à 105 °C. Após secagem e resfriamento, foram determinadas as frações de areia grossa e areia fina, submetendo a areia total em uma nova peneira de 0,212 mm. A fração retida e pesada constitui fração de areia grossa. A areia fina, que passou pela peneira, também foi pesada, anotando-se o valor de sua massa.

Para a determinação de silte e argila foi utilizado o método da pipeta conforme Teixeira et al., (2017). Em uma proveta de 1000 mL foi preparada a prova controle, adicionando-se 10 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e completando o volume com água destilada. Com uma pipeta volumétrica, coletou-se 25 mL da solução e esta foi transferida para um béquer de 50 mL, previamente seco e tarado. A solução foi submetida à secagem em estufa por 24 h à 105 °C.

Após a secagem e resfriamento, foi novamente determinada a massa do béquer e anotado o resultado. Todas as soluções contidas nas provetas, inclusive a prova controle foram submetidas à aferição de temperatura da suspensão, utilizando um termômetro. Em seguida, todas as suspensões foram agitadas vigorosamente durante 1 min com bastões de vidro, coletando imediatamente 25 mL de cada solução sobrenadante. Da mesma forma, as soluções coletadas foram colocadas em béqueres

de 50 mL, previamente secos e com sua massa aferida, sendo colocados em estufa por 24 h à 105 °C. Após esse período, realizou-se o tempo de sedimentação da fração silte, conforme a temperatura registrada da solução e os intervalos indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Tempo de sedimentação calculado para a fração silte ($0,002 \text{ mm} < \varnothing < 0,05 \text{ mm}$) em função da temperatura da suspensão para a profundidade de 5 cm e para solos com densidade de partículas média de $2,65 \text{ kg dm}^{-3}$, em determinação efetuada ao nível do mar.

Temperatura (°C)	Tempo de sedimentação a 5 cm	
	Horas	Minutos
15	4	23
16	4	16
17	4	10
18	4	4
19	3	58
20	3	52
21	3	46
22	3	41
23	3	36
24	3	31
25	3	26
26	3	21
27	3	17
28	3	13
29	3	9
30	3	5

Fonte: Teixeira et al. (2017)

Passado o tempo de sedimentação da fração silte, foram retirados das soluções sobrenadantes, em triplicata, 25 mL de tal forma que não aprofundasse mais do que 5 cm na proveta. As alíquotas foram transferidas para béqueres limpos, previamente secos e pesados, e levadas à estufa de secagem à 105 °C durante 24 horas. Após resfriamento em dessecador, os béqueres foram pesados em balança com precisão de 0,0001 g. Todas as massas foram reservadas.

Os cálculos foram efetuados, conforme as seguintes relações (Equação 3-7):

Equação 3 - Equação do somatório da massa das frações

$$S_m = \left(\frac{m_{af} \cdot f}{m_i} \right) + \left(\frac{(m_{at} - m_{at}) \cdot f}{m_i} \right) + \left(\frac{(m_{sa} - m_{ar}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) + \left(\frac{(m_{ar} - m_{br}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right)$$

Fonte: Teixeira et al. (2017)

Em que: S_m = Somatório da massa das frações, em g. m_{af} = Massa de areia fina, em g. m_{at} = Massa de areia total, em g. m_{sa} = Massa de silte + argila, seca em estufa, em g. m_{ar} = Massa de argila, seca em estufa, em g. m_{br} = Massa do controle, seca em estufa, em g. m_i = Massa inicial da amostra, em g. R_v = Razão do volume pipetado para o volume total da proveta. f = fator de correção de umidade para a massa inicial.

Equação 4 - Equação de concentração de areia fina.

$$T_{af} = \left(\frac{m_{af} \cdot f}{m_i} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Fonte: Teixeira et al. (2017)

Em que: T_{af} = concentração de areia fina, em g kg⁻¹. m_i = massa inicial da amostra, em g. m_{af} = massa de areia fina, em g. f = fator de correção de umidade para a massa inicial. S_m = Somatório da massa das frações, em g.

Equação 5 - Equação da concentração de areia grossa.

$$T_{ag} = \left(\frac{(m_{at} - m_{af}) \cdot f}{m_i} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Fonte: Teixeira et al. (2017)

Em que: T_{ag} = concentração de areia grossa, em g kg⁻¹. m_i = massa inicial da amostra, em g. m_{at} = massa de areia total, em g. m_{af} = massa de areia fina, em g. f = fator de correção de umidade para a massa inicial. S_m = somatório da massa das frações, em g.

Equação 6 - Equação da concentração de silte.

$$T_s = \left(\frac{(m_{sa} - m_{ar}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Fonte: Teixeira et al. (2017)

Em que: T_s = concentração de silte, em $g\ kg^{-1}$. m_i = massa inicial da amostra, em g. m_{sa} = massa de silte + argila, seca em estufa, em g. m_{ar} = massa de argila, seca em estufa, em g. R_v = razão do volume pipetado para o volume total da proveta. f = fator de correção de umidade para a massa inicial. S_m = somatório da massa das frações, em g.

Equação 7 - Equação da concentração de argila.

$$T_{arg} = \left(\frac{(m_{ar} - m_{br}) \cdot f}{m_i \cdot R_v} \right) \cdot \left(\frac{1000}{S_m} \right)$$

Fonte: Teixeira et al. (2017)

Em que: T_{ar} = concentração de argila, em $g\ kg^{-1}$. m_i = massa inicial da amostra, em g. m_{ar} = massa de argila, seca em estufa, em g. m_{br} = massa do controle, seca em estufa, em g.

R_v = razão do volume pipetado para o volume total da proveta. f = fator de correção de umidade para a massa inicial. S_m = somatório da massa das frações, em g.

3.2.4. Capacidade de retenção de água (CRA)

Foram colocados 50 g de solo em copos de plástico perfurados, posicionados sobre um suporte com funil de vidro acoplado a uma bureta. Em seguida, adicionaram-se 50 mL de água destilada ao solo, mantendo o conjunto em repouso por 3 horas, conforme Casaroli e Van-Lier (2008). Após a drenagem de toda a água do solo, foi feita a leitura do volume coletado em cada uma das provetas e calculado a capacidade de vaso de cada solo, utilizando a seguinte fórmula:

Equação 8 – Determinação da capacidade de Vaso: -

$$CV = \frac{\text{Água retida no solo (mL)} \times 100\%}{\text{Volume do solo (mL)}}$$

Onde: CV = capacidade de Vaso , em % de volume de solo utilizado. Água retida no solo = volume de 50 mL - volume de água coletado na proveta (mL). Volume de solo no funil = 50 mL.

3.3. Montagem dos microcosmos para avaliação *in vitro* da interação de *Bacillus subtilis* com os agroquímicos

3.3.1. Preparo dos tratamentos com agroquímicos e inoculação bacteriana

Amostras dos agroquímicos Biozyme®, Comet®, Gamit® e Trichodermil® foram fornecidas por um agricultor local. Para a definição das doses aplicadas, considerou-se a dose máxima recomendada em bula para cada insumo. A partir dessas informações, foram realizados os cálculos de aplicação com base em um hectare (ha), considerando uma profundidade de solo de 20 cm, com posterior adequação do volume para 1 kg de solo por microcosmo.

O preparo do solo foi realizado em bandejas de polietileno previamente higienizadas, e os agroquímicos foram adicionados com o auxílio de micropipetas, garantindo precisão nas doses aplicadas.

Células frescas de *Bacillus subtilis* foram cultivadas em meio Ágar Yeast Manitol (YMA). As colônias bacterianas foram coletadas das placas de cultivo e ressuspensas em água estéril, obtendo-se uma suspensão com densidade aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹, considerando que uma absorbância a 600 nm corresponde a cerca de 1×10^9 UFC mL⁻¹.

Foram estabelecidos sete tratamentos nos ensaios de solo, tanto *in vitro* quanto em vasos (Tabela 3), contemplando as diferentes combinações e doses dos insumos (L ha⁻¹). As avaliações foram realizadas em dois períodos distintos: aos 7 dias, logo após a inoculação e a interação inicial com o ambiente, e aos 50 dias de incubação.

Em cada microcosmo foram inoculados 5 mL da suspensão bacteriana, com densidade celular inicial superior a 1×10^6 UFC de *B. subtilis*. Os tratamentos controle (solos não inoculados) receberam o mesmo volume de água estéril.

Os microcosmos foram incubados por 50 dias, em temperatura ambiente, na ausência de luz. Durante o período de incubação, foram realizados revolvimentos periódicos, em ambiente estéril, visando à homogeneização do solo e à adequada aeração do sistema.

Tabela 3. Relação dos tratamentos e os procedimentos de preparo.

Tratamentos	Massa de solo (g)	Doses dos insumos	<i>Bacillus subtilis</i>
Controle	1000	Água destilada, sem adição de insumos.	
Solo + <i>B. subtilis</i>	1000	Água destilada contendo <i>B. subtilis</i> .	
Comet® + <i>B. subtilis</i>	1000	Água destilada contendo <i>B. subtilis</i> e Comet®, na dose equivalente a 0,5 L ha ⁻¹ .	
Gamit® + <i>B. subtilis</i>	1000	Água destilada contendo <i>B. subtilis</i> e Gamit®, na dose equivalente a 3,5 L ha ⁻¹ .	
Tricodermil® + <i>B. subtilis</i>	1000	Água destilada contendo <i>B. subtilis</i> e Tricodermi®, na dose equivalente a 1,0 L ha ⁻¹ .	Superior a 10 ⁶ UFC mL ⁻¹
Biozyme® + <i>B. subtilis</i>	1000	Água destilada contendo <i>B. subtilis</i> e Biozyme®, na dose equivalente a 400 mL ha ⁻¹ .	
Mix de insumos + <i>B. subtilis</i>	1000	Água destilada contendo <i>B. subtilis</i> e mistura dos insumos (Comet® + Gamit® + Tricodermi® + Biozyme®), preparados individualmente conforme dose de bula e posteriormente combinados na calda final.	

Fonte: Autor.

Definidas as dosagens e sua forma de preparo, iniciou-se a montagem de cada tratamento com o preparo seguindo o modelo da tabela 3 bem como as diluições propostas. Conforme a figura a seguir.

3.3.2. Montagem e incubação dos microcosmos

Os microcosmos foram montados utilizando frascos de vidro estéreis, com tampa de fechamento hermético com capacidade de 3,5 L sendo adicionados 1,0 kg de solo com cada 1 dos agroquímicos em cada frasco (Figura 4).



Figura 4. Estrutura geral e montagem dos microcosmos em condições de laboratórios.

Fonte: Autor.

A umidade foi previamente ajustada para 60% da capacidade de campo, conforme Yu e Rinklebe (2011), através da adição de água destilada estéril. O solo utilizado foi revolvido com espátula previamente estrelizada para a homogeneização. Para cada tratamento foram mantidos microcosmos em quadruplicata, além de microcosmos sem a adição de agroquímicos (Controle) e dois frascos sem solo (brancos), totalizando 30 microcosmos que foram mantidos no escuro e em temperatura ambiente $\pm 25^{\circ}\text{C}$ (Figura 5).

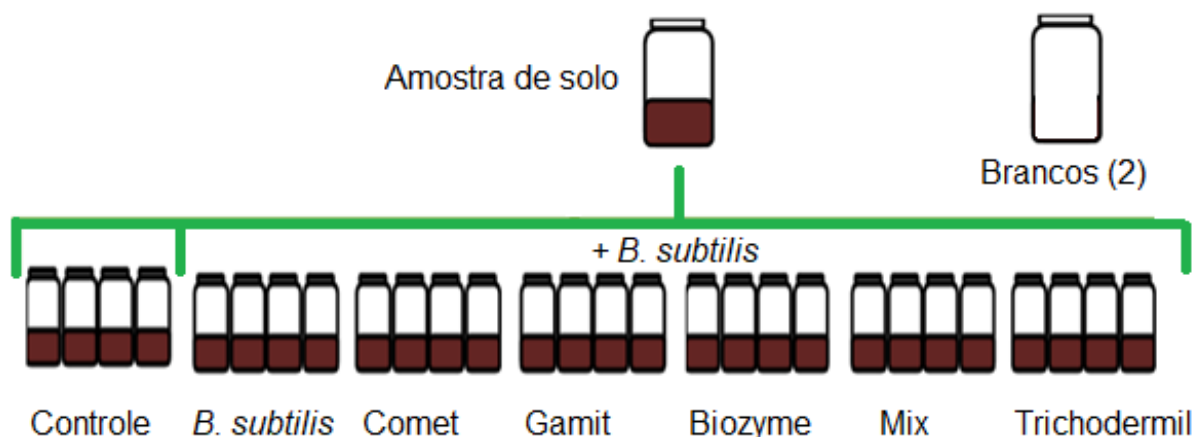


Figura 5. Design experimental proposto para análise de interação de agroquímicos e *B. subtilis*.

Fonte: O autor.

Durante a incubação dos microcosmos, foram realizadas coletas de amostras compostas para a análise dos parâmetros microbiológicos e bioquímicos aos 7 dias, e atividade respiratória determinadas realizadas diariamente durante os 50 dias. O termo "amostras compostas" refere-se à criação de uma amostra única a partir da combinação de subamostras coletadas de diferentes pontos dentro do mesmo microcosmo. Esse procedimento é importante para garantir que as análises reflitam de maneira mais precisa a heterogeneidade do solo, proporcionando uma visão representativa da população bacteriana e das características do ambiente nas condições experimentais.

Para a coleta, várias pequenas amostras foram retiradas de diferentes locais dentro de cada microcosmo. Essas subamostras foram então misturadas cuidadosamente para formar uma amostra composta para cada microcosmo. Assim, ao invés de analisar cada subamostra individualmente, a análise foi conduzida sobre essa amostra composta, permitindo a comparação entre os tratamentos (Spertus, 2021). Esse método também ajuda a reduzir erros potenciais que poderiam ocorrer ao analisar uma única amostra de um ponto específico, garantindo que todas as variações dentro do microcosmo sejam consideradas nas análises (Spertus, 2021).

3.4. Caracterização microbiológica dos solos

3.4.1. Atividade Respiratória

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos foi avaliada com base na liberação cumulativa de C-CO₂ (Alef, 1995). A liberação do CO₂ pode, indiretamente, indicar a potencial degradação de agroquímicos (Labud et al., 2007). Os microcosmos foram equipados com um sistema para a captação do CO₂ liberado, constituído de um recipiente plástico contendo 20 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹). Dois frascos sem solo, porém contendo recipiente com NaOH, foram utilizados como provas em branco (Taylor e Ball, 1994).

Os microcosmos foram mantidos hermeticamente fechados, sendo somente abertos periodicamente (a cada 24h) para a retirada dos recipientes contendo NaOH e o CO₂ capturado, bem como para a imediata substituição por novo recipiente contendo NaOH. Aos recipientes retirados foi adicionado 1 mL de solução de BaCl₂ (30%, m v⁻¹) e duas gotas de fenolftaleína 1%. Após, a quantidade residual de NaOH foi titulada com HCl (0,5 mol L⁻¹). Amostras de solo dos microcosmos foram utilizadas para determinação da massa seca de solo. A quantidade de CO₂ liberado foi determinada pela seguinte equação (Stotzky, 1965; Taylor e Ball, 1994; Colla et al., 2014) (Equação 9):

Equação 9 – Relação utilizada para determinação do dióxido de carbono liberado

$$C - CO^2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ solo seco)} = [(B - T) \times eq \times MHCl \times Fc] / Mc$$

Onde: B = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação da prova em branco; T = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação do tratamento (microcosmos); eq = equivalente-grama do carbono (igual a 6); MHCl = concentração molar da solução padronizada de HCl; Fc = fator de correção da molaridade de ácido/base (mol L⁻¹ HCl / mol L⁻¹ NaOH); Mc = massa de solo seco (em kg) no microcosmo.

Com isso a respiração foi avaliada diariamente e os resultados foram apresentados na forma de respiração acumulada.

3.4.2. Atividade hidrolítica microbiana do solo

O diacetato de fluoresceína (FDA) é um composto incolor utilizado para avaliar a atividade hidrolítica em solos. Este substrato é hidrolisado tanto por enzimas extracelulares quanto parietais, liberando como produto a fluoresceína que é mensurada em espectrofotômetro (Adam e Duncan, 2001).

Amostras de solo (2,0 g) foram utilizadas do 7º e 50º dia e transferidas para frascos Erlenmeyer (125 mL). Em seguida, foram adicionados 15 mL de tampão fosfato (60 mmol L⁻¹; pH 7,6) e 0,2 mL de solução de FDA (1000 µg mL⁻¹, preparada em acetona), em triplicata. Os frascos foram fechados, agitados manualmente e então incubados em agitador orbital (30 °C; 100 rpm) por 20 min. A reação foi finalizada com a adição de 15 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, v v⁻¹) e os frascos agitados vigorosamente. Após, o conteúdo foi alocado em tubos de centrífuga (50 mL) e centrifugados por 10 min a 7.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, filtrado utilizando papel filtro, e a absorbância do filtrado foi mensurada em espectrofotômetro a 490 nm. Foram realizados controles contendo solo e tampão, mas sem FDA. Estes controles foram utilizados como “zero” para a mensuração da absorbância. A quantidade de fluoresceína liberada (µg fluoresceína g⁻¹ solo seco) foi determinada através de curva padrão de fluoresceína (Adam e Duncan, 2001).

3.4.3. Contagem de microrganismos do solo: diluição e preparo das amostras para contagem de microrganismos

As contagens foram realizadas nas amostras do 7º e 50º dia após a adição dos agroquímicos em cada tipo de solo. Aproximadamente 5 gramas de cada frasco foram retiradas de forma asséptica, e incubados no meio: Agar Nutriente para contagem de bactérias totais e fungos totais. Para diluição das amostras foram adicionados 5,0 g de solo a um Erlenmeyer contendo 95 mL de uma solução de pirofosfato de sódio 0,1% (p/v). Após agitação por 30 minutos, em mesa agitadora a 1500 rpm, foram feitas diluições decimais em série, de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰.

Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas pelo método Pour plate para placas de Petri contendo meio de cultura. As placas foram

acondicionadas em saco plástico com o objetivo de evitar o ressecamento do meio de cultura.

3.4.4. Microrganismos totais

Para contagem do número total de microrganismos foi utilizado o meio de cultura Ágar Nutriente, as amostras foram incubadas em duas estufas BOD, com temperaturas a 28 ± 2 °C, em ausência de luz. As contagens foram feitas a cada 24 horas em um contador de colônias com 6x de aumento, até não se constatar nenhum aumento do número de colônias, conforme metodologia proposta por Olsen e Bakken (1987) e Sorheim et al. (1989).

3.4.5. Fungos totais

Foi utilizado o meio de Martin (1950), para contagem do número total de fungos constituído por 1.000 mL água, 10 g ágar, 1 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g peptona e 10 g dextrose. Foi ajustado o pH 5,5, acrescido de 70 mg mL^{-1} de rosa de bengala. O meio foi autoclavado por 15 min e acrescido com 0,1 g L^{-1} de uma mistura de antibiótico no momento da incubação. A incubação das culturas foi realizada a 38 ± 2 °C por três dias. As contagens foram feitas em contador de colônias com 6x de aumento.

3.4.6. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

Amostras de cada solo foram homogeneizadas. O ensaio começou com a diluição seriada em solução salina esterilizada (0,85% de NaCl). As diluições escolhidas foram 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , que foram semeadas por espalhamento em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (yeast extract, manitol, ágar) com vermelho Congo (Vincent, 1970). Após a semeadura, as placas foram incubadas invertidas a 28 ± 2 °C por um período de cinco a oito dias. Após a incubação, contou-se o número de colônias formadoras de unidade (UFC) em cada diluição e calculou-se a média das contagens. Em seguida, a média de UFC foi multiplicada pela diluição correspondente e pelo fator de correção de 10 (para converter a alíquota de 100 μL para 1 mL),

resultando na determinação do número de UFC por grama.

3.4.7. Carbono da Biomassa Microbiana

O carbono da biomassa microbiana foi determinado conforme as metodologias descritas por Ferreira et al. (1999) e Gogoi et al. (2021), realizando coletas aos 7 dias e ao final do experimento, aos 50 dias. O método da Irradiação-Extração consiste na utilização da energia eletromagnética (micro-ondas) para promover o rompimento celular, liberando os compostos intracelulares para posterior extração e quantificação do carbono. A determinação foi feita pela diferença entre as quantidades de carbono da amostra irradiada e outra que não sofreu esse tratamento, submetida aos mesmos procedimentos. A extração foi feita com sulfato de potássio 0,5 M e a quantificação foi realizada por titulação de uma alíquota do extrato que foi oxidada com excesso de dicromato de potássio 0,066 M em meio ácido e determinado esse excedente com sulfato ferroso amoniacal 0,03 M. O carbono de biomassa foi determinado pela equação do carbono da biomassa microbiana.

Equação 9 - Equação do carbono da biomassa microbiana.

$$c = \frac{(v_b - v_{am}) \cdot (\text{concentração sulfato ferroso}) \cdot 3 \cdot 1000 \cdot (\text{volume extrator})}{(\text{volume extrator}) \cdot (\text{peso do solo})}$$

Fonte: Teixeira et al. (2017)

Onde: V_b – média volumes gastos na titulação dos brancos; V_{am} – média dos volumes gastos na titulação das amostras; Concentração de sulfato ferroso – 0,03 M (mols) resultado da reação entre Cr_2O_7^- que reage com Fe^{2+} multiplicado pelo número de mol de Cr_2O_7^- que reage com monóxido de carbono, multiplicado pela massa atômica de C (12); 1000 fator de conversão de unidades; Volume extrator 40 mL 0,05 M; Volume extrato 10 mL.

3.4.8. Atividade da desidrogenase

Foi determinada a atividade da desidrogenase com coletas no início 7 dias e no final do experimento 50 dias. Foram pesados 3 g de solo seco (< 2 mm) em tubo de ensaio 18 x 180 mm, adicionado 0,03 g de carbonato de cálcio, 0,5 mL de cloreto de 2,3,5-tripheniltetrazolio (TTC) (Carbonell et al., 2000) e 1,3 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada, os tubos vedados com filme plástico PVC e colocados em banho maria a 37 °C por 24 horas. Após esse período a amostra foi diluída com metanol para a extração de todo o TFF (Trifenilformazan) transformado com até 30 mL de metanol filtrado em papel de filtro e a intensidade da cor vermelha foi medida em espectrofotômetro com absorbância de 485 nm.

A atividade enzimática desidrogenase foi determinada pela equação da atividade enzimática da desidrogenase, conforme Casida et al. (1964).

Equação 10 – Atividade enzimática da enzima desidrogenase.

$$At = \frac{v \cdot x \cdot d}{p}$$

Onde: v – volume da amostra; x – equação da curva padrão; d – diluição da enzima; p – peso seco da amostra.

3.5. Estudos em vasos com plantio de cana-de-açúcar

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente a Universidade Estadual de Minas Gerais, Unidade Frutal – MG, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo controle (Sem bactérias e insumos, seis tratamentos (apenas *B. subtilis* e insumos em isolado e em combinação (Mix), todos com quatro repetições. Foram utilizados vasos de 1 L contendo considerando cada vaso como unidade experimental (parcela).

Os vasos foram colocados em estufa em área nivelada sem vegetação arbórea próxima, evitando interferências da exposição dos vasos à radiação solar. Foram utilizados vasos, com furos, para drenagem e evitar a perda de solo.

O plantio nos vasos foi feito manualmente, utilizando gemas com idade fisiológica de 10 meses da variedade IACCTC072361. No experimento conduzido em vasos foram realizadas as mesmas análises físico-químicas aplicadas no experimento

em microcosmos, com exceção da atividade respiratória. Ao final do período experimental dias, procedeu-se às análises de biometria das plantas. Nas folhas foi avaliado perfil metabólico e à determinação dos teores de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn, por meio de espectrofotometria de absorção atômica, além da quantificação do nitrogênio total.

3.5.1. Biometria das mudas de cana-de-açúcar

3.5.1.1. Altura da planta

A altura (cm) foi determinada medindo-se da base da planta até a lígula da folha + 1 (sistema de numeração de Kuijper) utilizando régua graduada.

3.5.1.2. Comprimento e densidade das raízes

O tamanho das raízes foi determinado com auxílio de régua graduada. A determinação de densidade de raiz foi realizada visualmente através de estabelecimento de escala própria (Muito, Médio e Pouco denso).

3.5.1.3. Matéria fresca

Foi determinada a massa de matéria fresca da parte aérea e da raiz, desmembrando a planta em parte aérea (colmo, folhas verdes e folhas secas/palha) e raízes.

