

CLEVERSON RODRIGUES

EFICIÊNCIA DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* NA SOLUBILIZAÇÃO DE
FOSFATOS E ADUBAÇÃO FOLIAR EM PLANTAS DE SOJA

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências e Engenharia, Tupã.

Supervisor: Prof. Dr. André Rodrigues dos Reis

Fundação de Estudos Agrícolas e Florestais – Nº Processo 4939

Tupã-SP

2025

Eficiência de *Pseudomonas fluorescens* na solubilização de fosfatos e adubação foliar em plantas de soja

Resumo

O fósforo, essencial para o crescimento das plantas, muitas vezes está em formas insolúveis no solo, tornando-se indisponível. Bactérias solubilizadoras de fósforo convertem esses compostos insolúveis em formas assimiláveis pelas plantas, usando ácidos orgânicos e enzimas. A pesquisa teve como objetivo caracterizar *in vitro* o potencial de solubilização de *P. fluorescens*, estipe BR 14810, sob diferentes fontes de fosfatos (cálcio, alumínio e ferro), e avaliar *in vivo* o efeito da aplicação foliar de doses do microrganismo no desenvolvimento de plantas de soja. Ambos os experimentos foram desenvolvidos seguindo métodos padrões indicados para determinar os efeitos no aspecto *in vitro* e *in vivo*, com análises agronômicas e fisiológica e condicionamento do solo em experimentação em casa de vegetação. De modo geral concluiu-se que há eficácia da presença do produto na solubilidade dos fosfatos *in vitro* e a aplicação foliar de *P. fluorescens* exerceu efeito bioestimulante em plantas de soja com ação no metabolismo fisiológico e incrementos de produtividade superiores ao controle, sendo a condição de solo sem proteção mais promissora no desenvolvimento das plantas.

INTRODUÇÃO

A solubilização de fósforo por bactérias é um fenômeno de grande relevância nos ecossistemas terrestres e aquáticos, desempenhando um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos. O fósforo é um elemento essencial para o crescimento das plantas e, portanto, é um fator crítico na produtividade dos ecossistemas (Lazeris et al., 2021)

No entanto, muitas vezes, o fósforo está presente em formas insolúveis no solo, associados diretamente a cálcio, alumínio ou ferro, na forma iônica de fosfato, tornando-se indisponível para as plantas. Nesse contexto, a capacidade das bactérias de solubilizar o fósforo assume uma importância relevante dentro do agroecossistema (Moreira e Siqueira, 2006; Geng et al., 2022).

As bactérias que desempenham o papel de solubilizadoras de fósforo possuem uma habilidade única de converter compostos de fósforo insolúveis em formas solúveis e assimiláveis pelas plantas. Esse processo envolve a produção de ácidos orgânicos e enzimas que liberam o fósforo das fontes inorgânicas, tornando-o disponível para a nutrição vegetal.

Dessa forma, esses microrganismos atuam como intermediários vitais no ciclo do fósforo, facilitando a transferência desse nutriente dos compartimentos geológicos para os biológicos (Batista et al., 2022)

A solubilização de fósforo por bactérias é um exemplo notável de simbiose entre organismos microbianos e plantas. As bactérias que executam essa função estabelecem relações mutualísticas com as plantas, beneficiando tanto os microrganismos quanto os vegetais. Em troca do fósforo solubilizado, as plantas fornecem às bactérias compostos orgânicos e um ambiente propício para o seu crescimento. Essa cooperação simbiótica é um dos pilares da ecologia dos solos e é essencial para a saúde e a fertilidade do ecossistema (Martin et al., 2022)

Além de seu impacto direto nas plantas, a solubilização de fósforo por bactérias também tem implicações significativas na agricultura sustentável. Neste contexto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na solubilização de fósforo por bactérias torna-se um diferencial. Os estudos científicos nessa área buscam elucidar os genes e as vias metabólicas responsáveis por essa habilidade, bem como a diversidade de microrganismos envolvidos. Isso pode levar a aplicações práticas, como a seleção de bactérias solubilizadoras de fósforo mais eficazes para a agricultura de precisão (Cruz et al., 2024).

A biossolubilização é um processo biológico notável com implicações profundas na ecologia, na agricultura e na nutrição das plantas, diante o exposto a presente proposta de pesquisa visou caracterizar *in vitro* o potencial de solubilização da *Pseudomonas fluorescens* sob diferentes fontes de fosfatos, e avaliar *in vivo* o efeito da aplicação foliar no desenvolvimento de plantas de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, a fim de verificar a eficiência da *Pseudomonas fluorescens* (estirpe BR 14810; 2×10^8 UFC mL⁻¹) presente no produto Phos'Up®, comercializado como inoculante no tratamento de sementes (TS) de soja. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas e casa de vegetação da UNESP – Campus de Tupã.

Experimento I – *In vitro*

Foram investigados a solubilidade dos fosfatos de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), alumínio (AlPO_4) e ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) por meio da aplicação de doses do produto. Para tanto foram realizados dois *screening in vitro*, avaliando qualitativa e quantitativamente a eficácia.

Screening I: Solubilidade de P em placa de Petri (método qualitativo)

Aplicação do inóculo no TS

Sementes de soja, previamente autoclavadas para total esterilização biológica, foram inoculadas com doses (0, 1 e 2 mL kg^{-1} semente) do inoculante líquido para soja Phos'Up® (Tabela 01). O TS ocorreu quatro horas antes da deposição sobre o meio de cultura. O delineamento foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e quatro repetições cada (placa de Petri).

Tabela 01 – Tratamentos adotados para o teste *qualitativo* e *quantitativo* de solubilidade *in vitro* de fosfatos de cálcio (P-Ca), de alumínio (P-Al) e de ferro (P-Fe) no meio sólido e líquido NBRIP por *P. fluorescens* em doses (0, 1 e 2 mL) de Phos'Up®.

Tratamentos		Dose (mL kg^{-1} ou mL L^{-1})
T1	P-Ca (controle)	0
T2	P-Ca	1
T3	P-Ca	2
T4	P-Al (controle)	0
T5	P-Al	1
T6	P-Al	2
T7	P-Fe (controle)	0
T8	P-Fe	1
T9	P-Fe	2

Preparo do meio de cultivo

O potencial de solubilização de fosfato *in vitro* foi determinado em meio NBRIP conforme proposta de Nautiyal (1999) com modificações, sendo a fonte de fosfato alterada conforme o tratamento (Tabela 02).

Tabela 02 – Descrição do meio NBRIP, recomendado para avaliação da solubilidade do P.

Meio de Cultura NBRIP sólido (g L^{-1})	
Glicose	10,0
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ou $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou AlPO_4	5,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
KCl	0,20
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,10
Purpura de bromocresol	0,125

Ágar*	15,0
Água miliq	1000 mL

*Obs.: O meio ficou com aspecto leitoso e o pH foi ajustado para 7,0 antes da adição do ágar e autoclavagem.

Após o preparo e autoclavagem, o meio ainda fundente, foi vertido em placas de Petri. Em seguida, quando solidificado foi realizado uma perfuração ao centro da placa, a fim de retirar um disco ($\varnothing$ 4 mm) do meio, que permitiu o posicionamento fixo e total da semente sobre o meio de cultura. Em seguida as placas foram acondicionadas em BOD a 28° C na ausência luminosa (Material Suplementar 01).

As observações foram diárias até o quinto dia, quando se finalizou o teste indicativo de solubilidade, pois houve a mudança de coloração do meio (roxo para amarelo) com a formação de halos ao entorno das sementes (Material Suplementar 02). O registro fotográfico das placas foi com protocolo PRHQ proposto por Rodrigues et al., (2022).

Screening II: Solubilidade de P em meio líquido (método quantitativo)

Preparo do meio de cultivo

Para testar quanto ao potencial de solubilização de fosfato *in vitro* em meio líquido NBRIP, conforme proposto por Nautiyal (1999) (Tabela 03).

Tabela 03 – Descrição do meio de cultivo NBRIP líquido, recomendado para avaliação da solubilidade do P.

Meio de Cultura NBRIP (g L ⁻¹)	
Glicose	10,0
Ca ₃ (PO ₄) ₂ ou FePO ₄ .2H ₂ O ou AlPO ₄	5,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
KCl	0,20
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
Água miliq	1000 mL

Obs.: O meio ficou com aspecto leitoso e o pH ajustado para 7,0 antes da autoclavagem.

O meio foi fracionado em erlenmeyer de 250 mL colocando-se 100 mL do meio NBRIP líquido com tampo de gaze e alumínio, em seguida autoclavado por 20 min a 120°C 1 atm. Após resfriar, e em câmara de fluxo laminar, inoculou-se em cada erlenmeyer a dose do produto comercial (Tabela 01).

O delineamento foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e quatro repetições cada.