3.5.2. Determinação de macro e micronutrientes nas plantas

Foi utilizado o método Kjeldahl para determinação de nitrogênio total (Yasuhara e Nokihara, 2001). Utilizou-se 100 mg de amostra seca moída colocando-as em tubos de ensaio para biodigestão acrescentando 200 mg da mistura digestora e 3 mL de ácido sulfúrico. Para biodigestão colocou-se o material do tubo de ensaio em um bloco digestor por período de 1 hora à 350 °C, atingindo uma coloração clara, após a

digestão acrescentar 2 mL de água destilada. Após a digestão as amostras foram encaminhadas para o destilador de nitrogênio, iniciando o processo de destilação. Após a destilação a amostra foi titulada com HCL 0,05 N, até atingir o ponto de virada Rosa.

3.5.3. Espectrofotometria de absorção atômica

Para a análise de digestão utilizou-se aproximadamente 100 mg de matéria seca moída que foi colocada em tubo de ensaio para digestão, acrescentando 200 mg da mistura digestora e 3 mL de ácido sulfúrico. Colocou-se o tubo de ensaio com o material no bloco digestor (em capela) até atingir 350 °C para fazer a digestão por período de aproximadamente 1 hora ou até que a amostra atingisse uma coloração clara. Após a digestão deixou-se a amostra esfriar e adicionou-se de 2 a 3 mL de água destilada. Após a digestão completa, o extrato digerido foi transferido para balão de 50 mL onde o volume foi completado com água desmineralizada. Uma alíquota de cada amostra foi colocada em tubo de ensaio e posteriormente encaminhada para o Laboratório Central da FCAV/UNESP, Câmpus Jaboticabal, para determinação por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). Outra parte foi guardada como contraprova.

A determinação da concentração residual dos metais (Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn) nas folhas de cana-de-açúcar, foi realizada em espectrômetro de absorção atômica (EAA) modelo GBC 932 AA. A espectrofotometria de absorção atômica baseia-se no princípio em que átomos livres no estado fundamental podem absorver luz em um determinado comprimento de onda. A quantidade de radiação absorvida é proporcional à concentração de átomos que estão absorvendo e presentes na amostra (West e Crouch, 2005).

3.6. Perfil metabólico por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Para a obtenção dos extratos para análise, utilizou-se a metodologia descrita por Kim et al. (2010), com a obtenção de 50 mg de folhas secas submetidos à extração

com uma combinação de 0,75 mL de solução tampão de KH_2PO_4 em D_2O (pH 6,0), contendo 0,01% (m v⁻¹) do TSP-*d*4 e 0,75 mL de metanol-*d*4. Após a mistura dos solventes as amostras foram agitadas por 1 min em vortex. Em seguida, colocadas em banho de ultrassom por 20 min e centrifugadas a 17.000 rpm, obtendo-se 800 µL do sobrenadante que foram transferidos para tubos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN) ($\varnothing$ 5 mm). Assim o ensaio foi conduzido em espectrômetro de RMN (Avance Neo 600 MHz, Fällanden, Switzerland).

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos a 300 K com janela espectral de 12 ppm, número de pontos 64k, com pré-saturação do sinal de HDO, 128 promediações, tempos de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 2,6 s e 5 s, respectivamente. Todos os espectros foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos zgpg30 e calibrados pelo sinal do TSP-*d*4 em 0,00 ppm. As fases e linhas de base foram corrigidas automaticamente utilizando o programa Chenomx NMR Suite 9.0 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada).

Neste mesmo programa foram realizadas as identificações (putativas) dos compostos por comparação dos espectros obtidos com aqueles de substâncias puras que estavam no banco de dados. Além disso, utilizou-se a área do sinal do TSP-*d*4 como referência para a quantificação dos metabólitos.

3.7. Análise estatística e tratamento dos dados

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o software Microsoft Excel® 2013. O primeiro passo dessa análise consistiu no cálculo das médias e do erro padrão das repetições, proporcionando uma visão geral da tendência central dos dados. A análise de variância (ANOVA) foi então aplicada para verificar se existem diferenças significativas entre os tratamentos, utilizando o teste F. A ANOVA é uma ferramenta poderosa que avalia a influência de uma ou mais variáveis independentes sobre uma variável dependente, como a atividade de *B. subtilis* no solo. Após a ANOVA, o teste de Tukey foi empregado para realizar comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos, permitindo identificar quais grupos diferem significativamente (p-valor < 0,05).

Os dados foram coletados em diferentes momentos durante a incubação dos microcosmos, como no 7º e 50º dia, em que a coleta de amostras compostas a partir de subamostras do solo garantiu que as análises fossem representativas e minimizassem a variabilidade espacial.

A metodologia de Análise de Componentes Principais (PCA) foi empregada como uma ferramenta estatística fundamental para a redução de dimensionalidade dos dados e a identificação de padrões subjacentes. Inicialmente, os dados coletados foram normalizados para garantir que todas as variáveis contribuíssem igualmente para a análise, evitando assim que variáveis com escalas amplamente diferentes influenciassem indevidamente os resultados. Em seguida, foi calculada a matriz de covariância, da qual extraiu-se os autovalores e autovetores, permitindo a identificação das combinações lineares das variáveis originais que explicam a maior parte da variabilidade dos dados. Os principais componentes foram selecionados com base na proporção da variância explicada, garantindo a retenção de componentes que capturassem a essência dos dados. Por fim, as projeções dos dados originais nos novos eixos definidores dos principais componentes foram visualizadas em gráficos de dispersão, facilitando a interpretação e a análise comparativa dos diferentes fatores, tratamentos e parâmetros utilizados neste estudo.

A fertilidade do solo franco-argilo-siltoso é importante para a produção de cana-de-açúcar, demandando um enfoque na adubação equilibrada de macro e micronutrientes (Oliveira et al., 2017). Para solos com boa capacidade de troca catiônica (CTC) e adequada retenção de água, torna-se essencial a adição balanceada de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), bem como a realização de correções para micronutrientes, como zinco (Zn), boro (B), ferro (Fe) e cobre (Cu), além da incorporação de matéria orgânica (Oliveira et al., 2017).

4.2. Interações dos agroquímicos com o solo em microcosmos

A análise das interações entre os agroquímicos e o solo em condições controladas de microcosmos (*in vitro*) possibilitou compreender os efeitos imediatos dos diferentes tratamentos sobre as propriedades físico-químicas e biológicas do solo. Os resultados indicam que o tempo de avaliação exerceu forte influência negativa significativa sobre as variáveis microbiológicas, enquanto os insumos promoveram respostas diferenciadas, em relação a atividade enzimática e aos grupos microbianos, com efeitos dependentes do período de avaliação para várias variáveis.

Na Tabela abaixo, são apresentadas as relações entre as variáveis analisadas e os tratamentos aplicados, evidenciando as alterações decorrentes da associação de *B. subtilis* com os diferentes insumos agrícolas (Tabela 5).

Tabela 5. Relação entre as variáveis físico-químicas do solo e os tratamentos para o microcosmos.

Semana	Fatores							
	pH	U%	Desi.	CB	AH	BT	FT	BN
1 ^a	6,10	40,24a	81,65a	57,15	1,07a	18,8x10 ³ a	249,28a	97,21x10 ³ a
7 ^a	6,02	37,88b	62,95b	46,22	0,65b	2,7 x10 ³ b	48,46b	1,31x10 ³ b
Insumos								
Solo	6,19	37,41c	62,89cd	52,10	0,51d	30,0x10 ³ a	179,75ab	54,65x10 ³ a
Bs	5,96	39,79b	84,32ab	50,53	0,70cd	8,7x10 ³ b	106,37c	49,66x10 ³ ab
C+Bs	5,93	36,81c	97,76a	53,12	1,05ab	3,8x10 ³ b	168,12b	51,68x10 ³ a
G+Bs	6,09	39,31b	78,53b	42,91	0,89bc	8,2x10 ³ b	116,12c	50,65x10 ³ a
T+Bs	6,23	42,10a	55,89d	37,97	0,78bcd	7,4x10 ³ b	179,75ab	51,11x10 ³ a
B+Bs	6,12	40,19b	56,06d	59,72	0,90bc	4,9x10 ³ b	70,75c	34,54x10 ³ b
M+Bs	5,91	37,41c	70,63bc	65,46	1,22 a	12,2x10 ³ b	221,25 ^a	52,52x10 ³ a
Causas de Variação								
F(semana)	1,03 ^{ns}	114,82 ^{**}	61,76 ^{**}	1,76 ^{ns}	76,53 ^{**}	34,42 ^{**}	581,60 ^{**}	1234,37 ^{**}
F(insumos)	1,73 ^{ns}	40,34 ^{**}	24,49 ^{**}	0,73 ^{ns}	13,09 ^{**}	6,07 ^{**}	22,66 ^{**}	3,42 ^{**}
F insumos X semana	1,81 ^{ns}	0,96 ^{ns}	5,68 ^{**}	0,30 ^{ns}	5,28 ^{**}	6,81 ^{**}	21,92 ^{**}	3,44 ^{**}
CV (%)	4,54	2,10	12,31	59,66	20,67	54,88	20,92	20,73

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); Bs (Solo + *B. subtilis*); C+Bs: (Comet® + *B. subtilis*); G+Bs: (Gamit® + *B. subtilis*); T+Bs (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+Bs: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+Bs: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Médias seguidas de mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F. CV (%) = Coeficiente de variação.

Fonte: Autor.

A avaliação do efeito do tempo sobre as populações microbianas também revelou padrões relevantes. Na análise realizada aos 7 dias, observou-se um aumento simultâneo das populações de fungos, bactérias totais e bactérias fixadoras de nitrogênio, indicando um período de crescimento microbiano acelerado. Esse efeito já foi documentado como resposta inicial de microrganismos à aplicação de agroquímicos, conforme relatado por Hellequin et al. (2020). Segundo Martins et al., (2025), a microbiota pode mineralizar temporariamente agroquímicos, como herbicidas, utilizando-os como fonte de energia, o que resulta em aumento populacional. No entanto, tais incrementos iniciais tendem a ser seguidos de redução ao longo do tempo, comportamento também descrito por Huang et al. (2021) para o gênero *Bacillus* em rizomas de cana-de-açúcar. O que foi também observado neste estudo para *B. subtilis* para os parâmetros avaliados FT e BT considerando o fator tempo.

Ao compararmos os tratamentos utilizados, observou-se que, para o parâmetro de umidade (U%), o tratamento Bs apresentou valores superiores ao controle. No entanto, o maior valor geral de umidade foi registrado no tratamento T+B_s. Quanto à atividade de desidrogenase (Desi.), os tratamentos C+B_s e Bs apresentaram os maiores valores. Em relação à atividade hidrolítica, os tratamentos Mix+B_s e C+B_s, apresentaram os maiores valores.

Para a contagem de bactérias totais, o tratamento Solo apresentou o maior valor, enquanto os demais não diferiram estatisticamente entre si. Em relação aos fungos totais, os maiores valores foram observados nos tratamentos M+B_s, T+B_s e Solo. Quanto às bactérias fixadoras de nitrogênio, os maiores valores foram nos tratamentos Solo, C+B_s, G+B_s, T+B_s e M+B_s, enquanto o tratamento Bs não diferiu estatisticamente do B+B_s.

A análise da umidade do solo (U%) evidenciou diferenças significativas entre os tratamentos avaliados. O tratamento T+B_s apresentou os maiores valores de umidade (42,10%), seguido pelo tratamento B+B_s (40,19%). Em contraste, os menores valores de umidade foram observados nos tratamentos C+B_s e M+B_s, sugerindo que determinados insumos químicos podem interferir na dinâmica hídrica do solo, possivelmente por alterações na atividade microbiana ou nas propriedades físicas relacionadas à retenção de água. Comparando o tratamento controle com o tratamento Bs, observou-se incremento de 37,41% para 39,79%, o que pode estar associado à inoculação com *B. subtilis*. Esse resultado pode indicar alterações na atividade biológica do solo, possivelmente relacionadas à produção de metabólitos microbianos e à modificação da estrutura dos agregados do solo, fatores que podem influenciar a dinâmica hídrica do sistema.

As oscilações na umidade do solo também podem estar associadas à atividade microbiana. Solos com maior biomassa microbiana tendem a apresentar melhores condições hídricas, como observado em estudos com outros organismos, nos quais *Trichoderma harzianum* libera substâncias que contribuem para a retenção de água no solo (Eastburn e Butler, 1991). Esse aumento na umidade é fundamental para o desempenho da cultura da cana-de-açúcar, já que a disponibilidade adequada de água favorece processos como germinação, crescimento inicial e absorção de nutrientes.

A maior umidade registrada no tratamento T+Bs reforça que consórcios microbianos são capazes de melhorar a estrutura física do solo e aumentar sua capacidade de retenção hídrica. Estudos demonstram que *B. subtilis* forma biofilmes ricos em substâncias exopoliméricas, tornando o solo mais hidrofílico e reduzindo sua repelência à água, efeito evidente principalmente em solos de textura arenosa (Prabhukhot et al., 2023; Gutierrez et al., 2022).

Em contraposição, os tratamentos C+Bs e M+Bs apresentaram valores inferiores de umidade. Esses resultados indicam que a combinação de *B. subtilis* com alguns produtos químicos pode reduzir a eficiência da bactéria na manutenção da água no solo. Como consequência, a umidade reduzida pode favorecer condições de estresse hídrico, que podem prejudicar processos fisiológicos essenciais, como fotossíntese, absorção de nutrientes e crescimento das plantas, conforme demonstrado por Song et al. (2012). Assim, fica evidente que a interação entre bioinsumos e agroquímicos deve ser cuidadosamente avaliada para evitar a perda de benefícios microbianos importantes.

Em nossos resultados, ao comparar o tratamento controle ($62,89 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ de solo h^{-1}) com o tratamento inoculado apenas com *B. subtilis* ($84,32 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ de solo h^{-1}), observou-se que a inoculação da bactéria isoladamente promoveu um aumento na atividade de desidrogenase. O maior valor foi registrado no tratamento C+Bs ($97,7 \mu\text{g TPF g}^{-1}$ de solo h^{-1}), indicando elevada capacidade das comunidades microbianas em desempenhar funções metabólicas associadas à qualidade biológica, fertilidade do solo e crescimento vegetal.

Contudo, esses achados não corroboram os resultados relatados por Han et al. (2025), que observaram a redução da atividade de desidrogenase após a aplicação de piraclostrobina, embora tenham se baseado em solos diferentes dos utilizados neste estudo. Assim, esta divergência pode estar relacionada às diferenças no tipo de solo, nas doses aplicadas ou na interação específica entre o fungicida e a microbiota presente. A inoculação com *B. subtilis* mostrou-se particularmente eficiente em estimular a atividade microbiana, favorecendo a saúde e a fertilidade do solo, como também relatado por Yadav et al. (2021). A desidrogenase, por refletir a intensidade da oxidação da matéria orgânica, indica maior eficiência nos processos de

mineralização e consequentemente maior disponibilidade de nutrientes às plantas (Attademo et al., 2021).

Além disso, a variável desidrogenase apresentou interação significativa entre tratamentos e semanas, evidenciando que a atividade respiratória microbiana responde de maneira diferenciada ao manejo aplicado e à evolução temporal do sistema (tabela 6).

Tabela 6. Interação de fatores para a atividade da desidrogenase.

Sem.	Tratamentos							F (5%)
	Solo	Bs	C+Bs	G+Bs	T+Bs	B+Bs	M+Bs	
1 ^a	71,07CDa	87,96BC	122,17Aa	91,00Ba	65,42Da	60,57D	73,35BCD	22,35**
7 ^a	54,71BCDb	80,69A	73,36ABb	66,06ABCb	46,35Db	51,55CD	67,90ABC	7,82**
F (5%)	6,75*	1,33ns	60,09**	15,68**	9,17**	2,05ns	0,75ns	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); Bs (Solo + *B. subtilis*); C+Bs: (Comet® + *B. subtilis*); G+Bs: (Gamit® + *B. subtilis*); T+Bs (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+Bs: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+Bs: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F.

A atividade das desidrogenases é um dos indicadores mais sensíveis da atividade microbiana no solo, pois reflete diretamente processos metabólicos relacionados à decomposição da matéria orgânica e à ciclagem de nutrientes. Essas enzimas participam de reações de oxirredução essenciais para o metabolismo microbiano, atuando na transferência de elétrons para aceptores como oxigênio ou nitrato (Bandyopadhyay e Maiti, 2021).

Na 1^a semana, observaram-se valores mais elevados em alguns tratamentos, destacando-se C+Bs, que apresentou a maior atividade (122,17Aa), diferindo estatisticamente de todos os demais. Esse resultado indica forte estímulo inicial à atividade oxidativa microbiana, possivelmente devido à rápida disponibilização de substratos orgânicos facilmente decomponíveis. Outro tratamento com resposta elevada foi G+Bs (91,00Ba), enquanto Bs, M+Bs, Solo e T+Bs apresentaram valores intermediários. O menor valor inicial foi registrado para B+Bs (60,57D), sugerindo que, nesse caso, a combinação utilizada não exerceu estímulo imediato sobre a comunidade microbiana.

Na 7ª semana, verificou-se um comportamento distinto, com redução geral da atividade enzimática na maioria dos tratamentos, embora alguns tenham mantido valores relativamente altos. O tratamento C+Bs permaneceu entre os maiores (73,36ABb), indicando efeito mais duradouro ao longo do tempo. Em contrapartida, tratamentos como T+Bs (46,35Db) e B+Bs (51,55CD) exibiram quedas acentuadas, reforçando que o estímulo inicial associado a esses tratamentos é transitório. O tratamento Solo também apresentou declínio claro (71,07CDa para 54,71BCDb), o que é consistente com a diminuição natural da atividade enzimática à medida que os microrganismos consomem os substratos lábeis presentes no início do experimento.

Os valores da análise de variância confirmam essa dinâmica temporal: o F geral para semanas (22,35** na 1ª semana e 7,82** na 7ª semana) indica diferenças significativas ao longo do tempo. Além disso, vários tratamentos apresentaram contrastes marcantes entre as semanas, destacando-se C+Bs (60,09), G+Bs (15,68), e T+Bs (9,17), todos com elevada significância estatística. Esses resultados mostram que tais tratamentos sofrem oscilações expressivas na atividade da desidrogenase, reforçando seu caráter sensível às mudanças na disponibilidade de carbono e aos ciclos metabólicos microbianos.

No tratamento C+Bs, a manutenção de altos níveis de atividade enzimática sugere intensa atividade respiratória da microbiota. Esse comportamento pode ser explicado, em parte, pela capacidade de *B. subtilis* de secretar compostos bioativos que estimulam o crescimento microbiano (Qiao et al., 2024). Além disso, a piraclostrobina pode ter promovido a morte de microrganismos sensíveis, liberando substratos orgânicos que servem de recurso adicional para microrganismos tolerantes (Feng et al., 2020), contribuindo para a elevação da atividade enzimática observada.

Nos tratamentos B+Bs e T+Bs, a atividade da desidrogenase foi reduzida. O Biozyme®, um fertilizante líquido rico em macro e micronutrientes, pode gerar efeitos tóxicos em microrganismos, inibindo processos metabólicos essenciais (UPL, 2025). O Tricodermil®, contendo *Trichoderma harzianum*, pode liberar compostos que inibem outros microrganismos para favorecer seu próprio crescimento, o que também pode explicar a redução observada na atividade enzimática (Qiao et al., 2024).

Os dados de CB não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Esse comportamento pode estar associado às limitações impostas pelo

sistema de microcosmos, que reduz a complexidade das interações ecológicas e restringe a ciclagem natural de nutrientes (Wilkerson e Olapade, 2020).

A análise da atividade de fluoresceína, indicador amplamente utilizado para avaliar a atividade hidrolítica do solo, mostrou que os tratamentos M+Bs e C+Bs apresentaram os maiores valores, alcançando 1,22 e 1,05 $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} , respectivamente. Esses resultados refletem elevado potencial de mobilização de nutrientes, especialmente fósforo, elemento essencial para o desenvolvimento da cana-de-açúcar (Adesemoye e Kloepper, 2009). Resultados semelhantes foram descritos por Zhang et al. (2019), que também observaram aumento da atividade hidrolítica em tratamentos contendo Comet®.

O tratamento M+Bs destacou-se como o mais eficiente na promoção da atividade hidrolítica, sugerindo que a combinação de múltiplos insumos intensifica a decomposição da matéria orgânica e a liberação de nutrientes. Essa interpretação está alinhada a estudos que demonstram que misturas de insumos orgânicos e microbianos favorecem um ambiente mais propício à proliferação microbiana, aumentando a atividade enzimática do solo (Sánchez-Monedero et al., 2008; Berg et al., 2019; Wilkerson e Olapade, 2020). Tal comportamento reforça a hipótese de que interações sinérgicas entre diferentes inoculantes ampliam os efeitos benéficos sobre a fertilidade biológica e a funcionalidade do solo (Han et al., 2007; Ahmed et al., 2023).

Além disso, a elevada atividade hidrolítica no tratamento M+Bs sugere maior eficiência na decomposição da matéria orgânica e consequente aumento na disponibilidade de nutrientes, corroborando outros trabalhos que destacam o papel de inoculantes microbianos na promoção da atividade enzimática (Avis et al., 2008; Huang et al., 2021; Wilkerson e Olapade, 2020). Estudos recentes apontam ainda que espécies de *Bacillus* são capazes de estimular atividade hidrolítica por meio da secreção de enzimas extracelulares e do aumento da atividade microbiana associada à rizosfera (Alves et al., 2023; Daunoras et al., 2024), o que contribui para explicar os valores superiores observados quando *B. subtilis* é utilizado em combinação com outros insumos.

No tratamento C+Bs, que contém piraclostrobina, observou-se o segundo maior valor de atividade hidrolítica. A piraclostrobina apresenta persistência moderada a alta no solo, com meias-vidas de $\text{DT}_{50} \approx 60$ dias e $\text{DT}_{90} \approx 282$ dias, permanecendo

biodisponível e potencialmente capaz de influenciar a atividade metabólica microbiana e a estrutura da comunidade (Fulcher et al., 2014; Feng et al., 2020). Seu elevado coeficiente de sorção, responsável pela forte ligação às partículas do solo, também pode modular sua disponibilidade e interações biológicas conforme as condições de umidade (Cusaac et al., 2017). Esses fatores ajudam a explicar o aumento da atividade hidrolítica observado no tratamento C+Bs.

A atividade hidrolítica apresentou interação significativa entre tratamentos e semanas, refletindo mudanças expressivas na dinâmica microbiana e na disponibilidade de substratos ao longo do tempo (Tabela 7).

Tabela 7. Interação de fatores para a atividade da hidrolítica.

Semanas	Tratamentos							F (5%)
	Solo	Bs	C+Bs	G+Bs	T+Bs	B+Bs	M+Bs	
1 ^a	0,76Ca	0,92BCa	1,16B	1,11BCa	0,85BC	1,02BC	1,72Aa	12,46**
7 ^a	0,27Cb	0,48BCb	0,94A	0,67ABb	0,72AB	0,78AB	0,72ABb	5,91**
F (5%)	14,54**	12,33**	2,75 ^{ns}	11,80**	0,94 ^{ns}	3,48 ^{ns}	62,36**	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); Bs (Solo + *B. subtilis*); C+Bs: (Comet® + *B. subtilis*); G+Bs: (Gamit® + *B. subtilis*); T+Bs (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+Bs: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+Bs: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F.

Na 1^a semana, observaram-se valores relativamente elevados na maioria dos tratamentos, com destaque para M+Bs, que apresentou a maior atividade hidrolítica (1,72Aa), indicando forte estímulo inicial à degradação de compostos orgânicos. Tratamentos como C+Bs (1,16B) e G+Bs (1,11BCa) também exibiram respostas consideráveis, sugerindo rápida liberação de carbono lábil e intensa mobilização enzimática no início do experimento. Por outro lado, tratamentos como T+Bs (0,85BC) e solo (0,76Ca) apresentaram valores mais baixos, refletindo menor estímulo inicial à atividade enzimática.

Na 7^a semana, houve queda generalizada da atividade hidrolítica em todos os tratamentos, um padrão típico de sistemas em que os microrganismos já consumiram a maior parte dos substratos facilmente disponíveis. Os valores reduziram-se para níveis entre 0,27 e 0,94, com as maiores atividades registradas para C+Bs (0,94Aa) e

M+Bs (0,72ABb), ainda que ambos apresentem redução significativa em comparação à semana inicial. Essa persistência relativa indica que esses tratamentos mantêm algum nível de liberação de compostos orgânicos ou sustentam comunidades microbianas capazes de manter atividade hidrolítica mesmo após a fase inicial de adaptação.

O tratamento Bs, que apresentou 0,92BCa na 1ª semana, sofreu queda pronunciada para 0,48BCb, refletindo perda de estímulo enzimático ao longo do tempo. Um comportamento semelhante foi observado em G+Bs (1,11BCa para 0,67ABb) e B+Bs (1,02BC para 0,78AB), confirmando o padrão de estabilização ou declínio da atividade hidrolítica à medida que o sistema progride para uma fase de menor disponibilidade de substratos.

Os valores de F reforçam a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as semanas e entre os tratamentos dentro de cada semana. Destacam-se especialmente M+Bs ($F = 62,36$), que apresentou o maior contraste temporal, seguido por Bs (12,33), Solo (14,54) e G+Bs (11,80) indicando que os tratamentos respondem de maneiras distintas ao longo do tempo. O F geral entre semanas (12,46 na 1ª e 5,91* na 7ª) confirma que o fator temporal exerce forte influência na atividade hidrolítica.

Por fim, não foram encontrados estudos que avaliem especificamente a interação entre *B. subtilis* e piraclostrobina na cultura da cana-de-açúcar com enfoque nos atributos biológicos testados neste trabalho, o que reforça a originalidade e a relevância dos resultados obtidos. Estes achados indicam que a associação entre inoculantes microbianos e insumos agrícolas é capaz de potencializar a atividade hidrolítica do solo, favorecendo a decomposição da matéria orgânica, a mobilização de nutrientes e a dinamização da microbiota.

A análise das populações de bactérias totais (BT), fungos totais (FT) e bactérias fixadoras de nitrogênio (BN) revelou diferenças significativas entre os tratamentos, reforçando a hipótese de que insumos específicos podem criar um ambiente favorável para microrganismos benéficos (Huang et al., 2021; Niu et al., 2021). A relevância de *Bacillus subtilis* é destacada por sua capacidade de produzir compostos bioativos, como lipopeptídeos, que atuam não apenas como agentes de biocontrole contra

patógenos, mas também como promotores de condições propícias para o crescimento de microrganismos benéficos (Cawoy et al., 2011).

Apesar dos efeitos positivos observados na umidade e na atividade microbiana do solo, verificou-se uma redução no número total de bactérias (BT), que passou de 30×10^3 no tratamento solo para $8,7 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ no tratamento Bs. O mesmo padrão foi observado para os fungos totais (FT), que diminuíram de 179,75 para 106,37 UFC mL⁻¹, e para as bactérias fixadoras de nitrogênio (BN), que passaram de $54,65 \times 10^3$ para $49,66 \times 10^3$ UFC mL⁻¹.

Esse comportamento pode ser interpretado como resultado de um processo de seleção ecológica, no qual a introdução de microrganismos exógenos promove competição, reorganização e ajuste das comunidades microbianas já estabelecidas no solo, conforme discutido por Gadhav et al. (2018). Além disso, essa seletividade reflete a capacidade competitiva e colonizadora de *B. subtilis*, capaz de modificar microambientes do solo e influenciar a disponibilidade de nutrientes (Xu et al., 2022; Gu et al., 2021; Blake et al., 2020; Vasques et al., 2024). Dessa forma, mesmo com a redução de algumas populações microbianas, a introdução de *B. subtilis* pode favorecer o estabelecimento de comunidades mais eficientes e funcionais, beneficiando o desenvolvimento da cana-de-açúcar.

Por fim, a redução observada no tratamento Biozyme® + *B. subtilis* (B+B_s) na população de bactérias fixadoras de nitrogênio (BN) sugere efeitos inibitórios específicos desse insumo, possivelmente relacionados a fatores como toxicidade, pH ou interferências químicas, que merecem investigação adicional.

A aparente estabilidade do pH e do carbono da biomassa indica que as condições do solo permaneceram adequadas e equilibradas para a maioria dos microrganismos presentes. Isso sugere que, mesmo com a aplicação de agroquímicos, os parâmetros químicos do solo não foram afetados de forma significativa, permitindo que a atividade microbiana fosse estimulada sem comprometer a estabilidade química um aspecto considerado desejável em sistemas agrícolas sustentáveis (Pandey e Saharan, 2025).

Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significativas no pH entre os tratamentos, o fato de o Biozyme® apresentar pH próximo de 4 pode ter exercido influência local sobre a microbiota. Essa acidez pode ter contribuído para os

menores valores de Desi., bactérias totais (BT), fungos totais (FT) e bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) no tratamento B+B_s. Assim, mesmo sem alterar o pH geral do solo, o insumo pode ter afetado a atividade metabólica e a capacidade de colonização dos microrganismos, reforçando a importância de considerar o pH dos produtos utilizados na aplicação de inoculantes microbianos (Oliveira et al., 2025; Gauvry et al., 2021).

Outro fator importante verificado foi a variação temporal do fator BT que apresentou interação significativa entre tratamentos e semanas, indicando que sua resposta depende simultaneamente do manejo aplicado e da evolução temporal do sistema (tabela 8).

Tabela 8. Interação de fatores para bactérias totais.

Semana s	Tratamento							F (5%)
	Solo	Bs	C+B _s	G+B _s	T+B _s	B+B _s	M+B _s	
1 ^a	58,5x10 ³ A	15,0x10 ³	6,0x10 ³	14,5x10 ³	10,2x10 ³	6,0x10 ³	21,5x10 ³ B	12,82*
	a	B	B	B	B	B	a	*
7 ^a	1,6x10 ³ b	2,5x10 ³	1,7x10 ³	2,0x10 ³	4,6x10 ³	3,8x10 ³	3,0x10 ³ b	0,05 ^{ns}
F (5%)	61,75**	2,97 ^{ns}	0,35 ^{ns}	2,97 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,09 ^{ns}	6,53*	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) μmol p-NP g⁻¹ de solo h⁻¹; BT (bactérias totais) UFC mL⁻¹; FT (fungos totais) UFC mL⁻¹; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); B_s (Solo + *B. subtilis*); C+B_s: (Comet® + *B. subtilis*); G+B_s: (Gamit® + *B. subtilis*); T+B_s (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+B_s: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+B_s: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F.

Observa-se que na 1^a semana houve diferenças expressivas entre os tratamentos, com M+B_s exibindo o maior valor ($21,5 \times 10^3$), sugerindo forte estímulo inicial à atividade microbiana associada a essa variável, possivelmente devido à disponibilidade elevada de compostos lábeis ou à rápida colonização microbiana proporcionada por esse manejo.

O tratamento G+B_s também apresentou resposta elevada ($14,5 \times 10^3$), enquanto o controle Solo registrou $58,5 \times 10^3$, valor estatisticamente superior aos demais, indicando alta atividade microbiana intrínseca do solo antes da estabilização dos efeitos dos tratamentos. Por outro lado, tratamentos como C+B_s ($6,0 \times 10^3$ DB) e B+B_s ($6,0 \times 10^3$ DB) apresentaram os menores valores na semana inicial,

demonstrando que, para esses manejos, o estímulo microbiano não se manifestou imediatamente. Os valores de F para a 1ª semana ($p < 0,01$) confirmam diferenças significativas entre tratamentos no momento inicial.

Na 7ª semana, observa-se uma tendência de redução em praticamente todos os tratamentos, indicando estabilização do sistema e possível diminuição da disponibilidade de carbono facilmente degradável. O controle Solo reduziu-se a $1,6 \times 10^3$, e tratamentos como B+Bs ($3,8 \times 10^3$), C+Bs ($1,7 \times 10^3$) e G+Bs ($2,0 \times 10^3$) mantiveram valores baixos e estatisticamente semelhantes. A queda acentuada ao longo do tempo sugere esgotamento de recursos energéticos iniciais e diminuição da taxa respiratória microbiana.

O tratamento M+Bs, embora também tenha apresentado redução (de $21,5 \times 10^3$ para $3,0 \times 10^3$), mostrou diferença significativa entre as semanas ($F = 6,53^*$), indicando um forte efeito temporal específico desse manejo. Em contraste, vários tratamentos não apresentaram diferença significativa ao longo do tempo (Bs, C+Bs, G+Bs, T+Bs, B+Bs), revelando que sua atividade inicial já era baixa e permaneceu estável. O valor de F geral para semanas (0,03) mostra que, quando todas as comparações são consideradas, a diferença média entre semanas não é significativa. Entretanto, o valor elevado de F na comparação entre tratamentos da 1ª semana (61,75; $p < 0,01$) destaca um forte efeito de manejo na fase inicial.

Já a variável FT apresentou interação altamente significativa entre tratamentos e semanas, evidenciando respostas microbianas intensas e contrastantes ao longo do tempo (tabela 9).

Tabela 9. Interação de fatores para fungos totais.

Semanas	Tratamento							F (5%)
	Solo	Bs	C+Bs	G+Bs	T+Bs	B+Bs	M+Bs	
1ª	307,5Ba	150,0CDa	290,0Ba	192,50Ca	315,00Ba	100Da	390,0Aa	44,32**
7ª	52,0b	62,75b	46,25b	39,75b	44,50b	41,5b	52,5b	0,26 ^{ns}
F (5%)	134,49**	15,68**	122,40**	48,07**	150,74**	7,05**	234,67**	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); Bs (Solo + *B. subtilis*); C+Bs: (Comet® + *B. subtilis*); G+Bs: (Gamit® + *B. subtilis*); T+Bs (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+Bs: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+Bs: (Mix de insumos + *B. subtilis*). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F.

Na 1ª semana, observaram-se valores expressivamente elevados, indicando um forte pulso inicial de atividade associada à função analisada. O tratamento M+Bs apresentou o maior valor (390,00), seguido de T+Bs (315,0) e C+Bs (290,0), compondo um grupo de tratamentos que promoveram estimulação microbiana intensa logo no início do experimento. Essa magnitude sugere elevada disponibilidade de substratos lábeis e rápida ativação metabólica dos microrganismos.

Em contraste, o tratamento Bs apresentou o menor valor (150,0), demonstrando que a aplicação isolada do bioinsumo não foi suficiente para gerar resposta inicial comparável aos tratamentos combinados. O controle Solo apresentou valor intermediário, mas ainda assim elevado (307,5), indicando atividade microbiana intrínseca robusta antes da estabilização dos efeitos dos tratamentos. Os valores de F para a primeira semana (44,32, $p < 0,01$) confirmam diferenças expressivas entre os manejos nesse momento inicial.

Na 7ª semana, ocorreu um declínio acentuado em todos os tratamentos, um padrão típico de sistemas onde o carbono facilmente degradável é consumido rapidamente, levando à estabilização metabólica e retração da atividade microbiana. Os valores reduziram-se para faixas entre 39,75 e 62,75, indicando perda substancial da intensidade inicial. O tratamento Bs apresentou o maior valor na sétima semana (62,75), sugerindo que, apesar de sua resposta inicial modesta, o bioinsumo isolado pode promover estímulos persistentes ou uma estabilização diferenciada da comunidade microbiana.

Tratamentos como C+Bs (46,25), B+Bs (41,5), G+Bs (39,75) e M+Bs (52,5) apresentaram valores significativamente inferiores aos observados na 1ª semana, comprovando forte impacto temporal. Essa redução expressiva é coerente com a dinâmica de mineralização de compostos orgânicos, na qual ocorre forte atividade inicial seguida de declínio à medida que os microrganismos entram em fase de menor disponibilidade de energia.

Os valores de F entre semanas para cada tratamento reforçam a magnitude desta resposta temporal. Especialmente elevados foram M+Bs (234,67), C+Bs (122,40), T+Bs (150,74), e solo (134,49), demonstrando que esses tratamentos sofreram as maiores oscilações entre as semanas. Por outro lado, o F geral para

tratamentos na 7ª semana mostra que, após a fase inicial de intensa diferenciação, os tratamentos convergem para níveis similares de atividade.

Já a variável BN apresentou interação significativa entre tratamentos e semanas, com valores muito elevados e semelhantes entre os tratamentos na 1ª semana (variando de 98 a 103×10^3), indicando forte atividade microbiana inicial independentemente do manejo aplicado. O tratamento B+Bs foi a exceção, apresentando menor valor ($67,7 \times 10^3$), sugerindo menor estímulo inicial (Tabela 10).

Tabela 10. Interação de fatores para bactérias fixadoras de nitrogênio.

Semanas	Tratamentos (10^3)							F (5%)
	Solo	Bs	C+Bs	G+Bs	T+Bs	B+Bs	M+Bs	
1ª	108,2 Aa	98,2 Aa	102,0 Aa	100,0 Aa	100,7 Aa	67,7 Ba	103,5 Aa	6,86**
7ª	1,0 b	1,0 b	1,3 b	1,3 b	1,4 b	1,3 b	1,5 b	0,0 ^{ns}
F (5%)	220,30**	181,01**	194,12**	186,77**	188,98**	84,55**	199,29**	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); Bs (Solo + *B. subtilis*); C+Bs: (Comet® + *B. subtilis*); G+Bs: (Gamit® + *B. subtilis*); T+Bs (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+Bs: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+Bs: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F.

Na 7ª semana, todos os tratamentos convergiram para valores muito baixos ($1,0\text{--}1,5 \times 10^3$), caracterizando queda drástica e uniforme da atividade microbiana ao longo do tempo, típica do esgotamento dos substratos lábeis. Os elevados valores de F entre semanas confirmam a forte redução temporal, enquanto a comparação entre tratamentos na semana 7 não mostrou diferenças significativas.

4.3. Avaliação em Vasos

Na análise das variáveis avaliadas no experimento realizado em vasos, não foram observadas variações temporais significativas para os parâmetros Desi., CB e AH. Contudo, verificou-se alterações relevantes no pH, na umidade (%), nos Fungos Totais (FT) e na quantidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (BN). Dentre essas variáveis, apenas o FT apresentou aumento em relação à primeira avaliação. A tabela

abaixo ilustra a relação entre as variáveis físico-químicas do solo e os tratamentos aplicados, confirmando a importância das alterações observadas (Tabela 11).

Tabela 11. Relação entre as variáveis físico-químicas do solo e os tratamentos para a análise em vasos.

Fatores		Tratamentos						
Semana	pH	U%	Desi.	CB	AH	BT	FT	BN
1 ^a	5,96a	46,19a	23,60	95,52	0,89	1,7x10 ³	56,82b	3,9x10 ³ a
7 ^a	5,86b	31,19b	23,55	84,50	0,88	1,6 x10 ³	66,39a	1,0x10 ³ b
Insumos								
Solo	5,97	36,72	23,06b	74,87	0,77d	1,62x10 ³ b	54,12c	2,6x10 ³ abc
Bs	5,93	37,71	28,40a	78,75	0,93ab	1,57x10 ³ b	54,0c	1,8x10 ³ c
C+B_s	5,91	41,79	22,83b	105,09	0,86c	1,62x10 ³ b	64,25b	1,5x10 ³ c
G+B_s	5,85	39,72	21,16b	90,68	0,88bc	1,07x10 ³ c	52,87c	2,0x10 ³ bc
T+B_s	5,84	39,12	21,76b	108,77	0,95a	1,50x10 ³ bc	78,25a	3,7x10 ³ a
B+B_s	5,93	38,11	24,01b	97,56	0,90abc	2,17x10 ³ a	75,0a	3,1x10 ³ ab
M+B_s	5,94	37,68	23,80b	74,32	0,90abc	2,17x10 ³ a	52,75c	2,5x10 ³ bc
Causas de Variação								
F(semana)	5,79*	254,23**	0,01 ^{ns}	1,75 ^{ns}	0,73 ^{ns}	1,95 ^{ns}	51,72**	196,01**
F(insumos)	0,95 ^{ns}	40,34 ^{ns}	8,88**	1,70 ^{ns}	18,46**	13,44**	39,35**	8,17**
F Insumos x Semana	0,87 ^{ns}	0,96 ^{ns}	3,02*	1,23 ^{ns}	10,72**	7,81**	64,58**	7,27**
CV (%)	2,40	2,10	12,31	59,66	4,41	17,85	8,08	30,29

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); Bs (Solo + *B. subtilis*); C+B_s: (Comet® + *B. subtilis*); G+B_s: (Gamit® + *B. subtilis*); T+B_s (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+B_s: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+B_s: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Médias seguidas de mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F. NS = Não significativo pelo teste F. CV (%) = Coeficiente de variação.

Fonte: Autor.

Na análise do pH durante a pesquisa, observou-se uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a 1^a e a 7^a semana experimental, embora essa variação tenha apresentado um valor biológico limitado, com uma diminuição de apenas 0,1 unidade. Considerando que o pH é uma escala logarítmica, essa pequena alteração representa aproximadamente 26% na atividade de íons de hidrogênio (H^+), o que, em teoria, poderia impactar processos sensíveis (Xiong et al., 2024). No entanto, estudos anteriores indicam que reduções na atividade bacteriana tipicamente ocorrem apenas quando o pH se desvia em cerca de 1,5 unidades do nível ótimo para a comunidade microbiana, e não com uma variação tão sutil como 0,1 (Rousk et al., 2010).

Já a umidade apresentou decréscimo entre a primeira e a última semana ($p < 0,01$), essa diminuição pode ser atribuída ao próprio crescimento das plantas nos

vasos, uma vez que seu crescimento demanda aumentos progressivos nas necessidades hídricas, como ocorre com outras plantas como a soja (Ray e Sinclair 1998; Li et al., 2016) e milho (Ray e Sinclair 1998).

A análise dos tratamentos revelou que *B. subtilis*, quando aplicado isoladamente, foi o único a apresentar diferença estatística significativa para a atividade de desidrogenase (Desi.), demonstrando valor superior ao controle e aos demais tratamentos, embora essa resposta não tenha variado ao longo do tempo avaliado. Além disso, a atividade da desidrogenase apresentou interação significativa entre os fatores avaliados, indicando que o efeito dos tratamentos depende do período de avaliação (Tabela 12).

Tabela 12. Interação de fatores para a atividade da enzima desidrogenase em condição experimental de vasos.

Semanas	Tratamento							F (5%)
	Solo	Bs	C+Bs	G+Bs	T+Bs	B+Bs	M+Bs	
1 ^a	23,78BC	30,38Aa	23,08BC	21,65BC	23,94aC	25,00B	24,77BC	9,85**
7 ^a	22,34	26,43b	22,59	20,68	19,58b	23,03	22,84	2,05 ^{ns}
F (5%)	0,82 ^{ns}	6,21*	0,10 ^{ns}	0,37 ^{ns}	7,58**	1,54 ^{ns}	1,48 ^{ns}	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); **Desi.** (atividade da desidrogenase); **CB** (carbono da biomassa); **AH** (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; **BT** (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; **FT** (fungos totais) UFC mL^{-1} ; **BN** (bactérias fixadoras de nitrogênio); **Solo:** (Controle); **Bs** (Solo + *B. subtilis*); **C+Bs:** (Comet® + *B. subtilis*); **G+Bs:** (Gamit® + *B. subtilis*); **T+Bs** (Tricodermil® + *B. subtilis*); **B+Bs:** (Biozyme® + *B. subtilis*); **M+Bs:** (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. **NS** = Não significativo pelo teste F.

Na 1^a semana, observou-se maior variabilidade entre os tratamentos, com destaque para o tratamento Bs, que apresentou a maior atividade enzimática (30,38), diferindo estatisticamente tanto entre colunas (letras minúsculas) quanto entre linhas (letras maiúsculas). Esse valor superior evidencia uma intensificação da atividade microbiana inicial, possivelmente associada à maior disponibilidade de substrato ou estímulo metabólico imediato após a implantação do experimento.

Outros tratamentos, como B+Bs (25,00) e M+Bs (24,77), também apresentaram valores elevados, embora estatisticamente inferiores a Bs, sugerindo que combinações de materiais orgânicos e bioestimulantes podem incrementar a atividade, mas não no mesmo nível que o tratamento isolado Bs.

Na 7ª semana, a atividade da desidrogenase reduziu de forma geral em todos os tratamentos, evidenciando um declínio da respiração microbiana ao longo do tempo, fenômeno comum em sistemas onde o substrato facilmente degradável é consumido nas primeiras semanas. O tratamento Bs manteve atividade (26,43), mas significativamente inferior ao observado na 1ª semana (letra minúscula distinta), confirmando o efeito temporal. Os demais tratamentos exibiram valores entre 19 e 23 unidades, sem diferenças marcantes, o que reforça que o estímulo inicial não se sustenta ao longo do tempo.

A análise de variância mostra efeito significativo para os tratamentos na 1ª semana ($F = 9,83$, $p < 0,01$), indicando que as diferenças observadas no início não persistiram com a mesma intensidade ao longo do tempo. O efeito de tratamentos dentro de cada semana também apresenta significância para alguns grupos, como Bs ($F = 6,21$, $p < 0,05$) e G+Bs ($F = 7,58$, $p < 0,01$), reforçando que certos tratamentos respondem de maneira diferenciada entre as semanas.

A atividade da desidrogenase (Desi.) constitui um dos principais indicadores da atividade microbiana no solo, pois reflete a intensidade dos processos de decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, essenciais para a manutenção da saúde do solo e para o desenvolvimento vegetal (Mierzwa-Hersztek et al., 2020; Bandyopadhyay e Maiti, 2021). A inoculação com *Bacillus subtilis* contribui diretamente para a elevação dessa atividade, uma vez que esse microrganismo é capaz de produzir diversas substâncias bioativas, como sideróforos, fitormônios e enzimas mineralizadoras, que favorecem a agregação do solo, aumentam a retenção de umidade e melhoram a disponibilidade de nutrientes (Gutierrez et al., 2022; Yadav et al., 2021). Esse conjunto de mecanismos cria um ambiente propício para o metabolismo microbiano, permitindo que *B. subtilis* atue como agente catalisador da atividade das desidrogenases, mesmo na presença de uma comunidade microbiana diversa. Nessa condição, o microrganismo pode estimular tanto sua própria atividade quanto a de outros microrganismos do solo, aumentando a eficiência da decomposição e mineralização da matéria orgânica, o que explica o incremento significativo observado em Desi. (Mierzwa-Hersztek et al., 2020; Attademo et al., 2021).

Os demais tratamentos apresentaram níveis mais baixos de atividade da desidrogenase, indicando uma possível inibição da atividade microbiana. Essa redução pode ser explicada pela competição entre microrganismos e pela liberação de substâncias com ação antimicrobiana provenientes de alguns insumos, conforme discutido por Aviz et al. (2025). Além disso, essa diminuição pode estar associada a interações inibitórias, à competição por recursos e à presença de compostos específicos presentes em produtos como Gamit® e Trichodermil®, que podem limitar o crescimento ou a atividade metabólica das comunidades microbianas do solo.

Esses efeitos contrastam com o desempenho positivo observado quando *B. subtilis* foi aplicado isoladamente, reforçando que esse microrganismo desempenha papel fundamental na manutenção da atividade enzimática. No entanto, sua eficácia pode ser reduzida quando combinado com determinados insumos, em razão das interações químicas e ecológicas estabelecidas no solo, como apontado por Xu et al. (2022).

Em relação à atividade hidrolítica medida pela fluoresceína (FDA), os maiores valores foram registrados nos tratamentos que envolveram consórcios com *B. subtilis*, especialmente T+B_s (0,95 $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1}), seguido por B_s (0,93), B+B_s (0,90) e M+B_s (0,90). A atividade hidrolítica também demonstrou interação significativa entre tratamentos e semanas, indicando que o comportamento enzimático depende do tempo de avaliação (Tabela 13).

Tabela 13. Interação de fatores para a atividade hidrolítica em condição experimental de vasos.

Semanas	Tratamentos							F (5%)
	Solo	B _s	C+B _s	G+B _s	T+B _s	B+B _s	M+B _s	
1 ^a	0,779C	0,94AB	0,91ABa	0,96Aa	0,99ABa	0,95BCa	0,907AB	10,82**
7 ^a	0,770D	0,93AB	0,81CDb	0,81Db	0,92Ab	0,85ABb	0,901BC	18,36**
F (5%)	0,10 ^{ns}	0,15 ^{ns}	11,64**	32,51**	7,30**	13,29**	0,04 ^{ns}	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); B_s (Solo + *B. subtilis*); C+B_s: (Comet® + *B. subtilis*); G+B_s: (Gamit® + *B. subtilis*); T+B_s (Trichodermil® + *B. subtilis*); B+B_s: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+B_s: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F.

Na 1ª semana, os valores variaram de 0,77 a 0,99, com destaque para os tratamentos G+Bs (0,96Aa), T+Bs (0,99ABa) e B+Bs (0,95BCa), que exibiram as maiores atividades e diferiram estatisticamente entre si e em relação às demais combinações. Esses resultados sugerem que a combinação com bioestimulantes promove um estímulo inicial à atividade microbiana, favorecendo reações de hidrólise de compostos orgânicos logo após a instalação do experimento.