Os frascos foram incubados a 28 ± 1 °C sob agitação a 160 rpm na ausência luminosa. Diariamente, a partir da montagem do teste, realizou-se as leituras, a partir do tempo 0 h até observação de redução da solubilização do P (declínio nas leituras de absorbância).

Retirou-se 3 mL de amostra em eppendorf e centrifugou por 10 minutos a 10.000 rpm. Parte do sobrenadante foi usado para determinar o pH e parte para o teor de P livre por meio do método colorimétrico de Murphy e Riley (1962).

Em eppendorf de 2 mL, montou-se a reação com 100 µL do reagente + 100 µL da amostra centrifugada (sobrenadante) + 1,8 mL de água miliq. O controle foi com 100 µL do reagente + 100 µL do meio NBRIP centrifugado (sem a inoculação e mantido com os demais frascos na shaker) + 1,8 mL de água miliq. O equipamento foi zerado (branco) com 100 µL do reagente + 100 µL de água miliq estéril + 1,8 mL de água miliq.

As amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas por 40 minutos até a realização das leituras em espectrofotômetro (Abs 725 nm). Os valores foram corrigidos pela curva padrão de fosfato de potássio monobásico e expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Experimento II – *In vivo*

Foi realizado experimento para caracterizar os mecanismos de ação do Phos'Up® na aplicação foliar na soja, considerando doses (1, 2 e 3 mL L⁻¹) e acondicionamento do solo no momento da aplicação (com e sem proteção plástica sobre o solo), conforme tabela 04.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, nas dependências da Faculdade de Ciências e Engenharia da Universidade Estadual Paulista no Campus de Tupã-SP. Amostras de solo destinado ao experimento foram coletadas da camada superficial (0-20 cm) e encaminhadas ao laboratório especializado para determinação do estado nutricional (Material Suplementar 03).

Tabela 04 – Tratamentos para aplicação de *P. fluorescens* via foliar com doses (1, 2 e 3 mL L⁻¹) de Phos'Up® em plantas de soja (estádio V4).

Tratamentos		Dose (mL L ⁻¹)*
T1	Controle	-
T2	Phos'Up sem proteção	1
T3	Phos'Up sem proteção	2
T4	Phos'Up sem proteção	3
T5	Phos'Up com proteção	1

T6	Phos'Up com proteção	2
T7	Phos'Up com proteção	3

*volume de calda de 100 L ha⁻¹.

Fracionou-se o solo em embalagens plásticas transparentes, com porções equivalentes ao vaso de 5 L, na qual em cada um foram adicionados o calcário dolomítico filler (PRNT 100%) conforme a recomendação necessária a fim de corrigir a acidez presente. As embalagens foram mantidas fechadas no interior da casa de vegetação a fim de otimizar o processo da correção do pH. Após 30 dias, antecedendo a semeadura foi realizada a adubação (macro e micronutrientes) recomendadas para a cultura da soja, conforme o Boletim 100 para o estado de São Paulo.

Em delineamento inteiramente casualizado foram preparados 56 vasos, sendo 8 repetições para cada tratamento, das quais quatro foram conduzidas até o estágio R1 (amostras destrutivas) e demais mantidas até o final do ciclo da cultura para coleta de demais variáveis.

A semeadura da soja NS 6700 IPRO, foi sem tratamento químico ou industrial, inoculada apenas com produto comercial contendo *Bradyrhizobium japonicum* – SEMIA 5079 e 5080. Em seguida, quatro sementes foram depositadas (3 cm de profundidade) e cobertas com solo, sendo mantidas apenas duas por vaso após a emergência até o momento das avaliações. As regas foram manualmente, direcionada ao solo, conforme a necessidade, evitando o ponto de murcha permanente da cultura.

No estágio fenológico V4, realizou-se a aplicação foliar das doses de *P. fluorescens*, conforme descrição da tabela 05. A aplicação foi com o auxílio de pulverizador manual de pressão constante, considerando o volume de calda de 100 L ha⁻¹. Atendendo a proteção do solo utilizou-se uma cobertura plástica que evitou o contato e deposição das doses sobre o solo do vaso, garantindo assim a eficiência da aplicação foliar (Material Suplementar 04).

Análises agronômicas

As variáveis agronômicas foram determinadas em dois momentos: em R1 (início da floração) e final de ciclo (colheita).

No estágio R1 determinou-se:

- *Altura parte aérea (cm)*: Por meio de régua milimetrada, considerando a base, o colo da planta e o ápice a inserção do pecíolo do último trifólio;

- *Comprimento raiz (cm)*: Com auxílio de régua milimetrada, a partir do colo da planta até extremidade da raiz;
- *Massa seca da parte aérea e da raiz (g)*: Após coleta biométrica as partes foram separadas, alocadas em sacos de papel e acomodadas em estufa de circulação de ar forçada sob aquecimento de 65° C por 72 h. Em seguida, em balança de precisão, pesará a massa de amostra.
- *Número e peso dos nódulos (g)*: As plantas em vaso foram destinadas a lavagem das raízes para remoção do solo, a fim de preservar suas estruturas e manter a integridade dos nódulos formados, para tanto procedeu-se a lavagem em água corrente sobre peneira e em seguida, após a coleta biométrica, os nódulos foram retirados cuidadosamente contabilizados, registrados e pesados em balança analítica de precisão.
- *Teor de P*: as folhas foram secas em estufa e moídas em moinho, sendo encaminhadas para laboratório especializado a fim de determinar o teor de P mineral nas folhas de soja referentes a cada tratamento.

No final do ciclo da cultura determinou-se:

- *Número de vagens*: Com umidade entorno de 13% realizou-se a colheita manual contabilizando-se todas as vagens presentes nas plantas em cada vaso;
- *Produtividade por vaso (g) e o peso de 100 grãos (g)*: Após beneficiamento manual obteve-se o peso total dos grãos, possibilitando estimar a produtividade por vaso e o peso de 100 grãos, ambas variáveis respostas indicadoras para o incremento de produtividade na investigação do efeito bioestimulante.

Análises fisiológicas

As variáveis bioquímicas foram determinadas no estágio R1, a partir do material vegetal (folhas) a fim compreender os efeitos da *P. fluorescens* do produto Phos'Up® no metabolismo da planta. Todas as análises foram realizadas em quadruplicatas.

- *Malondialdeído (MDA) e Peroxido de hidrogênio (H₂O₂)*: Para a peroxidação lipídica será adotado o extrator a base de ácido tricloroacético (1%) e neste será macerado 1 g de material foliar moído em nitrogênio líquido, seguido de centrifugação e uso do sobrenadante para as análises do teste de MDA e H₂O₂, ambas determinadas em espectrofotômetro e expressas em nmol g⁻¹ de massa fresca e μmol g⁻¹ de massa fresca, conforme Heath e Packer (1968) e Alexieva et al. (2001), respectivamente.
- *Metabolismo antioxidante*: Serão utilizados 1,5 g de folhas e extraídas em 10 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), seguidos de centrifugação refrigerada e sobrenadante

usado para determinar atividade da superóxido dismutase - SOD (Giannopolitis e Ries, 1977), atividade da catalase – CAT (Azevedo et al., 1998) atividade da ascorbato peroxidase – APX (Moldes et al., 2008) e proteínas totais (Bradford, 1976).

No estádio R1, o solo de cada vaso correspondente aos tratamentos, foram coletados e enviado a laboratório especializado para determinação da atividade enzimática da fosfatase ácida.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância para verificação da significância e realizada a comparação de médias utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico Sisvar 5.3 (Ferreira, 2014) e as representações gráficas por meio software SigmaPlot.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Experimento 1 – *In vitro*

Screening I: Solubilidade de P em placa de Petri (método qualitativo)

O teste possibilitou observar que a cepa bacteriana de *P. fluorescences* do produto Phos'Up® possui capacidade de produzir ácidos orgânicos, visto que houve alteração da coloração do meio de cultura ao entorno da semente inoculada, visualmente o incremento das doses elevaram o diâmetro dos halos de acidificação indicados pela cor amarela, sendo mais expressivo para meio de cultura contendo fosfato de cálcio (P-Ca) (Figura 01).