O tratamento Bs isolado (0,94AB) também apresentou atividade elevada e estatisticamente semelhante aos melhores grupos, reforçando sua capacidade de intensificar a atividade enzimática no curto prazo. Por outro lado, o tratamento C+Bs (0,91ABa) apresenta desempenho intermediário, enquanto o tratamento Solo (controle) mostrou valores consistentemente inferiores.

Na 7ª semana, observa-se um padrão distinto: houve redução significativa da atividade hidrolítica em alguns tratamentos, especialmente em C+Bs (0,81CDb) e B+Bs (0,85ABb), que apresentaram queda expressiva e letras minúsculas diferentes entre semanas, indicando declínio ao longo do tempo. Essa diminuição sugere esgotamento parcial dos substratos mais facilmente hidrolisáveis e estabilização da biomassa microbiana, fenômeno típico de sistemas após o período inicial de adaptação.

A análise de variância confirma a presença de efeitos altamente significativos para vários tratamentos ao longo do tempo, com valores de F expressivos para C+Bs ($F = 11,64$), G+Bs ($F = 32,51$), T+Bs ($F = 7,30$), e B+Bs ($F = 13,29$), todos com $p < 0,01$. Isso demonstra que esses tratamentos apresentam forte resposta temporal, com variações acentuadas da atividade hidrolítica entre semanas. No conjunto dos tratamentos, também se detecta efeito significativo entre semanas ($F = 10,82$ na 1ª semana e $F = 18,36$ na 7ª), reforçando a influência do fator temporal.

A atividade hidrolítica (AH) é amplamente utilizada como indicador da atividade metabólica total da microbiota do solo, uma vez que o diacetato de fluoresceína (FDA) é hidrolisado por diversas enzimas microbianas, incluindo esterases, lipases e proteases (Adam e Duncan, 2001). Dessa forma, a medida da AH permite avaliar a capacidade do solo de degradar compostos orgânicos complexos em componentes mais simples, refletindo a eficiência metabólica da comunidade microbiana e,

consequentemente, a qualidade microbiológica do solo (Adam e Duncan, 2001; Mendes et al., 2020).

A análise da atividade hidrolítica revelou que o tratamento Trichodermil® + *Bacillus subtilis* (T+Bs) apresentou os maiores níveis, com 0,95 $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} , seguido pelo tratamento com *B. subtilis* isolado (Bs), que atingiu 0,93 $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} , ambos significativamente superior ao controle, que registrou 0,77 $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} . Esses resultados indicam que a aplicação de *B. subtilis*, isoladamente ou em consórcio com *Trichoderma* spp., pode estimular de forma expressiva a atividade biológica do solo, favorecendo a decomposição da matéria orgânica e a liberação de nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas. Os achados corroboram estudos anteriores, como Souza et al. (2018), que destacam a capacidade de *Trichoderma* spp. em solubilizar nutrientes e acelerar a decomposição da matéria orgânica, reforçando o efeito sinérgico observado quando combinado com *B. subtilis*.

Já a avaliação das populações microbianas, no caso das bactérias totais, demonstrou que os maiores valores ocorreram nos tratamentos B+Bs e M+Bs, ambos com $2,17 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$, superando o controle ($1,62 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$). Da mesma forma, os fungos totais (FT) também foram favorecidos por consórcios contendo *B. subtilis*, destacando-se os tratamentos T+Bs ($78,25 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$) e B+Bs ($75,0 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$), todos com níveis significativamente maiores que o controle (Tabela 11). Além disso, foi observada interação significativa entre os tratamentos e as semanas de avaliação, indicando que a dinâmica das populações microbianas é influenciada de forma conjunta pelo tipo de tratamento aplicado e pelo período de avaliação, evidenciando uma resposta dependente do tempo (Tabela 14).

Tabela 14. Interação de fatores para bactérias totais em condição experimental de vasos.

Semanas	Tratamentos							F (5%)
	Solo	Bs	C+Bs	G+Bs	T+Bs	B+Bs	M+Bs	
1ª	1,9x10 ³ ABa	1,3x10 ³ BCb	1,4x10 ³ BC	1,2x10 ³ C	1,7x10 ³ BC	1,8x10 ³ BCb	2,5x10 ³ Aa	9,33**
7ª	1,2x10 ³ BCb	1,8x10 ³ Ba	1,8x10 ³ B	0,9x10 ³ C	1,3x10 ³ BC	2,5x10 ³ Aa	1,7x10 ³ Bb	11,93**
F (5%)	11,11**	4,49**	3,33 ^{ns}	2,60 ^{ns}	3,87 ^{ns}	9,23**	14,20**	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; BT (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; FT (fungos totais) UFC mL^{-1} ; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); Bs (Solo + *B. subtilis*); C+Bs: (Comet® + *B. subtilis*); G+Bs: (Gamit® + *B. subtilis*); T+Bs (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+Bs: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+Bs: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. **NS** = Não significativo pelo teste F.

Na 1ª semana, observou-se um padrão típico de pulso inicial de atividade microbiana, com valores variando de $1,2 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$. O tratamento M+Bs apresentou a maior atividade ($2,5 \times 10^3$), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos e indicando forte estímulo inicial à comunidade microbiana. Esse aumento sugere altas taxas metabólicas associadas à disponibilidade de substrato lábil, favorecendo a síntese e turnover microbiano.

O controle Solo também apresentou valor elevado ($1,9 \times 10^3$ ABa), porém estatisticamente inferior a M+Bs. Tratamentos como Bs, C+Bs, G+Bs, T+Bs e B+Bs apresentaram valores intermediários ($1,2\text{--}1,8 \times 10^3$), indicando respostas moderadas e semelhantes entre si. Essa resposta homogênea entre tratamentos intermediários indica que, no momento inicial, a composição do bioinsumo influencia menos que a disponibilidade geral de matéria orgânica e nichos microbianos recém-alterados. Os valores de F (9,33, $p < 0,01$) confirmam diferenças altamente significativas entre tratamentos na primeira avaliação.

Na 7ª semana, observa-se uma redistribuição da atividade microbiana, com alguns tratamentos mantendo ou aumentando seus valores, enquanto outros apresentam queda acentuada. O tratamento M+Bs manteve elevada atividade ($1,7 \times 10^3$), porém significativamente menor que na 1ª semana, indicando consumo dos substratos mais lábeis e estabilização da biomassa microbiana.

O tratamento Solo exibiu ligeira redução ($1,2 \times 10^3$), comportamento semelhante ao de C+Bs e G+Bs, que mostraram valores entre $0,9$ e $1,8 \times 10^3$. Essa redução generalizada é típica de sistemas em que os microrganismos já utilizam a maior parte dos recursos facilmente degradáveis, entrando em fase metabólica mais lenta.

Por outro lado, o tratamento B+Bs apresentou a maior resposta temporal, com aumento significativo (de $1,8 \times 10^3$ para $2,5 \times 10^3$), sugerindo que sua composição promove liberação gradual de compostos, sustentando a atividade microbiana ao longo do tempo. O F referente às semanas (11,93, $p < 0,01$) confirma que os efeitos temporais são altamente significativos.

A análise das populações microbianas revelou que a aplicação de *Bacillus subtilis*, isoladamente ou em consórcio com outros insumos, exerceu influência significativa sobre a microbiota do solo. Em relação às bactérias totais (BT), os maiores valores foram observados nos tratamentos que combinaram Mix de insumos + *B. subtilis* (M+Bs) e Biozyme + *B. subtilis* (B+Bs), ambos apresentando $2,17 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ (Tabela 11).

Esses resultados indicam que tais combinações criam um ambiente favorável à proliferação bacteriana e estimulam o metabolismo microbiano. Em contraste, o tratamento G+Bs apresentou valor significativamente menor, $1,07 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, sugerindo possíveis efeitos inibitórios ou tóxicos deste insumo sobre as bactérias do solo. Tais achados estão em concordância com Aviz et al. (2025), que destacam a capacidade de *B. subtilis* em estimular a atividade microbiana por meio da produção de substâncias bioativas e enzimas que favorecem o desenvolvimento de comunidades benéficas.

Quanto às populações de fungos totais (FT), os maiores valores foram registrados nos tratamentos T+Bs (Trichodermil + *B. subtilis*), 78,25 UFC mL⁻¹ e B+Bs 75,0 UFC mL⁻¹, evidenciando que a presença do fungo *Trichoderma* spp., associada a *B. subtilis* ou a bioestimulantes como Biozyme, favorece o desenvolvimento de comunidades fúngicas benéficas. Por outro lado, os tratamentos Controle (Solo), Bs, G+Bs e M+Bs apresentaram os menores valores de FT, 52,87 e 52,75 UFC mL⁻¹, respectivamente, possivelmente devido à presença da piraclostrobina, fungicida presente em ambos os insumos, cuja ação, combinada à complexidade do mix, pode gerar efeitos competitivos ou inibitórios sobre a microbiota fúngica.

Deste modo a variável FT apresentou interação significativa entre tratamentos e semanas, revelando que sua dinâmica depende tanto do tipo de manejo aplicado quanto do tempo decorrido após a instalação do experimento (Tabela 15).

Tabela 15. Interação de fatores para fungos totais em condição experimental de vasos.

Semanas	Tratamentos							F (5%)
	Solo	Bs	C+Bs	G+Bs	T+Bs	B+Bs	M+Bs	
1ª	58,50Ba	36,25Db	37,0CDb	47,75BCb	90,0Aa	83,0Aa	45,25CDb	75,82**
7ª	49,75Db	71,75Ba	91,50Aa	58,0CDa	66,50BCb	67,0BCb	60,25CDa	28,08**
F (5%)	6,17*	101,64**	239,56**	8,47**	44,54**	20,65**	18,15**	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); **U%** (teor de umidade); **Desi.** (atividade da desidrogenase); **CB** (carbono da biomassa); **AH** (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; **BT** (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; **FT** (fungos totais) UFC mL^{-1} ; **BN** (bactérias fixadoras de nitrogênio); **Solo:** (Controle); **Bs** (Solo + *B. subtilis*); **C+Bs:** (Comet® + *B. subtilis*); **G+Bs:** (Gamit® + *B. subtilis*); **T+Bs** (Tricodermil® + *B. subtilis*); **B+Bs:** (Biozyme® + *B. subtilis*); **M+Bs:** (Mix de insumos + *B. subtilis*). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. **NS** = Não significativo pelo teste F.

Na 1ª semana, observaram-se diferenças marcantes entre os tratamentos, com destaque para T+Bs, que apresentou a maior atividade (90,0), indicando um estímulo metabólico imediato e intenso, seguido por B+Bs (83,0). Esses dois tratamentos formaram o grupo de maior resposta inicial, sugerindo a presença de compostos rapidamente assimiláveis pelos microrganismos. Em contrapartida, tratamentos como Bs e C+Bs exibiram os menores valores nessa fase (36,25 e 37,0 respectivamente), enquanto o tratamento Solo apresentou comportamento intermediário (58,50). O efeito global dos tratamentos na semana inicial foi confirmado pelo valor significativo de F (7,53**, $p < 0,01$).

Na 7ª semana, houve uma reconfiguração completa do padrão observado inicialmente. O tratamento C+Bs apresentou o maior valor (91,50), superando drasticamente o desempenho observado na 1ª semana e tornando-se o principal estimulador tardio da variável FT. O tratamento Bs também apresentou aumento substancial ao longo do tempo (71,75Ba), sugerindo que sua ação depende da estabilização da comunidade microbiana no solo. Por outro lado, tratamentos que apresentaram elevadas respostas iniciais, como T+Bs e B+Bs, sofreram reduções expressivas na 7ª semana, caindo para 66,50 e 67,0, respectivamente, evidenciando um efeito de curta duração associado provavelmente ao consumo rápido dos substratos mais lábeis. O tratamento Solo também apresentou decréscimo (49,75), embora de menor magnitude que os tratamentos inicialmente mais responsivos.

A significância estatística dos efeitos ao longo do tempo foi reforçada pelos elevados valores de F observados para vários tratamentos, destacando-se especialmente C+Bs (239,56**) e Bs (101,64**), que exibiram os maiores contrastes entre semanas. De forma geral, a dinâmica temporal da variável FT sugere que alguns tratamentos exercem efeito imediato, porém transitório, enquanto outros apresentam resposta mais lenta e sustentada, evidenciando mecanismos distintos de liberação e

utilização de substratos, além de diferenças na adaptação e no metabolismo da comunidade microbiana do solo.

Quanto às bactérias fixadoras de nitrogênio (BN), observou-se que os maiores valores ocorreram na primeira semana, com declínio nos períodos avaliados. Entre os tratamentos, T+B_s ($3,7 \times 10^3$ UFC mL⁻¹) e B+B_s ($3,1 \times 10^3$ UFC mL⁻¹) apresentaram os melhores resultados, demonstrando que esses consórcios favoreceram condições mais adequadas para a manutenção inicial das comunidades. O controle apresentou valor de $2,6 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, enquanto B_s apresentou redução para $1,8 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, indicando que a inoculação isolada com *B. subtilis* pode ter promovido competição com as bactérias fixadoras. Além disso a variável BN apresentou interação significativa entre tratamentos e semanas, indicando que sua dinâmica microbiológica depende fortemente do tempo de avaliação e do manejo aplicado. Na 1ª semana, os valores foram relativamente elevados, refletindo um pulso metabólico inicial típico de sistemas recém-perturbados (Tabela 16).

Tabela 16. Interação de fatores para bactérias fixadoras de nitrogênio em condição experimental de vasos.

Semana	Tratamentos							F (5%)
s	Solo	B _s	C+B _s	G+B _s	T+B _s	B+B _s	M+B _s	
1 ^a	4,4x10 ³ ABC	2,6x10 ³ DE	1,9x10 ³	3,5x10 ³ CDE	5,9x10 ³ A	5,3x10 ³ AB	3,7x10 ³ BCD	14,58*
	a	a	E	a	a	a	a	*
7 ^a	0,7x10 ³ b	1,0x10 ³ b	1,2x10 ³	0,5x10 ³ b	1,5x10 ³ b	1,0x10 ³ b	1,4x10 ³ b	0,86 ^{ns}
F (5%)	46,65**	8,16**	1,28 ^{ns}	38,84**	69,23**	65,18**	18,29**	

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); U% (teor de umidade); Desi. (atividade da desidrogenase); CB (carbono da biomassa); AH (atividade hidrolítica) μmol p-NP g⁻¹ de solo h⁻¹; BT (bactérias totais) UFC mL⁻¹; FT (fungos totais) UFC mL⁻¹; BN (bactérias fixadoras de nitrogênio); Solo: (Controle); B_s (Solo + *B. subtilis*); C+B_s: (Comet® + *B. subtilis*); G+B_s: (Gamit® + *B. subtilis*); T+B_s (Tricodermil® + *B. subtilis*); B+B_s: (Biozyme® + *B. subtilis*); M+B_s: (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo tratamento em diferentes tempos. Letras maiúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ambos pelo teste de Tukey. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente. NS = Não significativo pelo teste F.

O tratamento T+B_s exibiu o maior valor ($5,9 \times 10^3$ Aa), seguido por B+B_s ($5,3 \times 10^3$) e pelo controle Solo ($4,4 \times 10^3$), formando o grupo de maior atividade microbiana inicial. Esses resultados sugerem que tais tratamentos disponibilizaram substratos rapidamente assimiláveis, promovendo intensa resposta metabólica nas primeiras etapas do experimento. Em contraste, os menores valores foram observados em C+B_s ($1,9 \times 10^3$) e G+B_s ($3,5 \times 10^3$), indicando menor estímulo inicial à comunidade microbiana.

Na 7ª semana, entretanto, verificou-se uma queda drástica da variável BN em praticamente todos os tratamentos, revelando forte efeito temporal sobre essa atividade microbiana. Os valores se reduziram para níveis entre $0,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^3$, com destaque para o tratamento T+Bs, que, embora ainda apresentasse o maior valor ($1,5 \times 10^3$), registrou grande declínio em relação à semana inicial. A magnitude dessa redução sugere consumo acelerado dos substratos lábeis presentes nos primeiros dias, seguido de estabilização metabólica e provável limitação energética para as populações microbianas responsáveis pela função avaliada. O tratamento Solo, que havia apresentado alto valor inicial, também sofreu queda pronunciada ($0,7 \times 10^3$), comportamento replicado pela maioria dos tratamentos.

Os valores de F reforçam a forte influência temporal sobre essa variável, especialmente para os tratamentos Solo (46,65), G+Bs (38,84), T+Bs (69,23) e B+Bs (65,18), todos com elevada significância estatística, o que evidencia contrastes marcantes entre as duas semanas. Essa resposta temporal acentuada mostra que a atividade associada a BN é altamente sensível à disponibilidade inicial de recursos e tende a declinar à medida que o sistema entra em fase de estabilização microbiana. O F geral para a 1ª semana (14,58, $p < 0,01$) confirma que o efeito do tempo domina a variação observada, enquanto a ausência de significância na comparação entre tratamentos da 7ª semana ($F = 0,86$) demonstra que, após o pico inicial, os tratamentos convergem para um comportamento semelhante.

As bactérias fixadoras de nitrogênio (BN) apresentaram comportamento diferenciado, com maior abundância nos tratamentos T+Bs e B+Bs, atingindo $3,7 \times 10^3$ e $3,1 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, respectivamente. Esses resultados evidenciam a influência positiva da interação entre *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* na manutenção de comunidades diazotróficas, em concordância com Santos et al. (2017), que descrevem o papel de *Trichoderma* spp. na promoção da saúde do solo e crescimento vegetal, enquanto *B. subtilis* favorece a fixação biológica de nitrogênio. Em contrapartida, o tratamento C+Bs apresentou redução na população de BN, possivelmente devido à presença do fungicida piraclostrobina, que pode afetar negativamente as bactérias diazotróficas.

Esses achados demonstram que, embora *B. subtilis* seja altamente eficiente em estimular a atividade da desidrogenase e o desenvolvimento microbiano quando

aplicado isoladamente, sua combinação com determinados insumos deve ser cuidadosamente avaliada. Interações sinérgicas ou inibitórias podem modificar significativamente a dinâmica metabólica e estrutural da comunidade microbiana do solo.

Além disso, a resposta da microbiota pode variar conforme as condições de cultivo, sendo diferentes entre experimentos conduzidos em vasos (semi-campo) e sistemas agrícolas em campo aberto, onde fatores abióticos como temperatura, umidade, difusão de nutrientes e dinâmica do solo podem intensificar ou atenuar efeitos sinérgicos ou inibitórios entre microrganismos e insumos (Clark e Tilman, 2017).

Os resultados reforçam que consórcios microbianos envolvendo *B. subtilis* e *Trichoderma* spp., ou a combinação de *B. subtilis* com bioestimulantes, criam condições favoráveis para o crescimento de bactérias, fungos e bactérias fixadoras de nitrogênio, promovendo maior eficiência metabólica, decomposição da matéria orgânica e fertilidade biológica do solo. Entretanto, a presença de fungicidas e a complexidade dos mix de insumos podem gerar efeitos inibitórios específicos, evidenciando a necessidade de escolha criteriosa dos consórcios e produtos aplicados.

4.4. Atividade respiratória em microcosmos

O tratamento com Biozyme® e Trichodermil® inicia com altas taxas, porém rapidamente diminuem, logo na segunda semana de avaliação. Um padrão geral observado com a maioria dos tratamentos (Solo, Bs, B+Bs, C+Bs, G+Bs e M+Bs) com uma estabilidade entre a primeira e segunda semana, seguidas por inversões, os que iniciam em baixa, depois da segunda semana tendem a aumentar, enquanto os que iniciam em alta tendem a diminuir no mesmo período (Figura 7).

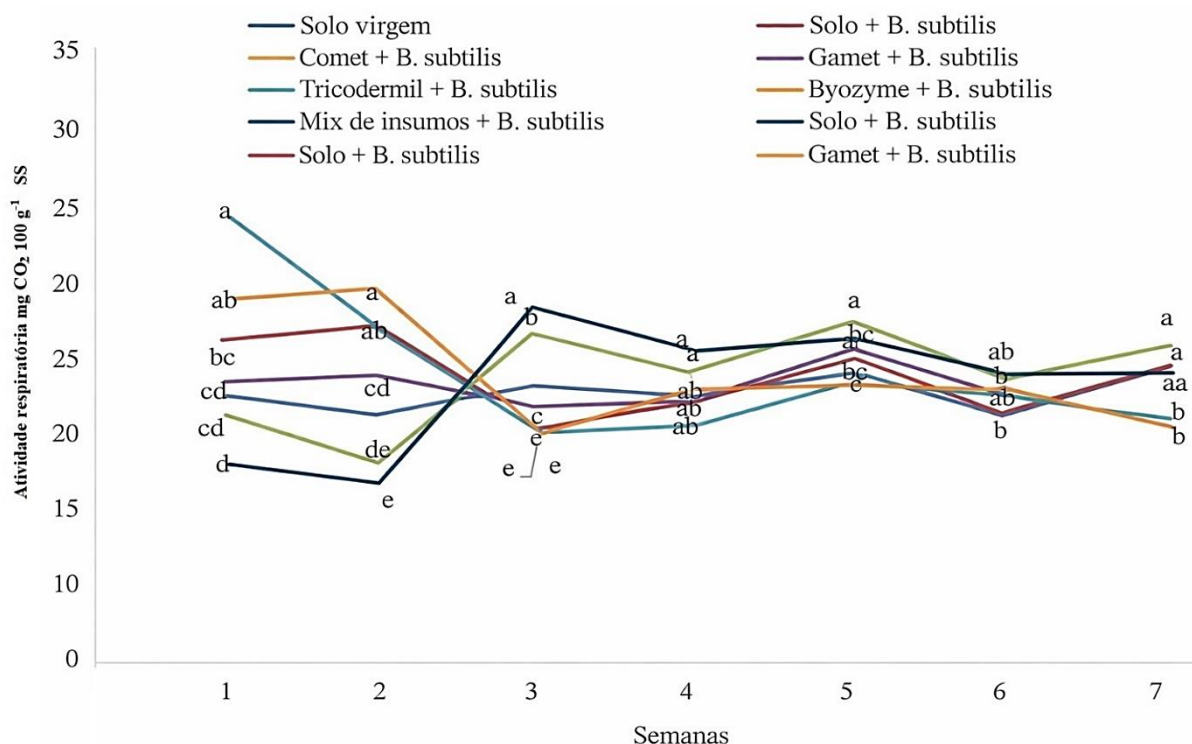


Figura 7. Análise da atividade respiratória em condição de microcosmos ao longo do período experimental.

Fonte: Autor.

Com o passar do tempo, notou-se uma estabilização na atividade respiratória, o que indica que a comunidade microbiana começou se adaptar às novas condições impostas pelos herbicidas (Martins et al., 2025) e agroquímicos avaliados. Essa capacidade de adaptação pode se manifestar por meio de resistência ou tolerância a esses compostos, permitindo que *B. subtilis* e demais microrganismos ajuste seu padrão de atividade respiratória.

A aplicação de produtos como o Trichodermil® e o Biozyme® pode ter proporcionado uma liberação gradual de nutrientes que os microrganismos utilizam (Niu et al., 2021), estabilizando assim a atividade respiratória. Quando os nutrientes estão disponíveis de forma constante, a atividade microbiana pode se tornar mais equilibrada, levando a uma menor flutuação na produção de CO₂. Esses insumos podem ter favorecido o crescimento de determinadas comunidades microbianas que são mais eficientes em utilizar o carbono disponível sem gerar quantidades excessivas de CO₂. A competição entre microrganismos por recursos pode ter sido afetada, permitindo que populações mais estáveis se estabelecessem.

Os insumos aplicados também podem ter exercido algum efeito inibitório sobre microrganismos que, em condições normais, produziram maiores quantidades de CO_2 , o que contribuiria para a estabilidade observada entre a primeira e a segunda semana. Além disso, é possível que esses insumos tenham provocado um efeito de choque na comunidade microbiana, alterando sua dinâmica, liberando nichos e disponibilizando materiais que favorecem a sucessão microbiana. Ademais, a aplicação de insumos pode ter aumentado a biomassa microbiana, permitindo uma utilização mais eficiente do carbono, que passa a ser incorporado à biomassa em vez de ser liberado na forma de CO_2 . Esse mecanismo explicaria o menor acúmulo de carbono liberado como CO_2 .

Não houve diferença significativa na atividade respiratória entre os tratamentos Solo, Bs, C+Bs, G+Bs e Mix+Bs, o que sugere que os microrganismos do solo foram capazes de utilizar insumos como Comet® e Gamit® como fontes de carbono sem que isso afetasse significativamente a taxa de respiração microbiana. Estudos anteriores também relataram aumento no acúmulo de CO_2 em experimentos com microcosmos contaminados com herbicidas em comparação com o controle (Huang et al., 2021).