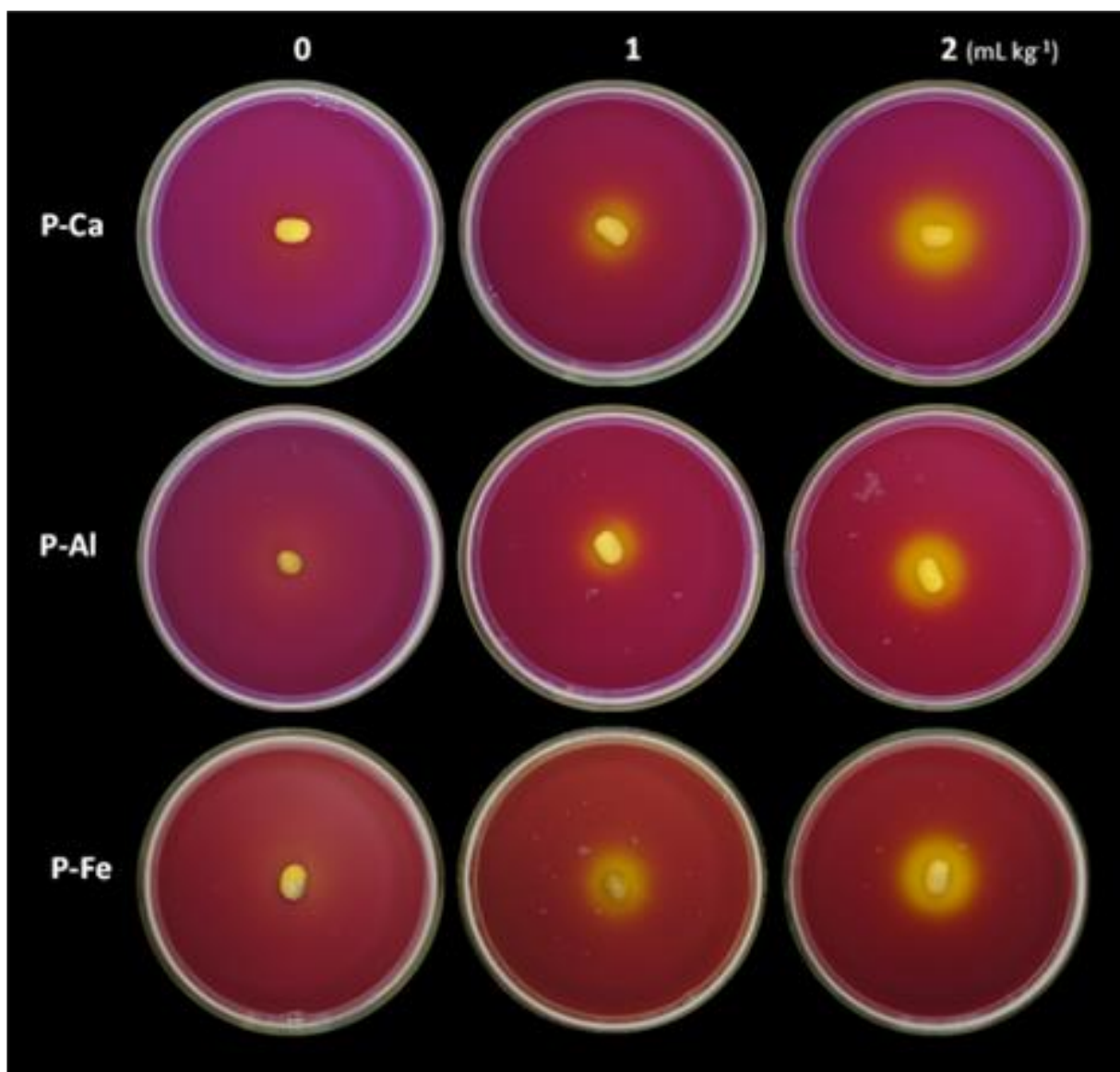


Figura 01 - Aspectos visuais do teste qualitativo (72h) para solubilidade de fosfatos de alumínio (P-Al), cálcio (P-Ca) e ferro (P-Fe) em meio NBRIP sólido com a aplicação de doses de Phos'UP (0, 1 e 2 mL Kg⁻¹) no tratamento de sementes de soja.

Barroso e Nahas (2008) descrevem que a solubilidade dos fosfatos é muito baixa, sendo maiores para fosfato de cálcio, seguido de fosfato de alumínio e com menor solubilidade o fosfato de ferro, de modo geral grande parte dos organismos como bactérias são capazes de solubilizar fosfatos de cálcio, mas poucos são capazes de solubilizar fosfatos de alumínio e ferro.

A baixa eficiência na absorção do fósforo inorgânico é um dos desafios no cenário da pesquisa agrícola atual. Muitos microrganismos presentes na rizosfera são capazes de atuar solubilizando o fosfato inorgânico (Ribas et al., 2016).

Screening II: Solubilidade de P em meio líquido (método quantitativo)

Ao realizar o teste de solubilidade para quantificar o teor de P livre no meio de cultura com a inoculação das doses de PhosUp[®], verificou-se ao longo do tempo (24 – 144 h) que houve maior disponibilização do P ligado ao cálcio (P-Ca), seguido do fosfato de alumínio e ferro (Figura 02-a).

Houve liberação gradativa conforme as doses, de modo que as reduções foram expressivas com passar dos dias, isso devido ao aumento populacional bacteriano que passa a consumir o P liberado mais rápido que sua capacidade de biossolubilização.

Cerca de 80% do fosfato inorgânico solúvel aplicado se torna indisponível, pois é rapidamente imobilizado na forma de fosfato insolúvel, pois fixam a minerais de argila, ao cálcio ou óxidos de ferro e alumínio (Behera et al., 2014).

Embora as formas predominantes de fosfatos sejam os fosfatos de ferro e alumínio, as informações sobre sua solubilização são escassas. Além disso, há diferenças na capacidade e potencial de solubilização entre microrganismos. Enquanto um microrganismo específico consegue solubilizar apenas P-Ca, outros têm a capacidade de solubilizar P-Al e P-Fe em diferentes intensidades. Portanto, é importante considerar a variabilidade na habilidade dos microrganismos em solubilizar esses fosfatos (Faria et al., 2022).

As bactérias solubilizadoras de fosfato desempenham um papel fundamental no ciclo do fósforo ao aumentar a biodisponibilidade desse elemento para absorção pelas plantas. Utilizando uma variedade de métodos, como a acidificação, a quelação e eventos de troca, os microrganismos tornam o fosfato mais solúvel. O principal mecanismo de solubilização envolve a liberação de metabólitos, como ácidos orgânicos, que reduzem o pH do solo rizosférico ou quelam os cátions responsáveis pela precipitação dos compostos inorgânicos de fósforo (Silva et al., 2023).