Em outro estudo, Wardle e Parkison (1990) investigaram a respiração microbiana em solos tratados com três herbicidas pós-emergentes (2,4-D, picloram e glifosato) nas concentrações de 0, 2, 20 e 200 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os resultados mostraram que todos os herbicidas causaram um aumento na respiração microbiana, mas apenas por um período de 9 dias após a aplicação e somente para concentrações de 200 $\mu\text{g g}^{-1}$. Isso sugere que a produção de CO_2 está relacionada à decomposição direta dos herbicidas no solo.

Esses resultados corroboram a ideia de que a atividade microbiana e a respiração do solo são influenciadas pela presença de insumos agrícolas, conforme demonstrado nos estudos de Wardle e Parkison (1990) e Huang et al. (2021). Os herbicidas podem impactar significativamente a microbiota do solo, afetando a comunidade de espécies, mas no geral um efeito positivo é observado, após um curto período (Martins et al., 2025). Esses compostos químicos podem inibir a atividade de microrganismos sensíveis e alterar a pressão competitiva e a disponibilidade de nutrientes, levando a um desequilíbrio na comunidade microbiana (Martins et al., 2025).

Nas primeiras semanas após a aplicação, *B. subtilis* pode se tornar mais ativo devido à liberação de nutrientes decorrente da decomposição de microrganismos afetados, resultando em uma menor variabilidade na atividade respiratória, já que sua contagem e atividade aumentadas uniformizam as respostas entre diferentes tratamentos (Martins et al., 2025).

Com o tempo, observa-se uma estabilização da atividade respiratória, sugerindo que a comunidade microbiana começa a se adaptar às condições alteradas pelos insumos. Essa adaptação pode ser manifestada pela resistência ou tolerância a esses compostos, permitindo que *B. subtilis* ajuste seu padrão de atividade respiratória (Han et al., 2006).

4.5. Avaliação biométrica

A partir dos resultados obtidos é possível verificar alterações em alguns parâmetros biométricos, como altura, número de folhas; massa fresca aérea. Porém foi observado que alguns parâmetros não foram alterados como comprimento da raiz, massa fresca da raiz, massa seca aérea e massa seca da raiz (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados do teste estatístico para as variáveis biométricas.

Insumos	Alt. (cm)	NF (cm)	CR (cm)	MFA (g)	MFR (g)	MSA (g)	MSR (g)
Sol	42,25ab	5,25ab	10,37	1,73ab	0,52	0,61	0,36
Bs	60,87ab	5,75a	14,27	2,31ab	0,30	0,81	0,21
C+Bs	49,95ab	4,50ab	12,62	1,74ab	0,15	0,67	0,05
G+Bs	47,00ab	4,25ab	14,25	1,08ab	0,13	0,42	0,07
T+Bs	36,95b	3,75ab	8,75	0,73b	0,12	0,32	0,06
B+Bs	64,50ab	5,25ab	17,37	3,34a	0,40	1,03	0,27
M+Bs	71,55a	5,25ab	16,25	3,29a	0,19	1,04	0,11
F (5%)	3,88**	3,09*	1,09 ^{ns}	4,05*	2,48 ^{ns}	2,58 ^{ns}	1,61 ^{ns}
CV	24,03	16,50	44,10	29,63	26,98	47,81	23,60
DMS (5%)	29,44	1,84	13,65	2,32	0,44	0,035	0,19

Legenda: pH (potencial hidrogeniônico); **U%** (teor de umidade); **Desi.** (atividade da desidrogenase); **CB** (carbono da biomassa); **AH** (atividade hidrolítica) $\mu\text{mol p-NP g}^{-1}$ de solo h^{-1} ; **BT** (bactérias totais) UFC mL^{-1} ; **FT** (fungos totais) UFC mL^{-1} ; **BN** (bactérias fixadoras de nitrogênio); **Solo:** (Controle); **Bs** (Solo + *B. subtilis*); **C+Bs:** (Comet® + *B. subtilis*); **G+Bs:** (Gamit® + *B. subtilis*); **T+Bs** (Tricodermil® + *B. subtilis*); **B+Bs:** (Biozyme® + *B. subtilis*); **M+Bs:** (Mix de insumos + *B. subtilis*); **Alt.** (Altura), **NF** (Número de Folhas); **CR** (Comprimento de Raíz); **MFA** (Massa Fresca Aérea); **MFR** (Massa Fresca da Raíz); **MSA** (Massa Seca Aérea); **MSR** (Massa Seca Raíz).

Médias seguidas de mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * e ** = Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F. **NS** = Não significativo pelo teste F. **CV (%)** = Coeficiente de variação.

Fonte: Autor.

A avaliação dos parâmetros biométricos da cana-de-açúcar mostrou que os tratamentos contendo *B. subtilis* isolado (Bs), bem como sua combinação com Biozyme® (B+Bs) e com o Mix de insumos (M+Bs). O tratamento M+Bs, por exemplo, apresentou a maior altura média (71,55 cm), seguido de B+Bs (64,50 cm) e Bs (60,87 cm). Esses resultados indicam que *B. subtilis* exerceu influência positiva no crescimento inicial das plantas, fenômeno amplamente relatado na literatura, uma vez que esse microrganismo atua como promotor de crescimento vegetal (PGPB), estimulando a absorção de nutrientes, produção de fitormônios e aumento da tolerância a estresses (Di et al., 2023; Fonseca et al., 2022).

O aumento da altura observado principalmente em Bs (60,87 cm), B+Bs (64,50 cm) e M+Bs (71,55 cm) é coerente com estudos que apontam que *B. subtilis* pode estimular a elongação caulinar por meio da produção de ácido indolacético (AIA), melhoria da disponibilidade de nitrogênio e solubilização de fósforo, promovendo maior vigor no estabelecimento da cultura (Singh et al., 2020). A literatura sobre cana-de-açúcar confirma que respostas positivas tendem a ocorrer no estágio inicial, especialmente quando há boa colonização radicular (Singh et al., 2020).

Por outro lado, o tratamento contendo Trichodermil® associado a *B. subtilis* (T+Bs) apresentou os menores valores de crescimento em quase todos os parâmetros biométricos, incluindo altura (36,95 cm), CR (8,75 cm), MFA (0,73 g) e MSA (0,32 g). Esse resultado pode estar relacionado a interações negativas entre microrganismos, fenômeno já registrado em estudos de compatibilidade microbiana. Dependendo da formulação, algumas espécies de *Trichoderma* podem competir com *Bacillus* pela colonização da rizosfera ou produzir compostos antifúngicos/bacteriostáticos que reduzem o desempenho de outras cepas (Jensen et al., 2024). Isso reforça a necessidade de avaliar previamente a compatibilidade entre bioinsumos antes do uso em conjunto.

A análise do número de folhas (NF) apresentou variação entre 3,75 e 5,75 folhas, sem diferenças estatísticas significativas a 5% de significância. Isso sugere que esse parâmetro é menos sensível à influência dos microrganismos no início da cultura, conforme relatado em experimentos com cana-de-açúcar em vasos e em campo (Prado, 2008). A literatura indica que a emissão de folhas na cana geralmente é mais impactada por condições nutricionais e de umidade do solo do que pela aplicação de bioinoculantes.

Assim, os resultados demonstram que a biomassa aérea e o desenvolvimento radicular foram os parâmetros mais responsivos aos tratamentos, especialmente à presença de *B. subtilis*, isolado ou combinado. Os efeitos benéficos observados são compatíveis com os mecanismos fisiológicos e bioquímicos atribuídos a PGPB, como produção de fitormônios, maior eficiência na absorção de N, P e K, e indução de resistência sistêmica (Taiz et al., 2017; Qiu et al., 2022). De forma geral, nota-se que o desempenho biométrico inicial da cana é influenciado pela interação entre microrganismos, tipo de insumo aplicado e respostas fisiológicas específicas da cultura.

4.6. Avaliação dos nutrientes foliares

Foram observados importantes interações dos tratamentos com a análise de teores de nitrogênio absorvidas pelas plantas. A Tabela a seguir apresenta os teores

de nitrogênio foliar em cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos (Tabela 18).

Tabela 18. Teores de nitrogênio foliar em cana-de-açúcar, submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	Média*(mg kg ⁻¹)
Solo (Controle)	845,83 ab
Bs	968,33 ab
C+Bs	810,83 b
G+Bs	1003,33 a
T+Bs	863,33 ab
B+Bs	810,83 b
M+B	828,33 ab
DMS(5%)	186,6253

Legenda: **Bs:** *B. subtilis*; **C+Bs:** Comet® + *B. subtilis*; **G+Bs:** Gamit® + *B. subtilis*; **T+Bs:** Tricodermil® + *B. subtilis*; **B+Bs:** Biozyme® + *B. subtilis*; **M+B:** Mix de insumos + *B. subtilis*. Médias seguidas de mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise dos teores de nitrogênio foliar apresentados na Tabela 8 demonstra que os tratamentos G+Bs, T+Bs, M+B, Solo e Bs foram superiores. Porém, o tratamento G+Bs apresentou o maior valor absoluto (1003,33 mg kg⁻¹), diferindo apenas dos tratamentos B+Bs e C+Bs. Esse comportamento é coerente com estudos em cana-de-açúcar que mostram que espécies de *Bacillus* podem melhorar a absorção de nutrientes e o desempenho fisiológico da planta, porém com respostas altamente dependentes da cepa utilizada, das condições ambientais e do manejo experimental (Fonseca et al., 2022; Di et al., 2023).

A literatura também reforça que a atuação de biofertilizantes na eficiência do uso de nitrogênio pode ser positiva, mas não é uniforme entre sistemas de cultivo, sendo modulada por formulação, dosagem e interação com o ambiente (Qiu et al., 2022). Assim, a ausência de aumento estatístico significativo no teor de N (comparado ao controle) no presente estudo não contradiz o potencial agrônomo dos inóculos, mas evidencia que seus efeitos dependem da compatibilidade entre microrganismo, produto e condições de aplicação (Di et al., 2023).

Outro ponto relevante é a possível interferência de agroquímicos na sobrevivência e atividade de microrganismos benéficos. A compatibilidade relata que fungicidas e outros insumos podem reduzir a colonização microbiana e suprimir efeitos esperados de inoculantes (Jensen et al., 2024). Esse cenário é consistente com a

hipótese de que determinados insumos utilizados como produtos com ação fungicida podem ter limitado o desempenho de *B. subtilis*, contribuindo para a ausência de diferenças significativas nos teores de N.

Além disso, a nutrição mineral da cana-de-açúcar é fortemente influenciada pela elevada demanda por macronutrientes, especialmente nitrogênio e potássio, bem como por micronutrientes como cobre e molibdênio, que participam diretamente de processos fisiológicos e da fixação biológica de nitrogênio (Silva e Cruz, 2021). Dessa forma, o padrão observado no experimento, com menor acúmulo de K e Cu (Figura 9) do que em N, é fisiologicamente plausível, indicando que a dinâmica nutricional da cultura é multivariada e não necessariamente sensível às mesmas intervenções em todos os elementos.

Em conjunto, os resultados sugerem que os efeitos dos tratamentos avaliados sobre o teor foliar de N foram modulados por múltiplos fatores, incluindo compatibilidade bioquímica entre produtos, sensibilidade microbiana a insumos químicos e exigências nutricionais específicas da cultura. Esses achados reforçam a necessidade de uma abordagem integrada de manejo, que considere simultaneamente inoculantes, fertilizantes e o contexto químico–biológico do ambiente de cultivo.

4.7. Análise dos elementos acumulados nas folhas

Não foram detectados valores significativos de diferença entre os tratamentos para os parâmetros avaliados, embora o p-valor significativo de 0,032 para o cálcio (Ca) na análise de variância (ANOVA) sugira diferenças gerais entre os grupos, o teste de Tukey não identificou diferenças estatisticamente significativas quando avaliado a um nível de confiança de 5% (Figura 8).

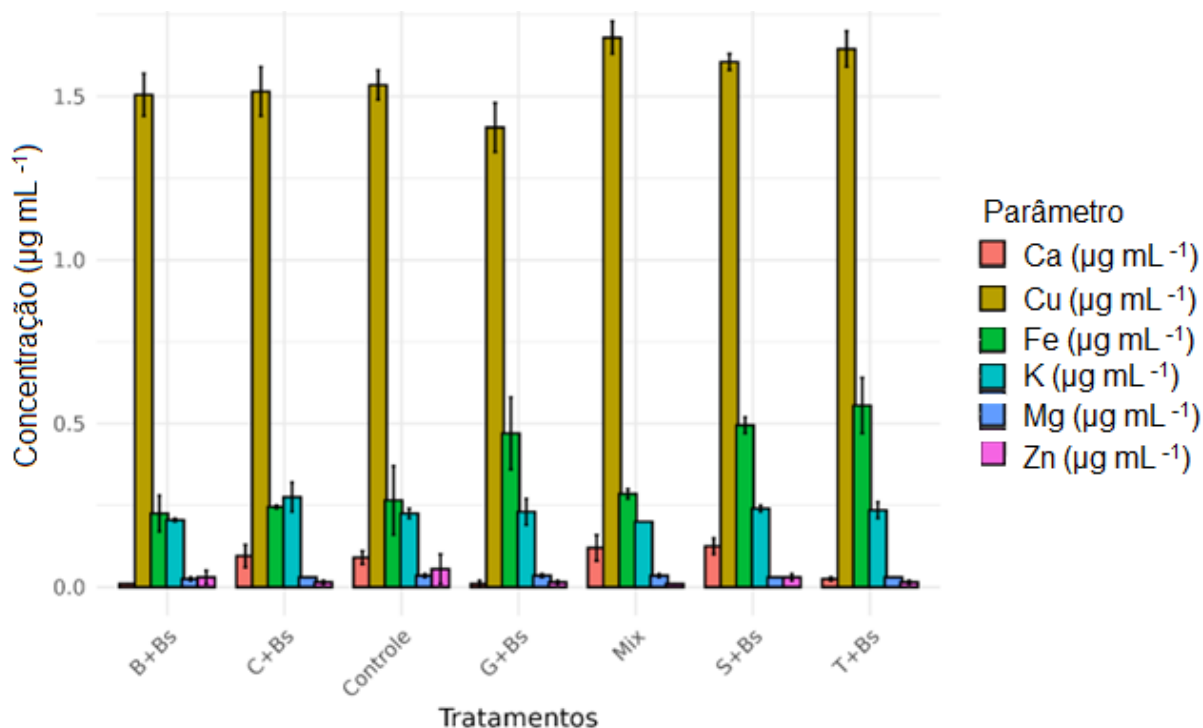


Figura 8. Valores Médios de elementos metálicos avaliados ao final do experimento em condições de vaso.

Legenda: **Solo:** (Controle); **S+B5** (Solo + *B. subtilis*); **C+B5** (Comet® + *B. subtilis*); **G+B5** (Gamit® + *B. subtilis*); **T+B5** (Tricodermit® + *B. subtilis*); **B+B5** (Biozyme® + *B. subtilis*); **M+B5** (Mix de insumos + *B. subtilis*).

Parte desse fato, se deve ao número limitado de avaliações realizadas em duplicata, isso representa uma limitação da própria técnica. Assim, é importante considerar que a análise elementar pelo método de absorção atômica é um método de custo elevado e, por isso, comumente envolve o uso de um número reduzido de amostras. Dessa forma, o padrão usual de execução de análises nessa metodologia é a realização de apenas duas repetições por variável. Essa abordagem não somente reduz os custos associados, mas também é uma prática comum que limita a capacidade dos testes post hoc de detectar variações específicas entre os grupos. Com isso, embora a ANOVA sugira variação, a baixa replicação e os custos elevados associados à técnica comprometem a robustez das conclusões sobre diferenças individuais.

Para observar diferenças entre os grupos, muitas vezes ocultas, análises multiparamétricas devem ser aplicadas, com isso a análise de elementos nas folhas

destinada a verificação de macro e micronutrientes em espectrômetro de absorção atômica identificou a formação de 7 clusters (associações) entre os tratamentos para as condições avaliadas (Figura 9).

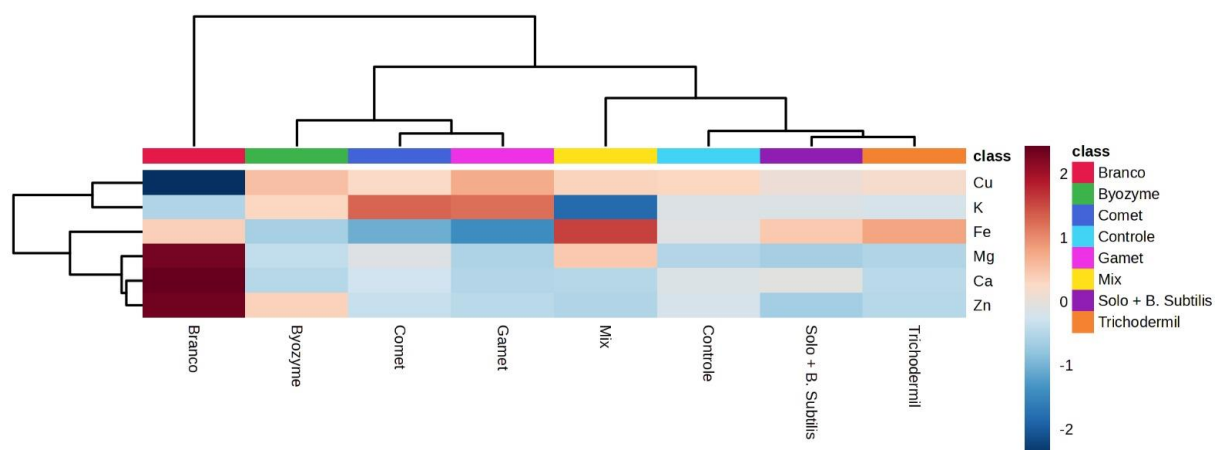


Figura 9. Análise de clusters para a avaliação de macro e micronutrientes metálicos em plantas submetidas a tratamentos químicos e biológicos.

Os clusters, indicam que os tratamentos com *B. subtilis* isolado e o Trichodermil apresentam características semelhantes ao observarmos todos os elementos. Esses juntos, apresentam-se próximo relacionados ao solo (controle) com a formação de um 3º cluster, seguido pelo mix de produtos, que se assemelha aos demais supracitados.

O cluster mais distante do agrupamento é formado por Comet e Gamet (4º cluster), juntos associam-se a Biozyme (5º cluster), que são compostos exclusivamente por agroquímicos. Esse comportamento indica que as características do solo se diferem entre os tratamentos químicos e biológicos.

Deste modo, nota-se que ao avaliar individualmente os valores, não é possível notar certas nuances do comportamento dos tratamentos, enquanto a análise multiparamétrica revela importantes diferenças entre o tratamento.

A análise dos dados obtidos por meio do mapa de calor permitiu observar que os diferentes tratamentos aplicados influenciaram de maneira distinta a absorção de macro e micronutrientes pelas gemas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos. De modo geral, verificou-se que *B. subtilis*, seja isoladamente ou em combinação com agroquímicos, exerceu impacto significativo no padrão de acúmulo de nutrientes,

corroborando seu papel como microrganismo promotor de crescimento vegetal, conforme relatado na literatura (Hashem et al., 2019).

O Magnésio (Mg), o Cálcio (Ca) e o Zinco (Zn) foram elementos incorporados em menores quantidades em todos os tratamentos, sendo que tanto o Mg quanto o Ca são considerados macronutrientes e devem estar presentes em grandes quantidades na planta (Freire, 2001). Assim verifica-se um aumento desses elementos nos tratamentos com biológicos associados como nos tratamentos T+B_s, Solo+B_s.

Os tratamentos compostos apenas por solo ou solo associado a *B. subtilis* apresentaram padrões nutricionais semelhantes, principalmente em relação à incorporação de cobre (Cu). Isso se deve ao fato de que espécies do gênero *Bacillus* possuem capacidade reconhecida de mobilizar metais de transição por meio da produção de sideróforos e ácidos orgânicos, o que aumenta a biodisponibilidade de elementos como Cu, Fe e Mn (Saxena et al., 2020). A similaridade observada entre o tratamento contendo apenas os bacilos e aquele contendo *B. subtilis* associado ao Trichodermil® reforça o entendimento de que a combinação desses dois microrganismos tende a modular processos fisiológicos sem alterar drasticamente a incorporação de nutrientes, como também demonstrado por Costa et al. (2022), que observaram sinergias no crescimento, mas não necessariamente em acúmulo nutricional.

Os tratamentos contendo os bioinsumos Biozyme®, Comet® e Gamit® destacaram-se pela maior incorporação de potássio (K) e cobre (Cu). O potássio é um macronutriente essencial envolvido na regulação osmótica, ativação enzimática e transporte de fotoassimilados, sendo particularmente relevante em espécies como a cana-de-açúcar, que demandam elevadas quantidades desse elemento para sua produção primária e translocação de açúcares (Taiz et al., 2017; Prado, 2008). A maior absorção de Cu nesses tratamentos pode estar relacionada à presença de substâncias húmicas e bioativos presentes em produtos como Biozyme® e Gamit®, os quais favorecem a complexação e mobilização de micronutrientes no solo (Canellas e Olivares, 2014). Além disso, *B. subtilis* amplifica o efeito desses insumos por estimular a proliferação de raízes finas e aumentar a capacidade de troca catiônica na rizosfera, o que reforça o acúmulo de micronutrientes metálicos (Saharan e Nehra, 2011).

Por outro lado, o tratamento contendo a mistura de todos os insumos avaliados (Mix) apresentou menor incorporação de K e níveis reduzidos de alguns micronutrientes quando comparado aos demais. Esse comportamento pode estar relacionado a possíveis interações antagônicas entre os compostos utilizados simultaneamente, resultando em competição química, alterações no pH e saturação de moléculas bioestimulantes que acabam por interferir negativamente nos processos de absorção radicular. Conforme descrito por Meena et al. (2017), a combinação indiscriminada de bioinsumos e agroquímicos pode reduzir a eficiência de microrganismos benéficos, inibindo sua atividade metabólica e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes.

De forma integrada, os resultados revelam que o potássio e o cobre foram os elementos com maior variação entre os tratamentos. O papel fisiológico desses nutrientes explica sua sensibilidade às intervenções experimentais. O K, além de ser importante para processos osmóticos e ativação enzimática, está diretamente envolvido no transporte de sacarose, o principal produto metabólico da cana-de-açúcar (Taiz et al., 2017). O Cu, por sua vez, atua como cofator em reações de oxidorredução, participa da fotossíntese (especialmente na plastocianina) e desempenha funções essenciais na defesa antioxidante e lignificação (Yruela, 2009; Briat et al., 2007).

A análise do agrupamento hierárquico demonstrou a formação de dois grandes grupos: (i) tratamentos sem bioinsumos químicos ou com poucas combinações (solo, *B. subtilis*, e Trichodermil®), cujas respostas se assemelham ao controle; e (ii) tratamentos contendo bioestimulantes comerciais (Biozyme®, Comet®, Gamit® e Mix), que apresentaram respostas nutricionais mais pronunciadas.

Assim, os resultados do presente estudo demonstram que *B. subtilis*, quando associado a determinados bioinsumos, potencializa a absorção de nutrientes essenciais e favorece ajustes metabólicos que podem ser desejáveis na produção de mudas de cana-de-açúcar. No entanto, a utilização conjunta de múltiplos produtos (Mix) pode ser contraproducente, reforçando a necessidade de manejo criterioso no uso combinado de bioestimulantes e microrganismos benéficos.

A visualização dos dados por meio de um mapa de calor mostra que os teores de nutrientes variaram ao longo dos tratamentos com o tratamento controle

apresentando altos índices apenas de Cobre. O tratamento com Solo e *B. subtilis* se assemelharam com o Trichodermil®, ambos se apresentaram mais proximamente relacionados ao controle. Esses três primeiros tratamentos se correlacionam ao Mix (mistura de produtos) com altas taxas de Ferro (Fe) sendo incorporadas, porém com baixas taxas de potássio (K). O potássio foi mais incorporado pelos tratamentos Biozyme®, Comet®, Gamit®, o Mix causou a menor incorporação deste elemento na planta e se manteve igual para os demais. O potássio é um macronutriente crítico com atuação na regulação osmótica, ativação de enzimas, transporte de nutrientes e síntese de carboidratos (Jiadosk et al., 2011).