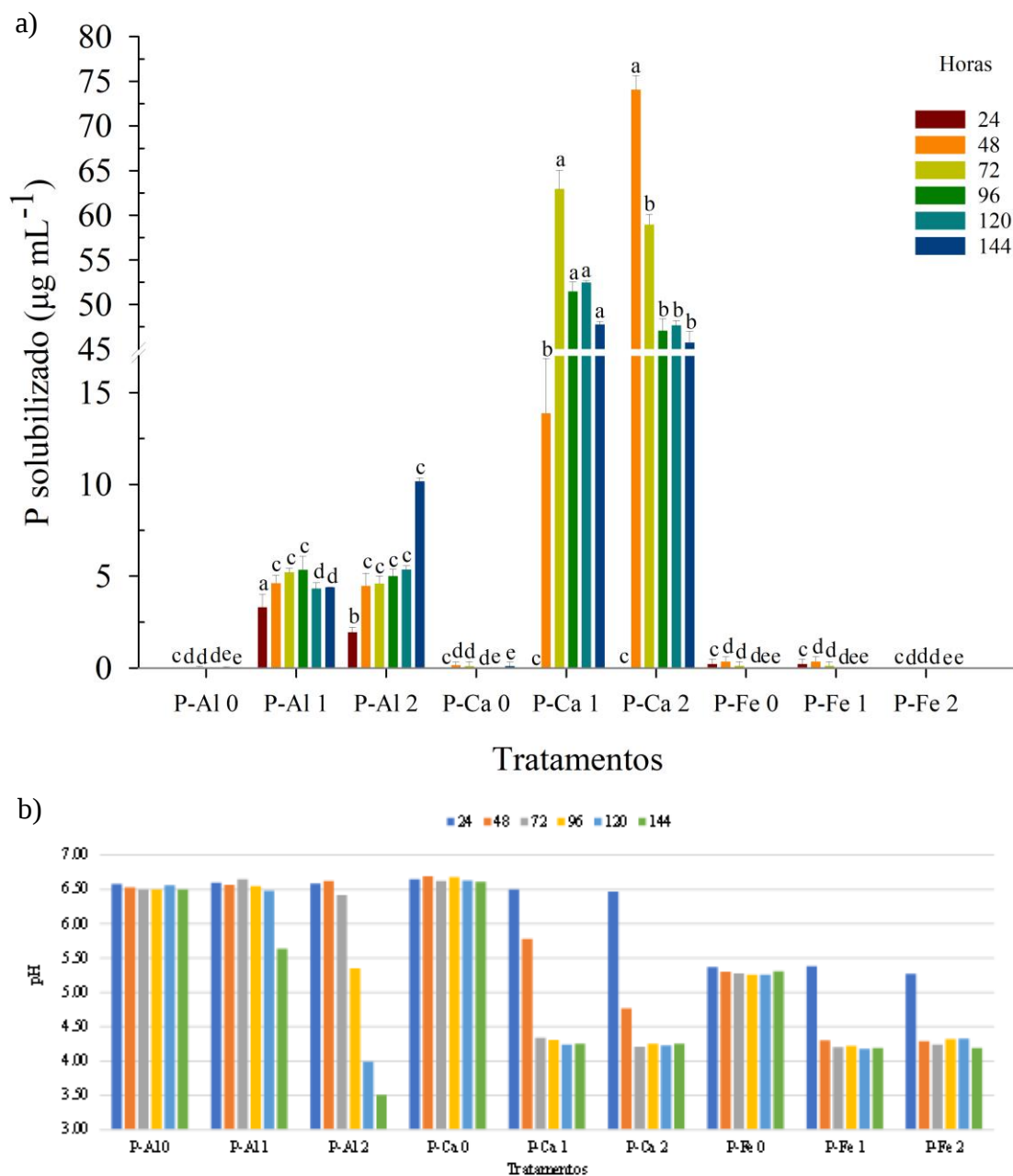


Figura 02 - Determinação da concentração de P ($\mu\text{g mL}^{-1}$) disponibilizado ao longo das horas (24 a 144 h) durante screening *in vitro* de solubilidade dos fosfatos de alumínio (P-Al), cálcio (P-Ca) e ferro (P-Fe) por meio da aplicação das doses 0, 1 e 2 de Phos'Up® (mL L^{-1}) em meio NBRIP líquido. Para solubilização barras seguidas de mesma letra, entre os tratamentos no mesmo período (h), não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

No ambiente natural quando as raízes excretam glicose, as bactérias podem absorvê-la e convertê-la em glicose-6-fosfato no citosol, um processo que requer ATP. Em condições de fosfato limitante, as bactérias empregam a via periplasmática, onde enzimas como glicose desidrogenase e gluconato desidrogenase, localizadas na membrana, oxidam a glicose em compostos ácidos, resultando em redução do pH no ambiente (Buch et al., 2008)

As leituras de pH revelaram que houve acidificação do meio de cultura, que provavelmente pela presença de ácidos orgânicos capazes de desempenhar esse papel, conforme observado nas reduções ao longo do tempo (Figura 02-b).

Os ácidos orgânicos são compostos de baixo peso molecular produzidos em vias metabólicas oxidativas e secretados pelo sistema radicular das plantas. Semelhantemente os microrganismos também liberam ácidos orgânicos que atuam na solubilização de fosfato inorgânico, sendo o glucônico, 2-ceto glucônico, ácido oxálico, acético, fumárico, málico, succínico, tartárico os principais ácidos envolvidos (Silva et al., 2023).

Os ácidos orgânicos acidificam o solo ou o meio de cultura, resultando na diminuição do pH. Isso leva à liberação de cátions ligados ao fósforo de seus grupos hidroxila e carbonila. Além disso, esses ácidos podem competir com os locais de adsorção de fósforo no solo, formando complexos com íons metálicos ligados ao fósforo (Wei et al., 2018).

Experimento II – *In vivo*

Screening I: Aplicação foliar de Phos'UP em plantas de soja

A aplicação foliar do produto possibilitou maior desenvolvimento das plantas comparado ao tratamento controle, conferindo as mesmas melhores índices biométricos como altura de parte aérea, comprimento radicular e massa seca. De modo geral, tratamentos com doses de 2 e 3 mL L⁻¹ e condição de solo exposto (sem proteção) tiveram melhores expressões biométricas (Figura 03).

A *P. fluorescens* é reconhecida por suas contribuições significativas para o crescimento das plantas, especialmente devido à sua habilidade na solubilização de fosfatos. Esta capacidade é atribuída à produção de ácidos orgânicos que ajustam o pH do solo de maneira favorável e à presença de fosfatases, enzimas hidrolases que desempenham um papel de suma importância na liberação de grupos fosfatos da matéria orgânica. Esses fosfatos solubilizados estão prontamente disponíveis para absorção pelas raízes das plantas, melhorando assim sua nutrição mineral e seu crescimento (Zhang et al., 2018).

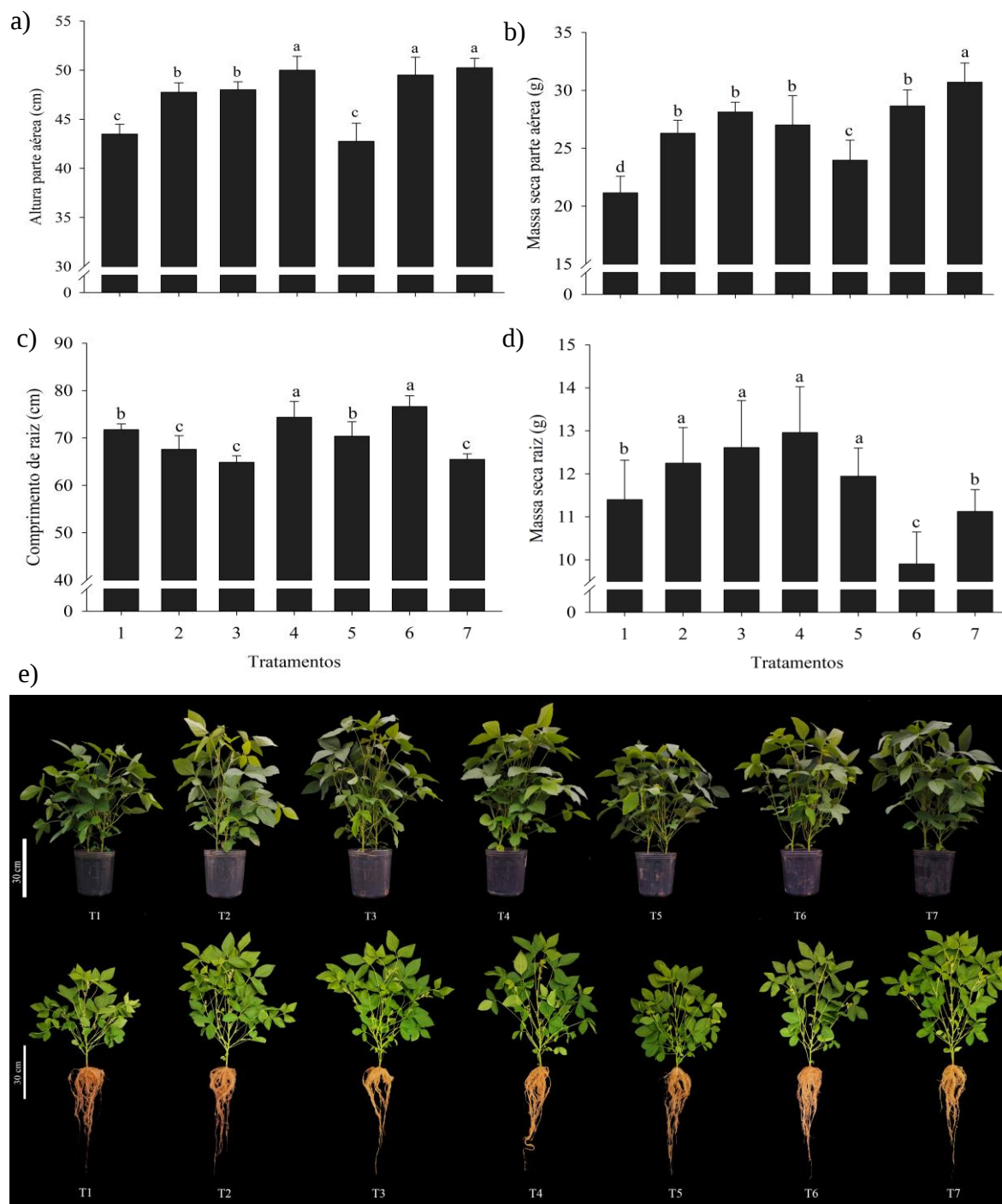


Figura 03 - Avaliação biométrica do desenvolvimento de plantas de soja submetidas a doses de Phos'Up® (mL L⁻¹) aplicadas via foliar com e sem proteção do solo, sendo: T1) Controle; T2) 1 mL sem proteção sol; T3) 2 mL sem proteção; T4) 3 mL sem proteção; T5) 1 mL com proteção; T6) 2 mL com proteção e T7) 3 mL com proteção. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. CV = 2,79; 6,05; 3,36 e 7,28 %.

O efeito bioestimulante possibilita à planta uma melhor performance fisiológica e consequentemente produtiva. Conhecer os mecanismos associados a essas interações permitem

o sucesso nas práticas agrícolas, o fato de realizar a aplicação de *P. fluorescens* (BR 14810) via foliar, teve reflexo direto sob o crescimento e desenvolvimento de plantas de soja em casa de vegetação, isso amplia a versatilidade de uso do produto, bem como a plasticidade adaptativa da cepa nas condições que foram expostas.

Conforme Chagas et al. (2017) a influência dos microrganismos no desenvolvimento das plantas é abrangente. Utilizar esses organismos como promotores de crescimento oferece diversos benefícios às plantas, incluindo melhor germinação das sementes, emergência de plântulas, crescimento vegetal e aumento do rendimento dos grãos. Portanto, bactérias solubilizadoras, promovem uma produção sustentável, reduzindo a necessidade de fertilizantes e essa prática é fundamental para os cultivos atuais, contribuindo para o desenvolvimento de sistemas racionais de produção.

A fixação biológica de nitrogênio, realizada por vários microrganismos simbióticos e de vida livre, é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico é convertido em amônio. Desta forma possibilitando a assimilação do elemento pelas plantas, especialmente as leguminosas. O fósforo é essencial desde a fase de germinação, especialmente em plantas de ciclo curto, como a soja e desempenha ação não somente no metabolismo energético, mas também na nodulação e na fixação do nitrogênio atmosférico (Oliveira-Paiva et al., 2022).

Assim os indicadores de número e massa fresca de nódulos, diferiram entre si, na qual doses elevadas (3 mL) não promoveram aumento no número de nódulos, porém elevaram a biomassa destes (Figura 04).

Nódulos maiores têm quantidades proporcionalmente elevadas de nitrogênio fixado no tecido, quando comparados a nódulos pequenos. As altas demandas de energia associadas a fixação do N₂ no tecido do nódulo pode gerar uma maior capacidade de dissipação por unidade de massa em nódulos grandes, resultando em maior distribuição de água e fotossintatos para estes, do que para nódulos pequenos. Resultando em melhores performances fisiológicas e incrementos de produtividade (King e Purcell, 2001).

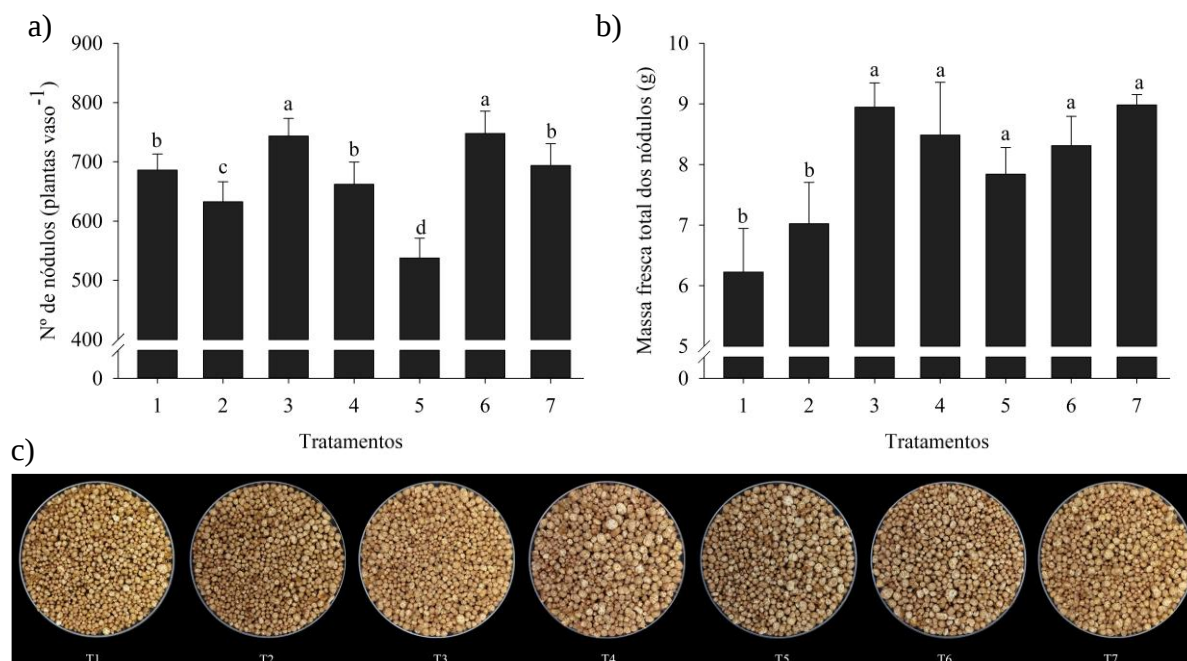


Figura 04 - Número e massa fresca de nódulos de plantas de soja submetidas a doses de Phos'Up (mL L⁻¹) aplicadas via foliar com e sem proteção do solo, sendo: T1) Controle; T2) 1 mL sem proteção sol; T3) 2 mL sem proteção; T4) 3 mL sem proteção; T5) 1 mL com proteção; T6) 2 mL com proteção e T7) 3 mL com proteção. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. CV = 5,06 e 7,28 %.

Bactérias em geral, especialmente *Bacillus* e *Pseudomonas* possuem a capacidade de secretar ácidos orgânicos, produzir fosfatases ácidas, e empregar diversos mecanismos para solubilizar e mineralizar fosfatos. Esses processos são fundamentais para a disponibilização de fosfato para as plantas, facilitando a absorção desse nutriente essencial para o seu crescimento e desenvolvimento (Mendonça et al., 2020).

A capacidade biossolubilizadora por parte de um microrganismo depende de vários fatores, e parte pode estar associada a atividade enzimática da fosfatase ácida, essa é responsável por liberar os íons de P no solo permitindo a assimilação do mineral pelas plantas. Neste contexto, observou-se que doses elevadas com solo sem proteção permitiu maior atividade enzimática da fosfatase quando comparados ao controle.

O teor nutricional das folhas de soja foi determinado em análise (Material Suplementar 05), possibilitando inferir, se o produto Phos'Up[®] nas doses testadas elevou a concentração do P no tecido da planta, dessa forma observou-se que plantas que receberam aplicação foliar com solo exposto apresentaram maior concentração em relação ao controle, e quando aplicado com

solo protegido apenas a maior dose 3 mL foi capaz de ser superior aos demais tratamentos na mesma condição (Figura 05).

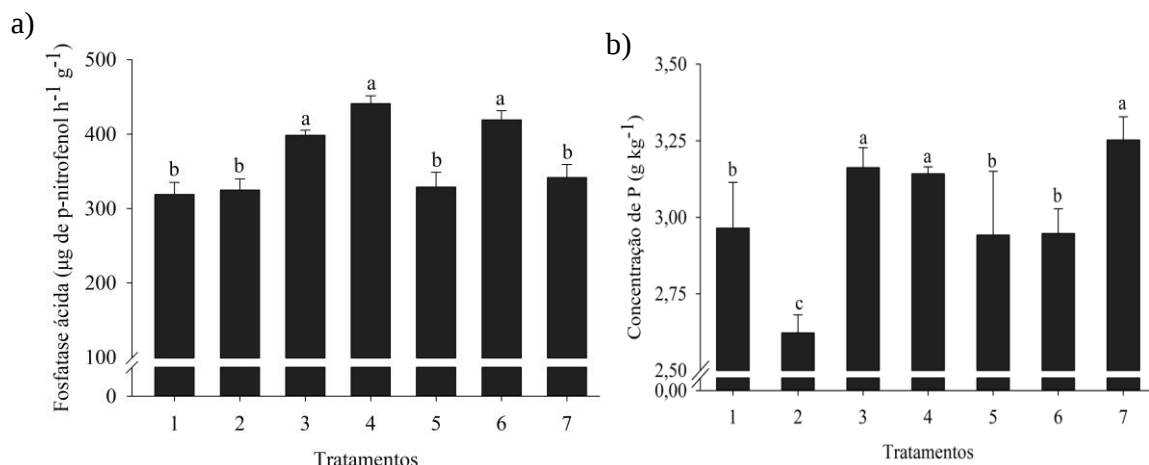


Figura 05 - Atividade da fosfatase ácida ocorrida no solo de vasos cultivados com soja e teor de P presentes em folhas de plantas de soja submetidas a doses de Phos'Up (mL L^{-1}) aplicadas via foliar com e sem proteção do solo, sendo: T1) Controle; T2) 1 mL sem proteção solo; T3) 2 mL sem proteção; T4) 3 mL sem proteção; T5) 1 mL com proteção; T6) 2 mL com proteção e T7) 3 mL com proteção. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. CV = 1,2 e 1,4%.

A proporção de fosfatases é relativa à abundância de P no solo e consequentemente influencia na disponibilidade desse nutriente às plantas, alguns estudos apontam correlação positiva entre atividade da fosfatase, absorção de P pelas plantas e peso dos nódulos em plantas de soja (Fraser et al., 2017). A solubilização de fosfato tem um impacto significativo na promoção do crescimento das plantas, principalmente ao aumentar a biomassa e o teor de fósforo nas plantas (Bashan et al., 2004).