Além disso o potássio e o cobre foram os elementos mais incorporados pelas plantas dos tratamentos, mesmo que estes não apresentem uma correlação direta em termos de fisiologia vegetal, ambos são necessários e desempenham importantes papéis no crescimento e desenvolvimento. O cobre é um micronutriente essencial que desempenha um papel em várias funções metabólicas, incluindo a síntese de clorofila, a ativação de enzimas e a resistência a patógenos. O cobre é fundamental para processos relacionados ao metabolismo de carboidratos, lignificação e defesa contra estresses oxidativos (Taiz et al., 2017).

As gramíneas em geral necessitam de altas taxas de ferro quando comparadas a outras culturas, a cana-de-açúcar acumula cerca de 9 kg ha⁻¹ (Prado, 2008), deste modo os tratamentos com mix de produtos e a associação T+B_s favoreceram seu acúmulo. Sendo o ferro um elemento essencial na composição da molécula da clorofila, além disso possui função catalisadora da respiração, fotossíntese e de outros sistemas enzimáticos (Madhurl et al., 2013); e aumenta a produtividade, assim está também relacionado à qualidade nutricional dos produtos vegetais (Briat et al., 2007).

4.8. Perfil Metabólico

Com a identificação de diversos padrões nutricionais diferentes entre os tratamentos, é possível verificar o estado metabólico da cana-de-açúcar com alguns ácidos orgânicos aparecendo em grandes quantidades, como é o caso do ácido trans-aconítico. Grande parte destes são responsáveis por Osmorregulação; Atividade

Antioxidante; Metabolismo energético; Sinalização e regulação gênica intra e interespecífica (Khan et al., 2020) (Figura 10).

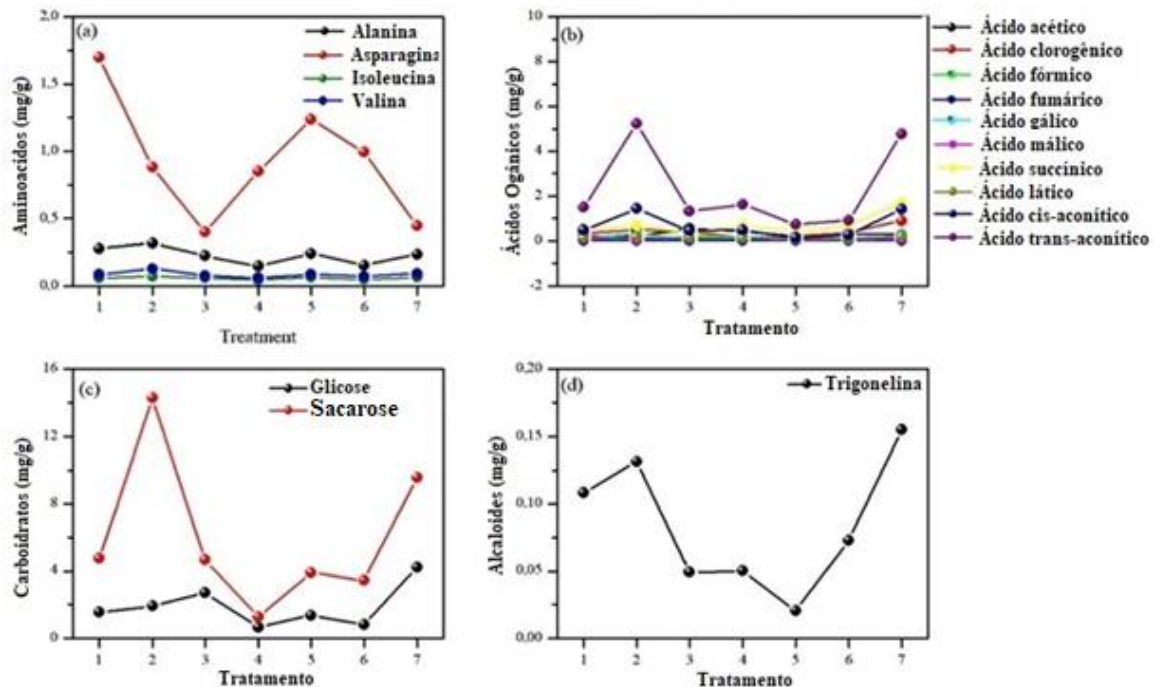


Figura 10. Concentração de metabólitos em cana-de-açúcar submetidos a diferentes tratamentos de insumos.

Legenda: T1: Controle; T2: *B. subtilis*; T3: Comet® + *B. subtilis*; T4: Gamit® + *B. subtilis*; T5: Tricodermit® + *B. subtilis*; T6: Biozyme® + *B. subtilis*; T7: Mix de insumos + *B. subtilis*.

A análise dos metabólitos em diferentes tratamentos revela importantes aspectos da interação de *B. subtilis* e agroquímicos. Ao serem observados os aminoácidos, observou-se uma variação significativa nos níveis de asparagina, que foram máximos no tratamento controle (T1) e permanecem elevados em T5 e T6, mas sofrem uma redução acentuada em T3 e T4, quando *B. subtilis* foi utilizado os agroquímicos.

Essa redução pode ser interpretada como um indicativo de que *B. subtilis*, em combinação com agroquímicos, promove maior utilização da asparagina, possivelmente através de assimilação de amônia e a intensificação na síntese proteica (Brouquisse et al., 1992). A redução acentuada da asparagina nos tratamentos T3 e T4 (quando *B. subtilis* foi aplicado junto a agroquímicos) pode indicar uma reprogramação do metabolismo nitrogenado da planta: em vez de acumular

asparagina como reserva de N, a planta a estaria utilizando mais rapidamente para incorporação em aminoácidos/proteínas e outras vias biossintéticas, possivelmente por estímulo microbiano à assimilação e reciclagem do nitrogênio (Brouquisse et al., 1992).

A asparagina é importante nesse processo, atuando como um intermediário no transporte e armazenamento de nitrogênio, fundamental para a saúde e crescimento vegetal (Yabuki et al., 2017). A conversão de amônia em asparagina, mediada pela asparagina sintetase, ocorre quando a amônia é integrada ao aspartato, resultando em uma molécula que possui alta eficiência na retenção de nitrogênio (Yabuki et al., 2017). Esse processo garante que o nitrogênio disponibilizado favoreça os tecidos em desenvolvimento, promovendo assim uma maior síntese de proteínas, visto que a asparagina fornece um suprimento constante de nitrogênio necessário para a produção de aminoácidos, os quais são os blocos construtores das proteínas (Yabuki et al., 2017).

Desta forma, a asparagina interliga a assimilação de amônia à biossíntese proteica, contribuindo significativamente para o crescimento e desenvolvimento das plantas, especialmente em condições de elevado consumo de nitrogênio ou estresse nutricional (Yabuki et al., 2017). Além disso, a regulação da produção de asparagina está intimamente ligada ao estado de nitrogênio da planta, evidenciando que seu aumento potencializa a capacidade de síntese proteica (Yabuki et al., 2017).

A alanina, por sua vez, apresentou estabilidade em todos os tratamentos, sugerindo uma homeostase no metabolismo de carbono e nitrogênio. Já os níveis baixos de isoleucina e valina indicam um metabolismo secundário não afetado significativamente pela presença de *B. subtilis*. Isso sugere uma reprogramação no balanço de aminoácidos, onde o sistema se adapta para otimizar o uso de nitrogênio e preservar aminoácidos estruturais.

Nos carboidratos, a sacarose apresentou um pico em T2 e uma subsequente redução nos tratamentos que incluem os agroquímicos. Essa dinâmica sugere que *B. subtilis* e sua ação isolada promovem um aumento significativo na fotossíntese e no acúmulo de carboidratos, possivelmente devido a efeitos benéficos como a promoção do crescimento radicular e a absorção de nutrientes (Lopes et al., 2013). Entretanto, a adição de insumos agrícolas parece inibir esses efeitos positivos, possivelmente por

meio da alteração da microbiota benéfica associada à planta. A glicose, por outro lado, manteve níveis baixos, reforçando a hipótese de uma rápida conversão em sacarose ou seu uso em processos respiratórios.

A análise das concentrações de ácidos orgânicos revelou um claro destaque para o ácido trans-aconítico, especialmente nos tempos T2 e T7, indicando intensificação da atividade respiratória e maior direcionamento do fluxo de carbono (Kulma et al. 2019). Esse comportamento é coerente com a ativação de um metabolismo energético mais robusto, possivelmente induzido pela aplicação de *B. subtilis*. Embora outros ácidos orgânicos tenham apresentado oscilações ao longo dos tratamentos, o padrão geral aponta para um aumento da atividade metabólica e para um equilíbrio redox mais dinâmico no tecido foliar, sugerindo estímulo à respiração celular (Kulma et al. 2019).

Segundo Taiz et al. (2017), os ácidos detectados podem ser classificados em três grupos funcionais: (i) os relacionados ao metabolismo energético, que incluem ácido acético, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido málico, ácido succínico e ácido trans-aconítico; (ii) os envolvidos na defesa e regulação, representados pelos ácidos gálico e clorogênico; e (iii) o ácido láctico, que está associado ao metabolismo fermentativo. Dentre esses compostos, o trans-aconítico foi o metabólito mais abundante em todos os tratamentos, caracterizando-se como um intermediário do ciclo do ácido cítrico e desempenhando papel essencial no metabolismo energético e na biossíntese de carboidratos (Khan et al., 2020). Além de sua função metabólica, esse composto possui reconhecida ação alelopática, interferindo no banco de sementes de espécies daninhas (Voll, 2019).

A literatura indica que o caldo de cana apresenta concentrações naturalmente elevadas de ácido aconítico, aproximadamente 1,8% (Larrahondo et al., 2000), enquanto seus níveis na planta intacta tendem a ser reduzidos (Araújo, 2017). Assim, as altas concentrações observadas no presente estudo provavelmente se relacionam ao estágio inicial de desenvolvimento da cultura, período no qual a planta direciona grande parte de seus recursos para rotas energéticas com o objetivo de sustentar processos de crescimento e diferenciação (Taiz et al., 2017; Voll, 2019). Além disso, esse composto é característico de gramíneas e pode ser exsudado para o solo, onde

interage com elementos como alumínio e ferro (Szmigielska et al., 1997), influenciando a dinâmica química e biológica da rizosfera.

Dentre os ácidos com papel fundamental no metabolismo energético, destacam-se aqueles diretamente envolvidos no ciclo de Krebs, processo essencial para a produção de energia nas células vegetais. Esses compostos podem atuar como precursores ou intermediários das principais rotas metabólicas associadas à geração de ATP (Khan et al., 2020). Já os que atuam na defesa e regulação (ácido gálico e clorogênico) estão associados à defesa das plantas contra patógenos, atuando como antioxidantes e inibidores de enzimas que podem danificar as células (Khan et al., 2020). E o ácido láctico está envolvido no metabolismo fermentativo, que pode ocorrer em condições anaeróbias, em geral é considerado uma fonte alternativa de energia para as plantas (Khan et al., 2020).

Dado que houve maior quantidade de ácido aconítico, seguido por málico e clorogênico, podemos inferir que a planta está metabolicamente ativa e provavelmente em um estado nutricional equilibrado. O ácido aconítico é intermediário importante no ciclo de Krebs, indicando atividade metabólica significativa. O ácido málico está envolvido na síntese de compostos orgânicos, enquanto o ácido clorogênico pode agir como um indicador de resposta a estresses ambientais.

Foi observado nos tratamentos 1, 2, 6 e 7 respectivamente o tratamento Controle; *B. subtilis*; Biozyme® + *B. subtilis*; e Mix de insumos + *B. subtilis* altas concentrações de alcaloide trigonelina. Essa molécula é derivada do ácido nicotínico (vitamina B3), desempenha um papel fisiológico significativo na cana-de-açúcar, com múltiplas funções relacionadas à regulação metabólica, detoxificação e defesa contra estresses ambientais (Ashihara et al., 2015). Este composto atua como um agente de detoxificação, ajudando a planta a neutralizar compostos tóxicos e a lidar com condições adversas, como seca, salinidade e ataques de patógenos (Ashihara et al., 2015). Além disso, a trigonelina está envolvida na regulação do ciclo do ácido nicotínico, um aspecto importante para o metabolismo energético e a manutenção do equilíbrio redox celular (Ashihara et al., 2015).

Altas concentrações de trigonelina nos tecidos da cana-de-açúcar geralmente indicam que a planta está enfrentando estresse fisiológico. Este acúmulo é uma resposta adaptativa, sugerindo que a planta está ativando seus mecanismos de

defesa para lidar com condições desfavoráveis, como ataques de insetos, déficit hídrico ou outros fatores ambientais (Ashihara et al., 2015). Em situações de herbivoria, por exemplo, a trigonelina pode ser depletada, pois é utilizada ou redirecionada para outras vias metabólicas de defesa (Sabino et al., 2019). Assim, níveis elevados de trigonelina são considerados indicadores de que a planta está em estado de alerta metabólico, buscando proteger-se e manter sua homeostase.

Quando submetida ao estresse abiótico, como a falta de água, a planta intensifica o acúmulo de alcaloides, aminoácidos e outros metabólitos secundários. Essa resposta adaptativa é fundamental, pois os alcaloides desempenham papéis cruciais na regulação osmótica, na proteção contra o estresse oxidativo e na defesa contra patógenos, conforme apontado por Yang et al. (2023), Yang et al. (2022), Williams et al. (2016) e Rao et al. (2022). Assim, embora o acumulado de alcaloides funcione como um mecanismo de defesa, ele também é um sinal claro de que a planta não se encontra em condições ideais de saúde (Yang et al., 2023; Yang et al., 2022).

Por fim, a análise dos alcaloides revelou um padrão variável para a trigonelina, que se correlaciona com respostas antioxidantes e sinalização de estresse. A diminuição observada nos tratamentos T3 e T4 pode ser interpretada como um reflexo da inibição de vias de defesa, enquanto a recuperação em T6 e T7 indica reativação do metabolismo secundário devido à combinação de bioinsumos, que potencialmente resgatam a diversidade microbiana e estimulam o metabolismo da planta.

Em síntese geral, os dados sugerem que o tratamento com *B. subtilis* isolado (T2) é o mais efetivo na maximização do acúmulo de compostos benéficos, como sacarose e ácidos orgânicos, implicando em uma eficiência metabólica e energética superior. Em contrapartida, os tratamentos (T3 e T4) demonstram ter um impacto negativo significativo sobre o metabolismo, interferindo na microbiota e na funcionalidade da planta. A introdução de bioestimulantes (T6) e misturas (T7), por sua vez, parece restaurar parcialmente os efeitos metabólicos positivos, evidenciando a importância da sinergia entre microrganismos e insumos naturais na promoção da saúde e vitalidade da planta. A análise comprova a relação intrínseca entre o potencial metabólico das plantas, a presença de *B. subtilis* e a minimização de interferências químicas adversas.

Pode-se dizer assim que os ácidos identificados desempenham um papel importante na interação planta-microrganismos, levando em conta especialmente o contexto da interação com simbioses de micorrizas com importante papel na fixação de nitrogênio (Kulma et al. 2019). Esses ácidos podem ser exsudados pelas raízes das plantas, influenciando a disponibilidade de nutrientes no solo e a comunicação com os microrganismos do solo. Além disso, os ácidos orgânicos podem desencadear respostas metabólicas nos microrganismos do solo, afetando sua atividade e função (Kulma et al. 2019).

Além disso diversos desses compostos são responsáveis por repostas fisiológicas a condições adversas de crescimento e desenvolvimento, como estresse hídrico, o nível de ácido málico aumenta significativamente em plantas submetidas a estresse hídrico prolongado, e esse aumento está associado à melhoria da tolerância à seca (Khan et al., 2020).

Uma forma de observar os dados com a amplitude e complexidade, ocorre através de análises multiparamétricas, que permitem de uma vez só integrar todas as variáveis. Deste modo a análise de componentes principais (PCA) permite a visualização gráfica entre os tratamentos e as variáveis nas diversas condições de estudo (Figura 11 a 14).

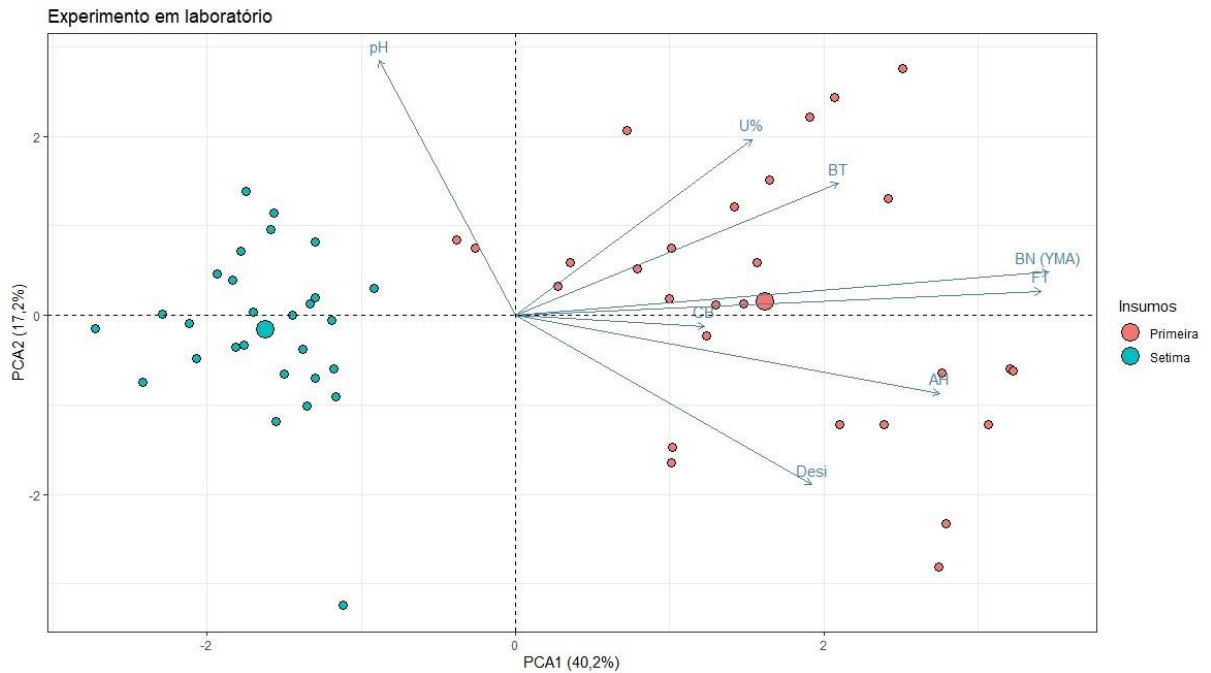


Figura 11. Análise de Componentes Principais (PCA) para a condição *in vitro* (Microcosmos).

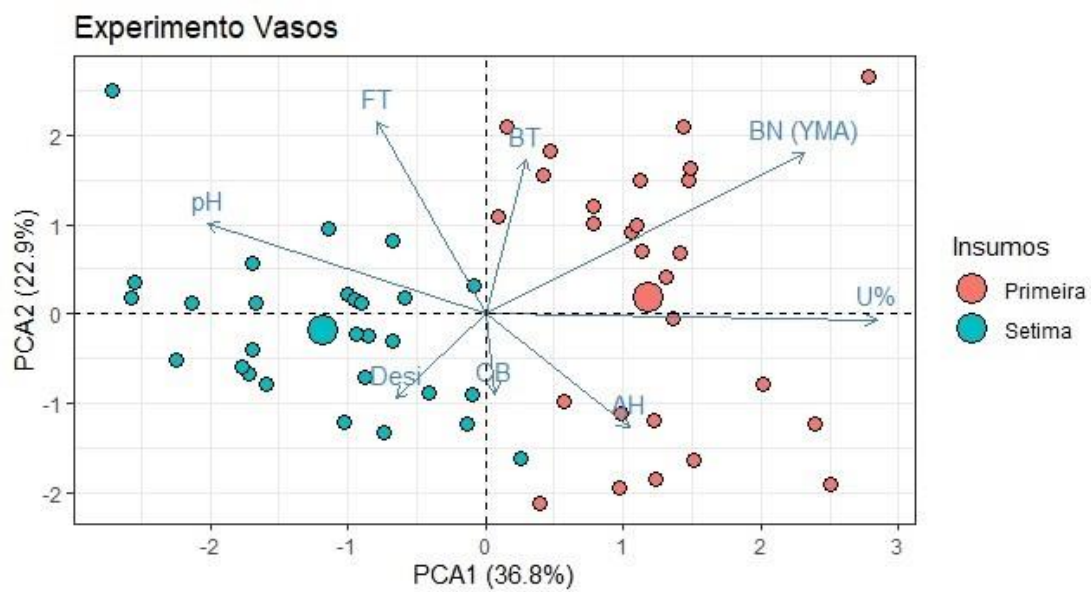


Figura 12. Análise de Componentes Principais (PCA) para a condição de vasos.
Fonte: Autor.

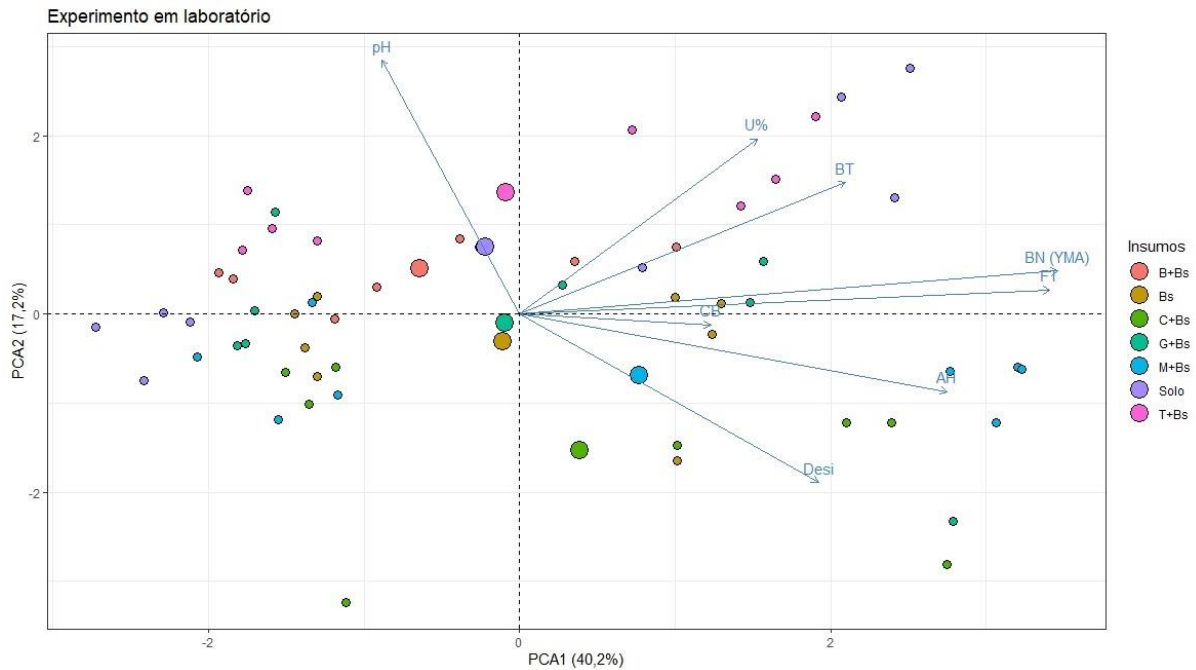


Figura 13. Análise de Componentes Principais (PCA) para os tratamentos em condição *in vitro* (Microcosmos) para os tratamentos individuais.

Fonte: Autor.