Ao considerar os efeitos fisiológicos da aplicação foliar de *P. fluorescens* nas folhas de soja, observou-se a espécies reativas de oxigênio (EROs), essas desempenham um papel ambivalente nas células, atuando tanto como produtos naturais do metabolismo quanto como agentes de estresse oxidativo quando presentes em excesso. Em condições normais, as EROs são neutralizadas por um sistema complexo de defesa antioxidante, composto por diversas enzimas especializadas. Estas enzimas, como a superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, atuam na manutenção do equilíbrio redox celular, protegendo as biomoléculas contra danos oxidativos (Taiz et al., 2017).

Quando há aplicação de microrganismos ou interação planta-microrganismo, observa-se aumento dos indicadores de espécies reativas de oxigênio, principalmente MDA, enquanto o H_2O_2 foi reduzida nos tratamentos T2, T3, T4 e T6 em comparação ao controle. A atividade

do complexo enzimático antioxidante (SOD, CAT e APX) correspondeu a produção dos EROs, revelando uma redução destas nos tratamentos que receberam aplicação do microrganismo (Figura 06).

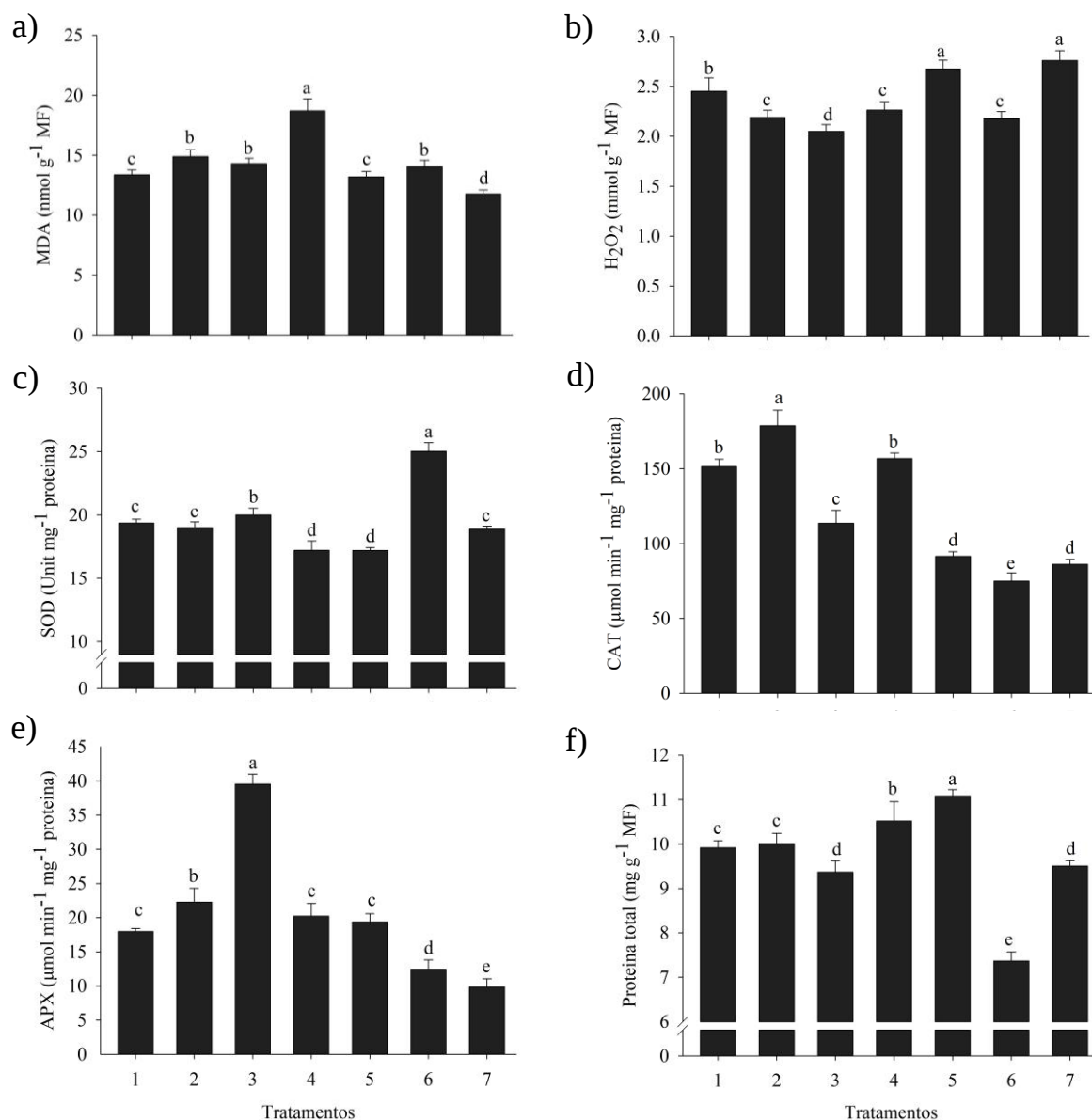


Figura 06 - Parâmetros indicadores de EROs (MDA e H₂O₂), atividades enzimáticas antioxidantes e proteína total em folhas de plantas de soja submetidas a doses de Phos'Up (mL L⁻¹) aplicadas via foliar com e sem proteção do solo, sendo: T1) Controle; T2) 1 mL sem proteção solo; T3) 2 mL sem proteção; T4) 3 mL sem proteção; T5) 1 mL com proteção; T6) 2 mL com proteção e T7) 3 mL com proteção do solo. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. CV = 4,0; 3,81; 2,52; 5,09; 7,13 e 2,5 %.

O reflexos fisiológicos desse comportamento conferem as plantas expostas a aplicação foliar de *P. fluorescens*, uma melhor capacidade na mitigação de estresses na cultura, sejam de natureza biótica ou abiótica. Observou-se que apenas os tratamentos T4 e T5 tiveram maiores teores proteicos foliares, quando comparados ao tratamento controle.

Em casa de vegetação, todas as variáveis fisiológicas e agronômicas converteram para o melhor desempenho da planta, bem como incrementos de produtividade. Desta maneira observou-se que a aplicação foliar do microrganismo elevou o número de vagens e aumentou a massa total de grãos por vaso, com incremento médio entorno de 18 % em relação ao controle, sendo um forte indício para os testes de campo (Figura 07).

Faria et al. (2022), observaram um incremento médio de 54% na produtividade de soja em campos agrícolas, com a aplicação foliar de *P. fluorescens* estirpe BR 14810, além de benefícios no desenvolvimento vegetativo das plantas.

A elevação de produtividade esta diretamente relacionada a parâmetros como o rendimento de grãos, que é o indicador mais direto da produtividade da cultura, seguido do número de vagens por planta, visto que quanto maior o número de vagens por planta, maior potencial de produção de grãos, e o peso médio dos grãos, na qual grãos maiores tendem a ter mais valor comercial.

Além do desenvolvimento vegetativo (parte aérea e comprimento de raiz), visto que plantas de soja com maior crescimento, geralmente estão associadas a uma maior produção de grãos, desde que não comprometam a estabilidade da planta, conforme evidenciou-se nesse experimento com os tratamentos T3, T4 e T6.

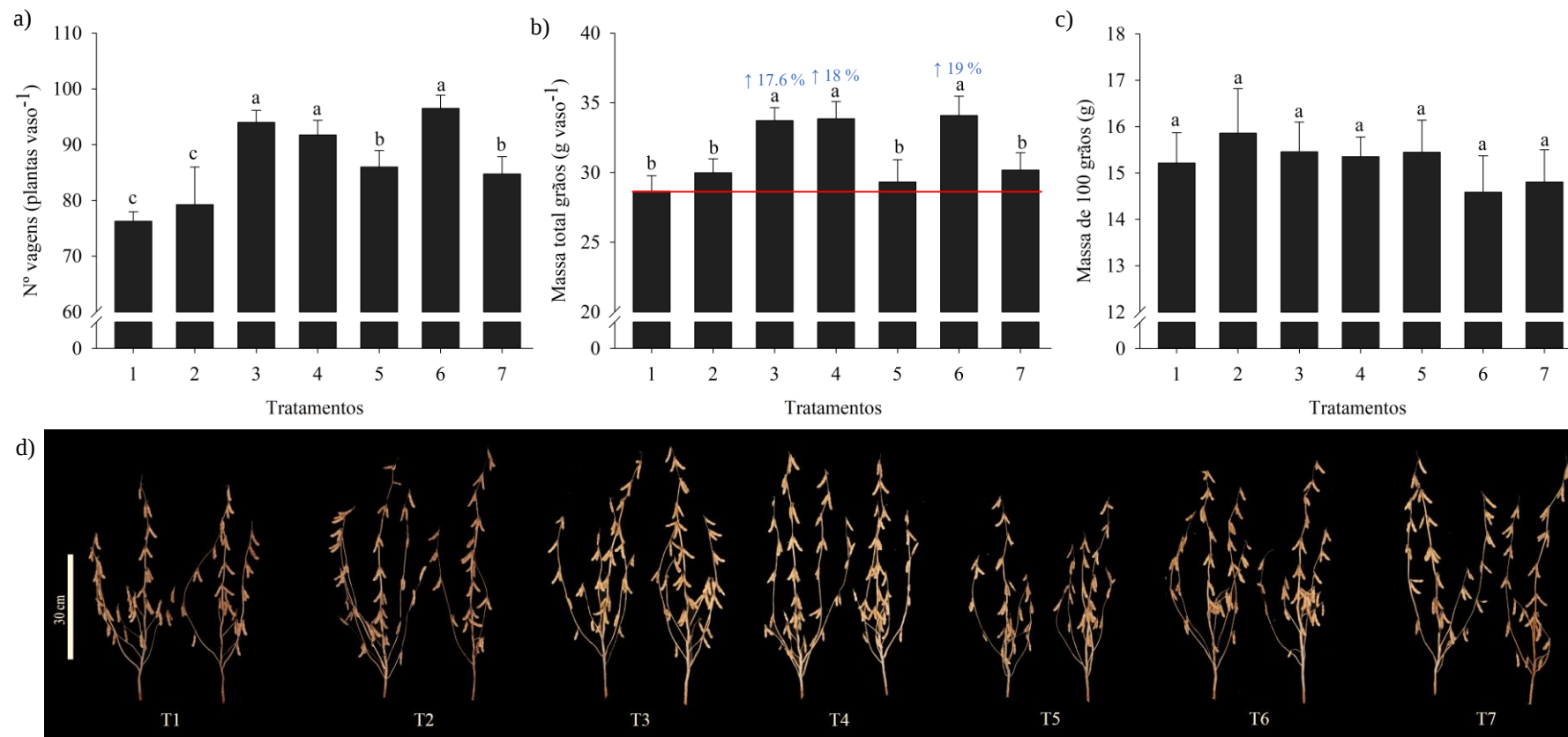


Figura 07 - Indicadores de produtividade de plantas de soja submetidas a doses de Phos'Up (mL L⁻¹) aplicadas via foliar com e sem proteção do solo, sendo: T1) Controle; T2) 1 mL sem proteção solo; T3) 2 mL sem proteção; T4) 3 mL sem proteção; T5) 1 mL com proteção; T6) 2 mL com proteção e T7) 3 mL com proteção. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. CV = 3,98; 3,92 e 4,66 %.

A busca por técnicas que possibilitem o uso racional dos sistemas agrícolas, fortalecem as cadeias produtivas e promovem a sustentabilidade das áreas produtivas. Experimentos como este, corroboram com os anseios de uma agricultura moderna e contribuem para a redução da dependência de químicos e otimização de recursos presentes nessas áreas, como o P não lábil, melhorando a qualidade nutricional dos alimentos, além de aumentar a resistência das plantas a estresses ambientais. E inegável que a adoção de bioinsumos continuam a crescer e proporcionam inúmeros benefícios, esses fatos foram sumarizados e evidenciado as principais contribuições obtidas neste estudo (Figura 08).

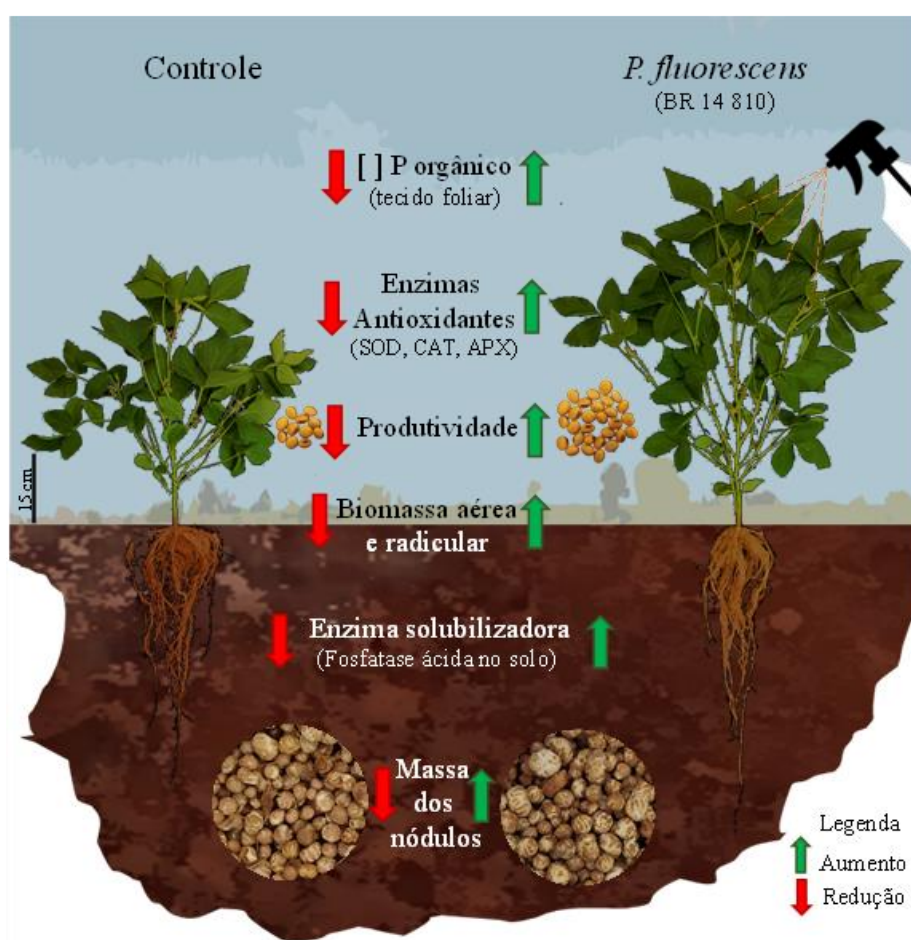


Figura 08 – Esquema comparativo dos principais benefícios desencadeados pela aplicação foliar de *P. fluorescens*, estirpe BR14810, em plantas de soja.

CONCLUSÃO

Os *screening in vitro* permitiram revelar eficácia do produto Phos'Up® na solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio.

O Phos'Up[®] aplicado via foliar melhorou a performance da soja nos critérios biométricos, fisiológicos e agronômicos, elevando a produtividade, sob tudo em condições de solo sem a proteção no momento da aplicação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Grupo Rovensa, pela parceria na execução da pesquisa. E a Fundação de Estudos Agrícolas e Florestais – FEPAF, pela bolsa concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- ALEXIEVA V., SERGIEV I., MAPELLI S., KARANOV E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, West Sussex, v.24, 1337 1344. 2001.
- AZEVEDO, R.A., ALA R.M., SMITH R.J., LEA P.L. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild type and a catalase deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, Hoboken v. 104, p. 280 292. 1998.
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G., BASHAN, L. E. (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 521-577.
- BATISTA, F. D. C., GUIEIRO, C., GUIMARAES, C. D. C., DE SOUZA, F. F., BINI, D., SIMEONE, M. L. F., OLIVEIRA-PAIVA, C. A. (2022). Produção de ácidos orgânicos por bactérias solubilizadoras de fosfato de ferro como mecanismo de biossolubilização. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Sete Lagoas, 33., 2022.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, Philadelphia, v. 72, n. 2, p. 248 254. 1976.
- BUCH, A.; ARCHANA, G.; NARESH KUMAR, G. (2008). Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency., 159(9-10), 0–642. doi:10.1016/j.resmic.2008.09.012
- CHAGAS, L. F. B., MARTINS, A. L. L., DE CARVALHO FILHO, M. R., DE OLIVEIRA MILLER, L., DE OLIVEIRA, J. C., JUNIOR, A. F. C. (2017). *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* sp. no incremento da biomassa em plantas de soja, feijão-caupi, milho e arroz. *Agri-environmental sciences*, 3(2), 10-18.
- CRUZ, D. R. C., FERREIRA, I. V. L., DA COSTA MONTEIRO, N. O., NASCENTE, A. S., OLIVEIRA, R. B., DOS SANTOS, S. G. F., OLIVEIRA VIEIRA, I. C. (2024). Microrganismos multifuncionais na agricultura: uma revisão sistemática sobre bactérias

solubilizadoras de fósforo. *CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES*, 17(3), e5854-e5854.

FARIA, T. C., VENTURA, M. V. A., DE SOUZA, T. R., RIBEIRO NETO, M., SEI, F. B., SOUCHIE, E. L. (2022). Agronomic efficiency and phosphate solubilization of *Pseudomonas fluorescens* and *Bradyrhizobium japonicum* in leaf-spray inoculation and seed treatment in soybean. *Journal of agricultural science*, v. 14, n. 8, p. 117.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.38, p.109-112, 2014.