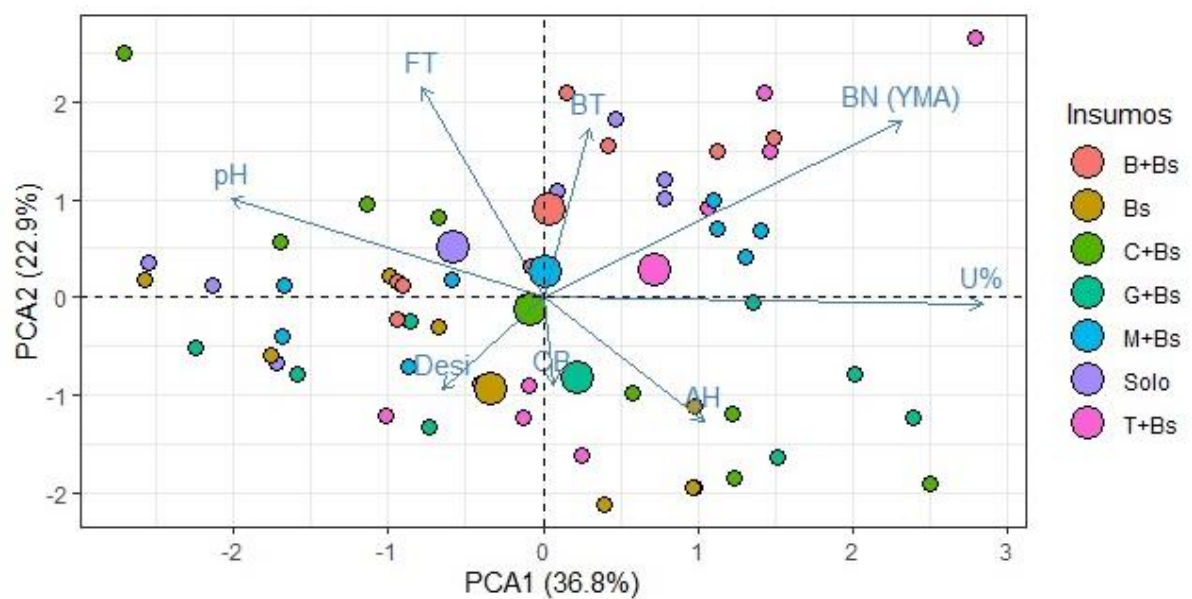


Figura 14. Análise de Componentes Principais (PCA) para os tratamentos em condição de vaso para os tratamentos individuais.

Fonte: Autor.

A análise de componentes principais (PCA) indica que a variabilidade nas respostas está fortemente relacionada aos tratamentos aplicados, evidenciando a complexidade das interações que influenciam o funcionamento do solo (Martins et al.,

2025). Os componentes juntos abrangeram 59,7% da variação total dos dados. Compreender essas dinâmicas é importante para o manejo sustentável do solo, permitindo que a aplicação de insumos não comprometa os benefícios ecológicos oferecidos por microrganismos benéficos (Han et al., 2006).

Além disso, a PCA destacou as mesmas variáveis que apresentaram significância nos testes univariados, reforçando a coerência entre as análises. Embora o carbono da biomassa microbiana (CB) não tenha diferido estatisticamente, seu vetor aparece nas figuras devido à correlação com variáveis relevantes um comportamento típico em análises multivariadas (Jolliffe e Jorge, 2016).

No microcosmo (Figura 13), a PCA revelou uma separação clara entre os tratamentos, indicando forte influência das variáveis microbianas e bioquímicas. Desidrogenase (Desi), atividade hidrolítica (AH), fungos totais (FT) e bactérias fixadoras de nitrogênio (BN) foram os principais vetores associados à dispersão, em concordância com as diferenças apresentadas na Tabela 5. As maiores variações observadas nessas variáveis sugerem que os insumos químicos, em interação com *B. subtilis*, modificaram intensamente os processos microbianos, possivelmente por mecanismos sinérgicos ou antagonistas, conforme discutido por Berg et al. (2020). Apesar de os vetores estarem relativamente agrupados indicando respostas semelhantes entre as variáveis os tratamentos aparecem distantes entre si, demonstrando que os efeitos sobre a microbiota foram intensos e diferenciados no microcosmo.

Em contraste, na condição de vasos (Figura 14), os vetores estão mais dispersos, refletindo relações mais complexas entre as variáveis. Contudo, os tratamentos ficaram mais próximos, revelando efeitos mais sutis. Esse comportamento é coerente com a Tabela 6, na qual as diferenças significativas foram menos expressivas. A menor separação entre os tratamentos indica que a heterogeneidade do solo e o estágio inicial das plantas atenuaram as respostas microbianas, embora incrementos em BT, BN e Desi demonstrem que *B. subtilis* e alguns insumos ainda exerceram influência.

Ao observar a primeira e a última avaliação de cada experimento (microcosmo e vaso) (Figuras 11 e 12), nota-se uma completa distinção entre os períodos de avaliação, com a primeira apresentando pontos mais dispersos e a última com pontos

agrupados, indicando uma tendência de homogeneidade das condições ao longo do tempo. No entanto, ao analisar os comportamentos dos tratamentos de forma individual, verifica-se uma diversidade de respostas em todos os tratamentos, sem formação de grupos homogêneos em nenhuma das condições avaliadas (Figuras 13 e 14).

No microcosmos, observou-se que a introdução de *B. subtilis* junto a outros agroquímicos resultou em variações significativas atividade enzimática mesmo com redução nas populações microbianas, na maioria dos tratamentos, reforçando a hipótese de sinergia entre os componentes (Berg et al., 2019). Esse efeito sinérgico sugere que a combinação de diferentes insumos não apenas favorece a umidade (Wang et al., 2019) e a decomposição de matéria orgânica, mas também propicia um ambiente mais diversificado, essencial para uma microbiota ativa que suporte o crescimento da cana-de-açúcar (Berg et al., 2019). Assim, o uso de agroquímicos deve ser pensado de maneira estratégica, de forma que com a adoção de práticas de manejo que promovam a atividade microbiana, direcionando a agricultura para um modelo mais sustentável.

Considerando as condições climáticas e a variabilidade dos insumos, um planejamento estratégico dos tratamentos e aplicação de insumos deve levar em conta o momento certo de manejo da cana-de-açúcar. Isso inclui a aplicação em momentos críticos, como o início e o desenvolvimento do crescimento da cana, onde a ciclagem de nutrientes e a taxa de atividade microbiana são mais impactantes (Tabela 5 e 6). Ao alinhar as práticas agrícolas aos ciclos biológicos do solo e das plantas, buscamos um equilíbrio que permita garantir produtividade e, ao mesmo tempo, preservar e enriquecer o solo, promovendo um cenário agrícola sustentável para o futuro (Berg et al., 2019).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos microcosmos evidenciaram que a interação entre *B. subtilis* e diferentes insumos agrícolas pode gerar efeitos sinérgicos ou inibitórios sobre a microbiota e as propriedades do solo. Em condições controladas (microcosmos), a combinação entre *B. subtilis* e Trichodermil® favoreceu o aumento da umidade, enquanto o tratamento Mix promoveu maior atividade hidrolítica e incremento nas populações de fungos totais (FT) e bactérias fixadoras de nitrogênio (BN), sem alterar de forma expressiva o pH e o carbono da biomassa microbiana (CB). Por outro lado, o Comet® apresentou efeito inibitório sobre a umidade e sobre a população de bactérias totais (em valores absolutos). A aplicação isolada de *B. subtilis* intensificou a atividade metabólica microbiana (Desi.), porém reduziu alguns grupos específicos (FT), sugerindo um possível efeito de seleção dentro da comunidade microbiana.

No experimento conduzido em vasos o tratamento com *B. subtilis* elevou a atividade da desidrogenase junto ao tratamento com *Trichoderma* aumentou a atividade hidrolítica. O Biozyme® destacou-se por promover elevação nos valores de bactérias totais, fungos totais e bactérias fixadoras de nitrogênio. Além disso, as combinações Biozyme® + *B. subtilis* e Mix + *B. subtilis* favoreceram maior altura de plantas, maior número de folhas e incremento da massa fresca aérea, em comparação ao controle (tanto em estatística quanto em valores absolutos).

Esses resultados sugerem que a coinoculação de *B. subtilis* com agroquímicos pode potencializar a ciclagem de nutrientes e contribuir para a manutenção da saúde do solo, porém aspectos biométricos podem não apresentar alterações. De forma geral, o estudo demonstra que o uso combinado de *B. subtilis* com insumos selecionados é uma estratégia promissora para conciliar produtividade e sustentabilidade na cultura da cana-de-açúcar, desde que se considerem possíveis efeitos antagônicos de alguns produtos sobre a microbiota.

Entretanto, por se tratar de resultados obtidos em microcosmos e em condições controladas de casa de vegetação (vasos), torna-se necessária a realização de ensaios em campo, em diferentes tipos de solo e sistemas de manejo, a fim de validar,

ajustar doses, definir combinações e determinar os momentos de aplicação mais adequados para uso em escala comercial.

REFERÊNCIAS

Abdelnur PV (2011) Metabolômica e Espectrometria de Massas. **Circular Técnica** 10:1-4.

Adam G, Duncan H (2001) Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology e Biochemistry** 33(7-8):943-951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)

Adeniji AA, Babalola OO, Loots DT (2020) Metabolomic applications for understanding complex tripartite plant-microbes interactions: Strategies and Perspectives. **Biotechnology Reports** 25:e00425. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00425>

Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Appl Microbiol Biotechnol** 85, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2196-0>

Agostini-Costa TS, Vieira RF, Bizzo HR, Silveira D, Gimenes MA (2012) Secondary metabolites. In.: Dhanarasu S (Ed.) Chromatography and its applications. IntechOpen: London, 8:131-156. <http://doi.org/10.5772/35705>

AGROFIT - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, D.F. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofitcons/principalagrofitcons> Acesso em: 25 jun 2020.

Ahmed T, Yao Y, Li B, Qi Y, Negm S, Qi X, Ali HM, El-Kott AF, Masood HA, Hussain S, Shahid M, Noman M, Xu L (2023) Fertilization of Microbial Composts: A Technology for Improving Stress Resilience in Plants. **Plants** 12(20), 3550. <https://doi.org/10.3390/plants12203550>

Alef K (1995) Estimation of soil respiration. In.: Ale K, Nannipieri P (Eds.) Methods in Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, New York. p. 464-470.

Alves LC, Silva JFM, Tornisiello DC, Betioli Junior E, Andreote FD, Pauli G. (2023) Soil enzyme activities and microbial community modulation after addition of poultry litter amendment enriched with *Bacillus* spp. **Ciência E Agrotecnologia**, 47, e006223. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202347006223>

Andres A, Machado SLO (2004) Plantas daninhas em arroz irrigado. In.: Gomes AS, Magalhães Jr AM. (Eds.). Arroz irrigado no sul do Brasil. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica. p. 457-546.

Araújo FAD (2017) Intensificação do processo de purificação do caldo da cana-de-açúcar por decantação química e adsorção. 233 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). UFPE-Recife.

Ashihara H, Ludwig I, Katahira R, Yokota T, Fujimura T, Crozier, A (2015) Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in planta and in human health. **Phytochemistry Reviews**, 14, 765-798. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9375-z>

Avis T, Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2008) Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil biology and biochemistry** 40(7):1733-1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>

Aviz RO, Campos JR, Silva DEO, Barbosa LMP, Costa RM, Borges JWP, Leite MRL, Rocha SMB, Morais PGC, Daula GA, Pereira APA, Medeiros EV, Araújo ASF (2025) Microbial biomass and enzymatic activity in the rhizosphere of prickly-pear cactus genotypes inoculated with *Bacillus subtilis* and Paeni *Bacillus* sp. **Scientific Reports** 15(1):1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-13708-7>

Attademo AM, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Repetti MR, Sanchez-Hernandez JC (2021) Enzyme Activities as Indicators of Soil Quality: Response to Intensive Soybean and Rice Crops. **Water, Air, e Soil Pollution**, 232(7). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05211-2>

Backer R, Rokem J, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S, Smith DL (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science** 9:1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

Bandyopadhyay, S., Maiti, S. K. (2021) Different Soil Factors Influencing Dehydrogenase Activity in Mine Degraded Lands—State-of-Art Review. **Water, Air, and Soil Pollution**, 232(9). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05302-0>

Basu S, Rabara R, Negi S (2017) Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. **Plant Gene** 12:43-49. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.004>

Baum R, Bieńkowski J (2020) Eco-efficiency in measuring the sustainable production of agricultural crops. **Sustainability**, 12(4). <https://doi.org/10.3390/su12041418>

Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology** 35(4):1044–1051. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600020>

Benício L (2022) Overview of the use of phosphate fertilizers in Brazil, a review. *agri-environmental sciences*. **Agri-Environmental Sciences** 8(2): p. 1-12. <https://doi.org/10.36725/agries.v8i2.7761>

Berg S, Dennis P, Paungfoo-Lonhienn C, Anderson J, Robinson N, Brackin R, Royle A, Dibella L, Schmidt S (2019) Effects of commercial microbial biostimulants on soil and root microbial communities and sugarcane yield. **Biology and Fertility of Soils** 56:565-580. <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01412-4>

Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH, Kazou M, Kinkel L, Lange L, Lima N, Loy A, Macklin JA, Maguin E, Mauchline T, McClure R, Mitter B, Ryan M, Sarand I, Smidt H, Schelkle B, Roume H, Kiran SG, Selvin J, Souza RSC, Overbeek LV, Singh BK, Wagner M, Walsh A, Sessitsch A, Michael Schlöter (2020) Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome** 8, 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

Blake C, Kovács ÁT, Christensen MN (2020) Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 34(1):15–25. <https://doi.org/10.1094/mpmi-08-20-0225-cr>

Braga-Junior GM, Colonia BSO, Chagas LFB, Scheidt GN, Miller LO, Chagas-Junior AF (2017) Soybean growth promotion and phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* strains in greenhouse. **International Journal of Current Research**, 9(5):50914-50918.

Brankatschk R, Towe S, Kleineidam K, Schlöter M, Zeyer J (2011) Abundances and potential activities of nitrogen cycling microbial communities along a chronosequence of a glacier forefield. **ISME Journal** 5:1025-1037. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.184>

Briat JF, Curie C, Gaymard F (2007) Iron utilization and metabolism in plants. **Current opinion in Plant Biology** 10(3):276-282. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.003>

Brouquisse R, James F, Pradet A, Raymond P (1992) Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. **Planta** 188, 384–395. <https://doi.org/10.1007/BF00192806>

Canellas LP, Olivares FL (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 1(3). <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>

Cara DVC, Rocha DL, Cunha CD, Sérvulo EFC (2012) Solubilização Biológica de Potássio. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI. 42 p.

Carbonell G, Pablos M, Garcí P, Ramos C, S´Anche P, Fern´Andez C, Tarazona, JV (2000) Rapid and cost-effective multiparameter toxicity tests for soil microorganisms. **Science of Total Environment**. 247:143–150.

Carneiro FF, Rigotto RM, Augusto LGS, Friedrich K, Búrigo AC (2015) Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV/Expressão Popular. 628 p.

Casaroli D, Van-Lier QJ (2008) Critérios para determinação da capacidade de vaso. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 32:59-66.

Casida LE, Klein DA, Santoro T (1964) Soil dehydrogenase activity. **Soil Science** 98:371-376.

Castro-Moretti FR, Gentzel IN, Mackey D, Alonso AP (2020) Metabolomics as an emerging tool for the study of plant–pathogen interactions. **Metabolites** 10(2):52. <https://doi.org/10.3390/metabo10020052>

Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena M (2011) **Controle biológico de doenças de plantas baseado em *Bacillus***. In.: Stoytcheva, M. (ed.). Pesticides in the modern world: pesticides use and management. Londres: Rijeka: InTech, p. 273-302.

Christofolletti CA, Souza CP, Guedes TA, Ansoar-Rodríguez Y (2017) O emprego de agrotóxicos na cultura de cana-de-açúcar. In.: Fontanetti CS, Bueno OC (Eds) Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Bauru: Canal6 editora, p. 51-61.

Clark M, Tilman D (2017) Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice. **Environmental Research Letters**, 12. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa6cd5>

Clément BJP, Delhayé HL, Triffault-Bouchet GG (2014) Comparison of laboratory batch and flow-through microcosm bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 108:217-223. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.015>

CONAB (2025) Companhia Nacional de Abastecimento (Brasil). Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar SAFRA 2025/26. Brasília: Conab, 2025. Disponível em: <https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/produtos-360.html> Acesos em 06 de outubro de 2025.

Colla TS, Andreazza R, Bücken F, Souza MM, Tramontini L, Prado GR, Frazzon APG, Camargo FAO, Bento FM (2014) Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. **Environmental Science and Pollution Research** 21(4):2592-2602.

Costa DAS, Cardoso AF, Castro GLS, Júnior DDS, Silva TC, Silva GB (2022) Co-Inoculation of *Trichoderma asperellum* with *Bacillus subtilis* to Promote Growth and Nutrient Absorption in Marandu Grass. **Applied and Environmental Soil Science**, 2022, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2022/3228594>

Coutinho FP (2012) Fungos solubilizadores de fosfato na rizosfera de videira (*Vitis vinifera* L.): ocorrência e aplicação. 89 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – UFPE, Recife.

Cusaac JPW, Mimbs WH, Belden JB, Smith LM, McMurry ST (2017) Factors influencing the toxicity of headline® fungicides to terrestrial stage toads.

Environmental Toxicology and Chemistry 36(10):2679-2688.
<https://doi.org/10.1002/etc.3816>

Dalzoto L (2017) Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão crioulo após tratamento com diferentes doses de *Trichoderma harzianum*. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) – UFFS: Erechim.

Daunoras J, Kačergius A, Gudiukaitė R (2024) Role of soil microbiota enzymes in soil health and activity changes depending on climate change and the type of soil ecosystem. **Biology**, 13(2), 85. <https://doi.org/10.3390/biology13020085>

Di Yn, Kui L, Singh P, Liu LF, Xie LY, He LL, Li FS (2023) Identification and Characterization of *Bacillus subtilis* B9: A Diazotrophic Plant Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated from Sugarcane Root. **Journal of Plant Growth Regulation** 42:1720–1737. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10653-x>

Diaz PAE (2018) *Bacillus* spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão. 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal.

Dick WA, Cheng L, Wang P (2000) Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. **Soil Biology and Biochemistry** 32:1915–1919. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00166-8)

Eastburn DM, Butler EE (1991) Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma Harzianum*. **Mycologia** 83(3):257-263.

Emon JMV (2020) Omics in fruits: concepts and application, Fruits crops: diagnosis and management of nutrient constraints. In.: Srivastava AK, Hu C (Eds.) Fruits Crops. 121-130 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818732-6.00010-1>

Expósito A, Velasco F. (2020) Exploring environmental efficiency of the European agricultural sector in the use of mineral fertilizers. **Journal of Cleaner Production**, 253, 119971. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119971>

Es-Soufi R, Tahiri H, Azaroual L, El Oualkadi A, Martin P, Badoc A, Lamarti A (2020) *In vitro* Antagonistic Activity of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Colletotrichum acutatum*. **Advances in Microbiology** 10(3), 2020. <http://doi.org/10.4236/aim.2020.103008>

Estrada GA, Baldani VLD, Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI (2013) Selection of phosphate solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil** 369: 115 129. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>

Fen S (2001) Characteristics of sugarcane fertilizer demand and fertilization technology. **Applied Technology in Rural Areas** 12(2):15.

<https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-7103.2001.02.015>

Feng Y, Huang Y, Zhan H, Bhatt P, Chen S (2020) An Overview of Strobilurin Fungicide Degradation: Current Status and Future Perspective. **Frontiers in Microbiology** 11(189):1-11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00389>

Fernandes MM, Silva MD, Veloso MEC, Oliveira TM, Fernandes MRM, Sampaio FMT. (2013) Biomassa microbiana e matéria orgânica em áreas desertificadas revegetadas com pinhão-mansão solteiro e consorciado com gramínea no Sui do Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 8(3):464-469. 2013. <https://doi.org/10.5039/agraria.v8i3a2392>

Ferreira AS, Camargo FAO, Vidor C (1999) Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 23:991-996.

Ferreira RJ, Soares PLM, Carvalho RB, Santos JM, Batista ESP, Barbosa JC (2007) Espécies de *Bacillus* no controle dos nematoides das galhas e no desenvolvimento de cana-de-açúcar. **Nematrópica** 47(2):106–113. <https://doi.org/10.1080/03235400600655347>

Fonseca M, Bossolani J, Oliveira S, Moretti L, Portugal J, Scudeletti D, Oliveira E, Crusciol C (2022) *Bacillus subtilis* Inoculation Improves Nutrient Uptake and Physiological Activity in Sugarcane under Drought Stress. **Microorganisms**, 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040809>

Freire FJ (2001) Sistema para cálculo do balanço nutricional e recomendação de corretivos e fertilizantes para cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Ciência do solo). Universidade Federal de Viçosa. 2001

Fulcher J, Wayment DG, White PM, Webber CL (2014) Pyraclostrobin wash-off from sugarcane leaves and aerobic dissipation in agricultural soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(10):2141-2146. <https://doi.org/10.1021/jf405506p>

Gabardo G, Dalla-Pria M, Carneiro DE, Barbosa EAA (2020) Physiological responses of soybean cultivars NA5909 and TMG7062 subjected to different products for fungal disease control in the field. **Brazilian Journal of Development** 6(3): 15673-15689. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-444>

Gadhavre KR, Devlin PF, Ebertz A, Ross A, Gange A, (2018) Soil Inoculation with *Bacillus* spp. Modifies Root Endophytic Bacterial Diversity, Evenness, and Community Composition in a Context-Specific Manner. **Microb Ecol** 76, 741–750. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1160-x>

Gauvry E, Mathot A, Couvert O, Leguérinel I, Coroller L (2021) Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* bsb1. **International Journal of Food Microbiology**, 337:108915. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108915>

Gogoi B, Kalita B, Sutradhar P, Sharma KK, Bhupenchandra I (2021) Soil carbon, microbial biomass carbon, soil health and productivity of toria (*Brassica campestris* L.) crop as affected by the application of organic manures. **Journal of Environmental Biology** 42:1379-1386. <https://doi.org/10.22438/jeb/42/5/MRN-1648>

Gomes CJA (2014) *Macrophomina phaseolina* em soja – padrão de ocorrência, danos e aspectos físico-químicos e biológicos do solo relacionados à doença. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UENP: Luiz Meneghel.

Government of Canada (2018) - *Bacillus megaterium*– information sheet. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/chemical-substances/fact-sheets/chemicals-glance/Bacillus-megaterium.html>. Acesso em 07 de outubro de 2025.

Gu Y, Wang J, Cai W, Li G, Mei Y, Yang S (2021) Different Amounts of Nitrogen Fertilizer Applications Alter the Bacterial Diversity and Community Structure in the Rhizosphere Soil of Sugarcane. **Frontiers in Microbiology**, 12: 721441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.721441>

Gutierrez MM, Cameron-Harp MV, Chakraborty PP, Stallbaumer-Cyr EM, Morrow JA, Hansen RR, Derby MM (2022) Investigating a microbial approach to water conservation: effects of *Bacillus subtilis* and surfactin on evaporation dynamics in loam and sandy loam soils. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 6:95959. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.959591>

Hall RD (2006) Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist** 169(3):453-468. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x>

Halfeld-Vieira BA, Santos MS (2018) Compatibilidade entre ativos biológicos bacterianos e agroquímicos utilizados na produção de mudas de cana-de-açúcar. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 77:1-28.

Han G, Zhou G, Xu Z, Yang Y, Liu J, Kui-qiao S (2007) Biotic and abiotic factors controlling the spatial and temporal variation of soil respiration in an agricultural ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry** 39(2):418-425. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.08.009>

Han, H.S., Supanjani, E. and Lee, K.D. (2006) Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. **Plant Soil Environment** 52(3):130–136.

Han L, Wang Y, Wang Y, Xu H, Liu M, Nie J, Huang B, Wang Q (2025) Pyraclostrobin repeated treatment altered the degradation behavior in soil and negatively affected soil bacterial communities and functions. **J Hazard Mater.** v. 5, n. 485: 136876. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136876>

Harthmann OEL, Mógor F, Wordell-Filho JA, Da-Luz WC (2010) Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural** 40(2):462-465. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-847820090050002>

Hashem A, Baby T, Elsayed FAA (2019) *Bacillus subtilis*, A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 26(6):1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>

Hellequin E, Monard C, Chorin M, Le bris N, Daburon V, Klarzynski O, Françoise Binet F (2020) Responses of active soil microorganisms facing to a soil biostimulant input compared to plant legacy effects. **Sci Rep** 10:13727. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70695-7>

Hoffmann RB, Moreira ÉEA, Hoffmann GSS, Araújo NSF (2018) Efeito do manejo do solo no carbono da biomassa microbiana. **Brazilian Journal of Development** 1(1):168-178. <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/738>

Hu M, Liu X, Wu X, Don F, Xu J, Chen W, Zheng Y (2017) Characterization of the fate and distribution of ethiprole in water fish-sediment microcosm using a fugacity model. **Science of the Total Environment** 576:696-704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.087>

Huang W, Lu Y, Chen L, Sun, An Y (2021) Impact of pesticide/fertilizer mixtures on the rhizosphere microbial community of field-grown sugarcane. **3 Biotech**, 11. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02770-3>

IBGE (2015) Manual Técnico de Pedologia. 3ª ed. n. 4. Rio de Janeiro: IBGE. 428 p.

Iqbal A, Dong Q, Wang X, Gui H, Zhang H, Zhang X, Song M (2020) Variations in nitrogen metabolism are closely linked with nitrogen uptake and utilization efficiency in cotton genotypes under various nitrogen supplies. **Plants** 9(2):250. <https://doi.org/10.3390/plants9020250>

James EK, Baldani JI (2012) The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil** 356:1-3. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1317-1>

Jan F, Arshad H, Ahad M, Jamal A, Smith D (2023) *In vitro* assessment of *Bacillus subtilis* fj3 affirms its biocontrol and plant growth promoting potential. **Frontiers in Plant Science** 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1205894>

Jensen C, Pang J, Gottardi M, Kračun S, Svendsen B, Nielsen K, Kovács Á, Moelbak L, Fimognari L, Husted S, Schulz A (2024) *Bacillus subtilis* promotes plant phosphorus (P) acquisition through P solubilization and stimulation of root and root hair growth. **Physiologia plantarum**, 176(3): e14338. <https://doi.org/10.1111/ppl.14338>

Jiadosk CJ, Toppa EVB, Julianetti A, Hulshof T, Ono EO, Rodrigues JD (2011) Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias** 3(2): 169-175. <https://doi.org/10.5777/paet.v3i2.1064>

Jolliffe IT, Jorge C (2016) Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**. 37420150202 <http://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>

Kandeler E (2024) Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their functions. In.: Paul EA, Frey SD (Eds.) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. p. 193-227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822941-5.00007-7>

Karpouzas DG, Kandeler E, Bru D, Friedel I, Auer Y, Kramer S, Vasileiadis S, Petric I, Udikovic-Kolic N, Djuric S, Martin-Laurent F (2014) A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial Community. **Soil Biology and Biochemistry** 75:282-291. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.04.022>

Khan MS, Almas Z, Wani PA (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. **Agronomy for Sustainable Development** 27(1):29-43. <https://doi.org/10.1051/agro:2006011>

Khan N, Ali S, Zandi P, Mehmood A, Ullah S, Ismail MI, Shahid MA, Babar MA (2020) Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. **Pakistan Journal of Botany** 52(2):607-616. <http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2>

Khosrozadeh S, Nourbakhsh F (2023) L-arginine application triggered soil hydrolytic activity. **Soil Science Annual** 74(1):161147. <https://doi.org/10.37501/soilsa/161147>

Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2010) NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature protocols**, 5(3):536–549.

Köehle H, Grossmann K, Jabs T, Gerhard M, Kaiser W, Glau J, Conrath U, Seehaus K, Herm S (2002) Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In.: Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Lyr H (Eds.) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. Bonn: AgroConcept GmbH. p. 61–74.

Koul B, Yakoob M, Shah M (2021) Agricultural waste management strategies for environmental sustainability. **Environmental research** v. 206: 112285. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112285>

Krebs CJ (2014) *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 6ª ed. Benjamin Cummings. São Francisco. 653 p.

Kulma A, Szopa, J., Czyczyło-Mysz I (2019) The role of organic acids in plant adaptation to nutrient deficiency and heavy metal toxicity. **Plant, Cell e Environment** 42(3):841-853. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.10.013>

Labud V, Garcia C, Hernandez T (2007) Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere** 66(10):1863-1871.

Lanna-Filho R, Ferro HM, Pinho RSC (2010) Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** 4(2):12-20.

Larrahondo JE, Morales AA, Victoria MH, Jaramillo A (2000) Compuestos orgánicos en vinaza. **Carta Trimestral Cenicana** 22(3):5-7.

Li X, Sinclair T, Bagherzadi L (2016) Hydraulic Conductivity Changes in Soybean Plant-Soil System with Decreasing Soil Volumetric Water Content. **Journal of Crop Improvement**, 30:713-723. <https://doi.org/10.1080/15427528.2016.1231729>

Lima FF, Nunes LAPL, Figueiredo MVB, Araújo FF, Lima LM, Araújo, ASF (2011) *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 6(4):657-661. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119021237016>

Lobo-Júnior M, Machado-Rosa TA, Geraldine AM (2019) Uso do *Trichoderma* na cultura do feijão-comum. In.: Meyer MC, Mazaro SM, Silva JC (Eds.). *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília, DF: EMBRAPA. 393-406 p.

Lopes AAC, Sousa DMG, Chaer GM, Reis-Júnior FB, Goedert WJ, Mendes IC (2013) Interpretation of Microbial Soil Indicators as a Function of Crop Yield and Organic Carbon. **Soil Science Society of America Journal** 77:461–472. <https://doi.org/10.2136/sssaj2012.0191>

Machado AP, Costa MJN (2017) Biocontrole do fitonematoide *Pratylenchus brachyurus* *in vitro* e na soja em casa de vegetação por *Bacillus subtilis*. **Revista Biociências** 23(1):83 –94. <https://periodicos.unitau.br/biociencias/article/view/2365>

Madhuri KVN, Sarala NV, Kumar MH, Rao MS, Giridhar V (2013) Influence of micronutrients on yield and quality of sugarcane. **Sugar Tech** 15:187-191.

Martin JP (1950) Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science** 69:215-232.

Martins HL, Korasaki V, Campalle AN, Zanqueta JFD, Oliveira AB, Perreira M, Alves PL (2025) Effects of Peanut Insertion on Soil Dynamics in Fallow Areas. **Agronomy** 15(4):912. <https://doi.org/10.3390/agronomy15040912>

Matheson F (2008) Microcosm. *Encyclopedia of Ecology*. 1 ed. p. 2393-2397.

Marulanda A, Barea JM, Azcón R (2009) Stimulation of plant growth and drought

tolerance by native microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from Dry Environments: Mechanisms Related to Bacterial Effectiveness. **Journal of Plant Growth Regulation** 28(2):115-124. <https://doi.org/10.1007/s00344009-9079-6>

McLeod ML, Cleveland CC, Lekberg Y, Maron, JL, Philippot L, Bru D, Callaway RM (2016) Exotic invasive plants increase productivity, abundance of ammonia-oxidizing bacteria and nitrogen availability in intermountain grasslands. **Journal of Ecology** 104(3):994-1002. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12584>

Meena VS, Meena SK, Verma JP, Kumar A, Aeron A, Mishra PK, Bisht JK, Pattanayak M, Naveed AM, Dotaniya ML (2017) Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: **A review. Ecological Engineering**. 107:8–32. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>

Melo IS (2015) Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In.: Melo IS, Azevedo JL (Eds.) *Ecologia microbiana*. 87-116 p.

Mendes IC, Chaer GM, Sousa DMG, Reis-Junior FB, Silva ODD, Oliveira MIL, Lopes AAC, Souza LM (2020) Bioanálise de solo: a mais nova aliada para a sustentabilidade agrícola. **Nutrição de Plantas Ciência e Tecnologia**, 8.

Mierzwa-Hersztek M, Wolny-Koładka K, Gondek K, Gałazka A, Gawryjolek K. (2020) Effect of Coapplication of Biochar and Nutrients on Microbiocenotic Composition, Dehydrogenase Activity Index and Chemical Properties of Sandy Soil. **Waste and Biomass Valorization**, 11(8), 3911–3923. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00757-z>

Morini MSC, Silva OGM, Zambon V, Nocelli RCF (2017) Cultura de cana-de-açúcar: manejo, impactos econômicos, sociais e ambientais. In: Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. Fontanetti C. S. e Bueno O. C. (Eds.) Bauru: Canal 6. 275 p.

Niu H, Pang Z, Fallah N, Zhou Y, Zhang C, Hu C, Lin W, Yuan Z (2021) Diversity of microbial communities and soil nutrients in sugarcane rhizosphere soil under water soluble fertilizer. **PLoS ONE**, 16(1): e0245626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245626>

Ngugia HK, Dedeb S, Delaplaneb KS, Savellea AT, Scherma H (2005) Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control** 33:32-38. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.01.002>

Odum EP, Barret GW (2007) *Fundamentos de Ecologia*. 5ª ed. Thomson Learning., São Paulo. 626 p.

Ofosu R, Agyemang ED, Márton A, Pásztor G, Taller J, Kazinczi G (2023). Herbicide Resistance: Managing Weeds in a Changing World. **Agronomy**, 13(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy13061595>

Oliveira ALM, Canuto EL, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JI (2006) Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant Soil** 284:23–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>

Oliveira, M., Macêdo, G., Martins, J., Silva, V., e Oliveira, A. (2017). Mineral Nutrition and Fertilization of Sugarcane. In: Sugarcane - Technology and Research Empty heading. Oliveira AB (Ed.). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72300>

Oliveira J, Reis H, Araújo J, Bomfim L, Barbosa A (2025) Biodiversidade e a revitalização dos solos – da ação microbiológica à adição de nutrientes para remineralização. **Ciência Florestal** 35:e70819. <https://doi.org/10.5902/1980509870819>

Olsen RA, Bakken LR (1987) Viability of soil bacteria: optimization of plate counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. **Microbial Ecology** 13:59-74. <https://doi.org/10.1007/BF02014963>

Pandey D, Agrawal M, Bohra JS (2014) Effects of conventional tillage and no tillage permutations on extracellular soil enzyme activities and microbial biomass under rice cultivation. **Soil and Tillage Research** 136:51–60. <https://doi.org/10.1016/j.still.2013.09.013>

Pandey K, Saharan BS (2025) Soil microbiomes: a promising strategy for boosting crop yield and advancing sustainable agriculture. **Discovery Agriculture** 3, 54. <https://doi.org/10.1007/s44279-025-00208-5>

Pang Z, Huang J, Fallah N, Lin W, Yuan Z, Hu C (2022) Combining N fertilization with biochar affects root-shoot growth, rhizosphere soil properties and bacterial communities under sugarcane monocropping. **Industrial Crops and Products** 182: 114899. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114899>

Panigrahy N, Priyadarshini A, Sahoo MM, Verma AK, Davery A, Sahoo NK (2022) A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook. **Environmental Technology e Innovation** 27:102423. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102423>

Prabhukhot GS, Eggleton CD, Patel J (2023) Multispecies Bacterial Biofilms and Their Evaluation Using Bioreactors. **Foods**. 12(24):4495. <https://doi.org/10.3390/foods12244495>

Pedraza R (2008) Recent advances in nitrogen fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 125:25–35, 2008. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079>

Pereira W, Leite JM, Hipólito GS, Santos CLR, Reis VM (2013) Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica** 44:363-370. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000200020>

Peters LP, Carvalho G., Martins PF, Dourado MN, Vilhena MB, Pileggi M, Azevedo RA (2014) Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bactéria. **PLoS One** 9:1-12, 2014. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0112271>

Pires ECC (2016) Microbiologia do ciclo do nitrogênio em solos do cerrado. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - UNB, Brasília.

Portilho IIR, Scorza-Júnior RP, Dores EFGC (2014) Determinação de Resíduos dos Agrotóxicos Tiametoxam, Bifentrina e Permetrina em Amostras de solo. **Pesticida Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente** 24(1): 1-12. <https://doi.org/10.5380/pes.v24i1.39009>

Prado RM (2008) Nutrição de Plantas. Universidade Estadual de São Paulo. UNESP:. São Paulo. 2008. 407 p.

Qiao J, Borriss R, Sun K, Zhang R, Chen X, Liu Y, Liu Y (2024) Research advances in the identification of regulatory mechanisms of surfactin production by *Bacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, 23(1):100. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02372-7>

Qiu Z, Paungfoo-LonhienneC, Ye J, Garcia AG, Petersen I, Bella LD, Hobbs R, Ibanez M, Heenan M, Wang W, Reeves S, Schmidt S (2022) Biofertilizers can enhance nitrogen use efficiency of sugarcane. **Environmental Microbiology** 24(8):3655-3671. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16027>

Raij BV, Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JÁ (2001) Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas. 285 p.

Rao M, Duan M, Wei X, Zuo HL, Qamar M, Li M, Han S, Hu L, Wang L (2022) LC-MS/MS-based metabolomics approach revealed novel phytochemicals from sugarcane rind having promising pharmacological value. **Journal of the science of food and agriculture**, 02(14):6632-6642. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12030>

Ray J, Sinclair T (1998) The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. **Journal of Experimental Botany**, 49:1381-1386. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.325.1381>

Reddy SN, Gupta S, Gajbhiye VT (2013) Effect of Moisture, Organic Matter, Microbial Population and Fortification Level on Dissipation of Pyraclostrobin in Soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 91:356–361.

<https://doi.org/10.1007/s00128-013-1045-0>

Reetz HF (2017) Fertilizantes e o seu uso eficiente. Trad. Alfredo S. Lopes. Editora São Paulo: ANDA, 178p.

Rodrigues BN, Almeida FS (2005) Guia de herbicidas. Londrina: IAPAR. 697p.

Rousk J, Rousk J, Bååth E, Brookes P, Lauber C, Lozupone C, Caporaso J, Knight R, Knight R, Fierer N, Fierer N (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, 4:1340-1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>

Ruiz LC (2021) Comparação de métodos de extração abrangentes para estudos metabolômicos em tecidos vegetais empregando folhas de cana-de-açúcar como modelo. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) – UNESP, Araraquara.

Sabino A, Tavares S, Riffel A, Li J, Oliveira D, Feres C, Henrique L, Oliveira J, Correia G, Sabino A, Nascimento T, Hawkes G, Santana A, Holmes E, Bento E (2019) 1H NMR metabolomic approach reveals chlorogenic acid as a response of sugarcane induced by exposure to *Diatraea saccharalis*. **Industrial Crops and Products**, 15: 111651. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111651>

Saharan BS, Nehra V (2011) Plant growth-promoting rhizobacteria: mechanisms and applications. **Agricultural Research**, 1, 223–231.

Salem MA, Souza LP, Serag A, Fernie AR, Farag MA, Ezzat SM, Alseekh S (2020) Metabolomics in the context of plant natural products research: from sample preparation to metabolite analysis. **Metabolites**, 10(1):1-30. 2020. <https://doi.org/10.3390/metabo10010037>

Sánchez-Monedero M, Mondini C, Cayuela M, Roi A, Contin M, Nobili M (2008) Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. **Biology and Fertility of Soils**, 44, pp. 885-890. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0263-1>

Santi C, Bogusz D, Franche C (2013) Biological nitrogen fixation in non legume plants. **Annals of Botany** 111:743-767. <http://doi.org/10.1093/aob/mct048>

Santos CV, Lima RS, Carvalho DS (2017) Impacto de *Trichoderma* e *Bacillus subtilis* na microbiota do solo e fixação biológica de nitrogênio. **Revista Brasileira de Microbiologia**, 48(2):256-263.

Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida JA, Araujo-Filho JC, Lima HN, Marques FA, Oliveira JB, Cunha TJF (2025) Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 6ª ed. ver. e ampl. Brasília, DF: Embrapa. 393 p.

Saravanan VS, Madhaiyan M, Thangaraju M (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* 66:1794–1798. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.067>

Saxena AK, Kumar M, Chakdar H, Anuroopa N, Bagyaraj DJ (2020) *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, 128(6):1583–1594, <https://doi.org/10.1111/jam.14506>

Segato SV, Mattiu CFM, Mozambani AE (2006) Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In.: Segato SV, Pinto AS, Jendiroba E, Nóbrega JCM. Atualização em produção de cana-de-açúcar. 1ª ed. Piracicaba: Livrocere, p. 19-36.

Senseman SA (2007) Herbicide handbook. 9.ed. Lawrence: Weed Science Society of America. 458p.

Shafi J, Tian H, Ji M (2017) *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology e Biotechnological Equipment** 1(1):446-459, 2017. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>

Silva MDS, Cocenza DS, Melo NFSD, Grillo R, Rosa AH, Fraceto LF (2010) Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova** 33: 1868-1873.

Silva VN, Silva LESF, Silva AJN, Stamford NP, Macedo GR (2017) Solubility curve of rock powder inoculated with microorganisms in the production of biofertilizers. **Agriculture and Natural Resources** 51(3):142-147. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.01.001>

Silva MO (2021) Qualidade do solo: indicadores biológicos para um manejo sustentável. **Brazilian Journal of Development**, 7(1):6853-6875.

Silva LDR, Cruz JML (2021) Micronutrient nutrition in sugarcane: a brief review. **Scientia Agraria Paranaensis** 20(4):214-218, 2021. <https://doi.org/10.18188/sap.v20i3.28188>

Sim J, Drigo B, Doolette C, Vasileiadis S, Karpouzas D, Lombi E, (2022) Impact of twenty pesticides on soil carbon microbial functions and community composition. **Chemosphere** 135820. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4124958>

Singh R, Singh P, Li H, Song Q, Gu D, Solanki M, Verma K, Malviya M, Song X, Lakshmanan P, Yang L, Li Y, (2020) Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. **BMC Plant Biology** 20. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02400-9>

Siqueira ACO (2016) Uso de *Metarhizium* spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças. 94 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – ESALQ/USP, Piracicaba.

Sobucki L, Ramos RF, Bellé C, Antoniolli ZI (2019) Manejo e qualidade biológica do solo: uma análise. **Revista Agronomia Brasileira** 3(4):1-4. <http://dx.doi.org/10.29372/rab201904>

Sorheim R, Torsvik VL, Goksoyr J (1989) Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbial Ecology** 17:181-192. <http://doi.org/10.1007/BF02011852>

Stotzky G (1965) Microbial respiration. In.: Black CA (ed.) *Methods of Soil Analysis*. v. 2, Madison: American Society of Agronomy, p. 1151-1572.

Song F, Han X, Zhu X, Herbert S (2012) Response to water stress of soil enzymes and root exudates from drought and non-drought tolerant corn hybrids at different growth stages. **Canadian Journal of Soil Science** 92:501–507.

Souza ED, Costa SEVGA, Anghinoni, I, Carvalho PCF, Andrigueti M, Caio E (2009) Estoque de carbono orgânico e de nitrogênio no solo em sistema de integração lavoura-pecuária em plantio direto, submetido a intensidades de pastejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33:1829-1836. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000600031>

Souza JT, Oliveira AG, Santos CV (2018) Efeitos de *Trichoderma* e *Bacillus subtilis* na atividade enzimática do solo e decomposição da matéria orgânica. **Revista de Ciências Agrárias** 39(4)456-463.

Spertus JV (2021) Optimal Sampling and Assay for Estimating Soil Organic Carbon. **Open Journal of Soil Science**, 11, 93-121. <https://doi.org/10.4236/ojss.2021.112006>

Spolaor LT, Gonçalves LS A, Santos OJAP, Oliveira ALM, Scapim CA, Bertagna FAB, Kuki MC (2016) Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônomo de milho pipoca. **Bragança** 75:33-40. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.330>

Stolf R, Oliveira APR (2020) The success of the Brazilian alcohol program (proálcool) - a decade-by-decade brief history of ethanol in Brazil. **Engenharia Agrícola**, 40(2), 243–248. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v40n2p243-248/2020>

SUGARCANE.ORG. Sustainability the Brazilian Experience. Disponível em: <https://www.sugarcane.org/sustainability-the-brazilian-experience/> Acesso em: 20 de dezembro de 2021.

Swisher, R.; Carroll, G. C (1980) Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbial Ecology* 6:217-226, 1980. <https://doi.org/10.1007/BF02010387>

Szmigielska AM, Van Ree KCJ, Cieslinski G, Huang PM (1997) Comparison of liquid and gas chromatography for analysis of low molecular weight organic acids in rhizosphere soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 28:(1):99-111.

Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A (2017) Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Taylor J, Ball AS (1994) The effect of plant material grown under elevated CO₂ on soil respiratory activity. **Plant and Soil** 162:315-318. <https://doi.org/10.1007/BF01347720>

Taylor JP, Wilson B, Mills MS, Burns RG (2002) Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry** 34:387-401. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00199-7)

Teixeira PC, Donagemma GK, Fontana A, Teixeira WG (2017) Manual de métodos de análise de solo. 3ª ed. rev. e ampl. Brasília, DF: EMBRAPA, 95-116 p.

Thomas AL, Costa JA (2010) Fixação biológica do nitrogênio na soja. In.: Thomas AL, Costa JÁ (Eds.) SOJA: Manejo para alta produtividade de grãos. 113-126 p.

Tleuova AB, Wielogorska E, Talluri VSSLP, Štěpánek F, Elliott CT, Grigoriev DO (2020) Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture. **Journal of Controlled Release**, 326: 468–481. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.035>

UnicaData (2025) Observatório da Cana e Bionergia. Dados de Área e Produção. Disponível em: <https://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=4> Acesso em 07 de outubro de 2025.

UPL (2025) UPL Corp. Biozyme: Fertilizante foliar Mineral Misto. Bula. Disponível em: https://mz.uplcorp.com/download_links/S2eBaA5cb5WYt74w1UcRFXu7Oq65LhRBrfNchPIE.pdf acesso em 06 de outubro de 2025.

Vasques, N. C., Hungria, M., Nogueira, M. A. (2024) Increasing Application of Multifunctional *Bacillus* for Biocontrol of Pests and Diseases and Plant Growth Promotion: Lessons from Brazil. **Agronomy**, 14(8), 1654. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081654>

Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Science Publishers, Oxford, UK.

Voll E (2019) Efeitos alelopáticos do ácido aconítico: considerações e resultados. **Circular Técnica** 153. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1112275>

Xiong R, He X, Gao N, Li Q, Qiu Z, Hou Y, Shen W (2024) Soil pH amendment alters the abundance, diversity, and composition of microbial communities in two contrasting agricultural soils. **Microbiology Spectrum**, 12(8). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04165-23>

Xu, W., Yang, Q., Xie, X., Goodwin, P. H., Deng, X., Zhang, J., Sun, R., Wang, Q., Xia, M., Wu, C., Yang, L. (2022) Genomic and Phenotypic Insights into the Potential of *Bacillus subtilis* YB-15 Isolated from Rhizosphere to Biocontrol against Crown Rot and Promote Growth of Wheat. **Biology**, 11(5), 778. <https://doi.org/10.3390/biology11050778>

Wang Z, Li Y, Zhuang L, Yu Y, Liu J, Zhang L, Gao Z, Wu Y, Gao W, Ding GC, Wang Q (2019) A rhizosphere-derived consortium of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* suppresses common scab of potato and increases yield. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 17:645-653. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.05.003>

Wardle DA, Parkinson D (1990) Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and soil** 122(1):21-28. <https://doi.org/10.1007/BF02851906>

West S, Crouch H (2005) Fundamentos de química analítica. ed.8, Thomson, p. 797-821, 2005.

Wilkerson A, Olapade O (2020) Relationships Between Organic Matter Contents and Bacterial Hydrolytic Enzyme Activities in Soils: Comparisons Between Seasons. **Current Microbiology** 77:3937-3944. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02223-9>

Williams I, Onyenweaku E, Atangwho I. (2016) Nutritional and antimicrobial evaluation of *Saccharum officinarum* consumed in Calabar, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, 15, 1789-1795. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14877>

Yabuki Y, Ohashi M, Imagawa F, Ishiyama K, Beier MP, Konishi N, Umetsu-Ohashi T, Hayakawa T, Yamaya T, Kojima S (2017) A temporal and spatial contribution of asparaginase to asparagine catabolism during development of rice grains. **Rice** 10(3) <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0143-8>

Yadav R, Ror P, Rathore P, Kumar S, Ramakrishna W (2021) *Bacillus subtilis* CP4, isolated from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi promotes biofortification, yield and metabolite production in wheat under field conditions. **Journal of Applied Microbiology**, 131(1), 339–359. <https://doi.org/10.1111/jam.14951>

Yang S, Chu N, Zhou H, Li, J, Feng N, Su J, Deng Z, Shen X, Zheng, D (2022) Integrated Analysis of Transcriptome and Metabolome Reveals the Regulation of Chitooligosaccharide on Drought Tolerance in Sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid) under Drought Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23179737>

Yang S, Chu N, Feng N, Zhou B, Zhou H, Deng Z, Shen X, Zheng, D (2023) Global Responses of Autopolyploid Sugarcane Badila (*Saccharum officinarum* L.) to Drought Stress Based on Comparative Transcriptome and Metabolome Profiling. **International Journal of Molecular Sciences**, 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24043856>

Yao A, Bochow H, Karimov S, Boturov U, Sanginboy S, Sharipov A (2006) Effect of FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. Archives of Phytopathology and Plant Protection 39:323-328. <https://doi.org/10.1080/03235400600655347>

Yasuhara T, Nokihara K (2001) High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of agricultural and food chemistry** 49:4581-4583.

Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Funct Plant Biol.** 36(5):409-430. <http://doi.org/10.1071/FP08288>

Yu K, Rinklebe J (2011) Advancement in soil microcosm apparatus for biogeochemical research. **Ecological Engineering** 37(12):2071-2075. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.08.017>

Zhang C, Zhou T, Zhu L, Juhasz A, Du Z, Li B, Wang J, Wang J, Sun Y (2019) Response of soil microbes after direct contact with pyraclostrobin in fluvo-aquic soil. **Environ Pollut** 255(1):113164. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113164>