FRASER, T. D., LYNCH, D. H., GAIERO, J., KHOSLA, K., DUNFIELD, K. E. (2017). Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Applied soil ecology*, 111, 48-56.

GENG, Y., PAN, S., ZHANG, L., QIU, J., HE, K., GAO, H., ... & TIAN, D. (2022). Phosphorus biogeochemistry regulated by carbonates in soil. *Environmental Research*, 214, 113894.

GIANNOPOLITIS C. N., RIES S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, Oxônia v. 59, p. 309-314. 1977.

HEATH R L., PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics Maryland Heights* v 125, 189-198. 1968.

KING, C. A., PURCELL, L. C. (2001). Soybean nodule size and relationship to nitrogen fixation response to water deficit. *Crop Science*, 41(4), 1099-1107.

LAZERIS, T. S., SOUZA, J. P. D., VEZZANI, F. M., MATOS, C. L. D., KASCHUK, G. (2021). Ciclos biogeoquímicos de carbono e fósforo em áreas de floresta nativa e horticultura na Região Metropolitana de Curitiba, Brasil. In *Colloquium Agrariae* (Vol. 17, No. 3, pp. 1-11).

LICHTENTHALER, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382.

MARTIN, T. N., STECCA, J. D. L., DEAK, E. A., SINTRA, F. F., MARTINS, M. F., VEY, R. T. (2022). Microrganismos promotores de crescimento, fixadores de nitrogênio e solubilizadores na cultura da soja. *Tecnologias Aplicadas para o Manejo Rentável e Eficiente da Cultura da Soja*, 69.

MENDONÇA, J. J., JUNIOR, M. A. L., CARVALHO, E. X., FRACETTO, G. G. M., FRACETTO, F. J. C., ALVES, M. J. G., PAULA OLIVEIRA, J. (2020). Diversidade, mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas, usando milho como cultura exemplo. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, 25 (2).

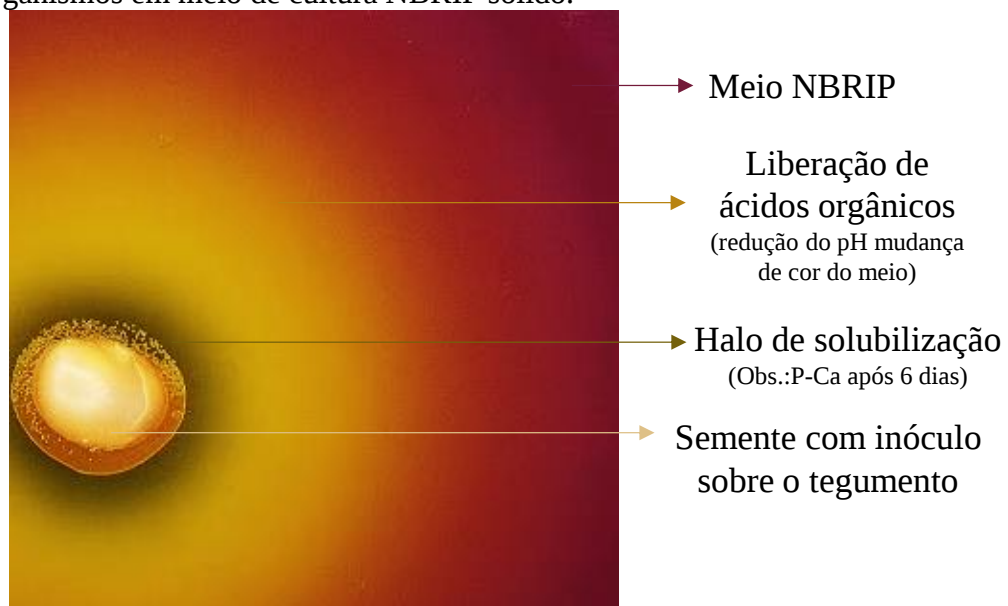
- MOLDES, C.A., MEDICI, L.O., ABRAHÃO, O.S., TSAI, S.M., AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. *Acta Physiologia e Plantarum*, Heidelberg, v. 30, p. 469-479. 2008.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Editora UFLA, Lavras, Brasil, 2006.
- MURPHY, JAMES; RILEY, JOHN P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, v. 27, p. 31-36, 1962. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; ALVES, V. M. C.; GOMES, E. A.; SOUSA, S. M. de; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E. Microrganismos solubilizadores de fósforo e potássio na cultura da soja. In: MEYER, M.; BUENO, A. de F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). *Bioinsumos da cultura da soja* Brasília, DF: Embrapa, 2022. p. 163-179.
- RODRIGUES, C., DAVID, G.Q., REIS, A.R. Photograph registration of Petri dishes in high quality and image editing of microbiological assays. *International Microbiology* 25, 561–570 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00242-z>
- SILVA, L.I.; PEREIRA, M.C.; CARVALHO, A.M.X.; BUTTRÓS, V.H.; PASQUAL, M.; DÓRIA, J. Phosphorus-Solubilizing Microorganisms: A Key to Sustainable Agriculture. *Agriculture* 2023, 13, 462. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020462>
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. 6ª Ed., Porto Alegre, Artmed, 2017.
- VOGELS, G.D., VAN DER DRIFT, C., 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33, 143–157.
- WEI, Y.; ZHAO, Y.; SHI, M.; CAO, Z.; LU, Q.; YANG, T.; WEI, Z. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresour. Technol.* 2018, 247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.092>
- YEMM, E.W., COCKING, E.C., RICKETTS, R.E., 1955. The determination of aminoacids with ninhydrin. *Analyst* 80, 209–214.

Material suplementar

MS 01 – Placas de Petri com meio de cultura NBRIP, sendo ao centro depositado a semente e soja inoculada com produto.



MS 02 – Zoneamento interpretativo do processo de solubilização de fosfatos por microrganismos em meio de cultura NBRIP sólido.



MS 03 – Laudo da análise físico-química do solo.

Nº Amostra	Descrição da Amostra	Talhão	Profundidade	pH H ₂ O	pH CaCl ₂	P Meh	P Res	P Rem	P Total	Na ⁺	K ⁺	S	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	M.O.	C.O.	
15318	AM: 01			ns	5,4	4,9	5	ns	ns	ns	34,0	4	0,90	15,0	3,0	0,0	12,0	5,4	3,1	
				mg/dm³									mmol/dm³						g/Kg	
Nº Amostra	Descrição da Amostra	Talhão	Profundidade	B	Cu	Fe	Mn	Zn	SB	T	t	V%	m%	Ca/Mg	Ca/K	Ca/T	Mg/T	K/T		
				mg/dm³			mg/dm³ (DTPA)			mmol/dm³			%				%			
15318	AM: 01			0,23	0,6	20,0	7,5	0,7	18,80	30,50	18,80	61,6	0,0	5,1	17,2	49,1	9,6	2,9		
Nº Amostra	Descrição da Amostra	Talhão	Profundidade	T argila	Argila	Silte	Areia Total	TIPO DE SOLO	CLAS. TEXTURA											
				g/Kg																
15318	AM: 01			1:1	145,0	50,0	805,0	AD 2	ARENOSO											

MS 04 - Desenvolvimento das plantas de soja ao longo do estádios até a fase V4 com a aplicação dos tratamentos, e detalhe da proteção do solo com cobertura plástica no momento da aplicação.



MS 05 - Laudo da análise dos componentes nutricionais, com destaque ao P, presentes em folhas de plantas de soja submetidas a doses de Phos'Up (mL L⁻¹) aplicadas via foliar com e sem proteção do solo, sendo: T1) Controle; T2) 1 mL sem proteção solo; T3) 2 mL sem proteção; T4) 3 mL sem proteção; T5) 1 mL com proteção; T6) 2 mL com proteção e T7) 3 mL com proteção.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Co	Mo	Na	Al	Ni	Cl	Si
	g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹											
1	37.89	2.97	16.97	13.72	4.69	1.58	48.75	5.63	171.28	122.67	29.15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2	33.70	2.62	14.77	13.71	4.45	1.63	38.80	5.13	146.00	106.38	26.40	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3	37.53	3.16	15.38	14.26	4.42	1.95	48.06	6.28	157.93	147.76	30.39	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4	37.25	3.14	15.45	14.73	4.28	2.09	30.97	5.34	187.13	185.03	32.05	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5	36.82	2.94	17.89	14.99	4.60	2.01	31.29	5.12	231.27	166.34	30.63	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
6	34.66	2.95	16.76	15.42	4.66	2.11	25.76	5.91	172.82	106.17	28.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7	38.98	3.25	14.50	14.59	4.73	1.80	57.35	5.00	196.82	182.58	34.52	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns