



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

FRANCISCO MATHEUS MEDEIROS DE FREITAS

**DIVERSIDADE FUNCIONAL DO GÊNERO NITROSPIRILLUM:
CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS ASSOCIADOS À PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL**

SEROPÉDICA
2026





FRANCISCO MATHEUS MEDEIROS DE FREITAS

DIVERSIDADE FUNCIONAL DO GÊNERO NITROSPIRILLUM: CARACTERIZAÇÃO
DE MECANISMOS ASSOCIADOS À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre**, Área de Concentração em Biologia do Solo.

Orientador: Pesq. Dr. Jerri Édson Zilli

Coorientador: Dr. Alberto Fernandes de Oliveira Junior

SEROPÉDICA
2026

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F862d Freitas, Francisco Matheus Medeiros de, 1996-
Diversidade funcional do gênero Nitrospirillum:
caracterização de mecanismos associados à promoção de
crescimento vegetal / Francisco Matheus Medeiros de
Freitas. - Seropédica, 2026.
169 f.: il.

Orientador: Jerri Edson Zilli.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Agricultura - Ciência do Solo, 2026.

1. genoma funcional. 2. promoção de crescimento. 3.
bactérias diazotróficas. 4. planta-bactéria. I. Zilli,
Jerri Edson, 1974-, orient. II Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Agricultura - Ciência do Solo III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

E também com o apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Bolsa Mestrado Nota 10 (Processo 201.871/2025 SEI-260003/005221/2025).

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, CIÊNCIA DO SOLO**

FRANCISCO MATHEUS MEDEIROS DE FREITAS

**DIVERSIDADE FUNCIONAL DO GÊNERO *NITROSPIRILLUM*:
CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS ASSOCIADOS À PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre**, Área de Concentração em Biologia do Solo.

BANCA EXAMINADORA:

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2026.

Jerri Édson Zilli. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Gabriela Cavalcanti Alves. Dra. Embrapa Agrobiologia

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



ATA DE DEFESA DE TESE Nº 19 / 2026 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.008347/2026-71

Seropédica-RJ, 25 de fevereiro de 2026.

ATA DE DEFESA DE TESE NO PPGA-CS Nº 497

Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e seis, às treze horas, por meio de videoconferência, instalou-se a banca examinadora de Dissertação de Mestrado do aluno FRANCISCO MATHEUS MEDEIROS DE FREITAS, sob a orientação do Pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli. A banca examinadora foi composta pelos Professores/Pesquisadores Jerri Édson Zilli, Leandro Azevedo Santos, Veronica Massena Reis e Gabriela Cavalcanti Alves, sob a presidência do primeiro. A Dissertação intitulada "Diversidade funcional do gênero Nitrospirillum: caracterização de mecanismos associados à promoção de crescimento vegetal" foi iniciada às treze horas e teve a duração de cinquenta minutos de apresentação. O Candidato, após avaliado pela Banca Examinadora obteve o resultado:

(☒) APROVADO (a), devendo o (a) Candidato (a) entregar a versão final em até 60 dias à sua coordenação de curso (de acordo com a Deliberação Nº 84 de 22 de agosto de 2017).

(☐) APROVADO (a) COM RESSALVA, devendo o (a) Candidato (a) satisfazer, no prazo estipulado pela banca, as exigências constantes da Folha de Modificações de Tese de Doutorado anexa à presente ata. Após, entregar a versão final em até 60 dias à sua coordenação de curso (de acordo com a Deliberação Nº 84 de 22 de agosto de 2017).

(☐) REPROVADO (a).

OBSERVAÇÃO: Esta ata é documento administrativo de uso exclusivo da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e NÃO pode ser utilizada a título de comprovação de Grau pelo candidato, que deve seguir o trâmite institucional para emissão de Diploma, Histórico Escolar e demais declarações.

(Assinado digitalmente em 26/02/2026 18:25)
LEANDRO AZEVEDO SANTOS
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO - SUBSTITUTO
CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)
Matrícula: 2626406

(Assinado digitalmente em 26/02/2026 11:55)
JERRI EDSON ZILLI
USUÁRIO EXTERNO
CPF: 927.881.579-91

(Assinado digitalmente em 26/02/2026 12:41)
VERÔNICA MASSENA REIS
USUÁRIO EXTERNO
CPF: 631.052.847-53

(Assinado digitalmente em 09/03/2026 12:19)
GABRIELA CAVALCANTI ALVES
USUÁRIO EXTERNO
CPF: 047.862.407-70

(Assinado digitalmente em 27/02/2026 12:17)
FRANCISCO MATHEUS MEDEIROS DE FREITAS
DISCENTE
Matrícula: 20241003760

Dedico a todos, que assim como eu, foram arretados para encarar o voo e, principalmente aqueles, que nos ajudam a alcançar novos horizontes. Voemos!

AGRADECIMENTOS

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo incentivo à pesquisa e pela concessão da Bolsa Mestrado Nota 10 (Processo 201.871/2025 SEI-260003/005221/2025), que possibilitou a continuidade e conclusão desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado durante o primeiro ano de curso (Processo nº 130177/2024-5), no âmbito da Chamada CNPq nº 73/2022 – Apoio à Pesquisa Científica, Tecnológica e de Inovação: Bolsas de Mestrado e Doutorado – Ciclo 2023.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em especial ao Instituto de Agronomia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (PPGA-CS), pela oportunidade de formação, pelo acolhimento acadêmico e pelo suporte científico oferecido ao longo desta trajetória. Estendo meus sinceros agradecimentos aos professores que compõem o PPGA-CS pelos ensinamentos e contribuições diretas e indiretas para minha formação científica e pessoal. Cada aula e diálogo ajudaram a consolidar a base teórica que sustentou este trabalho.

À **Embrapa Agrobiologia** e ao **Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD)** da Embrapa Agrobiologia, instituição onde este projeto foi desenvolvido, pelo suporte técnico, infraestrutura laboratorial, ambiente de pesquisa e, essencialmente, pelos “∞ cafés” que possibilitaram a execução deste estudo.

Ao Laboratório de Genética e Bioquímica (LGB) pelas inúmeras contribuições e pelo suporte essencial na condução dos ensaios, expresso minha profunda gratidão, especialmente à Dra. **Márcia Vidal**, pelos ensinamentos compartilhados e por constantemente me incentivar a “pensar fora da caixinha”, ampliando minha visão científica, bem como ao Dr. **Bruno Aires**, cuja dedicação e disponibilidade foram fundamentais ao me ensinar, com atenção e rigor, cada etapa dos ensaios realizados. Ao Laboratório de Gramíneas, agradeço pelo acolhimento e suporte na condução dos ensaios fisiológicos, com especial reconhecimento à Dra. **Thamires Ferreira**, que contribuiu de forma significativa para minha adaptação ao grupo e para a organização e execução dos bioensaios.

Ao meu orientador, **Jerri É. Zilli**, que ao longo dessa trajetória representou uma verdadeira figura paterna, acolhendo-me, incentivando-me e desafiando-me constantemente a evoluir. Agradeço por ter aceitado o desafio de me orientar não apenas no mestrado, mas também na especialização e nas validações das pesquisas, sempre com paciência, confiança e generosidade. E, claro, pelo financiamento dos cafés que tornaram essa caminhada mais leve.

Às inúmeras pessoas que, de diferentes formas, contribuíram para a construção deste estudo, meu sincero agradecimento. À Dra. **Gabriela Cavalcanti**, expresso minha sincera gratidão pelo apoio científico constante, pela disponibilidade em auxiliar na condução dos ensaios e por compartilhar, com generosidade, seu conhecimento e experiência. Sua contribuição foi essencial para o desenvolvimento e fortalecimento deste trabalho.

Às pessoas que me acolheram no Rio de Janeiro, especialmente aos pais e familiares de amigos que me receberam com tanto carinho e generosidade, oferecendo não apenas abrigo, mas afeto e segurança em um período de grandes desafios. Serei eternamente grato por terem sido meu suporte longe de casa.

A **Deus**, princípio e sustento de toda vida, cuja grandeza se manifesta tanto no vasto quanto no infinitamente pequeno, nos microrganismos que sustentam silenciosamente a existência.

Que este trabalho seja também uma forma de gratidão pelo invisível que sustenta o visível.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

DECLARAÇÃO DE USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Declaro que não foi feito uso de ferramenta de Inteligência Artificial Generativa neste trabalho.

Todo o conteúdo gerado foi submetido à revisão crítica pelo autor, que assume integral responsabilidade pela originalidade, veracidade e integridade do texto final, em conformidade com a Política de Integridade na Atividade Científica do CNPq (Portaria nº 2.664/2026).

“Somos assim. Sonhamos o voo, mas tememos a altura. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o voo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas. Mas é isso que tememos: o não ter certezas. Por isso trocamos o voo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas moram.”

(Rubem Alves, interpretação de O grande inquisidor).

RESUMO GERAL

FREITAS, Francisco Matheus Medeiros de. **Diversidade funcional do gênero *Nitrospirillum*: Caracterização de Mecanismos associados à Promoção de Crescimento Vegetal**. RJ. 2026. 169f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

A sustentabilidade dos sistemas agrícolas tropicais demanda estratégias que reduzam a dependência de insumos sintéticos e aumentem a eficiência no uso de nutrientes. Neste contexto, bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) representam uma alternativa promissora, embora muitos gêneros com potencial agrônômico permaneçam subexplorados. O gênero *Nitrospirillum*, reconhecido por sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), carece de estudos integrados que liguem sua diversidade genômica aos mecanismos funcionais de promoção de crescimento vegetal. Esta dissertação caracterizou a diversidade funcional de estirpes tipo de *Nitrospirillum* spp., integrando análises genômicas, ensaios bioquímicos e avaliações fisiológicas em plantas. No Capítulo I, dez estirpes foram analisadas quanto à presença de enzimas, vias metabólicas e capacidades funcionais associadas à promoção de crescimento, seguidas de validação fenotípica *in vitro*. As análises genômicas revelaram ausência de rotas canônicas completas para síntese de auxinas dependentes de triptofano, mas identificaram duas enzimas de finalização: a aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3), universal, que converte indol-3-acetaldeído em AIA; e a amidase (EC 3.5.1.4), amplamente distribuída, que hidrolisa intermediários amídicos, permitindo a síntese de ácido fenilacético (PAA), uma auxina não indólica. Todas as estirpes solubilizaram fosfato tricálcico (associado à produção de ácidos orgânicos), mas foram inativas frente a fosfatos de ferro e alumínio. A solubilização de zinco foi mais eficiente para o óxido de zinco (ZnO) do que para o fosfato de zinco (Zn₃(PO₄)₂). A produção de sideróforos e a formação de biofilme variaram significativamente entre as estirpes, correlacionando-se com vias de biossíntese de aminoácidos e de poliaminas, respectivamente. A enzima ACC-desaminase esteve ausente em todas as estirpes. No Capítulo II, as estirpes foram avaliadas quanto à promoção de crescimento em plantas de milho (*Zea mays* L.) e braquiária (*Urochloa* sp. sin *Brachiaria*). As respostas à inoculação foram dependentes do estágio de desenvolvimento e da interação planta-bactéria. No bioensaio, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, mas tendências numéricas indicaram que as estirpes BR 11142^T, BR 11163^T e BR 11828^T apresentaram os maiores incrementos relativos em comprimento radicular total. Em estádios mais avançados, observaram-se tendências de promoção de crescimento, com destaque para BR 11140^T e BR 11145 no milho, especialmente em parâmetros associados a parte aérea. Na braquiária, as

estirpes BR 11865^T, BR 11828^T e BR 11164^T apresentaram ganhos expressivos em biomassa radicular e índice de comprimento radicular por volume. Conclui-se que o gênero *Nitrospirillum* possui arquitetura metabólica singular, baseada na produção de auxinas alternativas (PAA) e na solubilização seletiva de nutrientes, aliadas à sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN). A eficiência da inoculação é modulada pela especificidade estirpe-cultivar e pela disponibilidade de nitrogênio, posicionando o gênero como candidato a bioinsumos direcionados para gramíneas.

Palavras-Chave: genômica funcional; promoção de crescimento; bactérias diazotróficas; planta-bactéria.

GENERAL ABSTRACT

FREITAS, Francisco Matheus Medeiros de. **Functional Diversity of the Genus *Nitrospirillum*: Characterization of Mechanisms Associated with Plant Growth Promotion**. RJ. 2026. 169p. Dissertation (Master Degree in Agronomy, Soil Science). Agronomy Institute, Soil Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil, 2026.

The sustainability of tropical agricultural systems demands strategies that reduce dependence on synthetic inputs and increase nutrient use efficiency. In this context, plant growth-promoting bacteria (PGPB) represent a promising alternative, although many genera with agronomic potential remain underexplored. The genus *Nitrospirillum*, recognized for its biological nitrogen fixation (BNF) capacity, lacks integrated studies linking its genomic diversity to functional plant growth promotion mechanisms. This dissertation characterized the functional diversity of type strains of *Nitrospirillum* spp., integrating genomic analyses, biochemical assays, and physiological evaluations in plants. In Chapter I, ten strains were analyzed for the presence of enzymes, metabolic pathways, and functional capacities associated with growth promotion, followed by phenotypic validation in vitro. Genomic analyses revealed the absence of complete canonical tryptophan-dependent auxin biosynthesis pathways but identified two final-step enzymes: aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3), universal in all strains, which converts indole-3-acetaldehyde into IAA; and amidase (EC 3.5.1.4), widely distributed, which hydrolyzes amide intermediates, allowing the synthesis of phenylacetic acid (PAA), a non-indolic auxin. All strains solubilized tricalcium phosphate (associated with organic acid production) but were inactive against iron and aluminum phosphates. Zinc solubilization was more efficient for zinc oxide (ZnO) than for zinc phosphate (Zn₃(PO₄)₂). Siderophore production and biofilm formation varied significantly among strains, correlating with amino acid and polyamine biosynthesis pathways, respectively. The enzyme ACC deaminase was absent in all strains. In Chapter II, the strains were evaluated for growth promotion in maize (*Zea mays* L.) and signal grass (*Urochloa* sp. syn. *Brachiaria*). The responses to inoculation were dependent on developmental stage and the plant-bacterium interaction. In the bioassay, no statistically significant differences were detected, but numerical trends indicated that strains BR 11142^T, BR 11163^T, and BR 11828^T showed the highest relative increases in total root length. At more advanced stages, growth-promoting trends were observed, with BR 11140^T and BR 11145 standing out in maize, especially for shoot-related parameters. In signal grass, strains BR 11865^T, BR 11828^T, and BR 11164^T showed expressive gains in root biomass and root length per volume index. It is concluded that the genus *Nitrospirillum* possesses a singular

metabolic architecture, based on the production of alternative auxins (PAA) and selective nutrient solubilization, coupled with its ability to biologically fix nitrogen (BNF). The efficiency of inoculation is modulated by strain-cultivar specificity and nitrogen availability, positioning the genus as a candidate for targeted bio-inputs for grasses.

Keywords: functional genomics; growth promotion; diazotrophic bacteria; plant-bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema completo do ensaio de quantificação de compostos indólicos.....	47
Figura 2 – Fluxograma ilustrativo dos protocolos de avaliação da capacidade de solubilização de Fosfatos e Zinco.....	49
Figura 3 – Esquema do procedimento experimental para o ensaio qualitativo de ACC deaminase.	54
Figura 4 – <i>Heatmap</i> metabólico associado à biossíntese de auxinas. Distribuição de enzimas relacionadas ao metabolismo do triptofano e à síntese de ácido indol-3-acético (AIA).	56
Figura 5 – <i>Heatmap</i> metabólico associado à biossíntese auxínica. Distribuição de enzimas relacionadas ao metabolismo da Fenilalanina.	58
Figura 6 – Biossíntese de compostos indólicos in vitro por estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. suplementadas com L-Triptofano. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o erro padrão da média ($n=3$).	60
Figura 7 – <i>Heatmap</i> do metabolismo do (3-indolil)-glicerol-fosfato sintase (IGP).	62
Figura 8 – Atividade da amidase na biossíntese do ácido fenilacético e do ácido indol-3-acético no metabolismo de <i>Nitrospirillum</i>	65
Figura 9 – <i>Heatmap</i> metabólico para síntese de ácidos orgânicos.	70
Figura 10 – <i>Heatmap</i> metabolismo da síntese de L-Triptofano.	72
Figura 11 – Índice de Solubilização de Fosfato tricálcico.	73
Figura 12 – Crescimento bacteriano (mm de colônia) de fontes de Fosfato férrico e Fosfato de alumínio.	74
Figura 13 – Painel de análise da solubilização de Zinco por estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. frente aos tempos de avaliação. Dai = dias após inoculação.	76
Figura 14 – Produção de Sideróforos (medido por formação de halo) de estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. Valores nas barras seguidos de mesmas letras no mesmo tempo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	78
Figura 15 – Via 01053 – Biossíntese de peptídeos não ribossomais do grupo Sideróforos.	81
Figura 16 – Via 00300 – Biossíntese de lisina.	82
Figura 17 – Via 00260 – Metabolismo da glicina, serina e treonina.	83
Figura 18 – <i>Heatmap</i> metabólico para detecção de putrescina e espermidina.	85
Figura 19 – Formação de Biofilme por estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp.	87
Figura 20 – <i>Heatmap</i> do metabolismo do Propanoato em estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. As tonalidades indicam o número de cópias das enzimas (EC): preto = ausência (0), amarelo = 1, laranja = 2 e vermelho = ≥ 3	89
Figura 21 – <i>Heatmap</i> integrativo dos Mecanismos de Promoção de Crescimento Vegetal produzidos por estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. A árvore filogenética à esquerda reflete as relações genômicas entre as estirpes.	90
Figura 22 – Esquema geral dos experimentos I a IV realizados em casa de vegetação com culturas de milho e braquiária.	101

Figura 23 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos atributos de morfologia radicular de plântulas de milho (SHS 5050) inoculadas com <i>Nitrospirillum</i> spp. aos 6 e 10 dias após a inoculação. Setas (vetores) indicam as variáveis medidas pelo WinRHIZO: CRP (Comprimento da Raíz Principal), PA (Comprimento da Parte Aérea), PFA (Peso Fresco da Parte Aérea), PSA (Peso Seco da Parte Aérea), PFR (Peso Fresco Radicular), PSR (Peso Seco Radicular), CRT (Comprimento Radicular Total), RLV (índice de comprimento por volume), Area (Área projetada), Diâmetro (Diâmetro médio), Pontas, Ramificações e Cruzamentos. Os pontos representam as estirpes e controles.....	115
Figura 24 – Variáveis biométricas das duas cultivares de milho AG 8088 Pro2 e SHS 5050 inoculadas com estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. Barras representam médias de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais sobre as barras de tratamentos dentro de cada variável não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	120
Figura 25 – Parâmetros do sistema radicular de duas cultivares de milho submetidas à inoculação com <i>Nitrospirillum</i> spp. As barras representam as médias de quatro repetições. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).	121
Figura 26 – Parâmetros de arquitetura radicular (WinRHIZO) de duas cultivares de milho inoculadas com estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. As barras representam as médias de quatro repetições ($\pm$ erro padrão da média). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças significativas entre cultivares pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	122
Figura 27 – Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa da parte aérea de milho submetido a inoculação com diferentes estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. (A) Altura; (B) Número de Folhas; (C) Diâmetro do colmo; (D) Área Foliar; (E) Massa Fresca da parte aérea (MFA) e (F) Massa Seca da parte aérea (MSA). As médias foram obtidas na última coleta (Semana 4). Colunas seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão da média.	125
Figura 28 – Comprimento radicular (A) e massa seca radicular (B) de plantas de milho em resposta à inoculação com diferentes estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão da média.	126
Figura 29 – Crescimento e acúmulo de biomassa em <i>B. decumbens</i> submetida a diferentes inoculações bacterianas e níveis de nitrogênio (0,6 mM e 6,0 mM), com 41 dias de condução. (A) Altura de plantas; (B) Massa fresca da parte aérea; (C) Massa seca da parte aérea. Médias seguidas por letras minúsculas comparam os tratamentos (estirpes) dentro de cada dose de N. Letras maiúsculas comparam as doses de N dentro de cada tratamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais indicam o desvio padrão da média.	128
Figura 30 – Atributos radiculares de plantas de <i>B. decumbens</i> em resposta à inoculação com estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. selecionadas e níveis contrastantes de nitrogênio mineral. (A) Comprimento radicular; (B) Massa fresca da raiz; (C) Massa seca da raiz. Médias seguidas por letras minúsculas comparam as estirpes dentro da mesma dose de N. Letras maiúsculas comparam as doses de N para a mesma estirpe (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras verticais indicam o erro padrão da média.	129
Figura 31 – Parâmetros morfológicos de parte aérea em plantas de braquiária inoculadas com estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o erro padrão da média.	131

Figura 32 – Parâmetros radiculares (Comprimento e MSR) de Braquiária (44 DAS) sob inoculação com <i>Nitrospirillum</i> spp. Letras indicam grupos estatísticos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o erro padrão da média.....	133
Figura 33 – Atributos morfológicos radiculares de braquiária inoculada com estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais indicam o erro padrão da média (n=6).	135
Figura 34 – Integração de incrementos percentuais médios (%) por estirpe de <i>Nitrospirillum</i> spp. nas variáveis analisadas em experimentos realizado na cultura do milho (tons amarelos) e na cultura da braquiária (tons verdes). Valores de incremento > 0 indicam efeito promotor de crescimento em relação ao controle.....	136
Figura 35 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos incrementos percentuais para as culturas do milho (A) e da braquiária (B). O gráfico biplot mostra a relação entre as estirpes (pontos) e as variáveis de crescimento (vetores).	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genomas obtidos do acesso à base de dados do Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC).	41
Tabela 2 – Catálogo de identificadores de genomas de referência utilizados nas análises in sílico para biossíntese de auxina.	43
Tabela 3 – Relação de espécies do gênero <i>Nitrospirillum</i>	46
Tabela 4 – Preparo da Solução de L-Triptofano.....	48
Tabela 5 – Composição das soluções nutritivas de Hoagland e Arnon, modificadas por Dias (2021) para alto (6,0 mM) e baixo (0,6 mM) suprimento de Nitrogênio.	103
Tabela 6 – Atributos morfofisiológicos e arquitetura radicular de plântulas de milho (SHS 5050) inoculadas com estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. aos 6 e 10 dias após a inoculação.....	113
Tabela 7 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para as variáveis biométricas de duas cultivares de milho inoculadas com diferentes estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp.	118
Tabela 8 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para as variáveis radiculares de duas cultivares de milho inoculadas com diferentes estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp.	120
Tabela 9 – Parâmetros morfofisiológicos e de arquitetura radicular entre cultivares de milho híbrido inoculadas com <i>Nitrospirillum</i> spp.	123
Tabela 10 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para parâmetros de biomassa e biométricos de plantas de milho (cv. SHS 5050) sob inoculação com <i>Nitrospirillum</i> spp.	124
Tabela 11 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para Comprimento radicular (CR) e Massa seca radicular (MSR) de milho sob inoculação com <i>Nitrospirillum</i> spp.	125
Tabela 12 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para componentes da parte aérea de plantas de Braquiária inoculadas com diferentes estirpes bacterianas sob duas doses de nitrogênio.....	127
Tabela 13 – Resumo da análise de variância (ANOVA) de componentes radiculares de plantas de braquiária inoculadas com estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp. sob duas doses de nitrogênio (0,6 mM e 6,0 mM).....	129
Tabela 14 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para parâmetros de biomassa e morfológicos de Braquiária sob inoculação com <i>Nitrospirillum</i> spp. (Dose 6,0 mM de N)..	130
Tabela 15 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para parâmetros radiculares de Braquiária sob inoculação com <i>Nitrospirillum</i> spp. (Dose 6,0 mM de N).....	132
Tabela 16 – Valores do Quadrado médio da análise de variância dos parâmetros morfológicos detalhados (WinRHIZO) de Braquiária sob inoculação com <i>Nitrospirillum</i> spp. (Dose 6,0 mM de N).	134
Tabela 17 – Média dos incrementos percentuais (%) por estirpe e por cultura, integrando todas as variáveis avaliadas nos experimentos com milho (Experimentos I e II) e braquiária (Experimentos III e IV).	137

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	22
2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL	24
2.1 AGRICULTURA E OS DESAFIOS PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR.....	24
2.1.1 Milho (<i>Zea mays</i> L.)	24
2.1.2 Braquiária (<i>Urochloa</i> sp.)	25
2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)	26
2.3 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	27
2.3.1 Auxinas	27
2.3.2 Precursor 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato Deaminase (ACC-Deaminase).....	29
2.3.3 Formação de Biofilme	30
2.3.4 Solubilização de Nutrientes	31
2.3.4.1 SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO (P)	31
2.3.4.2 SOLUBILIZAÇÃO DE ZINCO (ZN).....	32
2.3.5 Produção de Sideróforos	32
2.4 GÊNERO <i>NITROSPIRILLUM</i>	33
CAPÍTULO I	35
3 CAPÍTULO I: PROSPECÇÃO GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO GÊNERO <i>NITROSPIRILLUM</i>.....	36
3.1 INTRODUÇÃO	40
3.2 MATERIAL E METODOS	41
3.2.1 Análises <i>In Silico</i>	41
3.2.1.1 OBTENÇÃO DOS DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE GENOMAS	41
3.2.1.2 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE COMPARATIVA FUNCIONAL.....	41
3.2.1.2.1 <i>Comparative Systems e Integração de Ferramentas</i>	41
3.2.1.2.2 <i>Geração e Interpretação de Resultados</i>	42
3.2.2 Mapeamento Funcional dos Alvos Metabólicos.....	43
3.2.2.1 BIOSÍNTESE DE AUXINA	43
3.2.2.2 SOLUBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES	44
3.2.2.3 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS	44
3.2.2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME	44
3.2.2.5 ACC-DEAMINASE	45
3.2.2.6 ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	45

3.2.3 Estirpes bacterianas: aquisição, cultivo e manutenção de inóculo	45
3.2.4 Quantificação de Compostos Indólicos.....	46
3.2.4.1 PREPARO DO INÓCULO	47
3.2.4.2 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE AUXINAS.....	47
3.2.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE INDOL	48
3.2.4.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS	49
3.2.5 Solubilização de Nutrientes	49
3.2.5.1 PRÉ-INÓCULO, INOCULAÇÃO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.2.5.2 SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO (P).....	50
3.2.5.3 ORGANIZAÇÃO EXPERIMENTAL	50
3.2.5.4 PREPARO DO MEIO DE CULTURA.....	50
3.2.5.5 PROCEDIMENTO ESPECIAL PARA $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	51
3.2.5.6 ANÁLISES.....	51
3.2.5.7 SOLUBILIZAÇÃO DE ZINCO (ZN).....	51
3.2.6 Produção de Sideróforos.....	52
3.2.6.1 PROCEDIMENTOS.....	52
3.2.6.2 DO ENSAIO.....	52
3.2.7 Formação de Biofilme	53
3.2.8 Atividade da ACC-deaminase	54
3.2.9 Preparo do inóculo e Indução enzimática	54
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.3.1 Biossíntese de Compostos Indólicos: Integração genômica e funcional	56
3.3.2 Conservação da via fenilalanina: estratégia Auxínica	57
3.3.3 Produção Experimental de Compostos Indólicos.....	59
3.3.4 Origem do Sinal Indólico	61
3.3.5 Estratégias Metabólicas de Auxinas	63
3.3.5.1 ENZIMAS DE FINALIZAÇÃO: AMIDASE E ALDEÍDO DESIDROGENASE	64
3.3.5.2 REGULAÇÃO METABÓLICA VIA ANTRANILATO	66
3.3.5.3 SINERGIA COM O METABOLISMO VEGETAL.....	66
3.3.6 Solubilização de Nutrientes	69
3.3.6.1 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE MECANISMOS ASSOCIADOS A SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E ZINCO	69
3.3.6.2 ANÁLISES <i>IN VITRO</i> DE ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS.....	71
3.3.6.3 ENSAIO DE SOLUBILIZAÇÃO	72

3.3.6.3.1 Fosfato tricálcico (Ca_3PO_4)	72
3.3.6.3.2 Fosfato férrico (FePO_4) e o fosfato de alumínio (AlPO_4).....	73
3.3.6.3.3 Avaliação da caracterização in sílico com o fenótipo observado in vitro	74
3.3.6.3.4 Solubilização de Zinco (Zn).....	76
3.3.7 Produção de Sideróforos	77
3.3.7.1 DESEMPENHO DAS ESTIRPES	78
3.3.7.2 PERFIL GENÔMICO DE VIAS ASSOCIADAS À PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS	79
3.3.7.3 INTEGRAÇÃO DE RESULTADOS	83
3.3.8 Formação de Biofilme	84
3.3.8.1 ENSAIO DE IN SÍLICO	84
3.3.8.2 ENSAIOS IN VITRO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME	86
3.3.8.3 INTEGRAÇÃO DE RESULTADOS IN SÍLICO E IN VITRO	87
3.3.9 ACC-deaminase	88
3.4 CONCLUSÕES.....	91
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
CAPÍTULO II.....	95
4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ESTIRPES DE NITROSPIRILLUM SPP. EM PLANTAS DE MILHO E BRAQUIÁRIA	96
4.1 INTRODUÇÃO.....	99
4.2 MATERIAL E METODOS	101
4.2.1 Visão Geral.....	101
4.2.2 Bioensaio.....	101
4.2.2.1 HISTÓRICO DA INOCULAÇÃO.....	101
4.2.2.2 COLONIZAÇÃO RADICULAR	102
4.2.2.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RADICULARES E BIOMETRIA	102
4.2.3 Material Biológico e Soluções Nutritivas.....	102
4.2.4 Avaliação do Desempenho Fisiológico das Plantas de Milho	104
4.2.4.1 EXPERIMENTO I – SELEÇÃO DE GENÓTIPO RESPONSIVOS À INOCULAÇÃO	104
4.2.4.2 EXPERIMENTO II – RESPONSABILIDADE DE PLANTAS MILHO INOCULADAS COM ESTIRPES DE NITROSPIRILLUM SPP.	105
4.2.5 Avaliação do Desempenho Fisiológicos de Plantas de Braquiária.....	105
4.2.5.1 EXPERIMENTO III – RESPOSTA DA BRAQUIÁRIA À INOCULAÇÃO SOB DOSES CONTRASTANTES DE NITROGÊNIO	105

4.2.5.2 EXPERIMENTO IV – RESPONSABILIDADE DE PLANTAS DE BRAQUIÁRIA INOCULADAS COM ESTIRPES DE <i>NITROSPIRILLUM</i> SPP.	106
4.2.6 Variáveis e Análise Estatística.....	107
4.2.6.1 VARIÁVEIS BIOMÉTRICAS	107
4.2.6.2 AMBIENTE COMPUTACIONAL.....	107
4.2.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA E MULTIVARIADA - BIOENSAIO	107
4.2.6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA – EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	108
4.2.7 ANÁLISE INTEGRATIVA DOS INCREMENTOS PERCENTUAIS	110
4.2.7.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS INCREMENTOS E COMPARAÇÃO ENTRE CULTURAS	110
4.2.7.2 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	110
4.2.7.3 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS.....	111
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
4.3.1 Análises do Bioensaio	112
4.3.1.1 ALTERAÇÕES NA ARQUITETURA E ESTRATÉGIA DE EXPLORAÇÃO.....	114
4.3.1.2 RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE INDÓIS E FENÓTIPO RADICULAR	116
4.3.2 Análises do Experimento I – Seleção de Genótipos Responsivos a Inoculação	118
4.3.2.1 DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA.....	118
4.3.2.2. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RADICULAR	120
4.3.3 Análises do Experimento II - Responsividade de plantas Milho Inoculadas com Estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp.....	123
4.3.3.1 DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E BIOMASSA AÉREA.....	123
4.3.3.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RADICULAR	125
4.3.4 Análises do Experimento III – Resposta da Braquiária à Inoculação sob doses contrastantes de Nitrogênio	127
4.3.4.1 DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA.....	127
4.3.4.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RADICULAR	128
4.3.5 Análises do Experimento IV– Responsividade de plantas de Braquiária Inoculadas com Estirpes de <i>Nitrospirillum</i> spp.	130
4.3.5.1 BIOMASSA E DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA.....	130
4.3.5.2 COMPONENTE RADICULAR E ESTRATÉGIA DE CRESCIMENTO.....	132
4.3.5.3 ARQUITETURA RADICULAR – ANÁLISE WINRHIZO	133
4.3.6 Integração dos Incrementos Percentuais e Análise Descritiva dos Perfis Respostas das Estirpes	135
4.4 CONCLUSÕES.....	140

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	142
REFERÊNCIAS	143
APÊNDICES	163

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em um cenário marcado pela expansão das fronteiras agrícolas sobre solos degradados e pela necessidade urgente de recuperação de extensas áreas de pastagens degradadas, a dependência exclusiva de fertilizantes minerais revela limitações econômicas, logísticas e ambientais. Essa realidade impõe a adoção de estratégias capazes de aumentar a eficiência no uso de nutrientes, fortalecer a resiliência das plantas a estresses ambientais e reduzir os impactos negativos associados aos sistemas agrícolas.

Nesse contexto, tecnologias baseadas em processos biológicos emergem como pilares da intensificação sustentável da agricultura. O uso de insumos microbianos destaca-se como uma alternativa promissora para ativar processos biogeoquímicos intrínsecos do solo, reduzir a dependência de insumos químicos e promover sistemas produtivos mais eficientes e resilientes. Entretanto, a consolidação do uso de bioinsumos requer avanços científicos que permitam compreender, de forma funcional e estrutural, os microrganismos empregados, garantindo eficiência agrônômica, previsibilidade de resposta e segurança de uso.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) constituem um grupo de microrganismos capazes de beneficiar as plantas por meio de múltiplos mecanismos diretos e indiretos, incluindo a produção de fitormônios, a mitigação do estresse por etileno via atividade da ACC-desaminase, a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização e mobilização de nutrientes limitantes, a produção de sideróforos e exopolissacarídeos, bem como a formação de biofilmes e a supressão de fitopatógenos. A atuação integrada desses mecanismos posiciona as BPCV como elementos centrais na interface solo–planta–microrganismo, especialmente em ambientes tropicais caracterizados por baixa fertilidade natural e elevada pressão ambiental.

Apesar do avanço significativo na pesquisa sobre BPCV, se observa que os esforços científicos permanecem concentrados em um conjunto restrito de gêneros microbianos, limitando a exploração de táxons alternativos com potencial agrônômico relevante. Nesse contexto, o gênero *Nitrospirillum*, composto por bactérias diazotróficas e já empregado com sucesso em formulações comerciais, permanece sub-representado em estudos voltados à prospecção sistemática de mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

Análises recentes baseadas na integração de abordagens cienciométricas e genômicas comparativas, aplicada ao gênero *Nitrospirillum*, evidenciou de forma objetiva essa lacuna de conhecimento. A análise cienciométrica (2022–2025), conduzida a partir da base Web of

Science e visualizada por meio do VOSviewer, revelou a concentração da produção científica em poucos gêneros bacterianos, indicando a subexploração de *Nitrospirillum* em estudos de promoção de crescimento vegetal. Paralelamente, a aplicação de um *pipeline* de genômica comparativa na plataforma BV-BRC demonstrou que estirpes desse gênero apresentam um repertório genético equivalente em diversas funções-chave de promoção de crescimento, incluindo rotas alternativas de biossíntese auxínica, quando comparadas a gêneros mais amplamente estudados (Freitas *et al.*, 2025).

Esses resultados não apenas confirmam o potencial biotecnológico do gênero, mas também reforçam a importância de abordagens integradas que avancem da predição genômica para a validação funcional, por meio de ensaios bioquímicos e avaliações em sistemas planta-solo. Assim, a integração entre cienciometria e genômica comparativa estabelece uma base racional para direcionar estratégias de prospecção microbiana, enquanto a validação experimental tem seu valor para confirmar a expressão funcional desses mecanismos e compreender sua relevância agrônoma em condições reais.

Culturas agrícolas e forrageiras de interesse para os sistemas tropicais brasileiros, como o milho (*Zea mays* L.) e as braquiárias (*Urochloa* sp.), atuam como modelos adequados para esse tipo de investigação. O milho destaca-se por sua relevância econômica e por sua elevada demanda nutricional, enquanto as espécies de braquiária desempenham papel central na pecuária tropical e na recuperação de solos degradados, sendo fortemente dependentes de interações benéficas na rizosfera para expressar seu potencial produtivo em ambientes de baixa fertilidade.

Mediante a esse contexto, esta dissertação parte da hipótese de que a eficiência agrônoma de estirpes do gênero *Nitrospirillum* está associada à expressão integrada e sinérgica de múltiplos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, e que a caracterização funcional desses mecanismos é fundamental para otimizar seu desempenho em culturas estratégicas.

Assim, o objetivo central deste trabalho foi caracterizar nove dez do gênero *Nitrospirillum* quanto aos seus mecanismos de promoção de crescimento vegetal integrando análises genômicas *in silico*, com validações bioquímicas *in vitro* e avaliações fisiológicas em plantas *in vivo*. Ao aprofundar o entendimento funcional desse gênero, o estudo busca contribuir para o avanço científico no uso racional de insumos, para a valorização da biodiversidade microbiana e para o desenvolvimento de soluções sustentáveis voltadas à agricultura tropical.

2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 AGRICULTURA E OS DESAFIOS PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR

A agricultura contemporânea enfrenta o desafio de produzir mais alimentos em um planeta de recursos limitados pressionada pelo crescimento populacional que supera 8 bilhões em 2023 e pode chegar a 9,7 bilhões até 2050. Além disso, os eventos de alterações climáticas e da degradação ambiental exigem sistemas inéditos de segurança alimentar (FAO, 2024; Hart, 2022). Diante desses cenários, torna-se essencial a transição para sistemas agrícolas resilientes, com ênfase em tecnologias de baixo impacto.

O Brasil consolida-se como um dos líderes globais no setor de bioinsumos, e essa adesão é vista como uma solução estratégica importante, alinhada a objetivos cruciais para o futuro do planeta, como o ODS (objetivo de desenvolvimento sustentável) 2 (Fome Zero), o ODS 13 (Ação Contra a Mudança Climática) e o ODS 15 (Vida Terrestre) (Gerum *et al.*, 2023; Jacintho, 2022; Movimento Econômico, 2024).

Culturas estratégicas como o milho (*Zea mays* L.) e a braquiária (*Urochloa* sp.) assumem papel central nesse processo, tanto pelo peso econômico quanto pelo potencial de integração em sistemas produtivos mais equilibrados (Coelho *et al.*, 2023; Machado; Garcia; Concenço, 2023). A incorporação de insumos nessas culturas não apenas potencializa a produtividade, como também aumenta a resiliência dos sistemas agrícolas frente às constantes alterações climáticas (Guimarães *et al.*, 2022; Naamala; Smith, 2020). No entanto, para que o potencial máximo desses produtos biológicos seja alcançado, é crucial compreender e caracterizar os microrganismos que os compõem.

2.1.1 Milho (*Zea mays* L.)

Dentre os cereais cultivados no Brasil, o milho é o mais expressivo, por suas características fisiológicas, a cultura possui alto potencial produtivo e os valores que envolvem custos de produção, são superados apenas pelo da soja. A produtividade do milho é altamente dependente de um amplo espectro de condições climáticas e de solo (Farooqi *et al.*, 2022; Kim; Lee, 2023).

Além de sua importância agronômica, o milho é amplamente reconhecido como uma espécie modelo para estudos genéticos, fisiológicos e genômicos, desempenhando papel central no melhoramento genético de cereais e no mapeamento de características agronomicamente

relevantes (Peer *et al.*, 2024; Zhou; Xu, 2024). Investigações envolvendo a domesticação, evolução do genoma, fisiologia do desenvolvimento, epigenética, resistência a pragas, heterose, herança quantitativa e genômica comparativa têm utilizado o milho como sistema experimental de referência (Strable; Scanlon, 2009).

Do ponto de vista nutricional, a cultura apresenta elevada exigência por nitrogênio (N), sendo este o nutriente requerido em maior quantidade e, frequentemente, um dos principais fatores limitantes da produtividade de grãos (Dawar *et al.*, 2024; He *et al.*, 2024; Oliveira *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2018). Nesse contexto, estratégias biológicas capazes de aumentar a eficiência de uso de nutrientes tornam-se particularmente relevantes para a cultura.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), especialmente aquelas com metabolismo diazotrófico associativo (fixadoras de N), exercem papel estratégico na cultura do milho ao atuarem por múltiplos mecanismos, incluindo a produção de fitormônios que modulam a arquitetura radicular e ampliam a exploração do solo (Francioli *et al.*, 2025; Ríos-Ruiz *et al.*, 2024; Vurukonda *et al.*, 2016). Esses microrganismos podem atuar como endófitos, aumentando a atividade da nitrato redutase e contribuindo para o crescimento vegetativo e o rendimento da cultura (Cassán *et al.*, 2008; Hungria *et al.*, 2010; Portugal *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2020).

Dessa forma, o milho constitui um sistema experimental altamente adequado para a caracterização de mecanismos de promoção de crescimento vegetal mediados por bactérias, permitindo a integração entre abordagens bioquímicas, fisiológicas e genômicas, como as desenvolvidas no presente estudo.

2.1.2 Braquiária (*Urochloa* sp.)

As mudanças climáticas e o crescimento populacional global têm intensificado a demanda por sistemas pecuários mais produtivos e sustentáveis, especialmente em regiões tropicais, onde as pastagens constituem a base da alimentação de ruminantes (Montagu, 2020). Nesse contexto, as gramíneas forrageiras do gênero *Urochloa* (sin. *Brachiaria*) assumem papel estratégico na produção pecuária e na sustentabilidade dos agroecossistemas tropicais.

Espécies como *Urochloa brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis* destacam-se por sua elevada produção de biomassa, rusticidade, adaptação a solos de baixa fertilidade e tolerância a estresses físicos e químicos, sendo amplamente utilizadas em pastagens tropicais ao redor do mundo (Jank *et al.*, 2014; Vorontsova, 2022). Além disso, essas

espécies apresentam sistema radicular profundo e altamente ramificado, favorecendo a exploração do solo, a ciclagem de nutrientes e a estabilização da matéria orgânica (Baptistella *et al.*, 2020; Rosolem; Steiner, 2017).

No Brasil, grande parte das áreas de pastagem encontra-se em algum grau de degradação, caracterizada por baixa disponibilidade de nutrientes, compactação do solo e redução da atividade biológica. Estimativas recentes indicam que cerca de 40% das pastagens brasileiras apresentam sinais de degradação significativa (Bolfe *et al.*, 2024). Tradicionalmente, a recuperação dessas áreas tem sido baseada no uso intensivo de fertilizantes minerais, prática que eleva os custos de produção e apresenta eficiência limitada em solos tropicais altamente intemperizados (Almeida *et al.*, 2025; Cruz *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a associação entre *Urochloa* sp. e microrganismos promotores de crescimento vegetal representa uma estratégia para a recuperação de pastagens degradadas, ao favorecer processos-chave ligados à nutrição vegetal, ao desenvolvimento radicular e à melhoria da qualidade do solo (Duarte *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2020; Hungria *et al.*, 2021).

2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), também descritas como *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR), constituem um grupo funcional de microrganismos benéficos associados à rizosfera e tecidos vegetais que favorecem o crescimento e a saúde das plantas. Esses microrganismos ocorrem naturalmente no solo e podem ser isolados e aplicados como inoculantes em sistemas agrícolas para reduzir a dependência de fertilizantes sintéticos e aumentar a sustentabilidade produtiva (de Andrade *et al.*, 2023; Ikiz; Dasgan; Gruda, 2024).

Entre os microrganismos associados a esse grupo, se destacam diversos gêneros presentes em diferentes espécies vegetais, tais como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter* (Ríos-Ruiz *et al.*, 2024). Além disso, assim como *Nitrospirillum* outros gêneros têm se destacado, como *Paenibacillus* e *Pantoea*, atuando de forma sinérgica e reforçando a diversidade funcional dos BPCV em sistemas agrícolas (Kurt, 2025; Liu *et al.*, 2025; Tariq *et al.*, 2025).

O papel benéfico dessas comunidades microbianas na promoção de crescimento está relacionado à sua capacidade de modular processos fisiológicos das plantas e interações bioquímicas no solo, o que pode resultar em maior absorção de nutrientes, melhor estrutura radicular e maior resistência a estresses ambientais (Zhang, Tongrui *et al.*, 2024).

2.3 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

As BPCV podem estimular o desenvolvimento das plantas através de diferentes processos microbianos, sendo os mais estudados: (i) síntese de fitormônios como: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, ácido salicílico, desempenhando papéis na divisão e diferenciação celular, impactando o crescimento vegetal, em particular das raízes e conferindo às plantas tolerância a estresses abióticos e bióticos; (ii) síntese da enzima ACC-deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato, precursor do etileno), responsável pela degradação do ACC, transformando-o em α -cetobutirato e amônia, retardando a produção de etileno sob condições de estresses bióticos e abióticos e promovendo desenvolvimento radicular; (iii) síntese de exopolissacarídeos (EPS); (iv) formação de biofilmes, favorecendo a sobrevivência sob condições de estresses abióticos e também favorecendo a disponibilidade de nutrientes; (v) solubilização e mineralização de nutrientes, aumentando a disponibilidade desses nutrientes (Alemneh *et al.*, 2021; Almazrouei *et al.*, 2025a; Bhat *et al.*, 2023; de Andrade *et al.*, 2023; Jalal-Ud-Din; Elahi; Mubeen, 2024; Liu *et al.*, 2025).

2.3.1 Auxinas

As BPCV influenciam o desenvolvimento das plantas por meio da síntese e modulação de hormônios, que são sinais químicos fundamentais para processos fisiológicos e adaptativos. Entre os fitormônios, as auxinas, em particular o ácido indol-3-acético (AIA), o principal representante das auxinas, desempenham papel central na regulação do crescimento celular, diferenciação tecidual e respostas adaptativas à disponibilidade de recursos e estresses ambientais. A produção bacteriana de AIA e sua influência sobre o *pool* auxínico da planta têm sido destacada como um dos mecanismos mais significativos de promoção de crescimento, afetando a arquitetura radicular, a eficiência nutricional e a tolerância a estresses abióticos (Etesami; Glick, 2024; Giri; Virk, 2025).

A auxina não atua apenas como reguladora de crescimento, mas uma molécula integradora de múltiplos processos fisiológicos. Esse hormônio coordena a elongação e a divisão celular, define padrões de diferenciação vascular, controla tropismos físicos, como fototropismo e gravitropismo, e influencia diretamente a plasticidade radicular, aspectos centrais para estratégias de aquisição de água e nutrientes em ambientes variáveis (Gao; Zhuang; Zhang, 2024; Musazade; Mrisho; Feng, 2025). Estudos recentes também demonstram

que tanto plantas quanto microrganismos são capazes de modular os níveis locais e sistêmicos de AIA, alterando a sensibilidade tecidual e integrando sinais de desenvolvimento com estímulos ambientais (Kunkel; Ludwig-Müller; Ma, 2024).

A produção de auxina microbiana pode alterar a dinâmica de sinalização hormonal nas raízes, promovendo a formação de raízes laterais, enraizamento adventício e pelos radiculares. Esses efeitos se refletem no aumento da superfície de exploração do solo, favorecendo a exploração de água e nutrientes, especialmente sob condições de limitação ambiental ou estresse abiótico (Swarnakar; Chakraborty, 2025). Além disso, a interação entre a sinalização de auxina e outros hormônios, como citocininas e giberelinas, modula de forma integrada a arquitetura do sistema radicular, reforçando o caráter adaptativo dessas interações fisiológicas (Jan *et al.*, 2024; Ma *et al.*, 2024).

A biossíntese de AIA em microrganismos associados a plantas é um processo complexo e diversificado, frequentemente dependente do aminoácido triptofano presente nos exsudatos radiculares, cuja composição pode variar de acordo com o genótipo da planta (Gomes *et al.*, 2022; Woodward; Bartel, 2005; Zhao, 2010). Contudo, embora o ácido indol-3-acético seja a auxina biossintetizada por microrganismos mais estudada, bactérias associadas à rizosfera e a tecidos internos das plantas também são capazes de sintetizar outros compostos com atividade auxínica, incluindo auxinas não indólicas ou moléculas denominadas *auxin-like*, que contribuem de forma funcional para a promoção do crescimento vegetal (Lee *et al.*, 2024; Pantoja-Guerra; Valero-Valero; Ramirez, 2024).

Além do AIA, destaca-se o ácido fenilacético (PAA), uma auxina não indólica produzida por microrganismos associados às plantas e reconhecida por sua capacidade de modular respostas fisiológicas vegetais de maneira semelhante, embora não idêntica, ao AIA. A presença de PAA e de outros compostos *auxin-like* sugere que as auxinas microbianas constituem um espectro mais amplo de sinais hormonais do que o AIA isoladamente, aumentando a complexidade da regulação hormonal em sistemas planta–microrganismo (Kunkel; Ludwig-Müller; Ma, 2024; Lee *et al.*, 2024; Perez *et al.*, 2023). Essas auxinas alternativas podem atuar de forma complementar ou diferencial ao AIA, multiplicando as respostas fisiológicas da planta e reforçando a complexidade das interações hormonais mediadas por microrganismos benéficos.

Além dos compostos produzidos diretamente por microrganismos, compostos orgânicos complexos do solo, como os ácidos húmicos, também exibem atividade *auxin-like*, podendo modular a sinalização hormonal vegetal e induzir respostas fisiológicas típicas de auxinas no

sistema radicular. Estudos indicam que tratamentos com ácidos húmicos podem estimular vias de biossíntese e percepção de auxinas e citocininas, promovendo crescimento radicular e aumento da expressão de genes associados à resposta hormonal (Pantoja-Guerra; Valero-Valero; Ramirez, 2024; Rathor et al., 2024). Esses efeitos reforçam a ideia de que a regulação auxínica em sistemas solo-planta-microrganismo envolve um conjunto ampliado de sinais bioativos, integrando metabólitos microbianos, substâncias húmicas e hormônios vegetais, em um cenário complexo de *crosstalk* hormonal.

2.3.2 Precursor 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato Deaminase (ACC-Deaminase)

As plantas em geral elevam seus níveis de etileno em resposta a estresses abióticos, o que pode reduzir o crescimento radicular e geral. O etileno é um hormônio gasoso essencial para processos de desenvolvimento, como alongamento de raízes, senescência e respostas a estresse, sendo sintetizado a partir do precursor 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) por meio da ação das enzimas ACC sintase e ACC oxidase. A acumulação excessiva de etileno sob estresse e altos níveis de ACC está associada à inibição do crescimento vegetal (Baharudin; Osman, 2023; Tabassum *et al.*, 2024).

Dentre os processos realizados pelas BPCV, a ação da enzima ACC-deaminase é considerada como um dos principais mecanismos capazes de promover o crescimento vegetal. Sua importância se dá devido ao seu papel na modulação dos níveis de etileno no sistema das plantas (Ferreira; Cunha, 2020). Bactérias que produzem ACC-deaminase são frequentemente associadas à rizosfera ou ao interior de tecidos vegetais e atuam diretamente na degradação de ACC, o precursor do etileno em plantas.

Parte do ACC produzido pela planta pode ser exsudado e absorvido por bactérias que o convertem em amônia e α -cetobutirato por meio da ação da enzima ACC-deaminase. Esses dois produtos de reação são utilizados pelas bactérias como fonte de energia e de nitrogênio. A absorção e subsequente hidrólise do ACC pela bactéria diminuem a quantidade de ACC no ambiente externo da planta. Dessa maneira, para que o equilíbrio entre os níveis internos e externos de ACC seja mantido, a planta deve exsudar quantidades crescentes de ACC (Orozco-Mosqueda; Santoyo; Glick, 2023). Desse modo, o ACC exsudado é metabolizado pela bactéria e transformado em uma fonte de nitrogênio. Esta interação permite que microrganismos com ACC-deaminase prosperem em nichos onde o nitrogênio está em baixa disponibilidade, utilizando ACC como recurso nutricional (Abd-Elhalim *et al.*, 2024). Desse modo, as plantas

que interagem com BPCVs que possuem atividade de ACC-deaminase geralmente desenvolvem raízes e brotações maiores e acumulam maior biomassa que as ajudam a se adaptar ao ambiente (Almazrouei *et al.*, 2025; Gupta, Anmol *et al.*, 2022; Herpell *et al.*, 2023).

2.3.3 Formação de Biofilme

Um biofilme é um conjunto de células microbianas associadas à superfície que é encerrado em uma matriz de substância polimérica extracelular (Donlan, 2002). Comumente, são comparados aos hidrogéis por conterem 80 a 90% de água e sua maior contribuição de massa (~80% do seu peso seco) é atribuída à sua rede de biopolímeros da matriz extracelular (Chai; Zaburdaev; Kolter, 2024).

Biofilmes existem em uma ampla variedade de superfícies, incluindo superfícies foliares, tecidos vivos, dispositivos médicos implantados, cascos de navios e trocadores de calor, onde o fluxo de nutrientes está disponível e a fixação a uma superfície é possível por meio da interação de características do meio de crescimento, substrato e superfície celular (Monnappa *et al.*, 2014; Simões; Simões; Vieira, 2010; Singh *et al.*, 2015).

Estruturas de superfície celular como pili, fímbrias, flagelos, outras proteínas, enzimas envolvidas na ligação e metabolismo do diguinalato cíclico (c-di-GMP), lipopolissacarídeos (LPS) e polissacarídeos extracelulares (EPS) são componentes importantes nos estágios iniciais da fixação bacteriana, superando as forças repulsivas associadas ao substrato (Donlan, 2002; O'Toole, 2011).

A adesão bacteriana é um processo que pode ser afetado por diferentes fatores, incluindo as características físico-químicas das bactérias (hidrofobicidade, carga superficial), as propriedades das superfícies do material (composição química, carga superficial, hidrofobicidade, rugosidade e textura) e pelos fatores ambientais (temperatura, pH, tempo de exposição, concentração bacteriana, tratamento químico ou a presença de antimicrobianos e condições de fluxo de fluido) (Araújo *et al.*, 2010; Simões; Simões; Vieira, 2010).

Essas multicomunidades podem ficar aderidas em um substrato, sendo recobertas, ou não, por uma matriz polimérica, a qual é produzida pelas próprias bactérias (Bhinu, 2006). O biofilme formado na rizosfera por BPCVs desempenha diferentes papéis na proteção das plantas aos estresses bióticos e abióticos. Entre os avanços que impactam a compreensão de biofilmes, destaca-se a investigação dos genes envolvidos na adesão celular e na formação do biofilme (Sauer *et al.*, 2022). As bactérias no ambiente e *in vivo* frequentemente vivem como biofilmes

onde as células são incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Auerbach *et al.*, 2000).

2.3.4 Solubilização de Nutrientes

As mudanças climáticas e o crescimento populacional global têm intensificado a demanda por sistemas pecuários mais produtivos e sustentáveis, especialmente em regiões tropicais, onde as pastagens constituem a base da alimentação de ruminantes.

2.3.4.1 SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO (P)

O fósforo (P) é um nutriente limitante para o crescimento das plantas, pois, embora seu teor em muitos solos seja relativamente elevado, a fração disponível para absorção é bastante reduzida, sobretudo em solos tropicais altamente intemperizados. Nesses ambientes, grande parte do P encontra-se imobilizada em formas insolúveis de fosfatos de cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al), ou fortemente adsorvida a argilominerais (Gomes *et al.*, 2022). Entre as alternativas que possibilitam a melhoria na eficiência das fontes fosfatadas, destaca-se a ação dos microrganismos com capacidade de solubilizar fosfato (Prabhu; Borkar; Garg, 2019). Estes microrganismos desempenham papel primordial na ciclagem de P no solo e conseguem transformar o P insolúvel disponível às plantas (Owen *et al.*, 2015).

Dessa forma, a biota do solo pode contribuir com a fertilidade do solo e suprir as necessidades nutricionais das plantas. Aplicações agrícolas de cepas bacterianas que melhoram o uso de P demonstraram efeitos positivos na produtividade das culturas (Cozzolino *et al.*, 2021; Luo *et al.*, 2024). BPCV com capacidade de solubilizar fosfatos (PSB) desempenham papel fundamental na ciclagem e disponibilização de P, convertendo formas insolúveis em ortofosfatos assimiláveis por plantas por meio de acidificação do meio, secreção de ácidos orgânicos e enzimas fosfatases, estimulando a absorção de P e o crescimento vegetal (Samavat *et al.*, 2025).

Os mecanismos associados à disponibilização de P no solo por bactérias são variados e estão relacionados, principalmente à liberação de ácidos orgânicos, como acetato, succinato, citrato, gluconato e consequente redução de pH do solo, produção de exopolissacarídeos, além da ação de enzimas fosfatases e fitases (de Almeida Leite *et al.*, 2024; Goldstein; Lester; Brown, 2003; Santos-Torres *et al.*, 2021). A lógica é que os grupos carboxílicos dos ácidos orgânicos

se ligam aos cátions responsáveis pela precipitação do fosfato, aumentando a disponibilidade de fósforo (Ström *et al.*, 2001).

Além da produção de ácidos orgânicos, outros mecanismos também podem estar envolvidos na solubilização de P, como acidificação (Braz; Nahas, 2012; Pan; Cai, 2023), produção de sideróforos (Faller; Leite; Kuramae, 2024; Hamdali *et al.*, 2008) e produção de exopolissacarídeos (Oliveira *et al.*, 2024; Yi; Huang; Ge, 2008).

2.3.4.2 SOLUBILIZAÇÃO DE ZINCO (ZN)

O zinco (Zn) é um micronutriente essencial para plantas, atuando como cofator de enzimas envolvidas na síntese de proteínas, fotossíntese, metabolismo de auxinas e resistência a estresses abióticos; entretanto, sua mobilidade na solução do solo é baixa, especialmente em solos com pH elevado ou elevada adsorção a colóides minerais, reduzindo substancialmente a disponibilidade de Zn para as raízes vegetais. Em solos tropicais intensamente intemperizados, a formação de compostos de zinco pouco solúveis impõe uma limitação adicional à absorção radicular (Jalal; Júnior; Teixeira Filho, 2024; Khatun *et al.*, 2018).

Enquanto o manejo com fertilizantes de Zn é uma prática comum para corrigir deficiências, bactérias solubilizadoras de zinco (ZnSB) têm se destacado como alternativa sustentável (Ali *et al.*, 2023; Upadhyay *et al.*, 2025). Esses microrganismos mobilizam Zn por meio da produção de ácidos orgânicos que acidificam o ambiente da rizosfera, da quelatação de íons Zn e da secreção de ligantes orgânicos que liberam Zn^{2+} de compostos insolúveis, tornando-o mais disponível para absorção pelas plantas (Jalal-Ud-Din; Elahi; Mubeen, 2024; Mumtaz *et al.*, 2022).

A presença de BPCV em um ecossistema solo-raiz pode reduzir o efeito tóxico de metais em excesso ao formar complexos estáveis com Zn e outros metais pesados, reduzindo sua disponibilidade tóxica no solo e favorecendo a homeostase mineral da planta durante condições ambientais adversas (Shahid *et al.*, 2025; Shahzad *et al.*, 2023).

2.3.5 Produção de Sideróforos

Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular produzidas por microrganismos em resposta à limitação de ferro (Fe) no solo e possuem alta afinidade por Fe^{3+} , facilitando a captura e disponibilização desse micronutriente para as plantas (Xie *et al.*, 2024). Ao sequestrar ferro e formar complexos solúveis, sideróforos tornam o ferro mais acessível às plantas em solos onde

ele está fortemente ligado a minerais, particularmente em solos calcarosos ou com baixa solubilidade de Fe (Kamath *et al.*, 2025; Zhang, Yating *et al.*, 2025).

A produção de sideróforos por BPCV não apenas melhora a nutrição de ferro das plantas, reduzindo clorose e aumentando vigor vegetativo, mas também pode influenciar a disponibilidade de outros micronutrientes, como P e Zn, por meio de processos de quelação e competição por íons metálicos na rizosfera, favorecendo a mobilização e absorção desses elementos essenciais (Gupta, Govind *et al.*, 2026; Zhang, Yating *et al.*, 2025).

Além disso, sideróforos podem modular a microbiota do solo ao conferir vantagem competitiva a microrganismos benéficos e suprimir a proliferação de patógenos por limitação de ferro, colaborando com a saúde geral das plantas e a resistência a estresses bióticos (Hanif *et al.*, 2024; Hegde; Premchand; Raghavendra, 2025; Kamath *et al.*, 2025).

Por fim, a atividade siderofórica está frequentemente associada a outras funções promotoras de crescimento (como produção de ACC-deaminase, fitormônios e solubilização de nutrientes) tornando os sideróforos um dos mecanismos sistêmicos pelos quais BPCV contribuem para a nutrição mineral e o desempenho das culturas em solos de baixa fertilidade (Plascencia-Espinosa *et al.*, 2025).

2.4 GÊNERO *NITROSPIRILLUM*

As células de *Nitrospirillum* são Gram-negativas, não esporulantes e que se desenvolvem bem em meios específicos e apresentam uma temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C, com uma faixa de pH que varia de 5 a 8 (Baldani *et al.*, 2024). O gênero *Nitrospirillum* foi formalmente proposto em 2014 após a reclassificação da espécie *Azospirillum amazonense* para *Nitrospirillum amazonense*, com base em análises filogenéticas detalhadas de sequências de rRNA 16S e outros marcadores genéticos (Lin *et al.*, 2014; Oren; Garrity, 2018; Schwab *et al.*, 2018). Esta reorganização taxonômica consolidou o gênero na família Azospirillaceae (Hördt *et al.*, 2020).

Desde então, foram descritas mais duas espécies: *Nitrospirillum iridis*, isolada de solo rizosférico na Coreia, e a recém-descoberta *Nitrospirillum viridazoti*, isolada de plantas gramíneas no Brasil (Baldani *et al.*, 2024; Chung *et al.*, 2015). Análises integradas recentes levaram à proposta e a descrição formal de seis novas espécies: *Nitrospirillum bahiense* sp. nov. (= BR 11865^T), *Nitrospirillum guanabarensense* sp. nov. (= BR 11163^T), *Nitrospirillum guaranorum* sp. nov. (= BR 11164^T), *Nitrospirillum karajorum* sp. nov. (= BR 11752^T),

Nitrospirillum goiasense sp. nov. (= BR 11828^T) e *Nitrospirillum pindoramense* sp. nov. (= BR 11622^T). As espécies pertencentes a esse gênero apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em diferentes biomas brasileiros, como a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado, além de demonstrarem elevada capacidade de colonização de dezenas de espécies vegetais, com destaque para gramíneas da família Poaceae (Zilli *et al.*, 2025).

Os microrganismos incluídos nesse gênero também se destacam por sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e por promover o crescimento vegetal em várias culturas, especialmente gramíneas (Lange; Moreira, 2002; Rodrigues *et al.*, 2008). A espécie *N. amazonense* (*N. viridazoti*) tem sido amplamente estudada e utilizada comercialmente como inoculante agrícola para cana-de-açúcar no Brasil, promovendo melhorias significativas na produtividade e na eficiência do uso de nitrogênio, especialmente em áreas de solos de baixa fertilidade (Bello; Ferreira; César, 2018; Domingues Duarte *et al.*, 2020; Schultz *et al.*, 2014; Schwab *et al.*, 2023).

CAPÍTULO I

PROSPECÇÃO GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO GÊNERO *NITROSPIRILLUM*

3 CAPÍTULO I: PROSPECÇÃO GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO GÊNERO *NITROSPIRILLUM*

RESUMO

A integração entre ferramentas de bioinformática e bioquímicas tem acelerado a prospecção de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). O gênero *Nitrospirillum*, reconhecido pela capacidade de fixação de nitrogênio e produção de reguladores de crescimento, foi investigado neste capítulo, por meio da correlação entre perfis genômicos e atividades bioquímicas com efeitos potenciais na promoção do crescimento em plantas. Dez estirpes foram avaliadas quanto à produção de compostos indólicos, atividade de ACC-deaminase, produção de biofilme, solubilização de nutrientes, correlacionando esses fenótipos com análises genômicas. A biossíntese de compostos indólicos foi avaliada na presença de Triptofano (*Trp*) como precursor, utilizando o reagente de Salkowski. As estirpes produziram indóis na faixa de 4,77 a 8,72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (sem diferenças significativas), com destaque numericamente para estirpe BR 11140^T. As análises genômicas revelaram ausência de rotas canônicas completas de biossíntese auxínica dependentes de *Trp*. Embora as enzimas iniciais dessas vias estejam ausentes, foram identificadas duas enzimas atuantes nas etapas finais do metabolismo: a aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3), universal em todas as estirpes, que converte indol-3-acetaldeído em AIA; e amidase (EC 3.5.1.4), amplamente distribuída, que hidrolisa intermediários amídicos aromáticos derivados do indol e da fenilalanina. Isso possibilita que as estirpes acessem rotas alternativas para a síntese de auxinas, como a via da fenilalanina, originando ácido fenilacético (PAA), uma auxina não indólica com reconhecida atividade biológica. A atividade da ACC-deaminase foi avaliada por crescimento bacteriano em meio contendo 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de nitrogênio. Nenhuma das estirpes apresentou crescimento detectável. Todas as estirpes possuem vias completas para síntese de citrato e malato e, *in vitro*, foram capazes de mobilizar fósforo na forma de fosfato tricálcico, enquanto a solubilização de fosfatos de ferro e alumínio não foi detectada. A capacidade de solubilizar zinco apresentou variações entre estirpes e fontes, sendo mais eficiente para óxido de zinco (ZnO) do que para fosfato de zinco ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$). A produção de Sideróforos, detectada apenas nas estirpes com vias completas para lisina e treonina, foi avaliada qualitativamente pelo método do Cromoazurol S e quantitativamente através do índice de solubilização (IS), revelou diferenças significativas entre estirpes, com as BR 11828^T, BR 11163^T e BR 11140^T apresentando elevada atividade na disponibilização de ferro. A formação de biofilme, associada

à presença de vias completas de poliaminas, variou amplamente, com maiores valores em estirpes que combinam espermidina e putrescina. Em síntese, os resultados indicam uma combinação de mecanismos de promoção de crescimento vegetal. A ausência de ACC-deaminase sugere estratégias adaptativas distintas das BPCV clássicas, destacando a flexibilidade metabólica do gênero e seu potencial como BPCV em solos com diferentes condições químicas e microbiológicas.

Palavras-Chave: ácido fenilacético; biossíntese; promoção de crescimento vegetal; genômica comparativa.

ABSTRACT

The integration of bioinformatics and biochemical tools has accelerated the prospection of plant growth-promoting bacteria (PGPB). The genus *Nitrospirillum*, recognized for its ability to fix nitrogen and produce growth regulators, was investigated in this chapter by correlating genomic profiles and biochemical activities with potential effects on plant growth promotion. Ten strains were evaluated for indolic compound production, ACC deaminase activity, biofilm formation, and nutrient solubilization, linking these phenotypes to genomic analyses. Indole biosynthesis was assessed in the presence of tryptophan (*Trp*) as a precursor using the Salkowski reagent. The strains produced indoles in the range of 4.77–8.72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (no significant differences), with numerical emphasis on strain BR 11140^T. Genomic analyses revealed the absence of complete canonical Trp-dependent auxin biosynthesis pathways. Although the initial enzymes of these pathways are missing, two enzymes acting in the final metabolic steps were identified: aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3), universal in all strains, which converts indole-3-acetaldehyde into IAA; and amidase (EC 3.5.1.4), widely distributed, which hydrolyzes aromatic amide intermediates derived from indole and phenylalanine. This enables the strains to access alternative auxin synthesis routes, such as the phenylalanine pathway, yielding phenylacetic acid (PAA), a non-indolic auxin with recognized biological activity. ACC deaminase activity was assessed by bacterial growth on medium containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) as the sole nitrogen source; no detectable growth was observed for any strain. All strains possess complete pathways for citrate and malate synthesis and, *in vitro*, were able to mobilize phosphorus from tricalcium phosphate, whereas solubilization of iron and aluminum phosphates was not detected. Zinc solubilization capacity varied among strains and sources, being more efficient for zinc oxide (ZnO) than for zinc phosphate ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$). Siderophore production, detected only in strains with complete lysine and threonine pathways, was evaluated qualitatively by the Chrome Azurol S method and quantitatively by the solubilization index (SI), revealing significant differences among strains, with BR 11828^T, BR 11163^T, and BR 11140^T showing high iron-mobilizing activity. Biofilm formation, associated with the presence of complete polyamine pathways, varied widely, with higher values in strains combining spermidine and putrescine. In summary, the results indicate a combination of plant growth-promoting mechanisms. The absence of ACC deaminase suggests adaptive strategies distinct from classical PGPB, highlighting the metabolic flexibility

of the genus and its potential as a PGPB in soils with different chemical and microbiological conditions.

Key words: phenylacetic acid; biosynthesis; plant growth promotion; comparative genomics.

3.1 INTRODUÇÃO

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) representam aliadas estratégicas para o aprimoramento de sistemas agrícolas, uma vez que são capazes de estabelecer associações benéficas com plantas, contribuindo para o desenvolvimento vegetal e consequentemente para a saúde e qualidade do solo. Esses organismos atuam por meio de mecanismos diretos, como a fixação de nitrogênio, a disponibilização de nutrientes no solo, síntese de hormônios, além de mecanismos indiretos, como proteção contra patógenos e mitigação de estresses abióticos (Castaldi *et al.*, 2023; Dushku *et al.*, 2025; Khosravi *et al.*, 2024; Ortega-Ortega *et al.*, 2024; Zaid *et al.*, 2022).

Compreender os mecanismos moleculares subjacentes a essas interações planta-microrganismo exige a análise detalhada de genomas e proteínas bacterianas, tarefa para a qual plataformas bioinformáticas se tornam ferramentas essenciais (Mariano, 2025).

Entre elas, destaca-se o BV-BRC (*Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*), mantido com apoio do *National Institutes of Health* (NIH) e do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), que integra um extenso banco de dados genômicos a ferramentas analíticas voltadas à bacteriologia e virologia (Capria *et al.*, 2025). Seu fluxo de trabalho permite a montagem, anotação e comparação de genomas, além de análises filogenéticas e classificação de subespécies (Olson *et al.*, 2023).

Apesar do potencial funcional das BPCVs ser bem reconhecido, a base genômica que sustenta esses mecanismos e a diversidade natural entre diferentes estirpes de *Nitrospirillum* ainda não são completamente elucidadas. Para investigar sistematicamente essa diversidade e seu potencial biotecnológico, o Capítulo I deste estudo adotou a plataforma BV-BRC como ambiente integrado para todas as análises bioinformáticas.

Assim, este capítulo consistiu em uma análise exploratória *in silico* destinada ao mapeamento e à caracterização da distribuição de enzimas, identificadas por seus respectivos números de classificação enzimática (EC), bem como, quando presentes, dos genes associados aos principais mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Esses mecanismos incluem a biossíntese de auxina, a formação de biofilme, a solubilização de nutrientes, com ênfase em fósforo e zinco, a produção de sideróforos e a presença de ACC-deaminase. De forma complementar, ensaios bioquímicos preliminares *in vitro* foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade das diferentes estirpes em apresentar os mecanismos supracitados.

3.2 MATERIAL E METODOS

3.2.1 Análises *In Silico*

3.2.1.1 OBTENÇÃO DOS DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE GENOMAS

Os genomas foram obtidos da plataforma BV-BRC (versão 3.43) (Tabela 1). A extensão RASTtk foi utilizada para analisar regiões codificadoras e funcionais dos genomas das estirpes de *Nitrospirillum* spp.

Tabela 1 – Genomas obtidos do acesso à base de dados do Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC).

Species	Strain	Genome ID in BV-BRC	Status	GC conteúdo	Genome length	CDS
<i>N. viridazoti</i>	BR 11140 ^T	28077.7	Complete	67.34	7,476,108 bp	6479
<i>N. amazonense</i>	BR 11142 ^T	28077.15	WGS	67.46	6,877,902 bp	6103
<i>N. viridazoti</i>	BR 11145	1441467.6	WGS	67.52	7,289,358 bp	6387
<i>N. guanabarensense</i>	BR 11163 ^T	3104323.3	WGS	67.59	7,102,693 bp	6385
<i>N. guaranorum</i>	BR 11164 ^T	3104324.3	WGS	68.17	6,973,991 bp	6077
<i>N. pindoramense</i>	BR 11622 ^T	28077.8	WGS	67.21	6,574,974 bp	5741
<i>N. karajorum</i>	BR 11752 ^T	3104293.3	WGS	67.29	6,476,720 bp	5849
<i>N. guiasens</i>	BR 11828 ^T	3104325.3	WGS	67.65	6,328,746 bp	5623
<i>N. bahiense</i>	BR 11865 ^T	28077.8	WGS	67.57	7,030,307 bp	6136
<i>N. iridis</i>	BR 15444 ^T	765888.3	WGS	67.236	7,088,717 bp	6192

Complete - Genoma completo; WGS - Whole Genome Sequencing (Sequenciamento do genoma completo); Coding Sequence - Sequência Codificante. Fonte: Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center.

3.2.1.2 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE COMPARATIVA FUNCIONAL

3.2.1.2.1 Comparative Systems e Integração de Ferramentas

A plataforma Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC) foi utilizada como ambiente integrado para a condução das análises funcionais comparativas *in silico*, possibilitando a integração de genomas previamente anotados pelo pipeline RASTtk com ferramentas específicas para análise de vias metabólicas, funções enzimáticas e comparação entre múltiplos genomas.

As análises comparativas foram conduzidas por meio da ferramenta Comparative Systems que permite a avaliação simultânea da presença, ausência e abundância relativa de genes ou funções enzimáticas entre diferentes genomas, com base em anotações funcionais padronizadas, especialmente aquelas associadas a números de classificação enzimática (EC).

Essa abordagem permite inferências sobre o potencial metabólico comparativo das estirpes analisadas, sem depender exclusivamente da identificação de genes estruturais individuais.

Para cada conjunto de vias metabólicas investigadas, foram utilizados descritores funcionais, números de classificação enzimática (EC) como termos-chave de busca, inseridos no campo “*Filter by one or more keywords*”, presente na ferramenta Protein Families. Esta etapa inicial teve como objetivo a triagem das funções potencialmente associadas aos mecanismos metabólicos de interesse.

Após a primeira triagem, os resultados de buscas foram organizados através da ferramenta Pathway Summary, que fornece uma listagem detalhada das vias metabólicas associadas a cada genoma analisado. Essa etapa resultou, em muitos casos, em um conjunto de grande volume de *pathways*, exigindo uma avaliação criteriosa de cada via identificada.

3.2.1.2.2 Geração e Interpretação de Resultados

A partir da listagem gerada pelo *Pathway Summary*, cada via metabólica foi analisada em detalhe por meio da ferramenta *Pathway View*, que disponibiliza mapas metabólicos baseados no KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), acessados diretamente pelo BV-BRC. Essa visualização permitiu a inspeção de cada metabolismo, contemplando todas as enzimas que o compõem, independentemente de estarem presentes, ausentes ou não anotadas nos genomas analisados. Essa abordagem permitiu a avaliação do metabolismo em sua forma integral (bruta), servindo como base para a identificação das funções efetivamente anotadas em cada estirpe.

Adicionalmente, a ferramenta Pathway View permite a síntese das funções enzimáticas relevantes na forma de *heatmaps* metabólicos, nos quais é representado o número de cópias das funções anotadas com base nos números de classificação enzimática (EC). Esses valores são traduzidos em escalas cromáticas que facilitam a interpretação comparativa dos dados.

As tonalidades de cor nos *heatmaps* indicam o número de cópias das enzimas (EC) associadas a cada via metabólica em cada estirpe, sendo: preto = ausência (0 cópias), amarelo = presença única (1 cópia), laranja = duplicação (2 cópias) e vermelho = múltiplas cópias (≥ 3). Essa variação cromática reflete diferenças no potencial metabólico entre os genomas analisados.

Esses *heatmaps* foram empregados como a principal ferramenta visual para a comparação do potencial funcional entre as estirpes de *Nitrospirillum* spp. e os genomas de

referência, permitindo a identificação de padrões metabólicos conservados e específicos entre os diferentes grupos analisados.

3.2.2 Mapeamento Funcional dos Alvos Metabólicos

3.2.2.1 BIOSSÍNTESE DE AUXINA

A investigação do potencial de biossíntese de auxina foi conduzida por meio da identificação de enzimas-chave (números EC) envolvidas nas vias metabólicas do Triptofano (Trp) e, posteriormente, da Fenilalanina (PAA).

Para fornecer um painel comparativo robusto, a análise incluiu, além dos genomas de *Nitrospirillum* spp., o agrupamento do genoma de gêneros bacterianos reconhecidos por suas vias completas de biossíntese de auxinas dependentes triptofano. Foram anexados os gêneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (Tabela 2).

Tabela 2 – Catálogo de identificadores de genomas de referência utilizados nas análises in silico para biossíntese de auxina.

Genome ID	Espécie	Linhagem/estirpe
373.198	<i>Agrobacterium vitis</i>	CG3
1064539.50	<i>Azospirillum baldaniorum</i>	Sp245
192.50	<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp7
1396.4989	<i>Bacillus cereus</i>	G1-11
1428.336	<i>Bacillus Thuringiensis</i>	BR37
303.1288	<i>Pseudomonas putida</i>	OPM-ctrl2
384.304	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	SM52

Fonte: Elaborada pelo Autor.

Inicialmente, a busca priorizou as rotas bioquímicas clássicas para síntese de ácido indol-3-acético (AIA) a partir do Triptofano: IAOx, TAM, IAM e IPyA. Para isso, utilizou-se os termos-chave “indol” “indole” e “tryptophan” para filtrar e explorar as “*Pathway Families*” relacionadas no BV-BRC.

Diante da constatação preliminar de que os genes dessas rotas canônicas não estavam integralmente conservados, a estratégia foi ampliada para incluir uma busca exploratória por vias alternativas. O foco foi direcionado ao metabolismo da Fenilalanina e seu potencial relação com a biossíntese de Ácido Fenilacético (PAA), uma auxina não indólica, utilizando o termo-chave “phenylacetate” e “3.5.1.4”. Esta abordagem exploratória levou à identificação de potenciais rotas para a biossíntese de auxinas não indólicas.

3.2.2.2 SOLUBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES

A investigação da capacidade de solubilização de fontes fosfatadas (P) e de zinco (Zn) foi baseada na identificação de enzimas relacionadas à síntese de ácidos orgânicos descritos na literatura como diretamente associados aos processos de solubilização de nutrientes minerais no solo. Considerando que esses mecanismos ocorrem predominantemente por meio da acidificação do microambiente e da complexação de íons metálicos, a análise priorizou funções enzimáticas envolvidas em vias metabólicas produtoras de ácidos orgânicos.

Para essa finalidade, foram utilizados como termos-chave de busca os descritores “acid”, “gluconic”, “lactic”, “acetic”, “citric”, “oxalic” e “malic”, sendo a distribuição dessas funções analisada de forma comparativa conforme a estratégia descrita na seção 3.2.1.2.

3.2.2.3 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

Para a análise da capacidade de produção de sideróforos pelas estirpes de *Nitrospirillum* spp., foram realizadas buscas utilizando os descritores “siderophore”, “threonine”, “lysine” com foco nas vias relacionadas à síntese de sideróforos.

Especificamente, foram investigadas as *pathways*: 01053 - *Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides*, para precursores aromáticos como 2,3-dihidroxi-benzoato; 00300 - *Lysine biosynthesis*, para a geração de L-Lysine como aminoácido conjugável; e 00260 - *Glycine, serine and threonine metabolism*, que inclui a síntese de Threonine.

Os dados genômicos obtidos foram correlacionados com o ensaio Cromoasurol S (CAS) *in vitro*, que detecta sideróforos extracelulares ativos, permitindo inferir a capacidade funcional das estirpes.

3.2.2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME

As buscas no banco de dados BV-BRC foram realizadas utilizando como termos de palavras-chave “polyamine”, “putrescine” e “spermidine”. As buscas foram aplicadas aos campos de anotação de *pathway* e de compostos associados aos genomas bacterianos analisados, com foco em identificar evidências de produção de poliaminas e suas vias metabólicas.

3.2.2.5 ACC-DEAMINASE

Para investigar a presença da 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato Desaminase (ACC-deaminase) adotou-se uma estratégia baseada na identificação de enzimas associadas à via de degradação do 2-oxobutonoato (propanato), na qual a enzima está inserida.

Previamente foi criado um grupo de trabalho contendo os genomas das dez estirpes de *Nitrospirillum* spp. e o genoma da estirpe de *Azospirillum lipoferum* 4B (Acesso FQ311870; Genome ID 862719.13), foi incorporado como controle positivo por apresentar o gene *acdS* funcionalmente caracterizado, validando a sensibilidade da metodologia.

Em seguida, foram utilizadas as numerações das EC (*Enzyme Commission*) relacionadas à via de degradação do 2-oxobutanoato (Propanato), na qual a ACC-deaminase está inserida: EC 3.5.99.7 (1-Aminocyclopropane-1-carboxylate), EC 1.1.2.8 (Alcohol dehydrogenase (*cytochrome c*)), EC 2.3.1.8 (*Phosphate acetyltransferase*), EC 2.6.1.19 (4-aminobutyrate-2-oxyglutarate transaminases) e EC 2.7.2.1 (*Acetate kinase*).

3.2.2.6 ANÁLISES *IN VITRO*

Os ensaios laboratoriais para caracterização bioquímica foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) e Laboratório de Genética e Bioquímica (LGB), nas dependências da Embrapa Agrobiologia, localizados em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

3.2.3 Estirpes bacterianas: aquisição, cultivo e manutenção de inóculo

Os ensaios laboratoriais para caracterização bioquímica foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) e Laboratório de Genética e Bioquímica (LGB), nas dependências da Embrapa Agrobiologia, localizados em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Os microrganismos foram adquiridos junto ao CRB-JD, onde as bactérias crescidas em placa de petri foram repicadas para tubos de ensaios, previamente esterilizados por autoclavagem a 121°C por 30 minutos, contendo meio de cultura sólido 79 sacarose, dispostos em inclinação, para melhor conservação das colônias e reutilização das mesmas para os ensaios posteriores. Sequencialmente, as colônias foram replicadas em meio de cultura sólido LGI (Döbereiner, 1999), sendo este semi-seletivo para espécies do gênero *Nitrospirillum*, para o

desenvolvimento das primeiras colônias de trabalho a serem utilizadas na condução dos ensaios (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação de espécies do gênero *Nitrospirillum*.

	<i>Especies</i>	<i>Type strain</i>
I	<i>N. viridazoti</i>	BR 11140 ^T
II	<i>N. amazonense</i>	BR 11142 ^T
III	<i>N. viridazoti</i>	BR 11145
IV	<i>N. guanabarens</i>	BR 11163 ^T
V	<i>N. guaranorum</i>	BR 11164 ^T
VI	<i>N. pindoramense</i>	BR 11622 ^T
VII	<i>N. karajorum</i>	BR 11752 ^T
VIII	<i>N. guiasens</i>	BR 11828 ^T
IX	<i>N. bahiense</i>	BR 11865 ^T
X	<i>N. iridis</i>	BR 15444 ^T

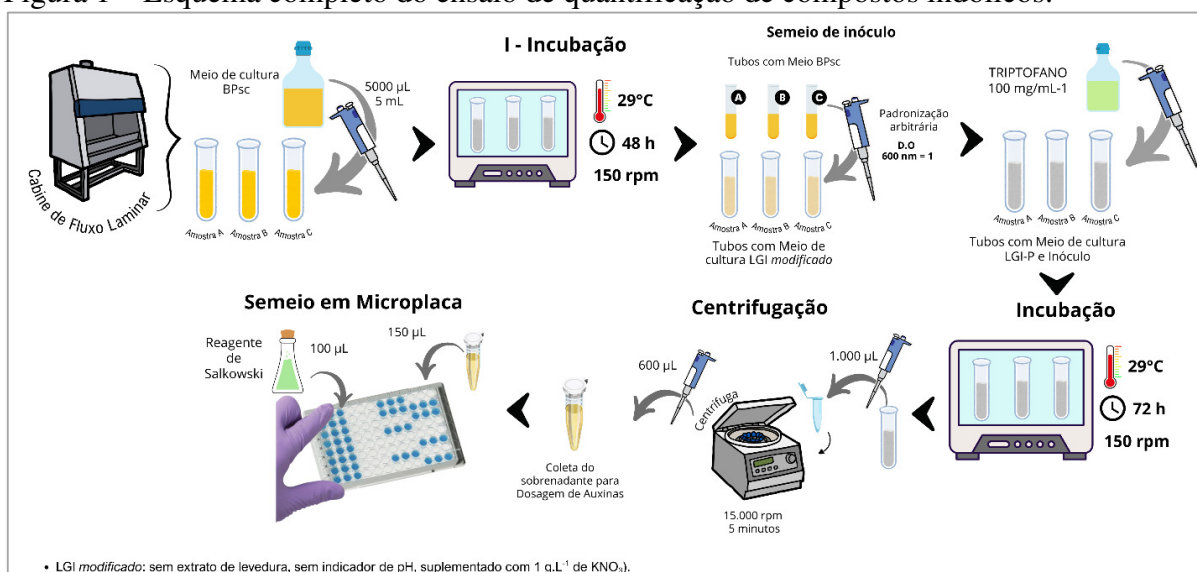
Fonte: Elaborado pelo Autor.

O material, com as colônias já bem desenvolvidas, foi utilizado nos ensaios de determinação de ácido indol-3-acético (AIA), quantificação de ACC-deaminase, além da formação de biofilme, solubilização de fósforo (P) e zinco (Zn) e produção de sideróforos. Para padronizar o inóculo utilizado em todos os ensaios bioquímicos, foi construída uma curva de crescimento das estirpes BR 11140^T e BR 11145 em meio BPsacarose, monitorando a densidade óptica (DO₆₀₀) ao longo de 24 h. Paralelamente, a relação entre $\log_{10}$ e o número de unidades formadoras de colônia (UFC·mL⁻¹) foi estabelecida por plaqueamento seriado (Apêndice H).

3.2.4 Quantificação de Compostos Indólicos

A quantificação de compostos indólicos foi realizada pelo método colorimétrico de Salkowski (Gordon; Weber, 1951; Mayer, 1958), adaptado para microplaca (Sarwar; Kremer, 1995), seguindo o protocolo operacional padronizado (POP) do LGB-Embrapa Agrobiologia (Código: 023.03.02.07.2.008, 2023), conforme exemplificado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema completo do ensaio de quantificação de compostos indólicos.



Fonte: Elaborado pelo Autor(?).

3.2.4.1 PREPARO DO INÓCULO

As estirpes de *Nitrospirillum* spp. foram pré-cultivadas em meio BP sacarose (10 g.L⁻¹ sacarose, 1 g.L⁻¹ KNO₃, 0,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0,2 g.L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; pH 6,9) a 29°C por 48 h sob agitação contínua (180 rpm).

Após o período de crescimento, as culturas foram padronizadas para densidade óptica DO₆₀₀ = 1,0, equivalente a aproximadamente 10⁹ UFC.mL⁻¹, validado por contagem de unidades formadoras de colônia em ágar NFB (Nitrogênio - *Free Bromothymol blue*).

3.2.4.2 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE AUXINAS

Alíquotas de 100 µL das culturas padronizadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LGI modificado (LGI-mod: sem extrato de levedura, sem indicador de pH, suplementado com 1 g.L⁻¹ de KNO₃). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada estirpe. O meio foi suplementado com L-triptofano na concentração final de 100 µg mL⁻¹, adicionado a partir de uma solução estoque esterilizada por filtração (10 mg mL⁻¹, preparada conforme descrito na Tabela 4).

Tabela 4 – Preparo da Solução de L-Triptofano.

Componentes	Especificações	Observações
Reagente principal	L-triptofano	Sigma-Aldrich, Cat. T0254
Concentração da solução	10 mg mL ⁻¹	Solução estoque
Solvente	Água destilada	q.s.p. 10 mL
Auxiliar de solubilização	HCl 30% (v/v)	Adicionada gota a gota, sob agitação, até completa solubilização
Esterilização	Filtração em membrana	Membrana esterilizante de 0,22 µm
Concentração final	100 µg mL ⁻¹	O pH do meio de cultura foi verificado e ajustado após a adição da Solução de Triptofano com NaOH 1 M estéril antes da inoculação.

q.s.p.= quantidade suficiente para. Fonte: Elaborado pelo Autor.

Um controle negativo, consistindo de meio de cultura não inoculado, foi incluído no ensaio. Os cultivos foram novamente incubados a 28°C por 72 h sob agitação (150 rpm). Após o período de incubação, alíquotas de 1,5 mL de cada cultura foram transferidas para microtubos com capacidade de 2,0 mL e centrifugadas a 15.000 × g por 5 min à temperatura ambiente.

Alíquotas de 600 µL do sobrenadante foram utilizadas para a quantificação de compostos indólicos pelo método de Salkowski adaptado para microplacas. O volume remanescente foi criopreservado a -20°C para análises posteriores.

3.2.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE INDOL

A curva de calibração foi preparada a partir da solução de ácido 3-indolacético (AIA) a 1 mg mL⁻¹, da qual foram obtidas diluições nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10, 20, 40 e 60 µg mL⁻¹ em água destilada.

Em microplaca de poliestireno, com capacidade de 96 poços foram dispostos em triplicata os seguintes volumes: 50 µL de cada ponto da curva padrão; 150 µL das amostras de sobrenadante; 150 µL de meio de cultura sem inóculo (Controle das amostras); 150 µL de água destilada (Controle do reagente).

Posteriormente, foram adicionados aos poços da placa 100 µL do Reativo de Salkowski (preparado com 50 mL de ácido perclórico 35% e 1 mL de solução de FeCl₃.6H₂O 0,5 M) a cada poço. A microplaca foi homogeneizada manualmente, coberta com papel alumínio e incubada ao abrigo de luz à temperatura ambiente por 40 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH).

3.2.4.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS

A concentração de compostos indólicos nas amostras, expressa em μg de AIA-equivalente, foi determinada por interpolação na curva padrão de AIA ($5,0$ a $60 \mu\text{g/mL}^{-1}$), após subtração da absorbância média do branco correspondente. A equação da reta ($y = ax + b$) obtida da curva padrão foi utilizada para o cálculo, onde y representa a absorbância corrigida e x a concentração.

3.2.5 Solubilização de Nutrientes

O potencial das estirpes bacterianas para solubilização de diferentes fontes de nutrientes minerais insolúveis foi investigado por meio dos ensaios descritos abaixo. A Figura 2 apresenta um fluxograma ilustrativo com o passo a passo unificado dos protocolos de solubilização de P e Zn.

Figura 2 – Fluxograma ilustrativo dos protocolos de avaliação da capacidade de solubilização de Fosfatos e Zinco.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

3.2.5.1 PRÉ-INÓCULO, INOCULAÇÃO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O preparo do pré-inóculo foi realizado conforme descrito na seção 3.2.4. Para os experimentos de solubilização de P e Zn, $10 \mu\text{L}$ da cultura crescida padronizada ($\text{DO } 600 = 1,0$) foram inoculados pontualmente, em triplicata, sobre a superfície do meio NBRIP solidificado (Nautiyal, 1999), seguindo o mapa de inoculação. Para o ensaio de Sideróforos, 30

μL do inóculo foram depositados centralmente na superfície do meio. Em todos os ensaios, uma placa sem inóculo serviu como controle negativo.

3.2.5.2 SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO (P)

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico foi avaliada para três fontes distintas: Fosfato de cálcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], Fosfato de ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e Fosfato de Alumínio (AlPO_4). Os ensaios foram realizados seguindo o protocolo operacional padronizado (POP) do LGB-Embrapa Agrobiologia (Código: 023.03.02.07.2.010), no qual utilizam o meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999), com modificações na concentração da fonte de P (Mendes *et al.*, 2015).

3.2.5.3 ORGANIZAÇÃO EXPERIMENTAL

Para avaliar a capacidade de solubilização pelas estirpes de *Nitrospirillum* spp., o experimento foi estruturado em quatro etapas principais, conforme a fonte testada:

- a) Fontes Fosfatadas: Períodos de avaliação: 5, 15 e 20 dias após a inoculação (dai) e Análise: Zoneamento de solubilização em milímetros (mm);
- b) Fontes de Zinco: As avaliações foram realizadas em 5 e 15 dai, com o Índice de Solubilização (IS) sendo a métrica principal;
- c) Sideróforos: As avaliações aconteceram em até 2 dias após inoculação das estirpes.

3.2.5.4 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O meio NBRIP foi preparado com os seguintes constituintes por litro: glicose, 10 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; KCl, 0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g; e ágar, 15 g. O pH do meio foi ajustado para 6,8 com soluções de KOH 10% (p/v) antes da adição da fonte de fosfato e do ágar. A fonte de fosfato inorgânico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 ou $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi adicionada na concentração de 3 g L^{-1} .

3.2.5.5 PROCEDIMENTO ESPECIAL PARA $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Devido à reação do fosfato de ferro com os constituintes do meio durante a autoclavagem, um protocolo diferenciado foi adotado. A fonte de $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi autoclavada separadamente em solução aquosa. O restante dos constituintes do meio NBRIP (sem a fonte de P) foi solubilizado, ajustado o pH, e autoclavado em volume reduzido contendo o ágar. Após a autoclavagem, o meio NBRIP fundido foi homogeneizado com a solução estéril de FePO_4 antes de ser vertido em placas de Petri estéreis.

3.2.5.6 ANÁLISES

As placas foram incubadas a 28°C. A avaliação da solubilização foi realizada pela medição dos diâmetros da colônia (B) e do halo de solubilização translúcido (A) com um paquímetro aos 5, 15 e 20 dias após a inoculação. A eficiência de solubilização de cada estirpe foi expressa pelo Índice de Solubilização (IS), calculado pela fórmula: $\text{IS} = \text{Diâmetro total do halo (A)} / \text{Diâmetro da colônia (B)}$.

3.2.5.7 SOLUBILIZAÇÃO DE ZINCO (ZN)

A avaliação do potencial de solubilização de zinco foi realizada em meio específico *Zinc Solubilizing Medium* (HiMedia Laboratories®, código M2023, revisão 01/2020), preparado de forma não comercial. Os constituintes do meio foram pesados separadamente, nas seguintes concentrações por litro: Dextrose (Glucose) 10,0 g; Sulfato de amônio, 1,0 g; Cloreto de potássio, 0,2 g; Fosfato dipotássico, 0,1 g; Sulfato de magnésio heptaidratado, 0,2 g; e Ágar, 15,0 g. A fonte de zinco insolúvel (Óxido de Zinco - ZnO ou Fosfato de Zinco - $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$) foi adicionada separadamente na concentração de 1,0 g L^{-1} . Para facilitar a dispersão da fonte de Zn no meio, esta foi submetida a aquecimento brando sob agitação antes da adição dos demais componentes e do ágar. Os demais constituintes foram incorporados sem aquecimento adicional. O pH foi ajustado para 6,7 e o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

A capacidade de solubilização de Zn (a partir de ZnO e $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$) pelas estirpes do gênero *Nitrospirillum* foram realizadas em 5 e 15 dias após a inoculação, com o Índice de Solubilização (IS) sendo a métrica principal. Para os ensaios de produção de solubilização de Zn, as estirpes foram inoculadas com suspensões bacterianas com densidade celular na ordem

de 10^9 UFC mL⁻¹. O ensaio foi conduzido de forma análoga ao de solubilização de P, conforme o fluxograma geral (Figura 7).

A avaliação da formação do halo de solubilização foi realizada aos 5 e 15 dias após a inoculação. O Índice de Solubilização de Zinco (IS-Zn) foi calculado conforme a fórmula: $IS-Zn = (\text{Diâmetro total do halo} + \text{Diâmetro da colônia}) / \text{Diâmetro da colônia}$.

3.2.6 Produção de Sideróforos

A avaliação da produção de sideróforos foi avaliada pelo método qualitativo baseado no ensaio universal do Cromo Azurol S (CAS) (Schwyn; Neilands, 1987) adaptado para o método *Overlaid CAS* (O-CAS) (Pérez-Miranda *et al.*, 2007a).

3.2.6.1 PROCEDIMENTOS

Para eliminar traços de ferro da vidraria e padronizar as condições de cultura tendo como única variável a quantidade de íons férricos em solução, todo o material utilizado nas culturas foi tratado. A vidraria foi deixada por pelo menos 48 h imersa em uma solução HCl a 5% (v/v) e posteriormente, foi lavada com água deionizada e, em seguida, autoclavada.

Para preparar 45 mL da solução CAS inicialmente foram dissolvidos 30,2 mg de CAS em 20 mL de água deionizada. Em seguida, foi adicionada uma solução composta de 5 mL da mistura da solução de Fe³⁺ (1 mM de FeCl₃.6H₂O e 10 mM de HCl). Por último, foi adicionada uma solução de 36,5 mg de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) previamente dissolvido em 20 mL de água que resultou numa solução de coloração azul.

3.2.6.2 DO ENSAIO

Decorrido esse período de incubação dos pré-inóculos, 1,5 mL da cultura foram transferidos para tubos de microcentrífuga e submetidos à centrifugação a 5.000 rpm, por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet celular ressuspensionado em 1,5 mL de meio líquido de LGI modificado isento de ferro (substituído extrato de levedura por Nitrato de potássio – 1 g/L e utilizado água deionizada no preparo). Essa etapa de lavagem foi repetida uma segunda vez, seguindo os mesmos parâmetros de centrifugação, com o objetivo de remover resíduos do meio de cultivo do pré-inóculo.

Após o processo de lavagem, uma alíquota de 1 mL da suspensão celular foi coletada para determinação da densidade óptica (D.O.) a 600 nm, garantindo o ajuste da densidade para 1,0. Em seguida, 50 µL do inóculo foi inoculada no centro de placas de Petri contendo 25 mL de meio sólido de LGI modificado livre de ferro. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C, por 2 dias. Posteriormente, a superfície das placas foi recoberta com 5 mL da solução de CAS-ágar preparada segundo a metodologia de Pérez-Miranda et al. (2007) para indução da produção de sideróforos.

Após solidificação do CAS-ágar, as placas foram mantidas em bancada, à temperatura ambiente, por aproximadamente 48 horas, de modo a intensificar o contraste e a definição dos halos de descoloração. O diâmetro do halo de sideróforo e o diâmetro da colônia foram medidos com auxílio de um paquímetro digital. O Índice de Síntese de Sideróforos (IS-S): diâmetro do halo+colônia dividido pelo diâmetro da colônia. Também foi avaliado a intensidade da produção de sideróforos em baixo, médio e alto de acordo com o tamanho do halo.

Simultaneamente, alíquotas do inóculo foram submetidas a diluições seriadas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até a diluição de 10^{-8} , sendo 100 µL de cada diluição plaqueados em meio NFB para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

3.2.7 Formação de Biofilme

A formação de biofilme pelas estirpes de *Nitrospirillum* foi avaliada em lâ de vidro, conforme metodologia adaptada de Oosthuizen *et al.* (2001). Foram utilizados 100 mg de lâ de vidro (MERCK, Cat. No. K91367686), previamente acondicionados em tubos de ensaio de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura LGI.

Cada tubo foi inoculado com 1 mL de suspensão bacteriana ajustada a densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 1,0, e incubado por 72 h a 29 °C, sob agitação constante de 150 rpm. Após o período de incubação, a $D.O._{600nm}$ das suspensões foi registrada, e o meio líquido descartado.

Para a coloração do biofilme, adicionou-se 1 mL de cristal violeta a 1% (m/v) em cada tubo, garantindo o completo contato do corante com a lâ de vidro. Após 10 a 20 minutos, o excesso de corante foi removido por duas lavagens rápidas com 50 mL de tampão fosfato 0,5 M, seguidas de duas lavagens adicionais sob agitação a 150 rpm por 15 minutos.

O cristal violeta retido pelas células aderidas à lâ de vidro foi extraído com 2×5 mL de etanol absoluto. A absorbância da solução resultante foi determinada a 560 nm em

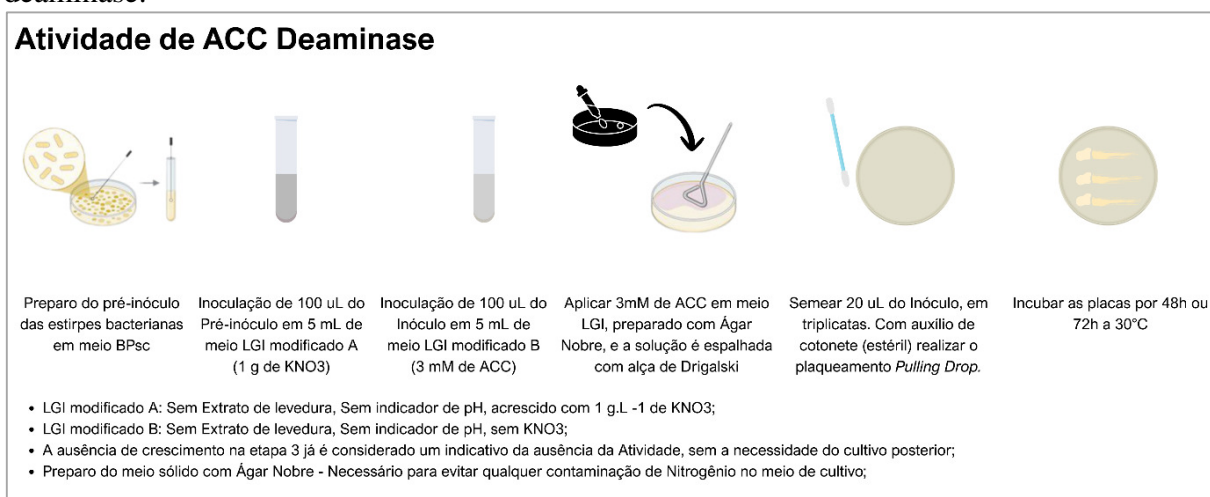
espectrofotômetro, sendo o valor de D.O._{560nm} utilizado como indicador quantitativo da formação de biofilme.

3.2.8 Atividade da ACC-deaminase

A formação de biofilme pelas estirpes de *Nitrospirillum* spp. foi avaliada em lâ de vidro, conforme metodologia adaptada de Oosthuizen *et al.* (2001). Foram utilizados 100 mg de lâ.

A atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase foi realizada com base na mensuração da qualitativa de α -cetobutirato (α -KB) produzido pela hidrólise do ACC, substrato específico da enzima (Ferreira; Vidal; Baldani, 2014), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema do procedimento experimental para o ensaio qualitativo de ACC deaminase.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

3.2.9 Preparo do inóculo e Indução enzimática

O ensaio foi conduzido em triplicatas, onde o preparo do pré-inóculo foi realizado conforme descrito no item 4.4.1.2. Células provenientes de 1 mL deste cultivo (com D.O._{600nm} ajustada para 1,0) foram subsequentemente transferidas, em 100 μ L para tubos de ensaio (capacidade para 15 mL) contendo 5 mL meio LGI modificado (suplementado com 1,0 g/L de sulfato de amônio e sem indicador de pH – Azul de bromotimol) e incubados (mesa agitadora KORAX – 3L340) a 30°C e 150 rpm por 48 horas. Para controle negativo foram atribuídas amostras de meio livre de inóculo bacteriano.

Passado o tempo de incubação, alíquotas de 100 μ L foram transferidas para novos tubos de ensaio, de igual capacidade, contendo 5 mL de meio LGI modificado (livre de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, indicador de pH, extrato de levedura e suplementado com 3,0 mM de ACC como única fonte de nitrogênio). Os cultivos foram levados a uma segunda incubação sob as mesmas condições, para indução da síntese da enzima ACC deaminase.

Posteriormente, a solução de ACC (3 mM) foi descongelada, espalhada sobre a superfície do meio de cultura LGI modificado (livre de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, indicador de pH, extrato de levedura e preparado com 1,8% de Ágar Nobre), vertido em placas (60x15mm) já solidificado, com auxílio de uma alça de *Drigalski*.

Após a secagem da solução de ACC, foi realizada a semeadura da cultura crescida com auxílio de um cotonete estéril, em seguida as placas foram levadas a incubação a 30°C durante 48h.

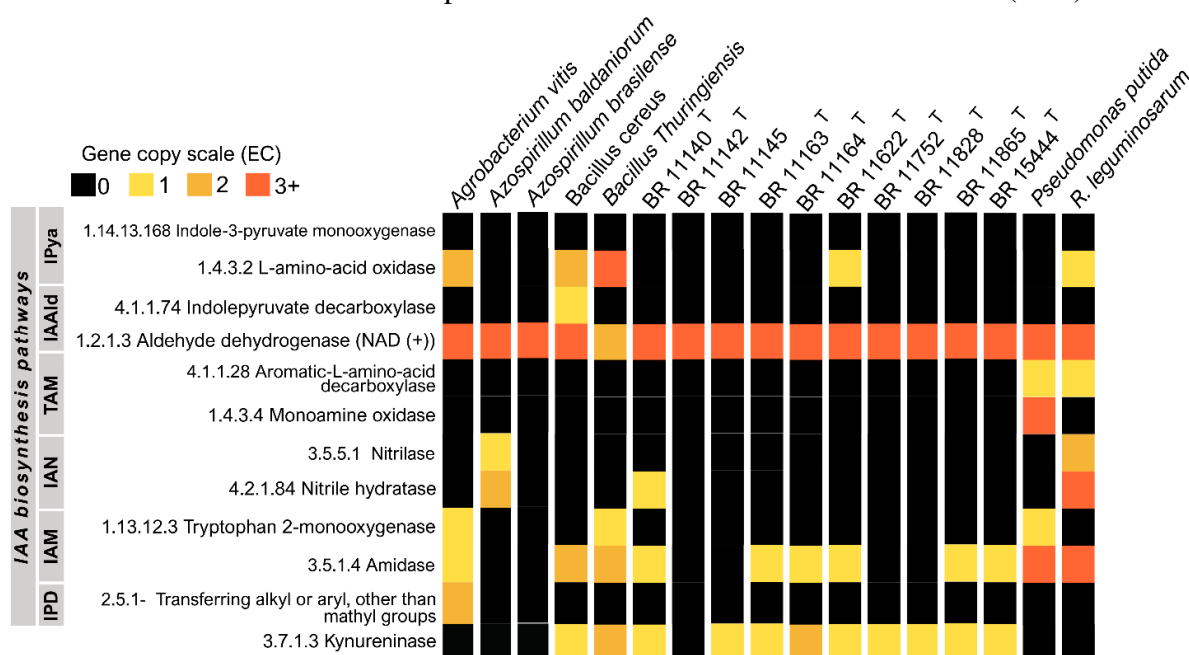
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Biossíntese de Compostos Indólicos: Integração genômica e funcional

A análise comparativa das vias metabólicas associadas à biossíntese de auxinas revelou padrões contrastantes entre os gêneros de referência (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*) e as estirpes de *Nitrospirillum* (Figura 4). Conforme esperado, os gêneros de referência apresentaram a presença de enzimas-chave das rotas canônicas dependentes de triptofano, incluindo *indolepyruvate decarboxylase* (EC 4.1.1.74), *aromatic-L-amino acid decarboxylase* (EC 4.1.1.28), e *nitrilase* (EC 3.5.5.1) confirmando sua capacidade de síntese de ácido indol-3-acético (AIA) por diferentes rotas indólicas.

Em contraste, as estirpes de *Nitrospirillum* exibiram ausência ou presença parcial dos conjuntos enzimáticos necessários às vias canônicas de biossíntese de AIA, incluindo as rotas do ácido indol-3-pirúvico (IPyA), triptamina (TAM), indol-3-acetamida (IAM) e indol-3-acetonitrila (IAN). O *heatmap metabólico* (Figura 4) evidencia a ocorrência esparsa de enzimas dessas vias nas estirpes BR 11140^T a BR 15444, indicando a inexistência de rotas completas para a conversão de triptofano em AIA.

Figura 4 – *Heatmap* metabólico associado à biossíntese de auxinas. Distribuição de enzimas relacionadas ao metabolismo do triptofano e à síntese de ácido indol-3-acético (AIA).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Esse padrão genômico sugere que a biossíntese clássica de AIA não constitui uma característica metabólica central em *Nitrospirillum* spp., distinguindo esse gênero de outros microrganismos amplamente reconhecidos como produtores de auxinas via triptofano.

O padrão genômico observado nas estirpes de *Nitrospirillum* é consistente com o relatado em análises genômicas previamente descritas para o gênero *Azospirillum*, em especial *Azospirillum amazonense*, cuja anotação revelou-se a ausência dos genes típicos das vias clássicas de biossíntese de AIA, como o gene *iaaM* (*tryptophan monooxygenase*) e *iaaH* (*indole-3-acetamide hydrolase*), além do gene *ipdC* (*indole-3-pyruvate decarboxylase*) (Sant'Anna *et al.*, 2011).

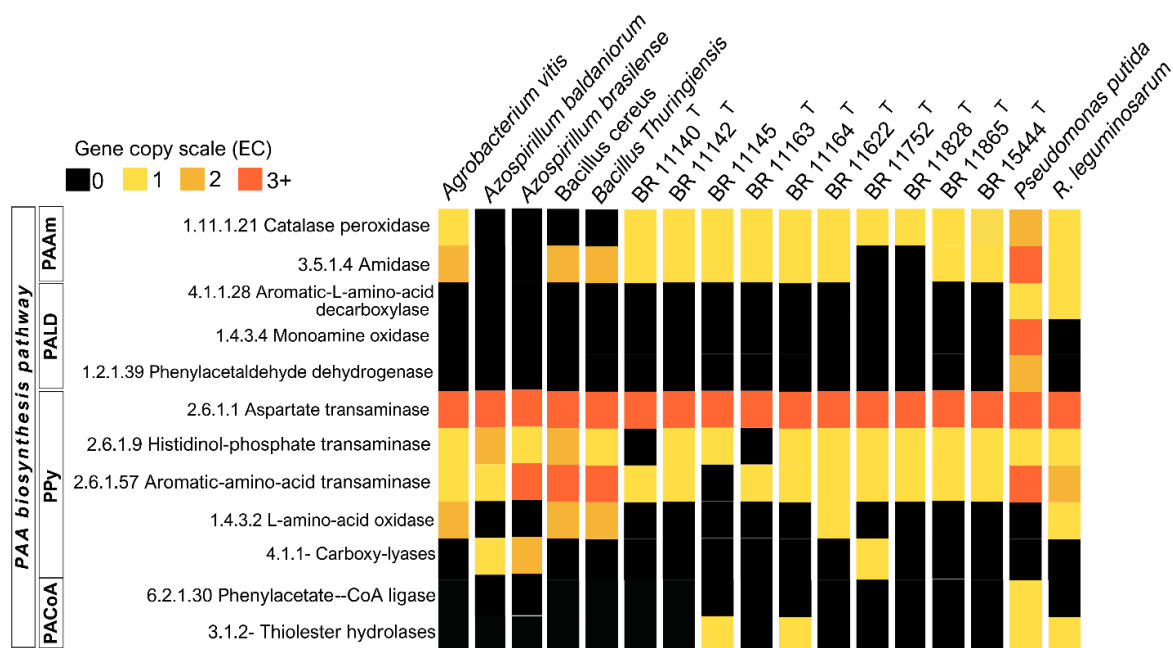
Esses achados indicam que, embora espécies do gênero *Azospirillum* sejam amplamente reconhecidas pela capacidade de sintetizar auxinas, os mecanismos moleculares subjacentes a esse processo não são universalmente conservados em nível genômico. Tal observação reforça a hipótese de que tanto *Azospirillum* quanto *Nitrospirillum* possam recorrer a vias alternativas ou incompletas de biossíntese de auxina, possivelmente associadas à formação de metabólitos indólicos secundários ou de auxinas não indólicas, como o ácido fenilacético (PAA).

Além disso, a produção de auxinas bacterianas não depende exclusivamente da conservação genômica das vias clássicas, sendo fortemente influenciada por fatores ambientais, como limitação de carbono, pH ácido e estresses osmóticos, os quais modulam a expressão gênica e o acúmulo de metabólitos auxínicos (Cassán; Vanderleyden; Spaepen, 2014). Esse comportamento sustenta a interpretação de que a promoção do crescimento vegetal por estirpes de *Nitrospirillum* pode emergir de uma regulação metabólica adaptativa, mais do que da presença de vias biossintéticas completas e canônicas.

3.3.2 Conservação da via fenilalanina: estratégia Auxínica

Diante da fragmentação das rotas indólicas clássicas, a análise foi direcionada para vias alternativas de biossíntese de auxinas, com ênfase na conversão da fenilalanina em ácido fenilacético (PAA). O *Heatmap* metabólico (Figura 5) destaca a conservação mais consistente de enzimas associadas ao metabolismo de *Nitrospirillum* spp., revelando diferentes classes de transaminases (EC 2.6.1.1, EC 2.6.1.9, EC 2.6.1.57), as quais sugerem potencial capacidade metabólica para o direcionamento de precursores aromáticos a rotas auxínicas alternativas.

Figura 5 – *Heatmap* metabólico associado à biossíntese auxínica. Distribuição de enzimas relacionadas ao metabolismo da Fenilalanina.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Adicionalmente, a detecção da catalase-peroxidase (EC 1.11.1.21) em todas as estirpes analisadas indica a presença de sistemas oxidativos eficientes, potencialmente relevantes para a manutenção do equilíbrio redox celular e para o metabolismo de compostos aromáticos no ambiente rizosférico. Nesse contexto, a ampla distribuição da amidase (EC 3.5.1.4) destaca-se como um elemento funcional importante, uma vez que essa enzima pode atuar na conversão de amidas aromáticas em ácidos orgânicos biologicamente ativos, incluindo o ácido fenilacético.

A ocorrência recorrente da amidase nas estirpes de *Nitrospirillum* reforça a hipótese de que a biossíntese auxínica nesse gênero esteja preferencialmente associada a rotas dependentes da fenilalanina, em detrimento das vias clássicas de biossíntese do AIA. Dessa forma, os dados genômicos sugerem que a produção de auxinas microbianas por *Nitrospirillum* é sustentada por uma arquitetura metabólica alternativa, caracterizada pela convergência funcional de enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos aromáticos.

Essa convergência metabólica já é descrita em estirpes de *Azospirillum brasilense* (Sp7, Sp245 e FAJ009), nas quais a produção de ácido fenilacético (PAA) é dependente da fenilalanina e envolve a enzima indole-3-pyruvate decarboxylase (IpdC). Embora classicamente associada à via do ácido indol-3-pirúvico (IPyA), a IpdC apresenta atividade catalítica sobre intermediários derivados da fenilalanina, promovendo a conversão do

fenilpiruvato em precursores do PAA, evidenciando uma sobreposição funcional entre as rotas biossintéticas de AIA e PAA (Somers *et al.*, 2005).

Essa estratégia metabólica pode representar uma adaptação ecológica ao ambiente rizosférico, permitindo a utilização de diferentes precursores aromáticos presentes nos exsudatos radiculares para a modulação do crescimento vegetal. Além do AIA, auxinas como o ácido fenilacético (PAA) são consideradas verdadeiras auxinas (*sensu stricto*), com relevância funcional nas interações rizobactéria-planta (Cassán; Vanderleyden; Spaepen, 2014).

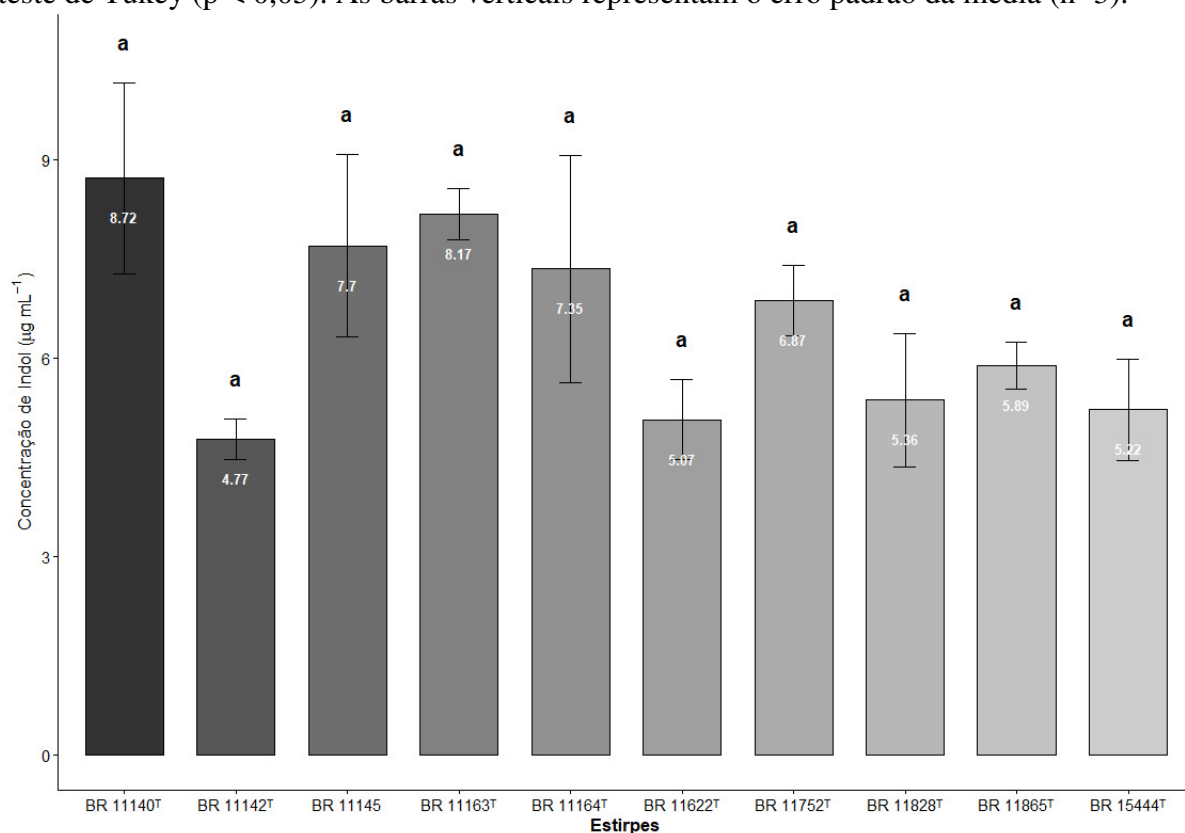
3.3.3 Produção Experimental de Compostos Indólicos

A biossíntese de compostos indólicos pelas estirpes de *Nitrospirillum* spp. foi avaliada por meio da quantificação de indol ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na presença do precursor L-Triptofano. Qualitativamente, foi observada a coloração rósea característica da reação positiva, para todas as estirpes, indicando a síntese de metabólitos indólicos.

A quantificação *in vitro* de compostos indólicos apresentaram valores médios, com inóculo inicial de 10^9 UFC/mL, que variaram de 4,77 a $8,72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Numericamente, a estirpe BR 11140 se destacou com a maior produção média de indol ($8,72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguida por BR 11163 ($8,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e BR 11145 ($7,70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em contrapartida, os menores acúmulos foram observados para as estirpes BR 11142, BR 15444 e BR 11622, com médias abaixo de $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A análise de variância (ANOVA) revelou uma tendência de diferenciação entre as estirpes ($p = 0,0754$). Contudo, sob o rigor estatístico do teste de Tukey ($p < 0,05$), não foram detectadas diferenças significativas entre as médias de produção (Figura 6).

Figura 6 – Biossíntese de compostos indólicos in vitro por estirpes de *Nitrospirillum* spp. suplementadas com L-Triptofano. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o erro padrão da média ($n=3$).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

As concentrações observadas situam-se na faixa inferior, porém compatível com os valores relatados para bactérias diazotróficas filogeneticamente relacionadas. A produção de ácido indolacético (AIA) em *Azospirillum* varia amplamente entre 5 e 50 µg·mL⁻¹, dependendo da estirpe e do meio de cultivo (Cassán; Vanderleyden; Spaepen, 2014). Os valores obtidos para *Nitrospirillum* spp., embora mais modestos, permanecem biologicamente coerentes com o perfil metabólico esperado para o grupo, podendo refletir diferenças na densidade celular, no tempo de incubação ou, ainda, a ausência parcial de genes envolvidos nas rotas clássicas de biossíntese de AIA. Esse comportamento é consistente com o observado em *Nitrospirillum amazonense* BR 11142^T, conforme discutido no Tópico 4.5.1.

É importante destacar que o reagente de Salkowski não é específico para o ácido indolacético (AIA), reagindo também com outros compostos indólicos, como indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrila (IAN), ácido indol-3-butírico (IBA) e indol-3-carbinol (Glickmann & Dessaux, 1995). Diante disso, os resultados obtidos indicam a produção de compostos indólicos totais, e não necessariamente de AIA puro.

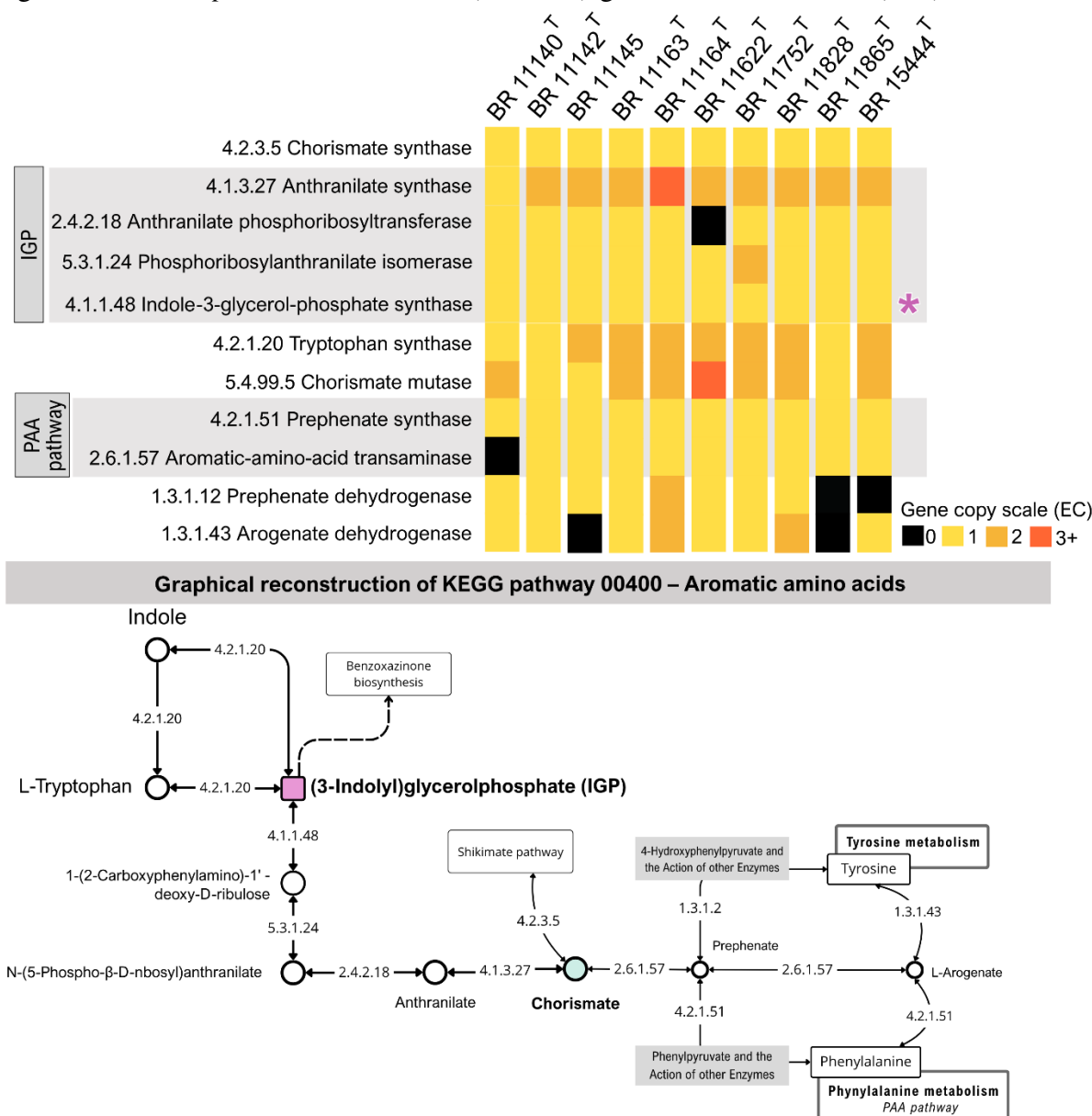
Essa inespecificidade pode explicar a detecção de reação positiva mesmo em estirpes que, segundo as análises genômicas, não apresentam vias completas de biossíntese clássica de AIA.

3.3.4 Origem do Sinal Indólico

Curiosamente, outro ponto relevante é que o indol detectado pelo reagente de Salkowski pode não derivar necessariamente das vias clássicas de AIA. Ao avaliar as rotas dependentes de triptofano, observou-se que nenhuma estirpe possui a maquinaria completa para metabolizar esse aminoácido até AIA. Esse achado está em consonância com o que é descrito para BPCV, nas quais a produção de compostos indólicos nem sempre segue exclusivamente as rotas clássicas dependentes de Triptofano (Castillo *et al.*, 2015).

Por outro lado, com uma análise exploratória ampliada, a única enzima comum a todas as estirpes e diretamente relacionada ao metabolismo do Triptofano (Trp) foi a (3-indolil)-glicerol-fosfato sintase (IGP-EC 4.1.1.48 *Indole-3-glycerol-phosphate synthase*), envolvida na formação de L-triptofano e indol (Figura 7). Além das rotas Trp-dependentes, a via independente de aminoácidos a partir do indol ou do indol-3-glicerol-fosfato, tanto em plantas quanto em bactérias, o que reforça o papel do IGP como um intermediário metabólico central na geração de sinais indólicos (Castillo *et al.*, 2015).

Figura 7 – *Heatmap* do metabolismo do (3-indolil)-glicerol-fosfato sintase (IGP).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Dessa forma, o sinal colorimétrico observado (coloração rósea) pode refletir tanto a presença de indol microbiano natural, ou seja aquele produzido pelo metabolismo microbiano, quanto a formação de produtos intermediários provenientes da metabolização do triptofano exógeno, ou seja suplementado (quando em laboratório) ou secretado/exsudado (quanto em contexto ambiental), sugerindo que o composto detectado não se origina exclusivamente da rota clássica de biossíntese de AIA.

O *Heatmap* metabólico (Figura 7) mostra a presença do intermediário 3-indolil-glicerol-fosfato (IGP) em todas as estirpes, indicando que a síntese de triptofano microbiano é possível. No entanto, a enzima que converte triptofano em IAM, necessária para a via clássica de AIA,

não está presente na maioria das estirpes, reforçando a importância da amidase para gerar compostos auxínicos bioativos por rotas alternativas. Conforme descrito para o gênero *Azospirillum*, embora múltiplas vias de biossíntese de AIA tenham sido propostas, a expressão e a completude dessas rotas variam entre estirpes (Castillo *et al.*, 2015; Sant’Anna *et al.*, 2011; Spaepen; Vanderleyden; Remans, 2007; Steenhoudt; Vanderleyden, 2000).

Nas estirpes de *Nitrospirillum*, o IGP surge como ponto de inflexão metabólica entre a biossíntese de aminoácidos aromáticos e a geração de compostos bioativos. Embora classicamente associado à formação de triptofano, o IGP também é precursor direto da via de benzoxazinoides (BX), um conjunto de metabólitos especializados típicos de gramíneas, com funções na defesa química e na modulação de interações rizosféricas (Glauser *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2024; Zhou; Richter; Jander, 2018).

No contexto da interação com plantas, o fato de *Nitrospirillum* conservar o potencial de geração de IGP e exibir vias redundantes para conversão de amidas aromáticas em auxinas (AIA/PAA) sugere que essas bactérias participem indiretamente na modulação do balanço entre crescimento e defesa. O PAA, além de sua função hormonal, apresenta atividade antimicrobiana (Hwang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004), o que pode atuar sinergicamente com os benzoxazinoides vegetais para estabilizar a microbiota rizosférica, sugerindo um envolvimento em mecanismos de defesa e vantagem ecológica em microambientes competitivos (Sánchez-Parra *et al.*, 2014).

3.3.5 Estratégias Metabólicas de Auxinas

A análise integrada dos dados genômicos e experimentais evidencia que as estirpes do gênero *Nitrospirillum* adotam uma lógica metabólica focada em enzimas de finalização. Diferente de outros gêneros microbianos que podem apresentar as vias completas de biossíntese auxínica de triptofano, as estirpes estudadas apresentam um notável “vazio genômico”, caracterizado pela ausência sistemática de enzimas-chave das etapas iniciais de conversão do triptofano.

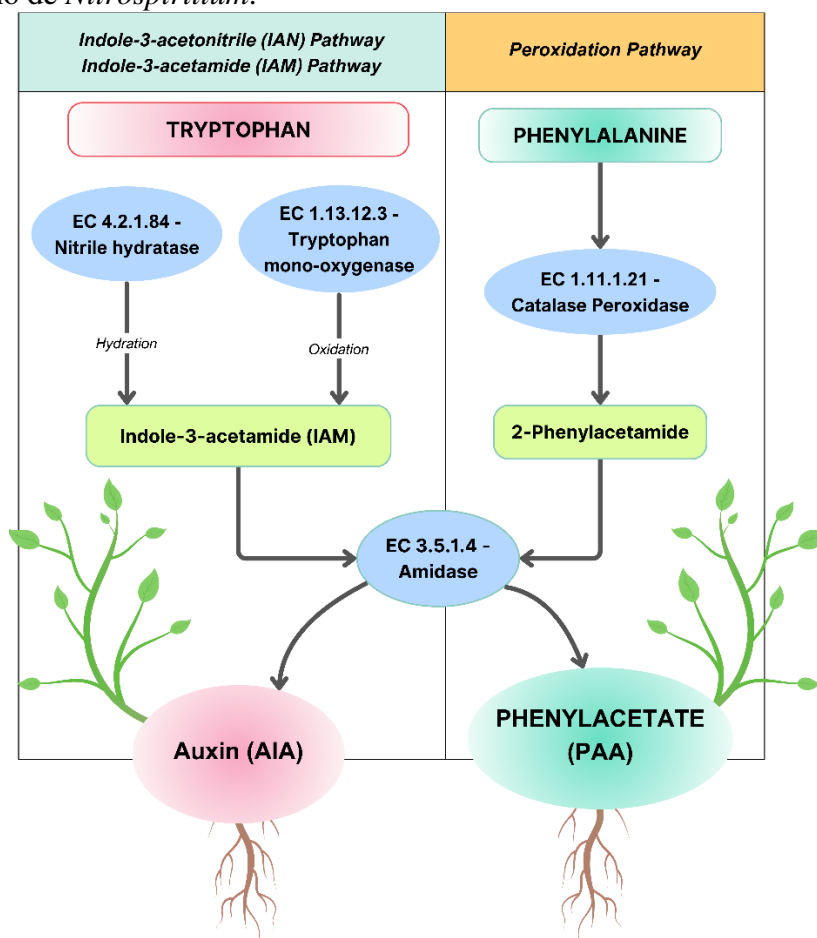
Essa configuração funcional propicia a adoção de uma estratégia baseada na utilização de intermediários exógenos e em processos de *cross-feeding* metabólico na rizosfera, nos quais compostos derivados de exsudatos vegetais ou do *turnover* da microbiota associada são captados e convertidos em metabólitos bioativos (Badri e Vivanco *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2021; Zhalnina *et al.*, 2018).

Nesse contexto, as estirpes de *Nitrospirillum* spp. avaliadas não atuam como produtoras primárias de auxinas a partir de precursores simples, mas como conversores metabólicos especializados na transformação de intermediários parcialmente processados disponíveis no ambiente. Esse processo é sustentado por um arsenal enzimático de finalização composto centralmente pelas enzimas: amidase (EC 3.5.1.4) e pela enzima aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3).

3.3.5.1 ENZIMAS DE FINALIZAÇÃO: AMIDASE E ALDEÍDO DESIDROGENASE

A amidase (EC 3.5.1.4), identificada em 80% das estirpes analisadas, amplamente distribuída em bactérias do solo, apresenta a capacidade de hidrolisar amidas aromáticas, atuando tanto na conversão de IAM em AIA, bem como 2-fenilacetamida em PAA (Ortiz-García *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2022). Essa dualidade funcional permite que algumas estirpes do gênero *Nitrospirillum* modulam o desenvolvimento vegetal, independentemente do precursor disponível, mantendo a produção de auxinas bioativas, funcionando como elo entre rotas indólicas (AIA) e não-indólicas (PAA), mesmo na ausência de vias clássicas completas, ampliando o espectro do composto que podem ser usados na síntese auxínica (Figura 8).

Figura 8 – Atividade da amidase na biossíntese do ácido fenilacético e do ácido indol-3-acético no metabolismo de *Nitrospirillum*.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A maior produção experimental de compostos indólicos observada em *N. viridazoti* BR11140^T pode estar associada à presença de uma via quase completa para a conversão do Indol-3-acetonitrila (IAN) via enzima Nitrila hidratase (EC 4.2.1.84) em IAM e, posteriormente, AIA (Figura 8). Essa conformação reforça a relação entre maior integridade genômica das rotas e otimização do rendimento metabólico.

Estudos envolvendo *A. amazonense* Y2 demonstram que, apesar da ausência total dos genes clássicos *iaaM*, *iaaH* e *ipdC*, a estirpe apresenta capacidade de produção de AIA. Os dados genômicos demonstram que a estirpe compensa esse vazio genômico possuindo uma nitrilase com 70% de similaridade funcional às nitrilases de milho e *Arabidopsis thaliana*, na ocasião, a enzima permite que a bactéria capte o indol-3-acetonitrila da planta hospedeira e o finaliza em auxina (AIA) (Steenhoudt, *et al.*, 2000, Vorwerk *et al.*, 2001; Spaepen *et al.*, 2007; Kriechbaumer *et al.*, 2007; Sant'Anna *et al.*, 2011).

Por outro lado, a enzima aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3), detectada em 100% das estirpes avaliadas, catalisa a oxidação de aldeídos aromáticos, incluindo a conversão de indol-3-acetaldeído (IAAld) em AIA. A presença universal da enzima indica a capacidade de “finalização” da biossíntese de auxinas também a partir de intermediários aldeídicos.

Em conjunto, essas enzimas apresentam uma estratégia metabólica baseada na conversão de intermediários parcialmente processados em auxinas bioativas, permitindo que essas bactérias operem como conversores terminais eficientes.

3.3.5.2 REGULAÇÃO METABÓLICA VIA ANTRANILATO

A regulação do metabolismo indólico em *Nitrospirillum* spp. também é associada ao antranilato, que opera na regulação do fluxo de carbono para aminoácidos aromáticos e também como modulador na produção de auxinas. Em modelos de *Azospirillum*, o antranilato inibe a síntese de AIA para evitar concentrações supra-ótimas que seriam inibitórias ao crescimento radicular (Rodrigues *et al.*, 2008; Spaepen *et al.*, 2007).

Dessa forma, propõe-se que o antranilato funcione como um “termostato metabólico”, regulando o balanço entre a biossíntese e o catabolismo do triptofano. Esse controle envolve a interação entre enzimas da via de produção (Antranilato sintase – EC 4.1.3.27) e consumo (Triptofano 2,3-dioxigenase – EC 1.13.11.11; Quinurenisase – EC 3.7.1.3 e Arilformamidase – EC 3.5.1.9). Nesse cenário, a interação planta-bactéria envolve um ajuste fino, onde a disponibilidade de precursores e o estado metabólico bacteriano determinam a produção final do fitohormônio, evitando concentrações supra-ótimas antagônicas para hospedeiro.

3.3.5.3 SINERGIA COM O METABOLISMO VEGETAL

A rizosfera é um ambiente altamente dinâmico, caracterizado pela troca contínua de compostos orgânicos entre plantas e microfauna (Bais *et al.*, 2006; Badri *et al.*, 2009;). Embora intermediários como IAM e IAAld não sejam tipicamente detectados como componentes estáveis dos exsudatos radiculares, a presença de compostos indólicos e precursores aromáticos derivados do metabolismo vegetal e microbiano pode gerar esses intermediários de forma transitória (Olandrewaju *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2024). Nesse cenário, tais moléculas tornam-se acessíveis a bactérias com capacidade de conversão terminal (Lopes *et al.*, 2023; Tang *et al.*, 2023).

O AIA é uma molécula sinalizadora que controla a divisão, o alongamento e a diferenciação celulares em plantas, de forma dependente da concentração (Davies, 2004). O Ácido fenilacético (PAA), por sua vez, é reconhecido como outro tipo de auxina amplamente presente em tecidos vegetais (Sugawara *et al.*, 2015), desencadeando efeitos semelhantes aos do AIA. Embora menos potente fisiologicamente do que o AIA (Leuba; LeTourneau, 1990), o PAA pode atuar como regulador localizado, complementando a ação do AIA ou modulando respostas em regiões onde o transporte polar do AIA é restrito (Morris; Johnson, 1987; Sugawara *et al.*, 2015).

Apesar disso, já foi relatado que em plantas de ervilha (*Pisum sativum*) o PAA, e não AIA, promove ativamente a formação de raízes laterais (Schneider; Kazakoff; Wightman, 1985). Além de ocorrer em níveis fisiologicamente significativos em diversas espécies de plantas, como tomate, tabaco, girassol, ervilha, cevada e milho (Schneider; Kazakoff; Wightman, 1985; Sugawara *et al.*, 2015; Wightman; Lighty, 1982). Em geral, as plantas acumulam níveis muito mais elevados de PAA do que de AIA (Mashiguchi *et al.*, 2019).

Em gramíneas da família Poaceae, como *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Setaria italica* e *Panicum virgatum*, foram identificados genes codificadores de amidases do tipo IAM/PAM (Os04g02780.1; GRMZM2G169087_T01; Si001473m; Pavirv00043873m, respectivamente), com funções semelhantes às observadas em bactérias fitotróficas, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae* (Sánchez-Parra *et al.*, 2014). Essa correspondência funcional reforça a hipótese de que amidases bacterianas, como as encontradas em *Nitrospirillum*, possam atuar em sinergia metabólica com as vias fenílicas das gramíneas hospedeiras, contribuindo para a regulação localizada de PAA na rizosfera.

Agrobacterium tumefaciens é um exemplo clássico de bactéria do solo que manipula os níveis endógenos de AIA e PAA para induzir formação de galhas da coroa, contornando a via principal de AIA das plantas. Nessas interações, a biossíntese de AIA e PAA aumenta significativamente em tecidos vegetais transformados com o gene *iaaM* de *A. tumefaciens* (Mashiguchi *et al.*, 2019). Curiosamente, proteínas *IaaM* de *Pseudomonas savastanoi* expressas em *E. coli* catalisam a conversão de fenilalanina (Phe) em fenilacetamida (PAM) *in vitro* (Emanuele; Heasley; Fitzpatrick, 1995).

Em síntese, essa organização metabólica indica que as estirpes *Nitrospirillum* spp. estão adaptadas ao ambiente rizosférico, onde a abundância de metabólitos de origem vegetal e microbiana favorece microrganismos especializados em etapas terminais da biossíntese, em

detrimento de vias completas. Assim, essas bactérias atuam como conversores metabólicos, explorando intermediários disponíveis no ambiente para a produção de auxinas bioativas.

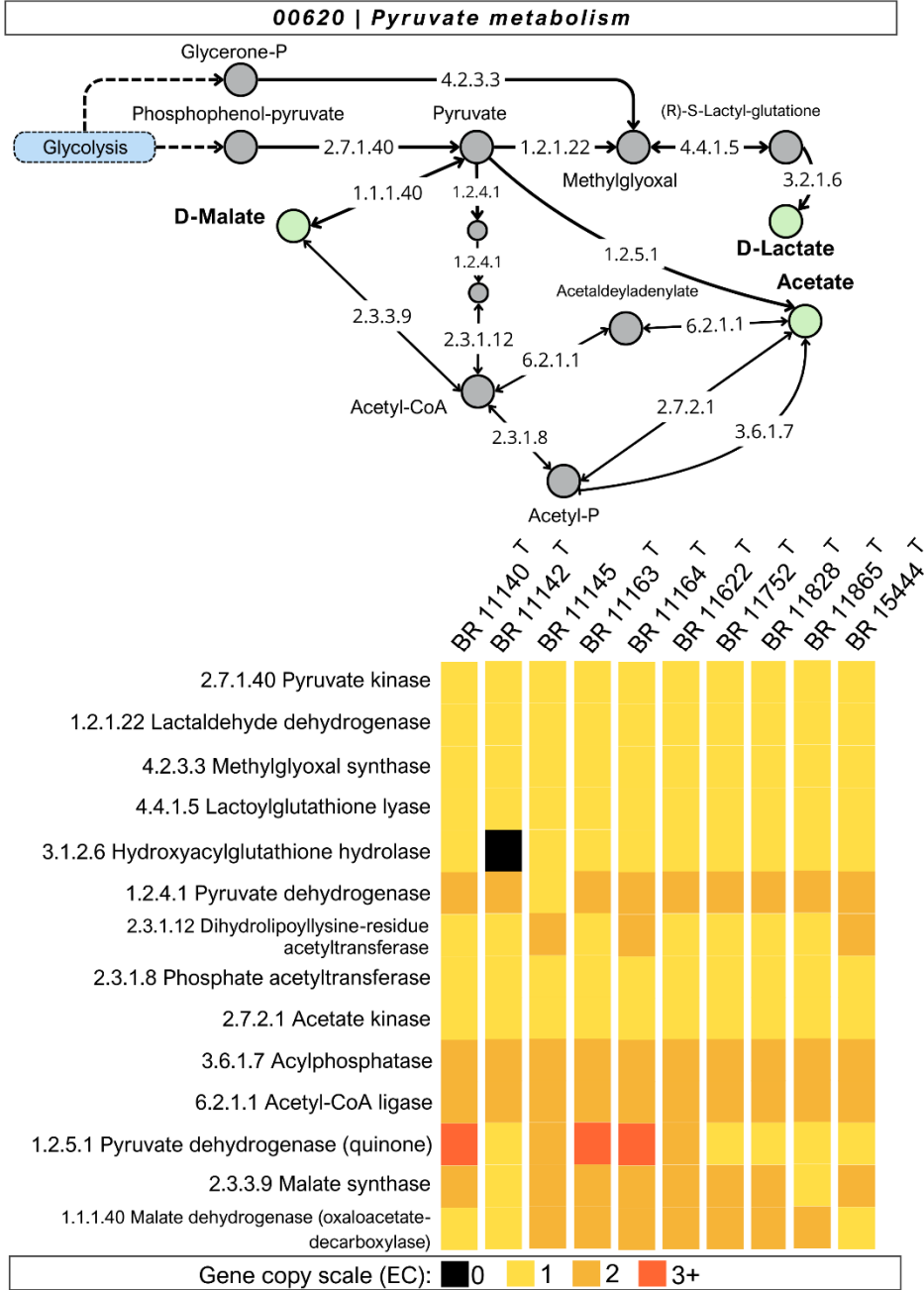
3.3.6 Solubilização de Nutrientes

3.3.6.1 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE MECANISMOS ASSOCIADOS A SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E ZINCO

A investigação sobre a capacidade de solubilização de fosfatos (P) e zinco (Zn) em estirpes de *Nitrospirillum* spp. foi orientada pela identificação de vias metabólicas associadas à síntese de ácidos orgânicos, compostos frequentemente envolvidos na solubilização microbiana de minerais no solo. A produção e secreção de ácidos orgânicos é considerada um dos mecanismos predominantes empregados por microrganismos solubilizadores de fósforo e micronutrientes, pois tais ácidos promovem a acidificação local e a complexação de cátions associados a formas insolúveis de nutrientes, facilitando sua mobilização para formas disponíveis às plantas (Cheng *et al.*, 2023).

Na via 00620 (*pathway* 00620 – *Pyruvate metabolismo*) foram identificados intermediários que podem levar à formação de ácidos orgânicos relevantes à solubilização, como *D-lactate* (ácido láctico), *acetate* (ácido acético) e *D-malate* (malato). A maioria das estirpes analisadas apresenta o aparato enzimático completo para a produção desses compostos, com exceção da estirpe BR 11142^T, que não possui a enzima EC 3.1.2.6 (*hydroxyacylglutathione hydrolase*) necessária à formação de *D-lactate*, embora possuindo as rotas para a formação de outros ácidos na mesma *pathway* Figura 9.

Figura 9 – Heatmap metabólico para síntese de ácidos orgânicos.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Adicionalmente, outras vias metabólicas centrais também mostram potencial para produção de ácidos orgânicos: Rota 00720 – *Reductive carboxylate cycle* (CO₂ fixation): a formação de citrate e *S-malate* é possível em todas as estirpes, embora a formação de *acetate* seja limitada a algumas (BR 11145, BR 11622 e BR 15444).

Pathway 00020 – *Citrate cycle* (TCA Cycle) e 00630 – Metabolismo do glioxilato e do dicarboxilato: todos os genomas apresentam rotas completas para a geração de *citrate* e *S-malate*.

Pathway 00650 –Metabolismo de Butanoato: a formação de *R-malate* está presente apenas em algumas estirpes (BR 11140, BR 11142, BR 11145, BR 11163 e BR 15444).

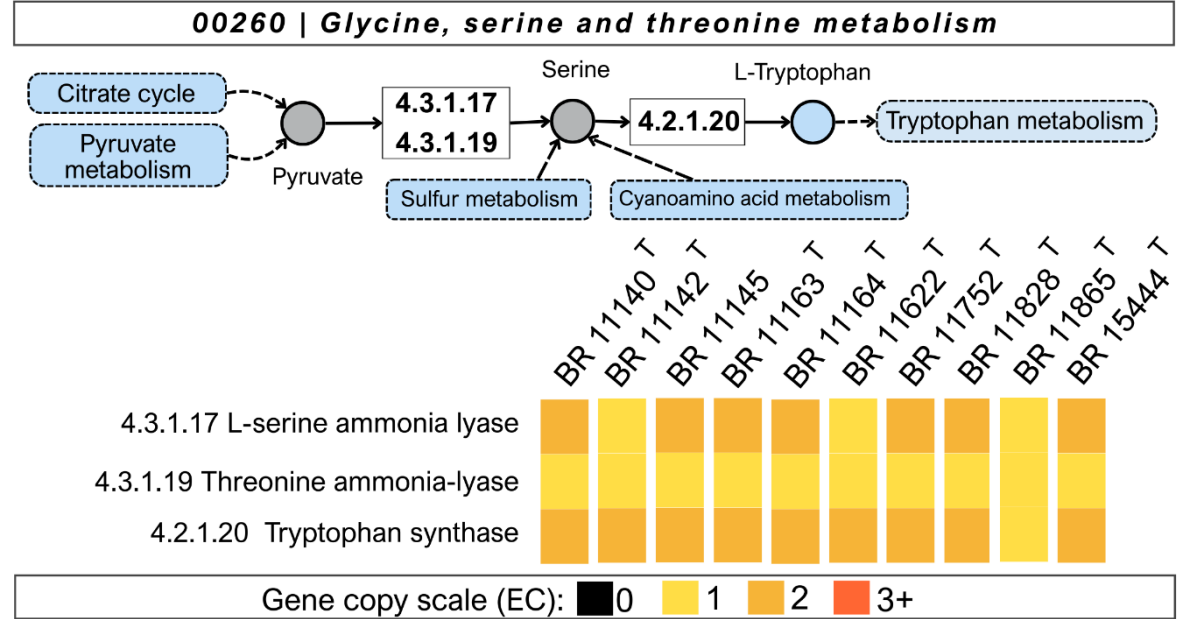
A presença combinada dessas rotas sugere um amplo potencial genômico para a produção de ácidos orgânicos. Os *heatmaps* complementares das rotas podem ser acessados no apêndice: A – *Heatmaps* metabólicos complementares para formação ácidos orgânicos.

3.3.6.2 ANÁLISES *IN VITRO* DE ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS

A avaliação da capacidade de solubilização de fosfato por diferentes estirpes bacterianas foi realizada por meio da análise do zoneamento de solubilização (halo de solubilização) em três tempos distintos: 5, 15 e 20 dias após a inoculação. Para complementar a análise da solubilização de fosfato tricálcico (Ca_3PO_4) foram investigadas as interações das estirpes bacterianas com fontes de fosfato de menor solubilidade, como o fosfato férrico (FePO_4) e o fosfato de alumínio (AlPO_4), em tempos de incubação de 5 e 20 dias após inoculação.

A presença da rota 00260 (glycine, serine and threonine metabolism) indica a capacidade metabólica das estirpes em sustentar fluxos de carbono e nitrogênio essenciais à biossíntese de aminoácidos aromáticos, incluindo o L-triptofano, cujo metabolismo é conhecido por ser sensível à disponibilidade de micronutrientes como o Zn (Figura 10).

Figura 10 – Heatmap metabolismo da síntese de L-Triptofano.



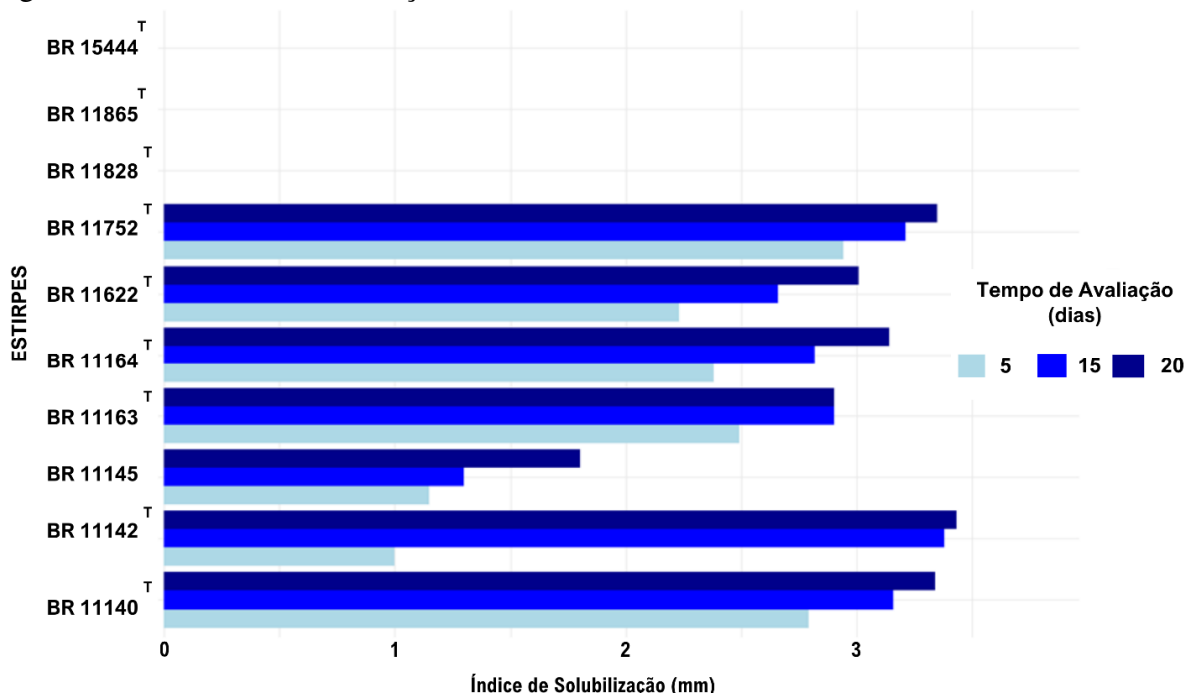
Fonte: Elaborado pelo Autor.

3.3.6.3 ENSAIO DE SOLUBILIZAÇÃO

3.3.6.3.1 Fosfato tricálcico (Ca_3PO_4)

A BR 11140, 11142 e 11752 apresentaram ótimo desempenho de solubilização da fonte $Ca_3(PO_4)_2$ alcançando halo de solubilização de 3,34, 3,43 e 3,35 mm aos 20 dias, respectivamente, comportamento contrário ao observado na estirpe BR 11145 (1,80 mm). Outras estirpes, por outro lado, como BR 11163 e 11622, não baixas diferenças de solubilização. As estirpes BR 11828, BR 11865 e BR 15444 não apresentaram atividades de solubilização nos dias avaliados (Figura 11).

Figura 11 – Índice de Solubilização de Fosfato tricálcico.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

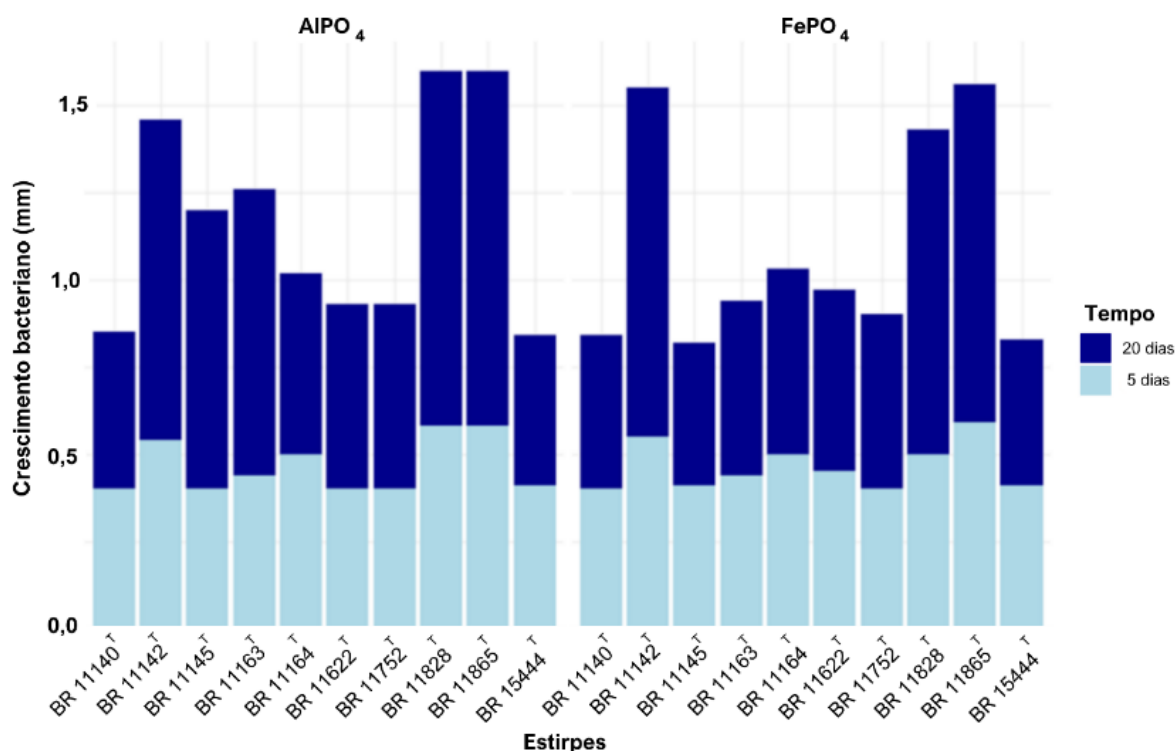
A análise da solubilização de fosfato tricálcico pelas estirpes bacterianas indica um comportamento diversificado entre os isolados, os dados apresentados possibilitam identificar diferenças entre as estirpes quanto à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico em ensaios *in vitro*.

3.3.6.3.2 Fosfato férrico ($FePO_4$) e o fosfato de alumínio ($AlPO_4$)

Na avaliação do halo de solubilização para as fontes de $FePO_4$ e $AlPO_4$, consistentemente, para todas as estirpes tipo de *Nitrospirillum*, tempos e condições, o diâmetro do halo foi de 0.00 mm, indicando que nenhuma das dez estirpes testadas demonstrou capacidade de solubilizar nas condições experimentais empregadas, resultando em um Índice de Solubilização (IS) de 0.00 para todas as observações (registro das placas presentes no Apêndice B).

Apesar da ausência de halo de solubilização, as estirpes foram capazes de se desenvolver nos meios contendo $FePO_4$ e $AlPO_4$. A dinâmica de crescimento das estirpes ao longo do tempo para ambas as fontes de fosfato é visualizada na figura 12 a seguir.

Figura 12 – Crescimento bacteriano (mm de colônia) de fontes de Fosfato férrico e Fosfato de alumínio.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A Figura indica o aumento no crescimento bacteriano para a maioria das estirpes de 5 para 20 dias, o comportamento semelhante em ambas as condições sugere que o desenvolvimento esteve aliado ao aporte da fonte de carbono (sacarose) fornecida no meio de cultivo.

3.3.6.3.3 Avaliação da caracterização *in silico* com o fenótipo observado *in vitro*

A análise *in silico* demonstrou que a capacidade metabólica das estirpes de *Nitrospirillum* spp. para a solubilização de fósforo está majoritariamente associada a biossíntese de ácidos orgânicos dicarboxílicos, com destaque para os ácidos citrato e malato, os quais foram identificados de forma consistente em múltiplas vias metabólicas centrais. As *pathways* 00020 (*Citrate cycle*), 00630 (*Glyoxylate and dicarboxylate metabolism*) e 00720 (*Reductive carboxylate cycle*) apresentaram rotas completas para a formação de (*S*)-malate e citrate em todas as estirpes avaliadas, indicando que esses dois carboxilatos constituem os compostos mais conservados e metabolicamente acessíveis no conjunto genômico analisado. Em contraste, ácidos como acetato, lactato e (*R*)-malato apresentaram distribuição variável entre as estirpes.

Os resultados de solubilização de fosfato tricálcico são compatíveis com esse perfil metabólico, uma vez que citrato e malato são amplamente reconhecidos na literatura como os ácidos orgânicos mais eficazes na solubilização deste composto, devido à sua elevada capacidade de quelar Ca^{2+} e promover a liberação de P por complexação e acidificação do microambiente (Pan; Cai, 2023; Panhwar *et al.*, 2013). Assim, a presença universal das rotas de síntese desses ácidos fornece uma base metabólica aceitável para o que foi observado na atividade de solubilização, enquanto as diferenças quantitativas nos halos de solubilização refletem variações na regulação, secreção e fluxo metabólico desses compostos, e não apenas na presença ou ausência das vias biossintéticas.

Adicionalmente, a ausência de solubilização de FePO_4 e AlPO_4 , apesar do crescimento bacteriano robusto, reflete a maior recalcitrância desses fosfatos ácidos. Diferentemente do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, cuja solubilização é favorecida pela acidificação (pH baixo dissolve precipitado alcalino) (Pan; Cai, 2023), os fosfatos de Fe/Al predominam e precipitam em pH ácido (<5), de modo que a acidificação microbiana agrava sua insolubilidade (Araújo *et al.*, 2024). Assim, embora o potencial genômico para síntese de quelantes (Citrato/Malato; Figura 9) esteja presente, as condições experimentais não elicitaram secreção suficiente desses complexantes ou geraram pH excessivamente ácido no microambiente, limitando a liberação de P dessas fontes mais estáveis (Xie *et al.*, 2025).

Os ácidos citrato e malato representam os principais ácidos orgânicos potencialmente envolvidos na solubilização de fósforo em *Nitrospirillum*, enquanto lactato, acetato e outras moléculas atuam como vias auxiliares, modulando a resposta conforme a estirpe e a fonte fosfatada disponível.

A solubilização de compostos de zinco por microrganismos também tem sido associada à produção de ácidos orgânicos e à capacidade de converter formas insolúveis de Zn em íons solúveis (Zn^{2+}), que são mais disponíveis para absorção vegetal (Maciel-Rodríguez; Moreno-Valencia; Plascencia-Espinosa, 2025; Srithaworn *et al.*, 2023). Além disso, outro mecanismo em bactérias solubilizadoras de Zn envolve a liberação de ácidos orgânicos que acidificam o meio local e promovem a quebra de ligações em compostos de zinco insolúveis, permitindo a liberação do micronutriente para a rizosfera (Maciel-Rodríguez; Moreno-Valencia; Plascencia-Espinosa, 2025; Sethi *et al.*, 2025).

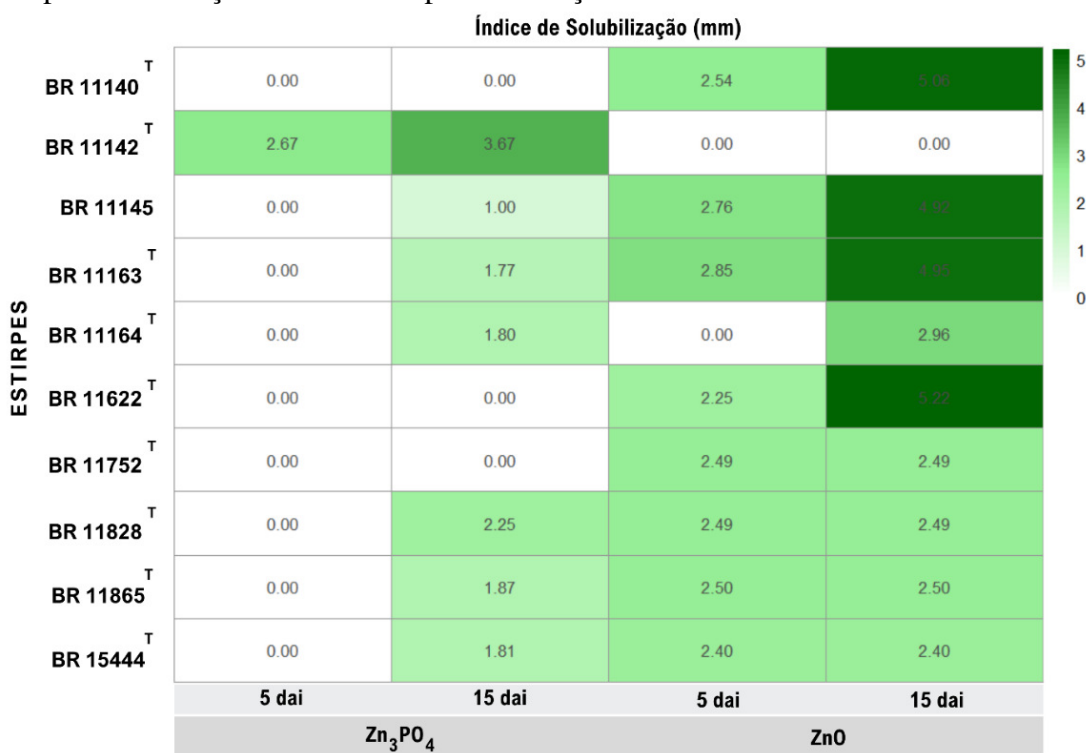
Os microrganismos solubilizadores de Zn também podem contribuir para o aumento da absorção de Zn por plantas por meio de produção de sideróforos que mobilizam metais, incluindo Zn (Srithaworn *et al.*, 2023).

3.3.6.3.4 Solubilização de Zinco (Zn)

a) Capacidade de solubilização de óxido de zinco

A solubilização da fonte de óxido de zinco (ZnO), evidenciado pelo halo de solubilização, apresentou padrões distintos e geralmente mais promissores em comparação com $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figura 13).

Figura 13 – Pannel de análise da solubilização de Zinco por estirpes de *Nitrospirillum* spp. frente aos tempos de avaliação. Dai = dias após inoculação.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Em 5 dias (Figura 13), a maioria das estirpes demonstraram capacidade de solubilizar ZnO, com Índices de Solubilização variando de 2.25 (estirpe BR 11622) a 2.85 (estirpe BR 11163). As estirpes BR 11142 e BR 11164, no entanto, apresentaram um IS de 0.00, indicando ausência de solubilização para ZnO neste período. Apesar destas duas exceções, a maioria das estirpes (80%) foi capaz de solubilizar ZnO neste tempo inicial.

Em 15 dias, observou-se um aumento notável na capacidade de solubilização de ZnO para as estirpes que já eram ativas, e um início de atividade para aquelas que não estavam ativas.

Estirpes como BR 11140, BR 11145, BR 11163 e BR 11622 atingiram Índices de Solubilização elevados (4.92 a 5.22 mm), superando consideravelmente seus desempenhos em 5 dias. A estirpe BR 11164, que inicialmente não solubilizou ZnO em 5 dias (IS = 0.00), demonstrou um IS de 2.96 em 15 dias, indicando um início tardio ou uma maior demanda por tempo para a indução do mecanismo de solubilização. As demais estirpes mantiveram seus resultados (0.00 para estirpe BR 11142, e 2.49 para as demais, onde não houve aumento significativo), sugerindo que a capacidade de solubilização de ZnO pode não ser progressiva ao longo do tempo para todas as estirpes. A porcentagem de estirpes solubilizadoras de ZnO em 15 dias permaneceu alta, com 80% das estirpes apresentando IS-Zn > 1.00.

b) Capacidade de solubilização de fosfato de zinco

Conforme os dados apresentados na Figura 13, a solubilização de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ foi observada em um número limitado de estirpes ou que se manifestou mais lentamente.

Em 5 dias após a inoculação, a maioria das estirpes não demonstraram capacidade de solubilização de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, registrando um Índice de Solubilização (IS) de 0.00. Apenas a BR 11142^T exibiu atividade de solubilização para esta fonte, com um IS de 2.67.

Conforme ilustrado, em 15 dias, verificou-se uma melhora na capacidade de solubilização para algumas estirpes que inicialmente não apresentavam atividade para $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$. As estirpes BRs 11163, 11164, 11828, 11868 e 15444, que iniciaram com IS de 0.00, registraram aumentos para valores entre 1.00 e 2.25.

Embora a estirpe BR 11145 tenha atingido um IS-Zn de 1.00, que indica ausência de halo, as demais estirpes demonstram que a solubilização para elas se manifesta ou se torna mais detectável com um período de incubação mais longo. A estirpe BR 11142 manteve seu destaque, aumentando seu IS para 3.67. Contudo, as estirpes BRs 11140, 11622 e 11752 permaneceram com IS de 0.00, indicando incapacidade de solubilizar $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ sob as condições e tempo avaliados. A proporção de estirpes solubilizadoras em 15 dias aumentou significativamente em 60%.

3.3.7 Produção de Sideróforos

A capacidade das estirpes de *Nitrospirillum* spp. em produzirem sideróforos foi avaliada qualitativamente pelo método do Cromoazurol S (CAS) (Schwyn; Neilands, 1987) adaptado

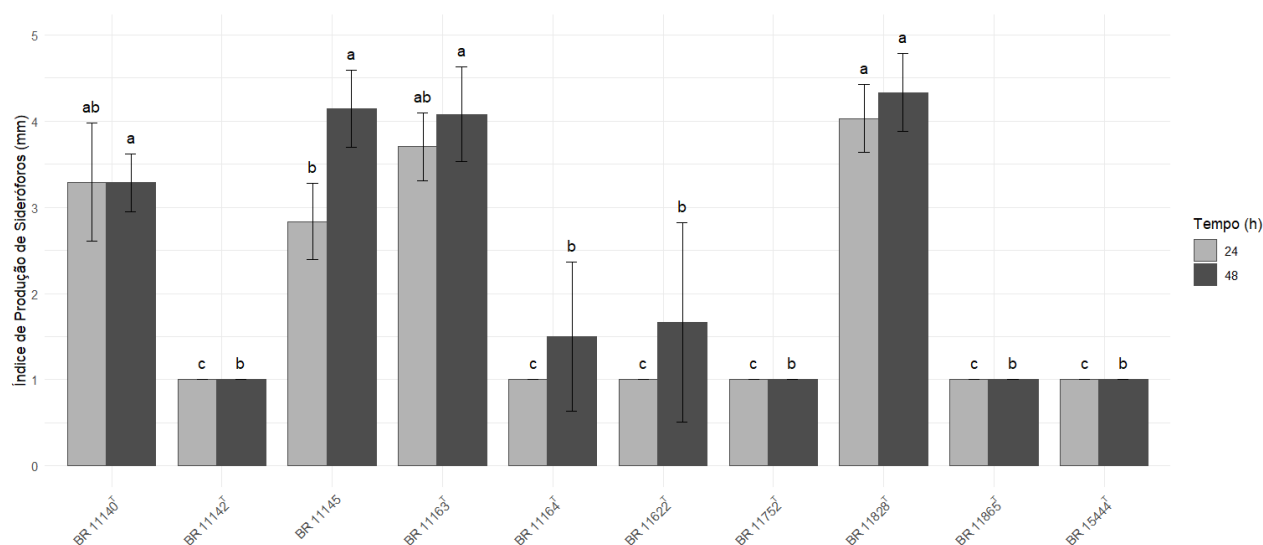
para o sistema O-CAS (Pérez-Miranda *et al.*, 2007b). Após o tempo de incubação, observou-se formação de halos alaranjados claros em torno das colônias de algumas estirpes, indicando a produção de sideróforos das classes hidroxamato e carboxilato (Pérez-Miranda *et al.*, 2007b). (Apêndice C – Placas de produção e Sideróforos).

3.3.7.1 DESEMPENHO DAS ESTIRPES

Após 24 h, as estirpes BR 11828, BR 11163 e BR 11140 apresentaram os maiores índices de produção de sideróforos, sem diferenças significativas entre si, e superiores às demais. A estirpe BR 11145 apresentou valor intermediário, diferindo das estirpes mais ativas e daquelas sem produção detectável. As estirpes BR 11142, BR 11164, BR 11622, BR 11752, BR 11865 e BR 15444 apresentaram índices próximos a 1,0, não diferindo entre si, indicando ausência de produção de sideróforos nesse período.

Após 48 h, as estirpes BR 11828, BR 11145, BR 11163 e BR 11140 mantiveram os maiores índices de produção de sideróforos, sem diferenças significativas entre si, e superiores às demais estirpes. As estirpes BR 11164 e BR 11622 apresentaram valores baixos, estatisticamente semelhantes entre si, enquanto BR 11142, BR 11752, BR 11865 e BR 15444 permaneceram com índices próximos a 1,0, não diferindo entre si, mesmo após 48 h de incubação. A análise qualitativa indica que BR 11145 apresentou o maior incremento relativo (~46 %) entre 24 h e 48 h, enquanto BR 11828 manteve produção elevada com incremento menor (~7,4 %) (Figura 14).

Figura 14 – Produção de Sideróforos (medido por formação de halo) de estirpes de *Nitrospirillum* spp. Valores nas barras seguidos de mesmas letras no mesmo tempo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os resultados apontam para diferenças significativas na produção de sideróforos entre as estirpes de *Nitrospirillum* spp. com algumas estirpes destacando-se claramente. Essa variabilidade é consistente com estudos prévios que associam a produção de sideróforos a fatores genéticos (Saha *et al.*, 2013) e ambientais, especialmente disponibilidade de ferro no meio (Ellermann; Arthur, 2017).

Estudos demonstram que bactérias do gênero *Azospirillum* sintetizam sideróforos como parte de seu repertório de promoção do crescimento vegetal e tolerância ao estresse (Gureeva; Gureev, 2023). Além disso, combinações de *Azospirillum* com outros BPCV como *Bacillus* aumentaram significativamente a produção de sideróforos em cultura, o que reforça o potencial microbiano de liberar ferro disponível para a planta e de competir com patógenos pela oferta de ferro (Yaadesh *et al.*, 2023).

3.3.7.2 PERFIL GENÔMICO DE VIAS ASSOCIADAS À PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

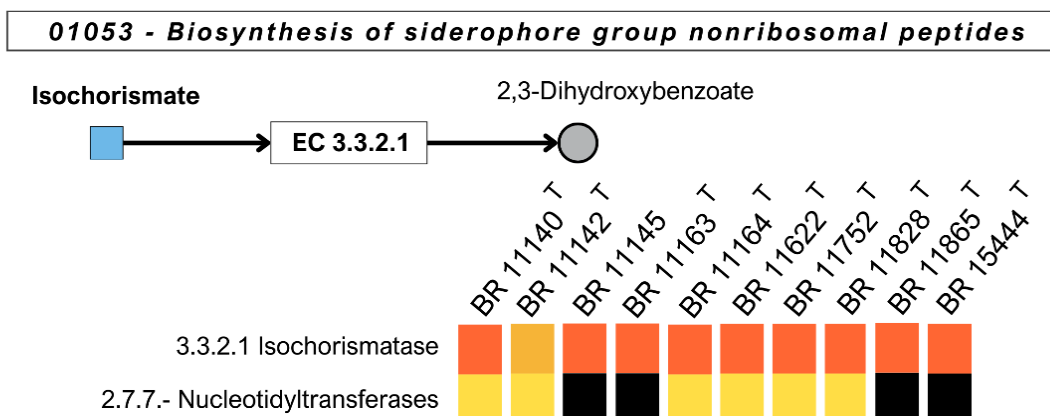
A análise funcional dos genomas das dez estirpes de *Nitrospirillum* investigou a presença de ECs e rotas metabólicas relacionados à síntese de sideróforos, com foco em três rotas distintas permitindo interpretar as variações fenotípicas à luz das capacidades genômicas das estirpes avaliadas.

A análise integrativa das vias metabólicas mostra coerência entre o fenótipo observado nos ensaios bioquímicos e a presença de ECs-chave (Figura 15): 01053 - *Biosynthesis of*

siderophore group nonribosomal peptides, 00300 - *Lysine biosynthesis* e 00260 - *Glycine, serine and threonine metabolism*.

Pathway 01053 – Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides (Figura 15): Todas as estirpes possuem a EC 3.3.2.1 (*Isochorismatase*), que catalisa a conversão de isochoresismato em 2,3-dihidroxi-benzoato (2,3-DHB). Este composto aromático é um precursor essencial para sideróforos do tipo catecholato, sendo incorporado em estruturas complexas que formam fortes quelantes de ferro (e possivelmente de outros metais) no ambiente externo.

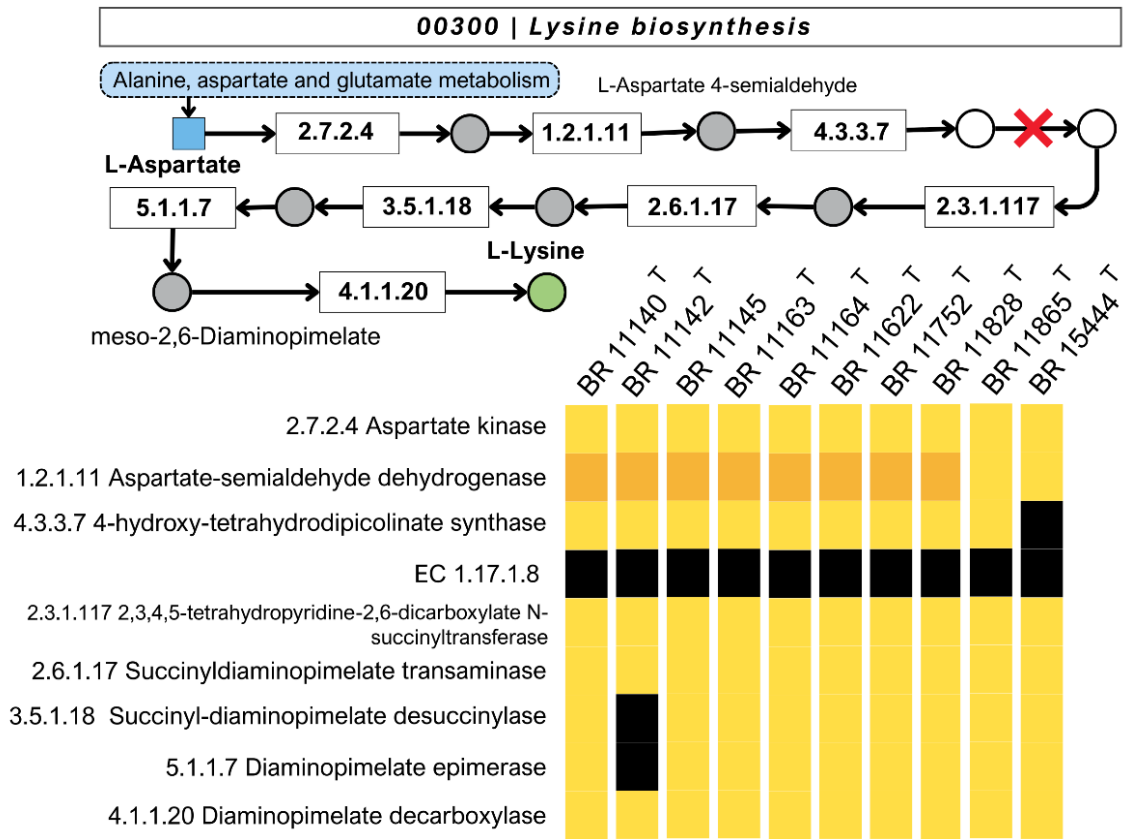
Figura 15 – Via 01053 – Biossíntese de peptídeos não ribossomais do grupo Sideróforos.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Pathway 00300 – Lysine biosynthesis (Figura 16): A enzima EC 1.17.1.8, que converte (2S,4S)-tetrahydro-dipicolinate em *L-lysine*, não foi detectada nas estirpes, indicando que esta rota está incompleta. Entretanto, a maioria das demais enzimas da via, que transformam *L-aspartate* em intermediários subsequentes, estão presentes em estirpes como BR 11140, 11145, 11163, 11164, 11752, 11828, 11865 e 15444; a exceção é BR 11142, que possui ausência adicional de ECs (3.5.1.18 e 5.1.1.7), tornando a via ainda mais comprometida. A falta de capacidade completa para biossíntese de *lysine* sugere que a formação de sideróforos que incorporam esse aminoácido como unidade estruturante pode estar impedida nestas estirpes, correlacionando-se com a ausência de halos no ensaio CAS.

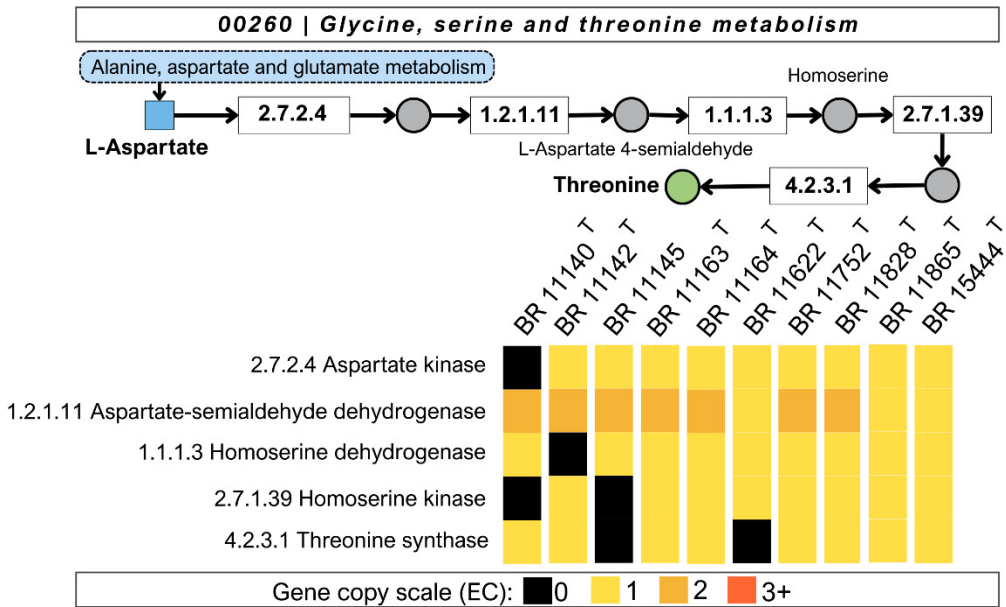
Figura 16 – Via 00300 – Biossíntese de lisina.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Pathway 00260 – Glycine, serine and threonine metabolismo (Figura 17): Esse metabolismo está completo em seis das dez estirpes, indicando potencial para gerar *L-threonine*, outro aminoácido frequentemente incorporado em sideróforos de catecolato estruturais em outros sistemas bacterianos, como observado em sideróforos bem caracterizados como *vibriobactin*, cujo esqueleto molecular incorpora unidades de 2,3-DHB e treonina. Nas estirpes com lacunas nos ECs desta via (e.g., BR 11140, 11142, 11145, 11622), a capacidade de incorporar *threonine* em sideróforos pode estar reduzida, o que coincide com o padrão fenotípico negativo observado.

Figura 17 – Via 00260 – Metabolismo da glicina, serina e treonina.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

3.3.7.3 INTEGRAÇÃO DE RESULTADOS

A produção de sideróforos por microrganismos está associada à habilidade de adquirir ferro em ambientes onde este micronutriente está quimicamente limitado, como em solos tropicais intensamente intemperizados, nos quais o Fe^{3+} forma compostos de baixa solubilidade (Timofeeva; Galyamova; Sedykh, 2022). Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular com afinidade muito alta por Fe^{3+} , sintetizadas em resposta à limitação desse metal, facilitando sua mobilização para uso biológico tanto pela bactéria quanto por plantas associadas (Maciel-Rodríguez; Moreno-Valencia; Plascencia-Espinosa, 2025; Zhang, Siwen *et al.*, 2023).

A presença do precursor aromático 2,3-dihidroxi-benzoato (2,3-DHB) em todas as estirpes analisadas indica que todas possuem a capacidade de gerar o núcleo catecolato necessário para sideróforos do tipo catecolatos. Sideróforos catecolatos, como enterobactina e seus congêneres, formam complexos de alta afinidade com Fe^{3+} e são sintetizados através de rotas metabólicas que incorporam precursores aromáticos ligados a unidades de aminoácidos específicos, frequentemente via sistemas de síntese de peptídeo não ribossomal (NRPS) ou variantes metabólicas equivalentes. A literatura recente descreve sideróforos catecolados produzidos por microrganismos e estruturados a partir de combinações de 2,3-DHB com aminoácidos como serina ou treonina, confirmando que a formação de sideróforos funcionais depende da presença de múltiplos precursores metabólicos além do simples 2,3-DHB (Liu *et al.*, 2023; Timofeeva; Galyamova; Sedykh, 2022).

Entretanto, a presença de 2,3-DHB por si só não garante a produção completa de sideróforos detectável no fenótipo CAS. A síntese efetiva de sideróforos funcionalmente ativos requer a integração de rotas que gerem aminoácidos que possam ser incorporados na estrutura final da molécula siderófora, como por exemplo, treonina ou outros aminoácidos que formam ligações com o núcleo catecolato (Liu *et al.*, 2023). Estirpes que possuem vias completas para o metabolismo de aminoácidos como treonina tendem a apresentar halos positivos no ensaio CAS, enquanto aquelas com lacunas nas vias de biossíntese de aminoácidos conjugáveis apresentam perfis genômicos que explicam a ausência de halos. Esse padrão sugere que a capacidade funcional de biossíntese de sideróforos por *Nitrospirillum* pode estar condicionada não apenas à disponibilidade de precursores aromáticos, mas também à competência no metabolismo de aminoácidos que participam da montagem estrutural da molécula siderófora. Este princípio é consistente com mecanismos descritos para sideróforos peptídicos em outros sistemas microbianos (Zhang, Siwen *et al.*, 2023).

3.3.8 Formação de Biofilme

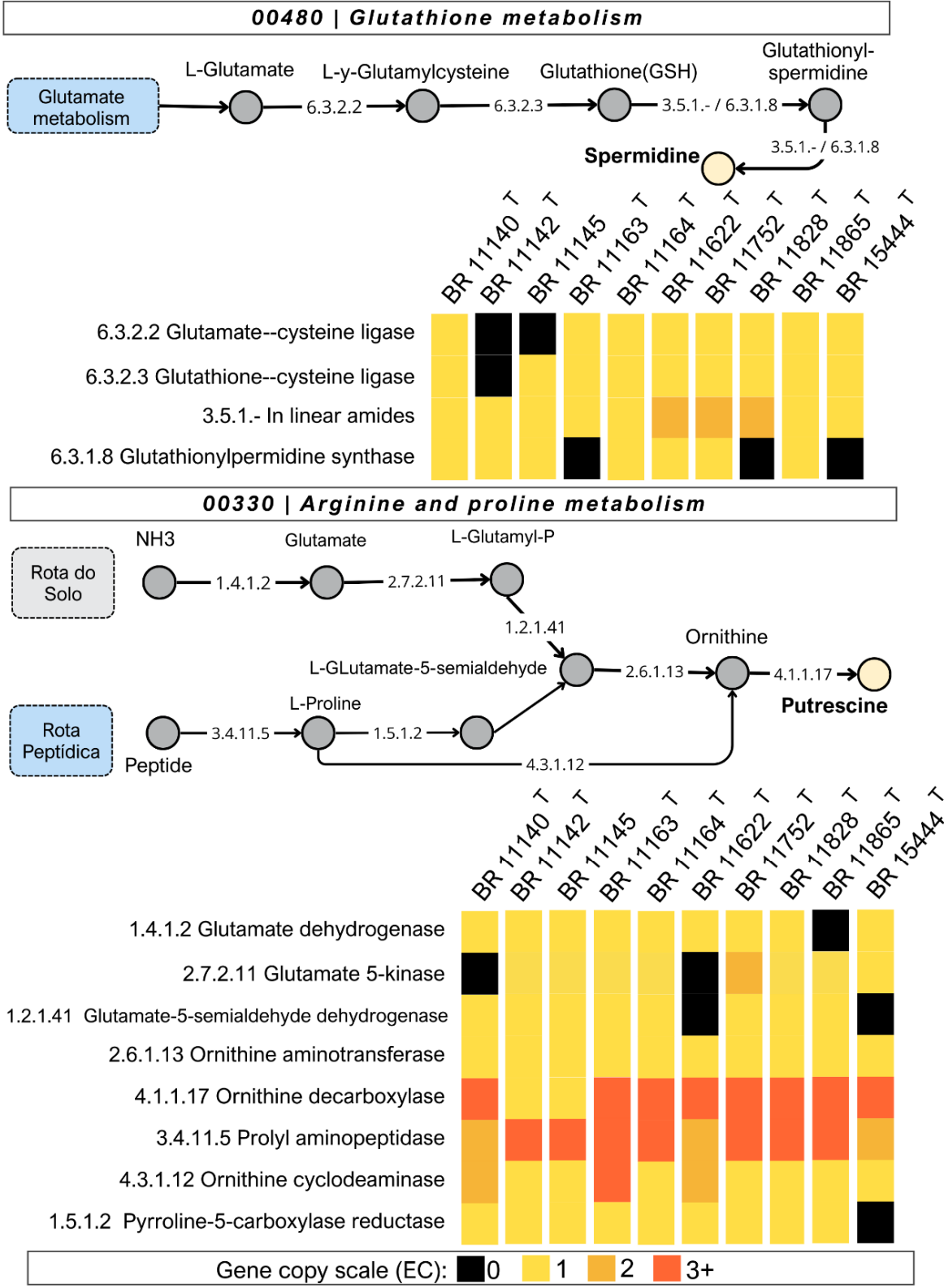
3.3.8.1 ENSAIO DE IN SÍLICO

Nas análises de anotação funcional, foram identificadas vias metabólicas associadas à biossíntese de poliaminas: Via 00330 - *Arginine and Proline Metabolism*, onde foi detectado o composto putrescina, e a Via 00480 - *Glutathione Metabolism*, associada ao composto espermidina (Figura 18). A síntese de espermidina está completa nas estirpes BR 11140, BR 11164, BR 11622, BR 11752 e BR 11865, enquanto BR 11142, 11145, 11163, 11828 e 15444 apresentam lacunas enzimáticas na via 00480.

A putrescina (via 00330) pode ocorrer por duas rotas metabólicas: (i) via assimilação amoniacal, na qual a enzima EC 1.4.1.2 (*glutamate dehydrogenase*) converte NH_3 em glutamato, nas estirpes BR 11142, BR 11145, BR 11163, BR 11164, BR 11752 e BR 11828; e (ii) rota peptídica, na qual a enzima *prolyl aminopeptidase* converte Peptídeos em L-Prolina, sequentemente ciclizada em Ornitina pela ação da EC 4.3.1.12 (*ornithine cyclodesaminase*) e descarbolizada pela EC 4.1.1.17 (*L-ornithine decarboxylase*).

Apesar da ausência da EC 1.5.1.2 (*L-glutamate-5-semialdeído desidrogenase*) na estirpe BR 15444, a presença universal das enzimas EC 4.3.1.12 e EC 4.1.1.17 garante o potencial biossintético de putrescina em todas as estirpes analisadas.

Figura 18 – Heatmap metabólico para detecção de putrescina e espermidina.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Essa detecção colabora com estudos envolvendo *Azospirillum baldaniorum* Sp245, um organismo filogeneticamente próximo e modelo de estudo para rizobactérias promotoras de

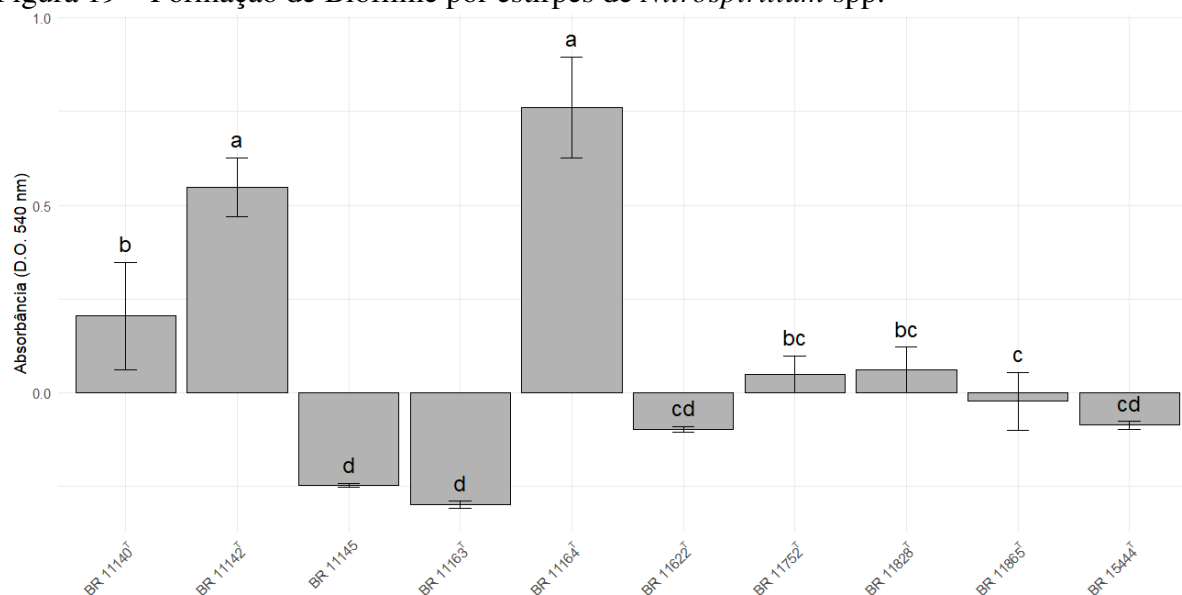
crescimento, que emprega essas poliaminas durante a formação de biofilme bacteriano (Pereyra *et al.*, 2023). As poliaminas, incluindo putrescina e espermidina, desempenham funções celulares fundamentais em crescimento, sinalização e regulação metabólica (Miller-Fleming *et al.*, 2015).

A produção de poliaminas em bactérias tem sido associada diretamente à capacidade de formar biofilmes bacterianos, importantes para a colonização e interação com o hospedeiro e a rizosfera. Estudos em *Escherichia coli* demonstraram que espermidina estimula a formação de biofilme, ligando-se a fatores regulatórios do estado de transição de células livres para biofilme. Estudos de revisão também relatam que tanto putrescina quanto espermidina podem atuar como sinais ou moduladores da formação e estrutura de biofilmes em diferentes espécies bacterianas (Zhang, Chong *et al.*, 2025).

3.3.8.2 ENSAIOS IN VITRO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME

As estirpes BR 11164 (absorbância = 0,761) e BR 11142 (0,549) apresentaram a maior capacidade de formação de biofilme, enquanto BR 11140 (0,205) exibiu capacidade intermediária, BR 11752 (0,050) e BR 11828 (0,062) demonstraram baixa formação de biofilme e as estirpes BR 11145 (-0,246), BR 11163 (-0,299), BR 11622 (-0,097), BR 11865 (-0,022) e BR 15444 (-0,086) não apresentaram formação detectável. O teste de Tukey revelou quatro grupos estatisticamente distintos (a-d), confirmando diferenças significativas na capacidade de formar biofilme entre as estirpes (Figura 19).

Figura 19 – Formação de Biofilme por estirpes de *Nitrospirillum* spp.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os resultados indicam que a capacidade de formação de biofilme em *Nitrospirillum* varia significativamente entre estirpes, refletindo diferenças em características fisiológicas e metabólicas intrínsecas. As estirpes BR 11164 e BR 11142 apresentaram as maiores médias de absorbância (Figura 19), sugerindo maior produção de biofilme e maior adesão celular. Estes fatores provavelmente conferem a essas estirpes melhores desempenho de colonização da rizosfera, favorecendo interações benéficas com as plantas hospedeiras. Em contraste, estirpes como 11163, 11145 e 11622 exibiram baixa formação de biofilme, o que pode indicar menor produção de componentes estruturais do biofilme ou limitação na capacidade de agregação celular.

3.3.8.3 INTEGRAÇÃO DE RESULTADOS IN SÍLICO E IN VITRO

A integração dos dados genômicos e fenotípicos indicam heterogeneidade metabólica entre as estirpes de *Nitrospirillum*, caracterizada pela presença diferencial de vias enzimáticas completas para biossíntese de poliaminas: espermidina (via 00480) completa em BR 11140, BR 11164, BR 11622, BR 11752 e BR 11865 versus ausente em BR 11142, BR 11145, BR 11163, BR 11828 e BR 15444. Embora todas as estirpes apresentem potencial para síntese de putrescina (via 00330) predominantemente pela rota peptídica, apenas BR 11142, BR 11145, BR 11163, BR 11164, BR 11752 e BR 11828 exibem rota de assimilação amoniacal funcional via EC 1.4.1.2. Tal variabilidade biossintética se reflete nos ensaios de biofilme, pois BR 11164

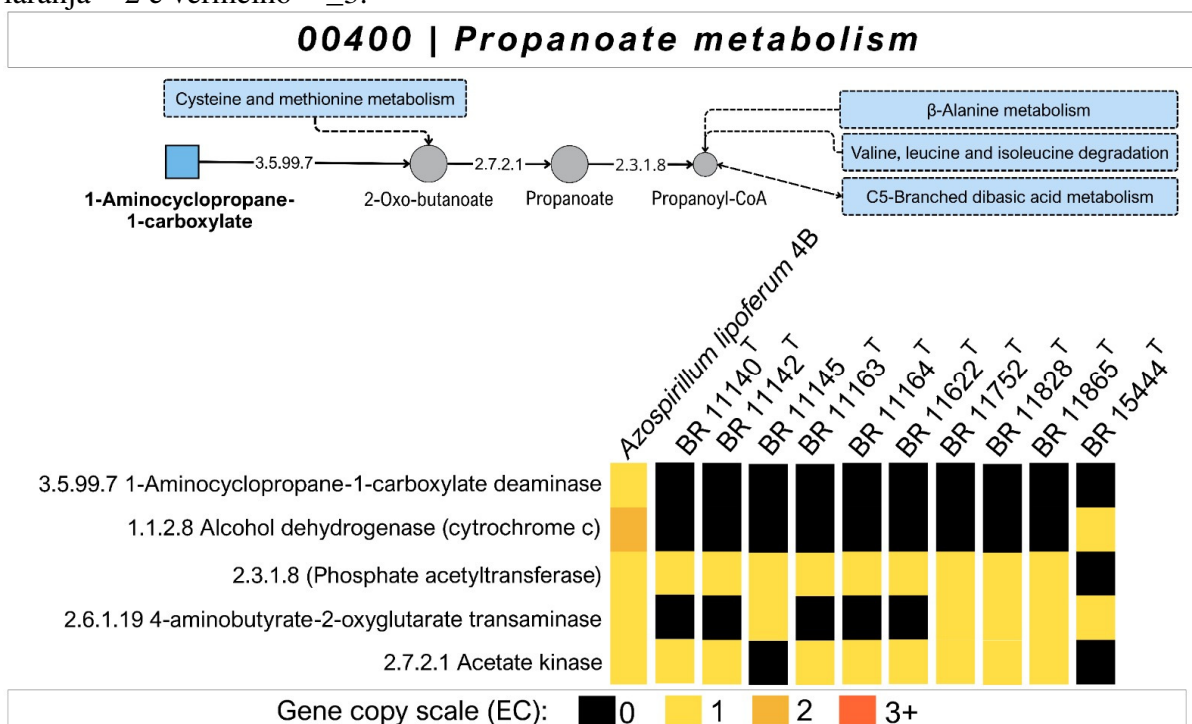
e BR 11142 (ambas com espermidina e dupla rota putrescina viável) produziram as maiores absorbâncias, ao passo que estirpes restritas à rota peptídica simples (BR 11140, BR 11622, BR 15444) ou com lacunas poliamínicas (BR 11163, BR 11145, BR 11622) apresentaram desempenho reduzido ou ausência de formação detectável (valores $\leq 0,205$), demonstrando que a redundância metabólica de poliaminas constitui determinante quantitativo da aptidão fenotípica para biofilme.

3.3.9 ACC-deaminase

Para investigar a potencial produção de ACC-deaminase, uma busca por homólogos do gene *acdS* (EC 3.5.99.7) e de enzimas da via Metabólica do Propanato foi realizada. Como esperado, a busca no genoma de *Azospirillum lipoferum* (controle positivo) identificou com sucesso o gene *acdS* e as enzimas relacionadas (Nascimento *et al.*, 2014; Orozco-Mosqueda; Glick; Santoyo, 2020; Prigent-Combaret *et al.*, 2008).

Em contrapartida, a mesma análise aplicada às estirpes de *Nitrospirillum* spp. demonstrou a ausência universal de homólogos do gene *acdS* (Figura 20). Os genes codificantes para outras enzimas centrais da Via do Propanato (à exemplo, ECs 2.3.1.8, 2.6.1.19 e 2.7.2.1) estão presentes e conservados na maioria das estirpes.

Figura 2 – *Heatmap* do metabolismo do Propanoato em estirpes de *Nitrospirillum* spp. As tonalidades indicam o número de cópias das enzimas (EC): preto = ausência (0), amarelo = 1, laranja = 2 e vermelho = ≥ 3 .



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A presença conservada de outras enzimas participantes do metabolismo do Propanato (ECs 1.1.2.8, 2.3.1.8, 2.6.1.19 e 2.7.2.1), rota central para geração de energia (succinil-CoA) via oxidação de ácidos graxos e aminoácidos (Huang *et al.*, 2020; Shafer *et al.*, 2025), indica que a ausência específica do *acdS* é uma característica biológica natural de *Nitrospirillum* e não uma limitação da anotação.

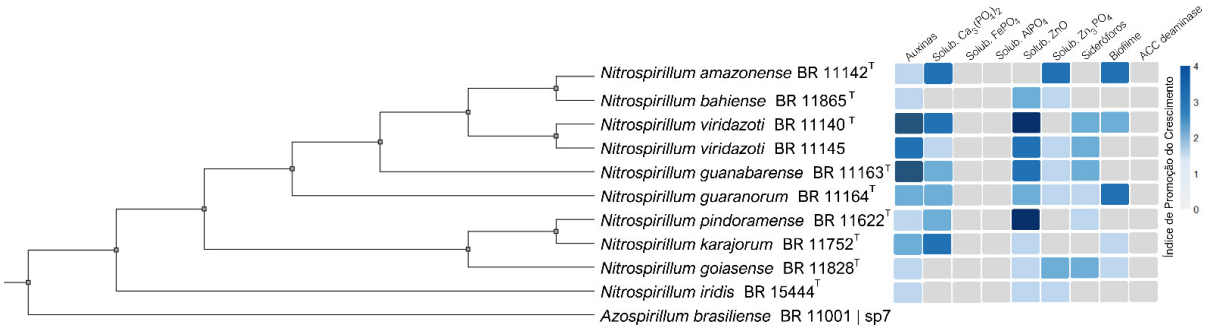
A ausência universal do gene *acdS* nas estirpes de *Nitrospirillum* confirma que a atividade de ACC deaminase não é um traço metabólico disponível neste gênero. Resultados semelhantes foram relatados para *Azospirillum brasilense* Sp245 e CBG497, nos quais o gene *acdS* também está ausente, em contraste com *A. lipoferum*, que o adquiriu por transferência horizontal de bactérias rizosféricas (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2012).

Essa diferença reflete a evolução complexa do grupo: enquanto *A. lipoferum* integrou genes exógenos associados à adaptação terrestre, *Nitrospirillum*, pertencente à família *Azospirillaceae* (Hördt *et al.*, 2020), manteve um repertório genético mais restrito, conservando rotas centrais como fixação de nitrogênio.

Tal cenário sugere que, dentro da família *Azospirillaceae*, o gene *acdS* não foi herdado verticalmente, mas sim adquirido de forma pontual em certas linhagens adaptadas à rizosfera.

A ausência de *acdS* nas estirpes de *Nitrospirillum* spp. avaliadas indica uma especialização ecológica distinta, possivelmente compensada pelos mecanismos alternativos associados modulação hormonal (via PAA e AIA a partir de precursores exógenos) e à melhoria nutricional (solubilização de P e Zn) (Figura 21).

Figura 21 – *Heatmap* integrativo dos Mecanismos de Promoção de Crescimento Vegetal produzidos por estirpes de *Nitrospirillum* spp. A árvore filogenética à esquerda reflete as relações genômicas entre as estirpes.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

3.4 CONCLUSÕES

A integração entre análises genômicas (vias metabólicas e mapeamento funcional) e ensaios bioquímicos (*in vitro*) conduzida neste capítulo reposiciona o gênero *Nitrospirillum* com uma identidade metabólica distinta, que desafia os modelos clássicos estabelecidos para bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).

Biossíntese auxínica independente de triptofano, centralidade na fenilalanina e regulação pelo antranilato: nenhuma estirpe apresenta rotas canônicas dependentes de triptofano (IPyA, TAM, IAM, IAN) completas. Em contrapartida, a maioria das estirpes conserva duas enzimas de finalização de síntese de cadeia, que atuam sobre precursores aromáticos exógenos captados do ambiente (exsudatos vegetais ou turnover microbiano):

- a) Amidase (EC 3.5.1.4), presente em 80% das estirpes, é a enzima terminal da via completa de conversão de fenilalanina em ácido fenilacético (PAA), hidrolisando o intermediário 2-fenilacetamida a PAA;
- b) Aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3), detectada em 100% das estirpes, oxida aldeídos aromáticos (indol-3-acetaldeído) diretamente em AIA, constituindo uma rota universal e independente da fenilalanina.

Associada a transaminases do metabolismo da fenilalanina, a amidase confere a capacidade de produzir PAA como a principal auxina microbiana funcional do gênero. A detecção de compostos indólicos totais (médias de $4,77 \sim 8,72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) confirma a atividade metabólica, ainda que o sinal do reagente de Salkowski não discrimine AIA de outros indóis, incluindo o 3-indolil-glicerol-fosfato (IGP), um tipo de indol oriundo da via biossintética do corismato, conservado universalmente nas estirpes. Adicionalmente, o antranilato atua como regulador do fluxo de carbono entre a síntese de aminoácidos aromáticos e a produção auxínica, evitando concentrações supra-ótimas que seriam fitotóxicas

Solubilização de nutrientes adaptada a contextos específicos de fertilidade: do ponto de vista nutricional, a combinação entre a solubilização consistente de fosfato tricálcico e a mobilização seletiva de zinco, aliada à incapacidade de atuar sobre fosfatos de ferro (Fe) e alumínio (Al), delineia um perfil adaptado a contextos específicos de fertilidade.

Fósforo: Todas as estirpes solubilizam fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), com destaque para BR 11140^T, BR 11142^T e BR 11752^T (halos de $\sim 3,4 \text{ mm}$ aos 20 dias). Esse potencial é

sustentado pela presença universal das vias de síntese de citrato e malato (vias metabólicas 00020, 00630, 00720). Nenhuma estirpe solubilizou fosfato férrico (FePO_4) ou fosfato de alumínio (AlPO_4), confirmando a recalcitrância dessas fontes em condições ácidas.

Zinco: O óxido de zinco (ZnO) é solubilizado pela maioria das estirpes (80% aos 15 dias, IS até 5,22). O fosfato de zinco ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$) é mobilizado por 60% das estirpes, com cinética mais lenta (detecção apenas aos 15 dias) e destaque para BR 11142^T (IS 3,67). Essa seletividade indica que a forma química do nutriente no solo ou fertilizante determina a eficácia do inoculante.

Produção de Sideróforos condicionada pela integridade das vias de aminoácidos estruturais: apenas 40% das estirpes (BR 11828^T, BR 11163^T, BR 11140^T e BR 11145) produzem sideróforos detectáveis pelo método CAS, com halos já mensuráveis em 24 horas de incubação. Todas as estirpes possuem a isocorismatase (EC 3.3.2.1), gerando o precursor 2,3-di-hidroxibenzoato (catecolato). No entanto, a produção funcional de sideróforos requer vias completas para lisina (pathway 00300) e treonina (pathway 00260), ausentes ou incompletas nas estirpes não produtoras. A correlação entre genoma e fenótipo é direta: estirpes com lacunas nessas vias não formam halo.

Formação de biofilme correlacionada com a redundância metabólica de poliaminas: a capacidade de formar biofilme varia amplamente (absorbância a 540nm de -0,299 a 0,761). As estirpes BR 11164^T e BR 11142^T apresentam os maiores valores, ambas com a via da espermidina completa (via 00480) e a rota dupla para putrescina (assimilação amoniacal + via peptídica). Estirpes com apenas uma rota de putrescina e espermidina incompleta (BR 11140^T, BR 11622^T, BR 15444^T) exibem formação intermediária ou ausente. A presença universal da enzima ornitina descarboxilase (EC 4.1.1.17) garante a síntese basal de putrescina, mas a produção de espermidina funciona como fator limitante para biofilme maduro.

Ausência constitutiva de ACC-deaminase como característica filogenética do gênero: nenhuma das estirpes avaliadas possuem o gene *acdS* ou homólogos funcionais, confirmando a inexistência da via de degradação do ACC (percursos do etileno). Essa ausência é consistente com o observado em *Azospirillum brasiliense* Sp245 e CBG497, com exceção de *A. lipoferum* 4B, que adquiriu o gene por transferência horizontal. Assim, o gênero *Nitrospirillum* spp. não atua na mitigação do estresse por etileno, compensando essa lacuna com mecanismos de modulação hormonal, melhoria nutricional e fixação biológica de nitrogênio.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A abordagem integrativa adotada neste capítulo, combinando genômica comparativa, mapeamento de rotas metabólicas e ensaios fenotípicos de bancada, possibilitou não apenas caracterizar o repertório funcional de *Nitrospirillum* spp., mas também reposicionar esse gênero no espectro das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).

Reposicionamento conceitual sobre auxinas microbianas: O achado mais estruturante é a independência funcional do triptofano para a produção de auxinas em *Nitrospirillum* spp. Enquanto a literatura clássica enfatiza a rota IPyA (via IpdC) como dominante em rizobactérias, os dados mostram que a amidase e a aldeído desidrogenase operam como um sistema de finalização da biossíntese auxínica.

A amidase, integrada à via endógena completa de conversão de fenilalanina em PAA, pode também, de forma oportunística, converter intermediários aromáticos exógenos, como 2-fenilacetamida e indol-3-acetamida, em PAA e AIA, respectivamente, caso estejam disponíveis no ambiente. Já a aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3) oxida indol-3-acetaldeído a AIA, sendo provável que o substrato derive majoritariamente de fontes exógenas (exsudatos vegetais) ou de vias metabólicas secundárias não canônicas. Do ponto de vista agrônomo, isso implica que a seleção de estirpes para inoculantes não deve se restringir à produção de AIA em meio suplementado com triptofano, mas também avaliar a atividade amidásica e explorar mais a fundo quanto capacidade de gerar PAA a partir de precursores endógenos.

Implicações da seletividade nutricional para fins agrônômicos: O perfil de solubilização observado, eficiente sobre $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e ZnO , inerte sobre FePO_4 e AlPO_4 , revela que o gênero não é um solubilizador generalista, mas sim especializado em fontes de nutrientes de caráter mais alcalino ou neutro. Essa seletividade apresenta consequências práticas, onde: (i) o gênero é mais adequado para solos com fertilização fosfatada solúvel ou com teores naturais de P ligado a cálcio; (ii) para solos ácidos ricos em Fe e Al (como grande parte dos solos brasileiros), a contribuição do gênero para a disponibilidade de P será limitada, exigindo manejo complementar.

Variabilidade intraespecífica exige abordagens de precisão: A ampla variação na produção de Sideróforos e na formação de biofilme demonstra que não existe um perfil funcional único para o gênero. A estirpe comercial BR 11145, embora produza compostos indólicos, não apresentou formação de biofilme nas condições testadas, além de apresentar modesta solubilização (1,80 mm) de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Para aplicações que exigem colonização

rizosférica robusta, estirpes como BR 11164^T (maior atividade de biofilme) ou a BR 11142^T (alta solubilização de P e Zn, moderado biofilme) seriam mais adequadas.

Ausência de ACC-deaminase como oportunidade para coinoculação: A confirmação da ausência constitutiva do gene *acdS* em todas as estirpes de *Nitrospirillum* spp. não representa uma deficiência, mas sim uma delimitação de nicho. Em condições de estresse que elevam a produção de etileno (seca, encharcamento, salinidade), a coinoculação com uma microrganismos portadores de ACC-deaminase pode srepresentar uma estratégia atenuadora ao estresse, enquanto a estirpe *Nitrospirillum* spp. atua na modulação hormonal e na melhoria nutricional. Nestes cenários, ensaios em casa de vegetação com estresse abióticos são necessários para validar essa sinergia.

Limitações do estudo e perspectiva futuras: Embora os ensaios *in vitro* forneçam evidências robustas da capacidade metabólica, eles não reproduzem a complexidade da rizosfera (gradientes de pH, competição microbiana, adsorção de nutrientes, exsudatos dinâmicos). Estudos futuros podem: (i) avaliar a expressão dos genes associados a amidase e aldeído desidrogenase em co-cultura com raízes de gramíneas; (ii) testar a coinoculação com estirpes produtoras de ACC-deaminase em solos com estresse abiótico; (iii) realizar experimentos em casa de vegetação e campo com fertilizantes fosfatados e zincados de diferentes solubilidades, correlacionando o desempenho agrônômico com o perfil funcional das estirpes.

Em síntese, este capítulo não apenas responde às perguntas de pesquisa propostas, mas também abre novas frentes de investigação sobre a biologia do gênero *Nitrospirillum* e seu papel na promoção do crescimento de gramíneas.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ESTIRPES DE *NITROSPIRILLUM* SPP. EM PLANTAS DE MILHO E BRAQUIÁRIA

4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ESTIRPES DE *NITROSPIRILLUM* SPP. EM PLANTAS DE MILHO E BRAQUIÁRIA

RESUMO

O presente capítulo teve como objetivo principal caracterizar a interação fisiológica de estirpes do gênero *Nitrospirillum* spp. com plantas de milho e braquiária, visando avaliar seu potencial como promotoras de crescimento vegetal. Para isso, foram conduzidos bioensaios in vitro e experimentos em casa de vegetação sob condições controladas. A abordagem experimental incluiu a avaliação da colonização radicular inicial em milho, seguida por ensaios fisiológicos detalhados com diferentes genótipos de milho e braquiária, submetidos a inoculação com dez estirpes bacterianas e a diferentes níveis de suprimento de nitrogênio. Os parâmetros analisados abrangeram características biométricas da parte aérea (altura, área foliar, número de folhas/perfilhos, biomassa fresca e seca) e do sistema radicular (comprimento, volume, área superficial, arquitetura e biomassa). Os resultados demonstraram uma clara especificidade na interação planta-estirpe. A estirpe BR 11140 destacou-se como a mais eficiente, promovendo incrementos significativos na altura (19%), área foliar (até 123% na cultivar SHS 5050) e massa seca da parte aérea (37%) das plantas de milho em relação ao controle não inoculado. A cultivar de milho SHS 5050 exibiu maior responsividade à inoculação em comparação à AG 8088 PRO2, evidenciando a influência do genótipo hospedeiro na eficiência da simbiose. Quanto ao sistema radicular, a mesma estirpe BR 11140 proporcionou o maior comprimento radicular (65,71 cm), enquanto a estirpe BR 15444 induziu um alongamento radicular significativo em outro experimento, sem, contudo, alterar a biomassa seca das raízes. Os experimentos com doses contrastantes de nitrogênio (0,6 mM e 6,0 mM) revelaram que, embora a alta disponibilidade do nutriente tenha promovido maior crescimento vegetativo, algumas estirpes mantiveram desempenho mesmo sob baixa concentração de N. Isto sugere um potencial adaptativo e uma possível contribuição para a nutrição nitrogenada da planta, seja via fixação biológica ou por outros mecanismos de promoção de crescimento. A ausência de interação significativa entre dose de N e estirpe para os parâmetros de biomassa indica uma consistência no efeito promotor das bactérias, independentemente da fertilização nitrogenada. Em conjunto, os dados fisiológicos obtidos validam e complementam as análises genômicas e bioquímicas apresentadas no Capítulo I.

Palavras-Chave: promoção de crescimento vegetal; *Nitrospirillum* spp.; especificidade planta-bactéria; fisiologia da inoculação.

ABSTRACT

The main objective of this chapter was to characterize the physiological interaction of strains of the genus *Nitrospirillum* spp. with maize and brachiaria plants, aiming to evaluate their potential as plant growth promoters. To this end, in vitro bioassays and greenhouse experiments were conducted under controlled conditions. The experimental approach included the assessment of initial root colonization in maize, followed by detailed physiological assays with different maize and brachiaria genotypes, subjected to inoculation with ten bacterial strains and different levels of nitrogen supply. The analyzed parameters encompassed biometric characteristics of the aerial part (height, leaf area, number of leaves/tillers, fresh and dry biomass) and the root system (length, volume, surface area, architecture, and biomass). The results demonstrated clear specificity in the plant-strain interaction. Strain BR 11140 stood out as the most efficient, promoting significant increases in height (19%), leaf area (up to 123% in cultivar SHS 5050), and shoot dry mass (37%) of maize plants compared to the non-inoculated control. The maize cultivar SHS 5050 exhibited greater responsiveness to inoculation compared to AG 8088 PRO2, highlighting the influence of the host genotype on the efficiency of the symbiosis. Regarding the root system, the same BR 11140 strain provided the greatest root length (65.71 cm), while strain BR 15444 induced significant root elongation in another experiment, without, however, altering root dry biomass. Experiments with contrasting nitrogen levels (0.6 mM and 6.0 mM) revealed that, although high nutrient availability promoted greater vegetative growth, some strains-maintained performance even under low N concentration. This suggests an adaptive potential and a possible contribution to plant nitrogen nutrition, whether via biological nitrogen fixation or other growth promotion mechanisms. The absence of a significant interaction between N level and strain for biomass parameters indicates consistency in the bacteria's promoting effect, regardless of nitrogen fertilization. Together, the physiological data obtained validate and complement the genomic and biochemical analyses presented in Chapter I.

Key words: plant growth promotion; *nitrospirillum* spp.; plant-bacteria specificity; inoculation physiology.

4.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos associados às raízes desempenham funções essenciais na regulação do fornecimento e na ciclagem de nutrientes (Luo *et al.*, 2024). Por essa razão, esses organismos têm sido amplamente explorados e ganhado destaque na formulação de inoculantes microbianos voltados à agricultura sustentável (García-Fraile *et al.*, 2015; Santos; Nogueira; Hungria, 2019).

O milho (*Zea mays* L.) e a braquiária (*Urochloa* sp.) se destacam entre as principais culturas de interesse econômico no Brasil, sendo amplamente utilizadas em sistemas de rotação, integração lavoura-pecuária e recuperação de pastagens degradadas (Pereira *et al.*, 2020; Pinc *et al.*, 2020).

O nitrogênio (N) é um constituinte essencial de muitas biomoléculas, sendo o nutriente requerido em maior quantidade na agricultura brasileira (Cabral *et al.*, 2016; Pinc *et al.*, 2020). De forma similar, adubações fosfatadas exercem influências sobre o desenvolvimento e a morfogênese das gramíneas forrageiras, favorecendo a renovação e senescência dos tecidos vegetais (Andrade *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2016).

De forma complementar a adubação, a utilização de bactérias diazotróficas tem se mostrado uma estratégia promissora na redução dos custos de produção, contribuindo com o rendimento das culturas e manutenção da qualidade das pastagens e otimização de absorção de nutrientes (Pinc *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2022). A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é realizada por um grupo restrito de bactérias (Santos; Nogueira; Hungria, 2019), as quais além de fornecer N₂ assimilável às plantas, promovem o crescimento vegetal através da síntese de fitormônios, controle de fitopatógenos e solubilização de nutrientes (Andrade *et al.*, 2019).

O sucesso da aplicação de inoculantes microbianos no Brasil é evidenciado pela ampla adoção de tecnologias comerciais, se consolidando como estratégia agrônômica relevante para otimizar a eficiência na utilização de nutrientes e reduzir a dependência de fertilizantes minerais. Produtos baseados na bactéria *Azospirillum brasilense*, como o Azotrop (estirpes Ab-V5 e Ab-V6), são referências na promoção do crescimento radicular e na eficiência do uso de nitrogênio em gramíneas (Fendrich; Silva; Marriel, 2025; Hungria; Nogueira, 2022; Hungria; Ribeiro; Nogueira, 2018). Paralelamente, inoculantes formulados com bactérias do gênero *Bacillus* (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119), como o produto BiomaPhos®, têm sido utilizados com o objetivo de aumentar a disponibilidade de fósforo no solo por meio da solubilização de formas pouco disponíveis, contribuindo para a nutrição e o desempenho fisiológico das plantas (Silva, Felipe Campos *et al.*, 2024). Avanços

recentes também incluem produtos multifuncionais, como o COMBio (BR 29 *Bradyrhizobium elkanii*, BR 10788 *B. subtilis* e BR 10141 *Paraburkholderia nodosa*), que combina diferentes estirpes bacterianas com mecanismos complementares de promoção de crescimento vegetal. Além da nutrição, a inovação biotecnológica avançou para a mitigação de estresses abióticos, com destaque para a tecnologia Auras (*Priestia aryabhattai*, antigo *Bacillus*), pioneira na indução de tolerância à seca, e o Hydratus (*Bacillus amyloliquefaciens*), que atua na regulação fisiológica das plantas sob déficit hídrico (Angelotti *et al.*, 2025).

Adicionalmente, inoculantes à base de *Nitrospirillum viridazoti* (antiga *N. amazonense*), como o produto Aprinza®, lançado comercialmente em 2018, representam uma tecnologia já estabelecida para fixação biológica de nitrogênio em gramíneas. Esse inoculante promove o aumento do sistema radicular e da área foliar e é o primeiro desenvolvido especificamente para a cana-de-açúcar (Bonassi *et al.*, 2024; Sica *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2025; Silva *et al.*, 2025; Zilli 2019).

Apesar desses benefícios, se observa que o uso de bactérias diazotróficas têm sido pouco utilizadas nas pastagens (Rocha *et al.*, 2022). Com base nos resultados obtidos nos ensaios apresentados no Capítulo I, que demonstraram o potencial das estirpes na síntese de metabólitos associados à promoção de crescimento, este capítulo aborda a avaliação funcional dessas estirpes em plantas.

Para isso, foram conduzidos ensaios em laboratório e em casa de vegetação, utilizando milho (*Zea mays*) e braquiária (*Brachiaria decumbens*), com o objetivo de verificar os efeitos fisiológicos e da interação individual com dez estirpes de *Nitrospirillum* spp.

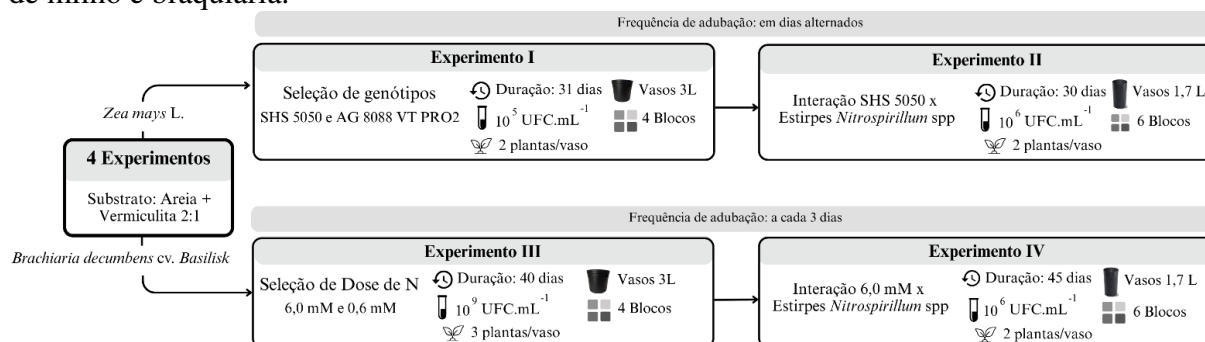
4.2 MATERIAL E METODOS

4.2.1 Visão Geral

A caracterização fisiológica das estirpes de *Nitrospirillum* spp. foi conduzida por meio de uma abordagem experimental sequencial, estruturada em duas etapas complementares. Inicialmente, foram realizados bioensaios *in vitro* para avaliar a capacidade de colonização radicular inicial das estirpes bacterianas em plântulas de milho, sob condições controladas de germinação.

Em seguida, experimentos em casa de vegetação foram conduzidos visando a avaliação dos efeitos fisiológicos da inoculação em plantas: Os Experimentos I e II foram conduzidos com a cultura do milho (*Zea mays*), enquanto os Experimentos III e IV utilizaram braquiária. (Figura 22).

Figura 3 – Esquema geral dos experimentos I a IV realizados em casa de vegetação com culturas de milho e braquiária.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.2.2 Bioensaio

O bioensaio foi conduzido para avaliar a capacidade de colonização radicular inicial das estirpes de *Nitrospirillum* spp. em plântulas de milho. O experimento seguiu o delineamento em blocos casualizados, com 12 tratamentos e 7 repetições. Dois períodos de avaliação foram estabelecidos: 6 e 10 dias após a inoculação (dai).

4.2.2.1 HISTÓRICO DA INOCULAÇÃO

Sementes da cultivar de milho SHS 5050 foram desinfestadas superficialmente (imersão em NaOCl 0,5% v/v com Tween 20 0,01% por 5 min). Para a inoculação, partiu-se de

suspensões padronizadas em $DO_{600} = 1,0$ (aproximadamente 1×10^8 UFC mL^{-1}), a partir dessas suspensões, foi preparado um inoculante de trabalho estimado na concentração-alvo de 1×10^6 UFC mL^{-1} e uma dose final de 500.000 UFC/semente. Foi aplicado um volume de 0,50 mL de inoculante por 100 g de semente. Dois controles foram utilizados: meio de cultivo estéril (C.S. INOC) e água estéril ($C.H_2O$).

4.2.2.2 COLONIZAÇÃO RADICULAR

A avaliação do método de cultivo se deu em rolos de papel Gemitest, revestida com papel filme, molhadas em dias alternados com 10 mL de água esterilizada, mantidos em câmara incubadora B.O.D à 29°C. Nos primeiros três dias as sementes permaneceram no escuro e, a partir do quarto dia, as plântulas foram submetidas ao fotoperíodo de 12 horas.

4.2.2.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RADICULARES E BIOMETRIA

Ao final de cada período experimental (6 e 10 dai) foram mensurados o comprimento da raiz principal e da parte aérea. Em seguida, as raízes foram dispostas em cubas acrílicas, onde a captura das imagens foi realizada utilizando scanner profissional Epson XL1000, equipado com unidade de transparência (TPU) e resolução ajustada pelo software de aquisição (v. 3.49).

O processamento das imagens foi efetuado via software WinRHIZO Pro™ 2016a (Regent Instruments Inc., Quebec, Canadá) para a obtenção dos parâmetros: Comprimento radicular total (cm), Área projetada (cm^2), Diâmetro radicular médio (mm), Índice de comprimento radicular por volume (RLV, cm/cm^3), Número de pontas (*Tips*), número de ramificações (*Forks*) e cruzamentos (*Crossings*). Quando necessário, as raízes foram armazenadas em álcool etílico a 50% (v/v) até a digitalização das raízes.

4.2.3 Material Biológico e Soluções Nutritivas

Sementes: Para os ensaios envolvendo a cultura do Milho foram utilizadas duas cultivares de milho híbrido: AG 8088 VT PRO 2 (ciclo precoce, da Agrocere) e SHS 5050 (ciclo superprecoce, da Santa Helena). As sementes de braquiária foram da *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, comercialmente peletizadas com revestimento à base de grafite, o que

exigiu adaptações no protocolo de inoculação, detalhadas no subtópico de Protocolos dos Inoculantes Experimentais, para favorecer a adesão bacteriana.

Substrato: Os experimentos foram conduzidos em vasos, revestidos por sacos plásticos contendo substrato de areia e vermiculita (2:1, v/v), autoclavados. A determinação do pH seguiu a metodologia padronizada pela Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solo e de Tecido Vegetal – ROLAS (SBCS/NRS, 2016), utilizando eletrodo combinado imerso em suspensão de solo em água destilada.

Para as análises, foram pesadas 10 g de substrato, transferidas para tubos tipo Falcon de 50 mL e acrescidas de 3 mL de água destilada. As amostras permaneceram sob agitação (150 rpm) por 30 min, seguidas de repouso por mais 30 min, e então procedeu-se à leitura do pH. O pH do substrato foi medido com potenciômetro Accumet Basic AB15 (sensibilidade ajustada em 98~100 %).

Soluções nutritivas: Para a adubação das plantas, foi utilizada a Solução Nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com modificações em sua concentração de nitrogênio (Dias; Reis; Santos, 2021). Foram preparadas duas Soluções: uma com alto suprimento de nitrogênio (5,0 mM NO_3^- e 1,0 mM NH_4^+) e outra com baixo suprimento nitrogênio (0,5 mM NO_3^- e 0,1 mM NH_4^+). Inicialmente, foram preparadas soluções concentradas (10x) dos macronutrientes para facilitar o manuseio, com as especificações se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição das soluções nutritivas de Hoagland e Arnon, modificadas por Dias (2021) para alto (6,0 mM) e baixo (0,6 mM) suprimento de Nitrogênio.

Composição	Alto Suprimento de N		Baixo Suprimento de N	
Macronutrientes	g/L (Solução 1x)	Contribuição de N	g/L (Solução 1x)	Contribuição de N
Mg (NO_3) ₂ .6H ₂ O	0,128	0,9984	0,0128	0,0128
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,120		0,223	
(NH ₄) ₂ .SO ₄	0,066	0,9989	0,0066	0,066
K ₂ HPO ₄	0,087		0,087	
K ₂ SO ₄	0,174		0,171	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,4723	4,000	0,0472	0,0472
CaSO ₄	-		3,1	
FeEDDHA	0,050		0,05	
Solução de micronutrientes	1 mL/L		1 mL/L	
Total de N		6,0 mM		0,6 mM

Fonte: Dias, 2021.

Em ambas as soluções, foi adicionado 1 mL de solução estoque de micronutrientes para cada litro de solução nutritiva. A solução estoque de micronutrientes foi preparada com os

seguintes compostos dissolvidos em 1 L de água deionizada: 2,86 g de H_3BO_3 ; 0,0789 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,8 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,22 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e 0,025 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

As soluções nutritivas foram aplicadas com auxílio de seringas estéreis, uma para cada tipo solução.

Protocolo dos Inoculantes Experimentais: Para todos os experimentos, as estirpes de *Nitrospirillum* spp. foram inicialmente pré-cultivadas em meio BPsc líquido (Scheidt *et al.*, 2020), sob agitação de 150 rpm a 28,7 °C por 24 horas. A densidade celular foi padronizada por meio de densidade óptica, sendo a $\text{DO}_{600}=1,0$ utilizada como referência para aproximadamente 10^8 UFC mL^{-1} , conforme calibração prévia. As contagens bacterianas foram confirmadas por plaqueamento em meio NFb sólido (Baldani *et al.*, 2014).

Para os experimentos com milho (Experimentos I e II), a inoculação foi realizada no sulco de plantio. A suspensão bacteriana foi padronizada para 10^5 UFC mL^{-1} , sendo aplicado 1 mL por semente. Dessa forma, cada vaso (com três sementes) recebeu um total de 3×10^5 UFC/mL.

Para os experimentos com braquiária (Experimentos III e IV), a inoculação foi realizada via embebição das sementes. No Experimento III, as sementes foram embebidas em suspensão bacteriana com concentração de 1×10^9 UFC mL^{-1} . No Experimento IV, a concentração da suspensão foi ajustada para a concentração-alvo de 1×10^6 UFC mL^{-1} . Em ambos os casos, as sementes foram incubadas na suspensão sob agitação leve (mesa agitadora à 1000 rpm) a 28,6 °C por 60 minutos. Após a embebição, as sementes foram drenadas com o auxílio de uma peneira metálica, em fluxo laminar. Removido o excesso de suspensão bacteriana, as sementes foram acondicionadas em placas de Petri e encaminhadas à casa de vegetação, onde foram semeadas manualmente em substrato estéril, utilizando pinças estéreis para garantir a distribuição uniforme.

Densidade de semeadura: No Experimento III foram semeadas 15 sementes por vaso, enquanto no Experimento IV a densidade foi reduzida para 5 sementes por vaso.

Posteriormente, as sementes de braquiária foram cobertas e foi aplicada uma camada de 700 g areia estéril, este foi manualmente compactado levemente, assegurando o contato entre substrato e as sementes.

4.2.4 Avaliação do Desempenho Fisiológico das Plantas de Milho

4.2.4.1 EXPERIMENTO I – SELEÇÃO DE GENÓTIPO RESPONSIVOS À INOCULAÇÃO

O Experimento I foi conduzido utilizando vasos de 3 L preenchidos com substrato composto por areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v) duplamente autoclavados. Cada estirpe de *Nitrospirillum* correspondeu a um tratamento, totalizando quatro tratamentos: I (BR 11140^T), III (BR 11145), X (BR 15444^T) e o Controle Absoluto, composto pelo meio de cultivo sem inóculo.

Os genótipos avaliados foram AG 8088 VT PRO 2 e SHS 5050, submetidos a inoculação. Cada vaso recebeu três sementes, totalizando 96 plantas; após a emergência, realizou-se o desbaste mantendo duas plantas por vaso.

Todos os tratamentos foram submetidos à aplicação de uma solução nutritiva de Hoagland de Alto suprimento de Nitrogênio (N) (6 mM, 5 mM NO₃⁻ + 1 mM NH₄⁺), conforme descrito na Tabela 5, com auxílio de seringas estéreis, garantido controle dos volumes aplicados.

O delineamento experimental adotado foi o delineamento em blocos casualizados (DBC), com quatro repetições, em esquema fatorial duplo (2 x 4), resultando em 32 unidades experimentais. O experimento foi conduzido por 31 dias.

4.2.4.2 EXPERIMENTO II – RESPONSABILIDADE DE PLANTAS MILHO INOCULADAS COM ESTIRPES DE *NITROSPIRILLUM* SPP.

O Experimento II foi conduzido utilizando a cultivar SHS 5050 em vasos de 1,7 L de capacidade preenchidos com 1,5 kg de substrato areia: vermiculita autoclavadas, objetivando avaliar a resposta da cultivar de milho à inoculação das 10 estirpes bacterianas (Tabela 3), além do controle (meio de cultivo livre de inóculo).

O delineamento adotado foi em blocos casualizados (DBC), com seis blocos, totalizando 66 unidades experimentais (11 tratamentos x 6 blocos). Cada vaso recebeu 3 sementes, distribuído com auxílio de uma pinça previamente esterilizadas. Foi realizado o desbaste após emergência, mantendo duas plantas por vaso. Todos os tratamentos foram adubados com a aplicação da solução nutritiva de alto suprimento de N, com auxílio de seringa com 15 mL de capacidade. O experimento teve duração de 40 dias.

4.2.5 Avaliação do Desempenho Fisiológicos de Plantas de Braquiária

4.2.5.1 EXPERIMENTO III – RESPOSTA DA BRAQUIÁRIA À INOCULAÇÃO SOB DOSES CONTRASTANTES DE NITROGÊNIO

O Experimento III avaliou a resposta da cultivar *Basillisk* à inoculação de três estirpes de *Nitrospirillum* (I - BR 11140^T, III - BR 11145, X - 15444^T), além do controle e à aplicação de duas doses de Nitrogênio (N), representadas pelas soluções nutritivas de Hoagland: Alto Suprimento de N e Baixo Suprimento de N (0,6 mM, 0,5 mM NO₃⁻ + 0,1 mM NH₄⁺), conforme Tabela 6. O controle, consistiu no meio de cultivo das bactérias livre de inóculo.

O delineamento experimental adotado foi o delineamento em blocos casualizados (4 estirpes × 2 doses de N), em esquema fatorial duplo (4x2) com quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste mantendo 3 plantas por vaso, garantindo uniformidade na densidade de plantas por unidade experimental.

A aplicação das soluções nutritivas foi realizada durante todo o experimento, com auxílio de seringas com 15 mL de capacidade, para homogeneidade na distribuição do nutriente. O experimento foi conduzido por 40 dias.

4.2.5.2 EXPERIMENTO IV – RESPONSABILIDADE DE PLANTAS DE BRAQUIÁRIA INOCULADAS COM ESTIRPES DE *NITROSPIRILLUM* SPP.

No Experimento IV avaliou-se a resposta da cultivar *Basillisk* à inoculação das 10 estirpes bacterianas (Tabela 3). O delineamento adotado foi em blocos casualizados (DBC), com seis blocos, totalizando 66 unidades experimentais (11 tratamentos x 6 blocos).

Cada vaso recebeu 3 sementes, distribuídas com auxílio de uma pinça previamente esterilizadas. Foi realizado o desbaste após emergência, mantendo duas plantas por vaso. Todos os tratamentos foram adubados com a aplicação da solução nutritiva de alto suprimento de N, com auxílio de seringa com 15 mL de capacidade. O experimento teve duração de 44 dias.

Ao final do experimento, o sistema radicular dos tratamentos: Controle, BR 11140, BR 11145, BR 11163 e BR 15444 foram preservados em solução de álcool 50% e analisadas com auxílio do software WinRHIZOTM para a determinação das variáveis: comprimento radicular total (cm), área projetada (cm²), índice de comprimento radicular por volume (RLV, cm/cm³) e diâmetro radicular médio (mm), número pontas, de ramificações e cruzamentos de raízes.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Bartlett). Atendidos os pressupostos, realizou-se a análise de variância (ANOVA) pelo teste F. Nos casos em que houve significância estatística ($p < 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD) ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.6 Variáveis e Análise Estatística

4.2.6.1 VARIÁVEIS BIOMÉTRICAS

Na parte aérea, avaliaram-se: altura, número de folhas (milho) ou perfilhos (braquiária), área foliar (milho, via medidor de Área foliar LI-3100C LI-COR), biomassas frescas (MFA) e seca (MSA).

No sistema radicular, avaliou-se o comprimento da maior raiz (cm) e as biomassas fresca (MFR) e seca (MSR). Para a análise de imagens no software WinRHIZO, todas as raízes dos Experimentos I e III, bem como das estirpes BR 11140, BR 11145, BR 11163, BR 15444 e do Controle do Experimento IV, foram armazenadas em solução de álcool a 50%, até o processamento das amostras.

Todo o material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada a 65°C, por 72 horas até massa constante para obtenção das biomassas secas.

4.2.6.2 AMBIENTE COMPUTACIONAL

As análises foram processadas utilizando a linguagem R (R Core Team, 2025) no ambiente de desenvolvimento RStudio (Posit Team, 2025). A manipulação de dados em todos os ensaios foi realizada via pacote *dplyr* (Wickham et al., 2023).

As representações gráficas dos *Biplots* foram customizadas utilizando a gramática de gráficos do pacote *ggplot2* (Wickham, 2009), com o auxílio do pacote *factoextra* para a projeção conjunta de indivíduos e variáveis. A organização dos painéis comparativos foi realizada via pacote *cowplot* (Wilke, 2025).

4.2.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA E MULTIVARIADA - BIOENSAIO

As análises de cada período de coleta (6 e 10 dai) foram realizadas de forma independente para cada período avaliado também no ambiente de desenvolvimento RStudio (Posit Team, 2025). Para ambos os períodos, os dados foram analisados utilizando o modelo Bloco + Tratamento. Os pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias foram verificados pelos testes de Shapiro-Wilk (função *shapiro.test*, pacote *stats*; R Core Team, 2025) e Levene (função *leveneTest*, pacote *car*; Fox et al., 2019).

Com base nessa verificação, definiu-se o procedimento para cada período: Nos períodos em que ambos os pressupostos foram atendidos (6 dias), aplicou-se a ANOVA paramétrica, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Nos períodos em que pelo menos um dos pressupostos não foi satisfeito (10 dias), optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (função `kruskal.test`, pacote *stats*), seguido do *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni (função `dunnTest`, pacote *FSA*; Ogle et al., 2025).

O delineamento experimental apresentou um número distinto de repetições entre os períodos de avaliação ($n=4$ aos 6 dias; $n=3$ aos 10 dias). Para garantir a validade das comparações estatísticas sob essa condição de desbalanceamento, as médias foram estimadas pelo Método de Mínimos Quadrados (LS-means) através do pacote *emmeans* (Lenth et al., 2025). Este procedimento permitiu o ajuste dos graus de liberdade do erro, assegurando que o erro padrão das comparações fosse recalculado com base no tamanho amostral específico de cada período.

Diante da ausência de diferenças significativas nos testes univariados e da alta variabilidade dos dados, realizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) sobre a matriz de correlação de Pearson, com padronização das variáveis (*center* = TRUE, *scale* = TRUE). Esta abordagem multivariada foi utilizada para integrar as variáveis de biomassa e arquitetura radicular fornecidas pelo WinRHIZO.

Os cálculos da PCA foram executados com a função `prcomp` (pacote *stats*), e a visualização dos resultados foi feito por meio dos pacotes *FactoMineR* (Lê; Josse; Husson, 2008) para os cálculos e *factoextra* (Kassambara; Mundt, 2016) para a extração e visualização dos resultados de dados, complementados com os pacotes *ggplot2* (Wickham, 2016) para construção personalizada dos gráficos, *ggrepel* (Slowikowski, 2025) para o posicionamento automático dos rótulos das variáveis e *patchwork* (Pedersen, 2024) para a composição dos painéis gráficos e legendas.

4.2.6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA – EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Para os experimentos I, II, III e IV, os pressupostos foram verificados pelos testes de Shapiro-Wilk (normalidade) e Bartlett (homogeneidade). Atendidos os requisitos, procedeu-se à ANOVA pelo teste F. Para os experimentos fatoriais (I e III), foram considerados os efeitos principais e a interação entre os fatores. Em todos os casos com significância ($p \leq 0,05$), as

médias foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD) a 5% de probabilidade utilizando o pacote *agricolae* (Mendiburu, 2023).

4.2.7 Análise Integrativa dos Incrementos Percentuais

Para sintetizar os efeitos das estirpes sobre as variáveis de crescimento e arquitetura radicular nos diferentes experimentos, calculou-se o incremento percentual de cada variável em relação ao respectivo controle, conforme a fórmula:

$$\text{Incremento (\%)} = \frac{\text{Valor médio do tratamento} - \text{Valor médio do Controle}}{\text{Valor médio do Controle}} \times 100$$

Os valores médios utilizados foram médias aritméticas obtidas nas análises estatística. Os incrementos foram expressos em porcentagem, possibilitando a comparação, em uma escala comum, a magnitude relativa dos efeitos das diferentes estirpes sobre as variáveis de parte aérea e arquitetura radicular, independentemente das unidades.

Considerando a heterogeneidade entre os experimentos, incluindo variações no número de estirpes avaliadas, nas culturas utilizadas e nas variáveis mensuradas, os dados foram organizados em uma base unificada e posteriormente estruturados em formato longo (*long format*), permitindo a integração das informações em uma única matriz analítica. Valores ausentes (NA), decorrentes da ausência de determinadas variáveis em alguns experimentos, foram removidos das análises, sem imputação, a fim de evitar a introdução de vieses.

4.2.7.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS INCREMENTOS E COMPARAÇÃO ENTRE CULTURAS

Os cálculos e a construção de todos os gráficos foram realizados no ambiente RStudio (Posit Team, 2025). O gerenciamento, a limpeza e a transformação dos dados foram realizadas com os pacotes *tidyverse* (Wickham et al., 2019), *dplyr* (Wickham et al., 2023) e *tidyr* (Wickham et al., 2025). A visualização dos dados foi feita com o pacote *ggplot2* (Wickham, 2016) para a construção de gráficos de barras, e o pacote *patchwork* (Pedersen, 2025) foi utilizado para combinar os gráficos em painéis únicos.

4.2.7.2 ANÁLISE MULTIVARIADA

Para a análise multivariada, aplicou-se a técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) separadamente para cada cultura (milho e braquiária) e para cada análise, foi utilizada uma matriz contendo os incrementos percentuais médios por estirpe, considerando apenas as

variáveis presentes em todas as estirpes dentro de cada cultura. Variáveis com valores ausentes foram previamente removidas.

Os dados foram centralizados e padronizados (média = 0; desvio padrão = 1) antes da análise, a fim de garantir que todas as variáveis contribuíssem de forma equivalente para a construção dos componentes principais.

As análises foram conduzidas com o pacote *FactoMineR* (Lê et al., 2008), enquanto a extração e visualização dos resultados foram realizadas com o pacote *factoextra* (Kassambara & Mundt, 2020). A interpretação dos resultados baseou-se na variância explicada pelos componentes principais, nas contribuições das variáveis (*loadings*) para a formação dos eixos e na qualidade de representação das estirpes (*cos2*).

4.2.7.3 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS

Embora a utilização de incrementos percentuais possibilite a integração de variáveis com diferentes unidades, reconhece-se que os atributos morfofisiológicos avaliados possuem pesos biológicos distintos, o que deve ser considerado na interpretação dos resultados. No entanto, a abordagem adotada, baseada em normalização percentual e análise multivariada, minimiza tais efeitos e permite a identificação de padrões robustos de resposta.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análises do Bioensaio

A avaliação da dinâmica de desenvolvimento radicular revelou que o crescimento inicial das plântulas de milho inoculadas com estirpes de *Nitrospirillum* spp. foi conduzido em dois tempos de avaliação (6 e 10 dias).

Para a primeira coleta (6 dias), a verificação dos pressupostos de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene), permitiu a aplicação da ANOVA. Para o período de 10 dias, observou-se um desvio da normalidade dos resíduos, o que levou à adoção do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para todas as variáveis, complementado pelo post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni.

A análise da variância não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para os parâmetros avaliados aos 6 dias (Tabela 6). Neste estágio inicial, o sistema radicular das plântulas apresentou-se uniforme, sugerindo que o crescimento inicial foi sustentado majoritariamente pelas reservas endógenas das sementes, com influência limitada da atividade bacteriana no rizoplaneo.

Tabela 6 – Atributos morfofisiológicos e arquitetura radicular de plântulas de milho (SHS 5050) inoculadas com estirpes de *Nitrospirillum* spp. aos 6 e 10 dias após a inoculação.

Tempo de avaliação	Tratamento	CRP (cm)	PA (cm)	PSR (g)	CRT (cm)	Área proj. (cm²)	Diâm. (mm)	Pontas	Ramific.	Cruz.	RLV (cm / cm³)
								Unidade			
6 dias	C H2O	18,92	4,74	0,03	99,90	8,11	0,25	163,61	175,31	11,30	204,03
	BR11140 ^T	20,94	6,68	0,04	118,04	9,88	0,28	221,87	193,44	10,46	181,61
	BR11142 ^T	21,49	6,01	0,05	120,72	9,69	0,26	188,08	241,92	19,97	193,80
	BR11145 ^T	18,85	6,43	0,03	88,73	8,01	0,43	177,23	148,86	7,18	159,14
	BR11163 ^T	16,37	4,80	0,03	86,32	7,56	0,25	154,10	158,93	8,59	155,38
	BR11164 ^T	17,60	5,86	0,04	97,62	8,57	0,45	194,14	144,92	6,72	160,45
	BR11622 ^T	16,62	4,77	0,03	98,66	8,42	0,43	172,34	185,13	9,36	166,38
	BR11752 ^T	21,35	6,14	0,04	116,40	10,17	0,37	221,66	221,40	12,31	161,61
	BR11828 ^T	18,78	5,72	0,03	96,99	8,40	0,37	184,27	174,71	9,76	165,82
	BR11865 ^T	20,51	7,12	0,04	100,24	8,88	0,38	182,56	193,53	10,24	161,46
	BR15444 ^T	19,62	6,47	0,04	97,44	8,85	0,46	160,46	177,51	8,14	146,09
<i>p</i> -valor	19,62	0,32	0,33	0,96	0,98	0,60	0,99	0,90	0,34	0,18	
10 dias	C H2O	21,36	9,44	0,03	111,05	10,54	0,22	281,23	379,69	23,57	189,36
	BR11140 ^T	24,64	12,75	0,04	137,54	10,49	0,21	325,47	324,70	14,97	213,74
	BR11142 ^T	24,04	12,80	0,04	172,00	12,03	0,22	424,89	438,05	23,96	257,95
	BR11145 ^T	23,18	9,83	0,03	121,69	10,07	0,24	242,28	233,13	9,93	186,76
	BR11163 ^T	23,47	10,66	0,03	165,36	13,01	0,22	402,34	429,76	20,60	206,02
	BR11164 ^T	26,57	12,37	0,03	160,01	11,87	0,23	427,67	377,58	21,50	230,01
	BR11622 ^T	20,80	6,47	0,02	114,96	8,94	0,43	240,01	251,07	14,05	192,05
	BR11752 ^T	25,85	8,81	0,02	162,16	11,59	0,21	338,75	374,41	26,50	245,21
	BR11828 ^T	27,65	12,52	0,03	162,39	12,65	0,26	385,68	382,66	16,31	208,50
	BR11865 ^T	23,81	7,18	0,02	126,27	9,63	0,25	300,51	285,04	14,91	218,17
	BR15444 ^T	22,05	9,84	0,03	119,94	9,18	0,21	285,33	248,93	12,13	206,73
<i>p</i> -valor	0,50	0,22	0,62	0,62	0,77	0,95	0,53	0,32	0,39	0,25	

Comprimento da raiz principal (CRP), Comprimento da Parte Aérea (PA), Peso Seco Radicular (PSR), CRT (Comprimento Radicular Total), Área Proj. (Área projetada), Diâm. (Diâmetro Médio das raízes), Pontas (Número de extremidades radiculares); Ramific. (Número de bifurcações); Cruz. (Número de cruzamentos radiculares) e RLV (índice de comprimento radicular por volume). Os dados representam as médias aritméticas de 4 repetições (6 dias) e 3 repetições (10 dias). *p*-valor: Probabilidade pelo teste F de Kruskal-Wallis, seguido do *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni quando necessário. Valores de *p* > 0,05 indicam ausência de diferença estatística significativa.

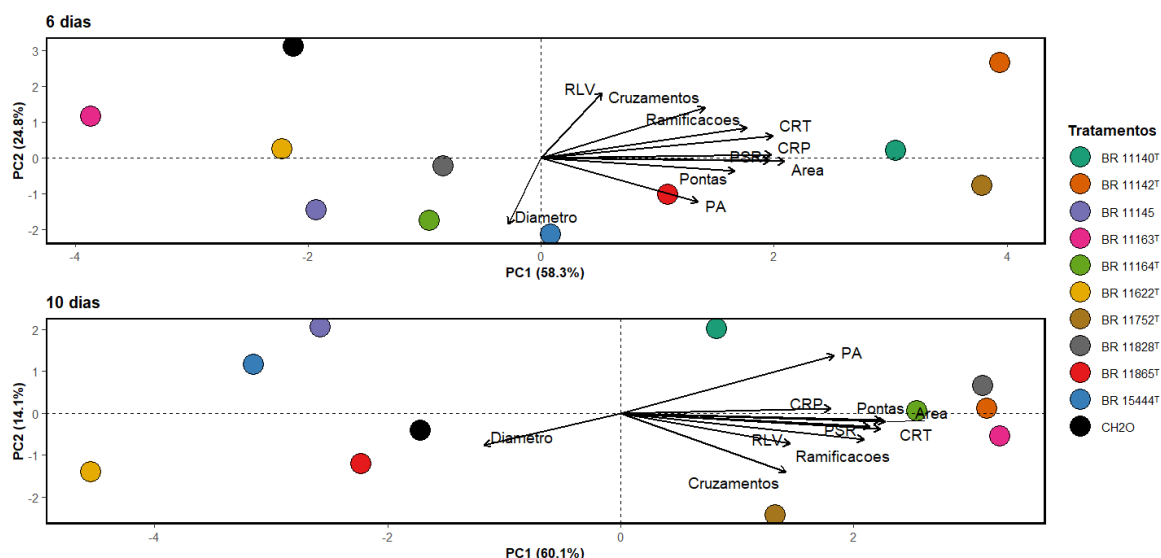
Embora os testes univariados não tenham detectado diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das variáveis avaliadas ($p > 0,05$ em todos os casos), observou-se, descritivamente, que alguns tratamentos apresentaram médias numericamente superiores para determinados parâmetros, além disso todos os tratamentos apresentaram aumento médio nos parâmetros de crescimento, refletindo o desenvolvimento natural das plântulas. Aos 10 dias, as estirpes BR 11142^T, BR 11163^T e BR 11828^T exibiram os maiores ganhos numéricos para comprimento radicular total (CRT), com incrementos variando de 46% a 55%. Para área projetada da raiz, BR 11163^T (+23,4%) e BR 11828^T (+20,0%) se destacaram. No comprimento da parte aérea (PA), BR 11142^T (+35,6%) e BR 11140^T (+35,1%) obtiveram os maiores ganhos. BR 11142^T também apresentou incremento expressivo no índice de comprimento radicular por volume (+36,2%), enquanto BR 11140^T destacou-se no peso seco radicular (+46,1%).

Diante da complexidade dos atributos de arquitetura radicular e da ausência de significância nos testes univariados, realizou-se uma análise de componentes principais (PCA) como ferramenta exploratória para visualizar correlações entre tratamentos e variáveis.

4.3.1.1 ALTERAÇÕES NA ARQUITETURA E ESTRATÉGIA DE EXPLORAÇÃO

Para explorar padrões multivariados e visualizar o relacionamento entre tratamentos e variáveis, a análise de componentes principais (PCA) foi realizada sobre as médias ajustadas das 10 variáveis, com padronização (escala unitária). Os dois primeiros componentes principais explicaram, 83,1% (dias) e 74,3% (10 dias) da variância total (Figura 23). A projeção dos tratamentos no *biplot* revelou um gradiente contínuo ao longo do primeiro componente (PC1), interpretado como um eixo de vigor radicular e aéreo (positivamente correlacionado com comprimento radicular total – CRT, área projetada, peso seco radicular – PSR e ramificações).

Figura 23 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos atributos de morfologia radicular de plântulas de milho (SHS 5050) inoculadas com *Nitrospirillum* spp. aos 6 e 10 dias após a inoculação. Setas (vetores) indicam as variáveis medidas pelo WinRHIZO: CRP (Comprimento da Raiz Principal), PA (Comprimento da Parte Aérea), PFA (Peso Fresco da Parte Aérea), PSA (Peso Seco da Parte Aérea), PFR (Peso Fresco Radicular), PSR (Peso Seco Radicular), CRT (Comprimento Radicular Total), RLV (índice de comprimento por volume), Area (Área projetada), Diâmetro (Diâmetro médio), Pontas, Ramificações e Cruzamentos. Os pontos representam as estirpes e controles.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Padrões aos 6 dias: os vetores de RLV, Cruzamentos e Ramificações apontaram predominantemente para o quadrante superior direito (PC2 positivo, PC1 positivo). O tratamento BR 11142^T posicionou-se alinhado com esses vetores (PC1 e PC2 elevados), indicando associação com raízes finas, ramificadas e de alto vigor. BR 11140^T e BR 11752^T, embora também com alto vigor (PC1 positivo), apresentaram PC2 próximo de zero ou negativo, sugerindo menor ênfase no índice de comprimento radicular por volume (RLV) e maior tendência a raízes mais grossas ou maior parte aérea.

Por outro lado, BR 11163^T e o controle, apesar de apresentarem PC2 positivo (alta RLV), localizaram-se no quadrante superior esquerdo (PC1 negativo), ou seja, opostos aos vetores de vigor. Sugerindo que o RLV ocorreu em plantas de baixo desenvolvimento geral, possivelmente associado a estratégia de exploração sob condições limitantes.

Aos 10 dias: O gradiente de vigor (PC1) se manteve, com os tratamentos de maior vigor para as estirpes BR 11140^T, BR 11142^T, BR 11163^T, BR 11164^T, BR 11752^T e BR 11828^T. Alinhadas ao vetor de comprimento da parte aérea (PA), a BR 11140^T (PC2 = 2,01) e BR 11828^T (PC2 = 0,65) destacaram-se com maiores índices, indicando maior alocação de recursos para ganhos de biomassa. As BR 11145^T e 15444^T, apesar de baixo vigor (PC1 negativo),

manifestaram PC2 positivo (2,05 e 1,16, respectivamente), sugerindo que ainda que houvesse pouco recurso para o desenvolvimento radicular, esses tratamentos possibilitaram alocar biomassa a parte aérea.

Os tratamentos controle (CH_2O), BR 11622^T e BR 11865^T posicionaram-se no quadrante inferior esquerdo (PC1 e PC2 negativos), associados ao vetor diâmetro que teve seu efeito mais evidente em BR 11622^T (diâmetro médio 0,43 mm), enquanto o controle (0,22 mm).

4.3.1.2 RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE INDÓIS E FENÓTIPO RADICULAR

Ao confrontar esses achados com o potencial de síntese de compostos indólicos *in vitro* (Capítulo I), observa-se que a estirpe BR 11140^T, embora tenha apresentado as maiores concentrações de indóis ($8,72 \mu\text{g mL}^{-1}$), esse potencial não traduziu em ganhos numéricos superiores de biomassa radicular. No entanto, a estirpe obteve os maiores incrementos relativos em comprimento de parte aérea (PA = +35,08%) e em peso seco radicular (PSR = +46,14%), seguida pelo desempenho da BR 11142^T (PA = +35,64; PSR = +34,08%).

Este comportamento está de acordo com a literatura, que descreve a resposta vegetal às auxinas como uma curva em forma de “U” invertido, na qual concentrações ótimas estimulam o alongamento radicular, mas concentrações mais elevadas tornam-se inibitórias (Li, Su *et al.*, 2023; Singh; Kanwar; Pandey, 2023). A estirpe BR 11145 apresentou produção de indóis de $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, porém seus incrementos relativos foram baixos ou negativos na maioria das variáveis: PA (+4,16%), PSR (+0,88%), CRT (+9,58%) e área projetada (-4,49%).

Por outro lado, as estirpes BR 11163^T (indol $8,57 \mu\text{g mL}^{-1}$) e BR 11142^T (indol $4,77 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram os maiores incrementos numéricos de CRT (48,9% e 54,9%, respectivamente). Estudos com PGPR produtores de AIA indicam que níveis moderados de auxina, quando fornecidos de forma gradual e localizada pela microbiota na rizosfera, são suficientes para estimular o crescimento radicular sem atingir limiares inibitórios. Isso reforça que o sucesso da interação reside na sincronia fisiológica e na concentração efetiva percebida pela planta, e não apenas no potencial bruto de síntese medido em condições laboratoriais (Arora *et al.*, 2024; Rehan *et al.*, 2023).

Além disso, a estirpe BR 11622^T (indol $5,07 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou baixo vigor (CRT +3,5%) e o maior diâmetro radicular (0,43 mm), sugerindo que, nesse caso, a produção de indóis pode não ter sido o fator determinante para a morfologia observada.

4.3.2 Análises do Experimento I – Seleção de Genótipos Responsivos a Inoculação

4.3.2.1 DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA

As análises de variância não revelaram interação significativa entre os fatores Cultivar e Inoculação ($p > 0,05$) para nenhuma das variáveis biométricas, indicando que não houve uma melhor combinação cultivar e estirpe. No entanto, houveram diferenças entre as cultivares para as variáveis altura, área foliar e biomassa total, com a cultivar SHS 5050 apresentando valores superiores a AG PRO2 8088. O fator cultivar isolado foi significativo para altura, área foliar e biomassa, enquanto o fator Inoculação influenciou a altura, número de folhas, diâmetro e massa seca (Tabela 7).

Tabela 7 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para as variáveis biométricas de duas cultivares de milho inoculadas com diferentes estirpes de *Nitrospirillum* spp.

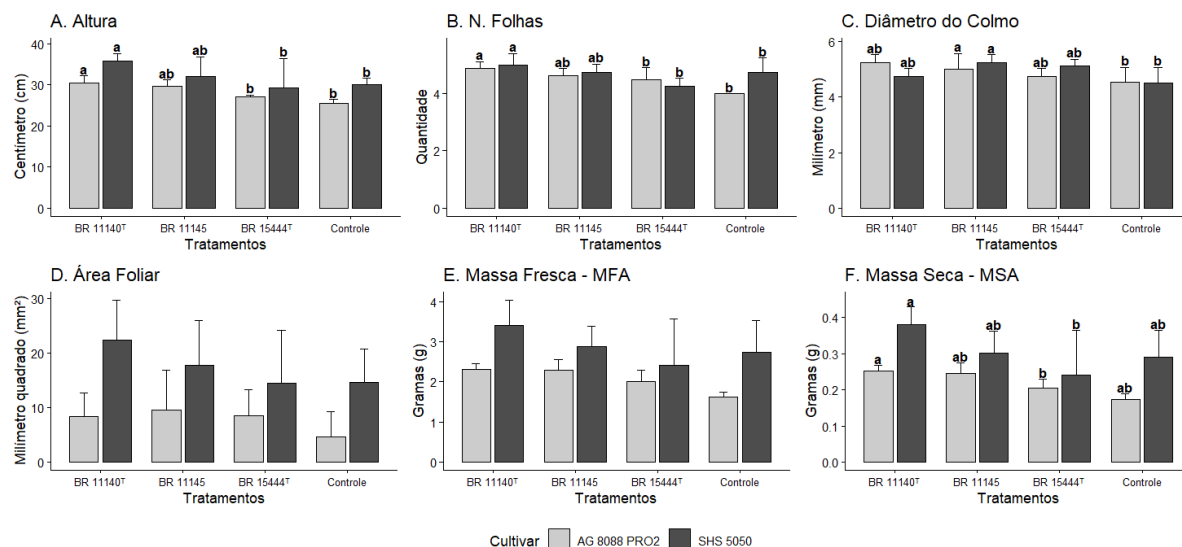
Fonte de Variação	GL	Altura	N. folhas	Diâmetro	Área Foliar	MFA	MSA
Bloco	3	0,6930 ns	0,7247 ns	0,3217 ns	0,2089 ns	0,8676 ns	0,9192 ns
Cultivar (C)	1	0,0083 **	0,1369 ns	0,8801 ns	0,0005 ***	0,0015 **	0,0012 **
Inoculação (I)	3	0,0179 *	0,0086 **	0,0378 *	0,3476 ns	0,1169 ns	0,0291 *
Interação C x I	3	0,7362 ns	0,0577 ns	0,1710 ns	0,6504 ns	0,5646 ns	0,4122 ns
CV (%)	-	11,51	7,46	8,28	51,99	25,32	24,47

Unidades: Altura (cm); N. folhas (unidade); Diâmetro do colmo (mm); Área Foliar (mm²); MFA: Massa Fresca Aérea (g); MSA: Massa Seca Aérea (g). ns: não significativo; *, **, ***: significativo a 5%, 1% e 0,1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. Os valores numéricos referem-se ao p-valor da análise de variância.

A inoculação promoveu incrementos significativos no desenvolvimento inicial, com destaque para a estirpe BR 11140^T, que superou o controle e a estirpe BR 15444^T em altura e número de folhas (Figura 24A e 24B), indicando uma aceleração no ritmo fenológico da cultura. E relação ao acúmulo de biomassa seca da parte aérea (MAS), nenhuma estirpe diferiu estatisticamente do controle: a BR 11140^T foi superior à BR 15444^T, enquanto a estirpe BR 11145 e BR 15444^T foram equivalentes ao controle (Figura 24F). A estirpe BR 11145 destacou-se no incremento do diâmetro do colmo em relação ao controle (Figura 24C) e não se diferenciou dos demais tratamentos nas variáveis altura, número de folhas e biomassa seca de parte aérea (Figuras 24A, 24B e 24F).

Variáveis como área foliar e massa fresca, embora com tendências numéricas positivas, não apresentaram diferenças estatísticas pelo teste F.

Figura 24 – Variáveis biométricas das duas cultivares de milho AG 8088 Pro2 e SHS 5050 inoculadas com estirpes de *Nitrospirillum* spp. Barras representam médias de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais sobre as barras de tratamentos dentro de cada variável não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



4.3.2.2. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RADICULAR

Assim como na parte aérea, não houve interação significativa entre os fatores Cultivar e Inoculação para os parâmetros radiculares (Tabela 8). O efeito principal de cultivar demonstrou que a AG 8088 PRO2 possui uma característica intrínseca de maior exploração vertical, com comprimento radicular superior à SHS 5050 (Figura 25A).

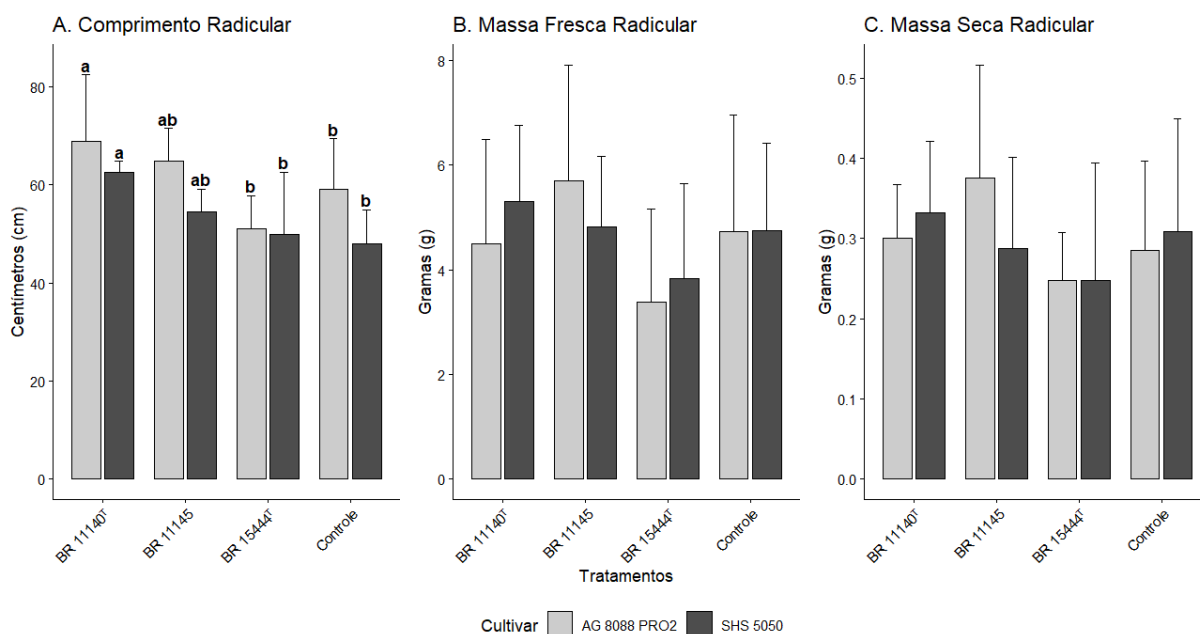
Tabela 8 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para as variáveis radiculares de duas cultivares de milho inoculadas com diferentes estirpes de *Nitrospirillum* spp.

Fonte de Variação	GL	Comprimento	MFR	MSR
Bloco	3	0,0428 *	0,1175 ns	0,0617 ns
Cultivar (C)	1	0,0158 *	0,8702 ns	0,8272 ns
Inoculação (I)	3	0,0041 **	0,2714 ns	0,4037 ns
Interação C x I	3	0,5617 ns	0,7861 ns	0,6382 ns
CV (%)	-	13,62	37,09	34,29

Legenda: ns (não significativo); *, ** (significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F). Os valores numéricos na tabela referem-se ao p -valor.

Quanto à inoculação, a estirpe BR 11140^T proporcionou o maior comprimento radicular médio, sendo estatisticamente superior aos tratamentos BR 15444^T e Controle (Grupo b), mas não diferindo da estirpe BR 11145 (grupo ab). Para as variáveis de massa fresca (MFR) e seca (MSR), não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 25B, C).

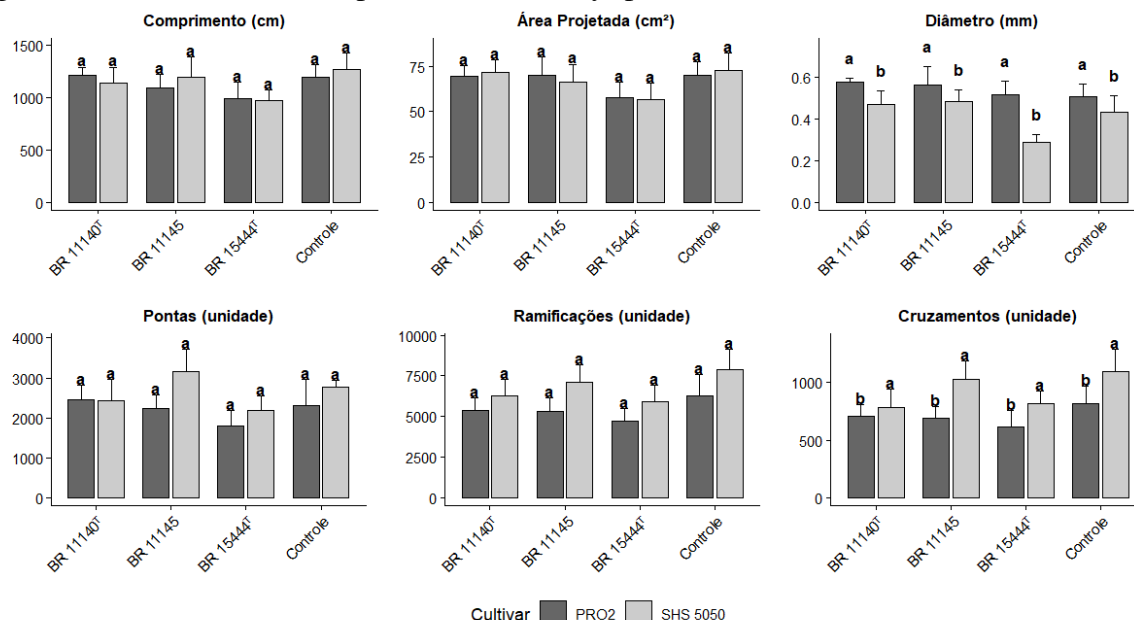
Figura 25 – Parâmetros do sistema radicular de duas cultivares de milho submetidas à inoculação com *Nitrospirillum* spp. As barras representam as médias de quatro repetições. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os parâmetros de arquitetura radicular obtidos por análise de imagem (WinRHIZO) corroboraram com os achados de métricas manuais. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação para nenhuma das variáveis avaliadas. O fator cultivar influenciou o diâmetro médio das raízes ($p = 0,011$) e o número de cruzamentos ($p = 0,035$). A cultivar AG PRO2 8088 apresentou raízes mais grossas (0,54 mm) que a SHS 5050 (0,42 mm), enquanto a SHS 5050 exibiu maior número de cruzamentos (929 vs 705) (Figura 26).

Figura 26 – Parâmetros de arquitetura radicular (WinRHIZO) de duas cultivares de milho inoculadas com estirpes de *Nitrospirillum* spp. As barras representam as médias de quatro repetições ($\pm$ erro padrão da média). Letras distintas sobre as barras indicam diferenças significativas entre cultivares pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A síntese dos resultados integrados dos parâmetros aéreos e radiculares indicam que a inoculação com as estirpes de *Nitrospirillum* spp. não promoveu efeitos estatisticamente significativos sob o crescimento e a morfologia das cultivares de milho dentro das condições testadas. Apesar disso, observaram-se tendências numéricas para as estirpes de *N. viridazoti* (BR 11140^T e BR 11145) para variáveis como: altura, número de folhas, comprimento radicular e diâmetro do colmo.

Por outro lado, diferenças estatísticas foram identificadas entre as duas cultivares em diferentes parâmetros (tabela 9). Embora a cultivar AG PRO2 8088 tenha manifestado maior comprimento radicular e diâmetro radicular. Assim, o genótipo SHS 5050 foi selecionado para as etapas subsequentes por apresentar maior vigor da parte aérea (altura, área foliar, massa fresca e seca) e arquitetura radicular mais complexa representando o genótipo com maior potencial de acúmulo de biomassa e responsividade sob as condições testadas.

Tabela 9 – Parâmetros morfofisiológicos e de arquitetura radicular entre cultivares de milho híbrido inoculadas com *Nitrospirillum* spp.

Parâmetro	Cultivar		Teste F - ANOVA
	AG PRO2 8080	SHS 5050	
Vigor aéreo			
Altura (cm)	28,14	31,69	0,0083**
Área foliar (cm ²)	4,50	4,69	0,1369 ns
Massa fresca (g)	4,88	4,91	0,8801 ns
Massa seca (g)	7,79	17,36	0,0005 ***
Número de folhas (unidade)	2,05	2,85	0,0015 **
Diâmetro colmo (mm)	0,22	0,30	0,0012 **
Sistema radicular			
Comprimento radicular	60,97	53,72	0,0158 *
Massa fresca (g)	4,58	4,68	0,8702 ns
Massa seca (g)	0,30	0,29	0,8272 ns
Arquitetura radicular			
Comprimento	1119,47	1142,07	0,8214 ns
Área projetada (cm ²)	66,910	66,84	0,9906 ns
Diâmetro (mm)	0,540	0,417	0,0114*
Pontas (unidade)	2201,60	2633,00	0,1840 ns
Ramificações (unidade)	5435,80	6787,10	0,0712 ns
Cruzamentos (unidade)	704,80	929,30	0,0349 *

Os valores apresentados representam as médias de quatro repetições. O *p*-valor refere-se ao teste F da ANOVA para o efeito de cultivar. A significância estatística é indicada por: ns = não significativo ($p \geq 0,05$); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.3.3 Análises do Experimento II - Responsividade de plantas Milho Inoculadas com Estirpes de *Nitrospirillum* spp

4.3.3.1 DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E BIOMASSA AÉREA

As análises de variância não revelaram efeito significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) da inoculação bacteriana sobre os parâmetros de biomassa (MFA e MSA) e área foliar, assim como para as variáveis monitoradas semanalmente, que mantiveram crescimento uniforme entre os tratamentos (Tabela 10). A ausência de significância estatística, especialmente para as variáveis de biomassa da parte aérea, sugere que a interação planta-microrganismo, neste estágio, é regulada por um refinado sistema de sinalização química e dependência de dose (Bashan; de-Bashan, 2010; Pankievicz *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023).

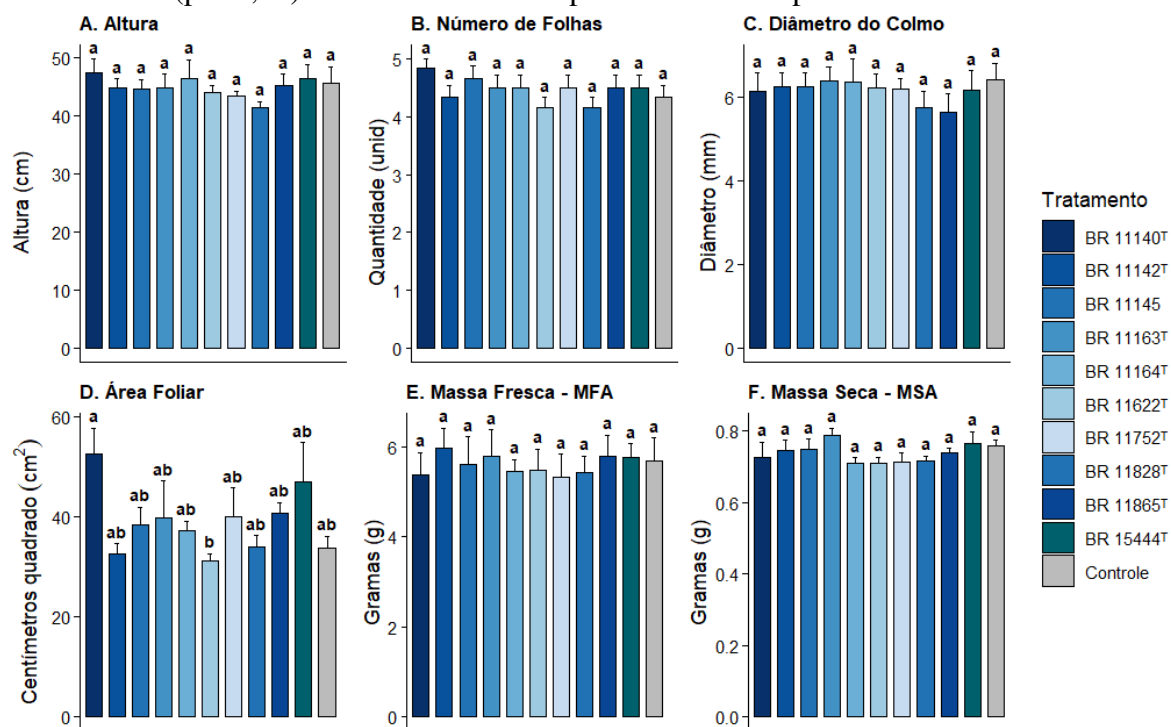
Tabela 10 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para parâmetros de biomassa e biométricos de plantas de milho (cv. SHS 5050) sob inoculação com *Nitrospirillum* spp.

Fonte de Variação	GL	QM (AF)	QM (MFA)	QM (MAS)	QM (AP)	QM (DC)	QM (NF)
Blocos	5	303,10 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,0059 ^{ns}	25,48 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,22 ^{ns}
Tratamentos	10	280,10 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,0041 ^{ns}	18,52 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,30 ^{ns}
Resíduo	50	253,9	0,47	0,0093	25,51	0,94	0,24
Média Geral	-	39,21	5,64	0,74	44,81	6,16	4,45
CV (%)	-	40,64	12,19	13,02	11,26	15,75	11,05

QM: Quadrado médio; AF: Área Foliar (cm²); MFA: Massa Fresca Aérea (g); MSA: Massa Seca Aérea (g); AP: Altura de Planta (cm); DC: Diâmetro do Colmo (mm); NF: Número de Folhas (unid.). *ns*: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$).

Apesar da ausência de significância estatística, observaram-se tendências de superioridade para a estirpe BR 11163 em biomassa seca e para a BR 11140 em área foliar (Figura 27). O incremento na expansão foliar pela BR 11140 corrobora os dados de quantificação hormonal do Capítulo I, onde a estirpe destacou-se como alta produtora de compostos indólicos favorecendo a acidificação da parede celular e a expansão do limbo foliar. Por outro lado, a constância no número de folhas sugere que a inoculação modula a expansão celular dos tecidos existentes em detrimento da antecipação de estádios fenológicos.

Figura 27 – Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa da parte aérea de milho submetido a inoculação com diferentes estirpes de *Nitrospirillum* spp. (A) Altura; (B) Número de Folhas; (C) Diâmetro do colmo; (D) Área Foliar; (E) Massa Fresca da parte aérea (MFA) e (F) Massa Seca da parte aérea (MSA). As médias foram obtidas na última coleta (Semana 4). Colunas seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3.3.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RADICULAR

Diferente do comportamento observado na parte aérea, o sistema radicular foi significativamente responsivo à inoculação (Tabela 11). O comprimento radicular apresentou resposta estatística significativa ($p < 0,01$), evidenciando que, nas condições testadas, o principal sítio de ação mediado pelas estirpes, neste estágio fenológico, se concentra a extensão radicular em resposta à presença de *Nitrospirillum* spp.

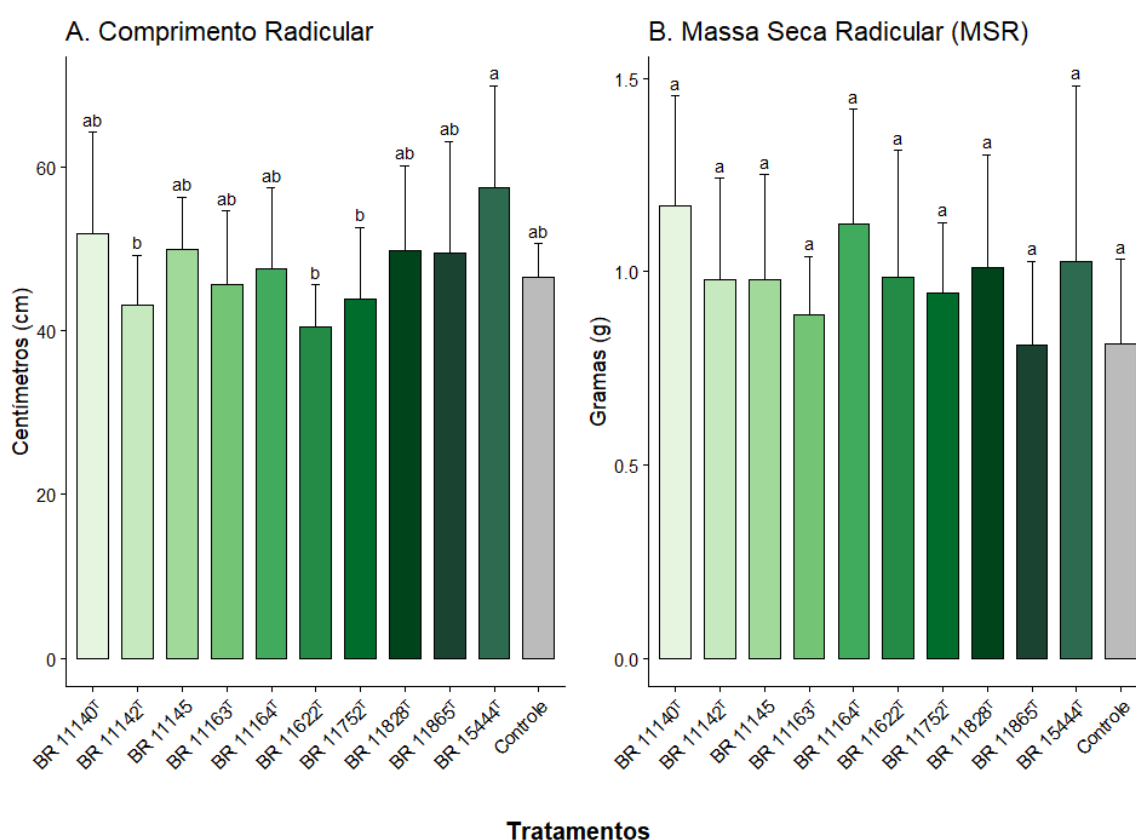
Tabela 11 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para Comprimento radicular (CR) e Massa seca radicular (MSR) de milho sob inoculação com *Nitrospirillum* spp.

Fonte de Variação	GL	QM (CR)	QM (MSR)
Blocos	5	144,26 ^{ns}	0,12 ^{ns}
Tratamentos	10	257,18**	0,14 ^{ns}
Resíduo	114	86,36	0,08
Média Geral	-	47,78	0,98
CV (%)	-	19,44	28,42

** : significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); ns: não significativo. QM: Quadrado Médio. GL: Graus de Liberdade.

A estirpe BR 15444 promoveu o maior crescimento radicular linear (57,41 cm), superando estatisticamente as estirpes BR 11752, BR 11142 e BR 11622 (Figura 28A), embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento controle (H₂O) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 28 – Comprimento radicular (A) e massa seca radicular (B) de plantas de milho em resposta à inoculação com diferentes estirpes de *Nitrospirillum* spp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Em síntese, no Experimento II os resultados demonstram que a inoculação com estirpes selecionadas de *Nitrospirillum* spp. promove benefícios à cultura do milho. Enquanto as estirpes BR 11140 e BR 15444 mostraram tendências positivas na expansão da área foliar e biomassa da parte aérea, a estirpe BR 15444 apresentou comprimento radicular maior, apesar de não diferir do controle. Esses resultados sugerem que o benefício da inoculação, neste estágio, está voltado ao suporte estrutural e à capacidade de absorção hídrica e mineral da cultivar SHS 5050.

4.3.4 Análises do Experimento III – Resposta da Braquiária à Inoculação sob doses contrastantes de Nitrogênio

4.3.4.1 DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA

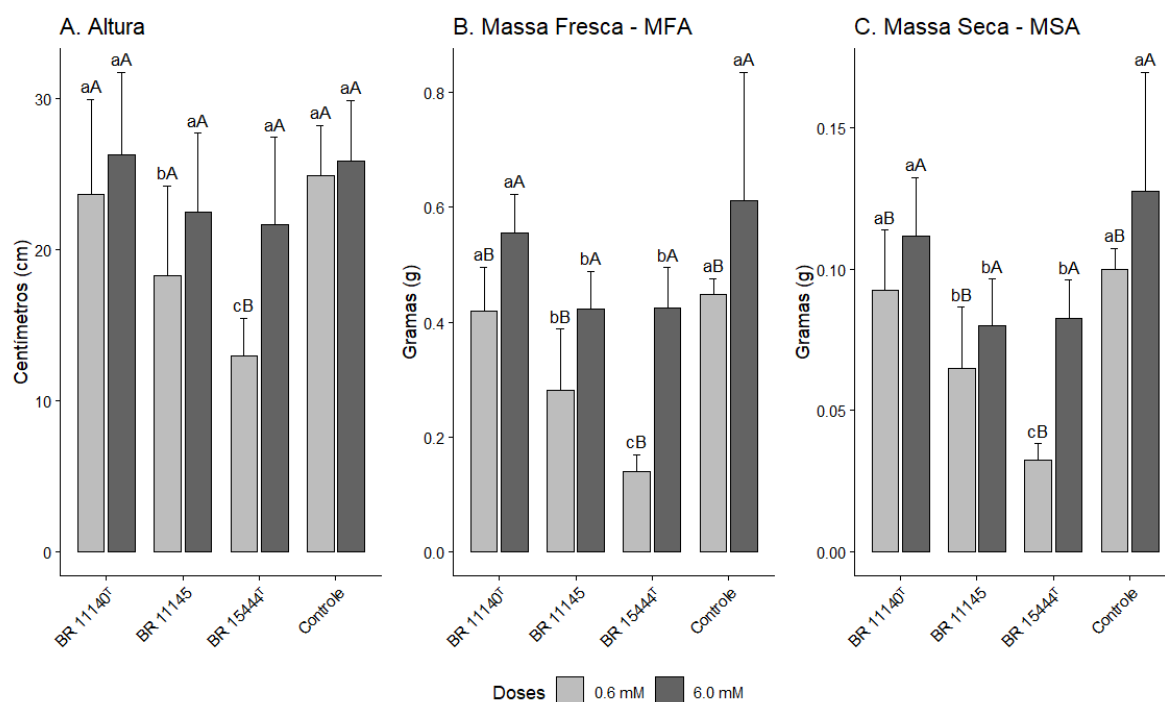
A análise de variância indicou interação significativa entre os fatores dose e tratamento ($p < 0,05$) para as variáveis altura e acúmulo de biomassa seca (Tabela 12). Sob estresse nitrogenado (0,6 mM), as estirpes demonstraram comportamentos distintos: enquanto a BR 11140 manteve o crescimento similar ao controle, a BR 15444 apresentou efeito antagônico, reduzindo significativamente a massa seca da parte aérea (Figura 29C). Esse comportamento pode estar associado à elevada concentração do inóculo utilizada (10^9 UFC mL⁻¹). Concentrações bacterianas excessivas no rizoplane podem intensificar respostas de defesa e alterar o balanço hormonal, o que, sob baixa disponibilidade de nitrogênio, pode resultar em inibição do crescimento em vez de promoção (Zhang et al., 2024; Etesami, 2025). Por outro lado, na dose de 6,0 mM, o suprimento mineral de N equalizou o crescimento das plantas, mascarando os efeitos da inoculação.

Tabela 12 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para componentes da parte aérea de plantas de Braquiária inoculadas com diferentes estirpes bacterianas sob duas doses de nitrogênio.

Fonte de Variação	GL	Altura	MFA	MSA
Blocos	3,00	78,37*	0,0579***	0,0026***
Dose de N (D)	1,00	405,78***	0,7830***	0,0187***
Tratamentos (T)	3,00	360,99***	0,3207***	0,0162***
Interação D x T	3,00	66,32*	0,0292*	0,0015*
Resíduo	85,000	22,960	0,009	0,000
CV (%)	-	21,760	22,410	22,670

GL: Graus de Liberdade; MFA: Massa Fresca Aérea; MSA: Massa Seca Aérea. ns: não significativo; *, **, ***: significativo a 5%, 1% e 0,1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. Os valores no corpo da tabela referem-se aos Quadrados Médios (QM).

Figura 29 – Crescimento e acúmulo de biomassa em *B. decumbens* submetida a diferentes inoculações bacterianas e níveis de nitrogênio (0,6 mM e 6,0 mM), com 41 dias de condução. (A) Altura de plantas; (B) Massa fresca da parte aérea; (C) Massa seca da parte aérea. Médias seguidas por letras minúsculas comparam os tratamentos (estirpes) dentro de cada dose de N. Letras maiúsculas comparam as doses de N dentro de cada tratamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais indicam o desvio padrão da média.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3.4.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RADICULAR

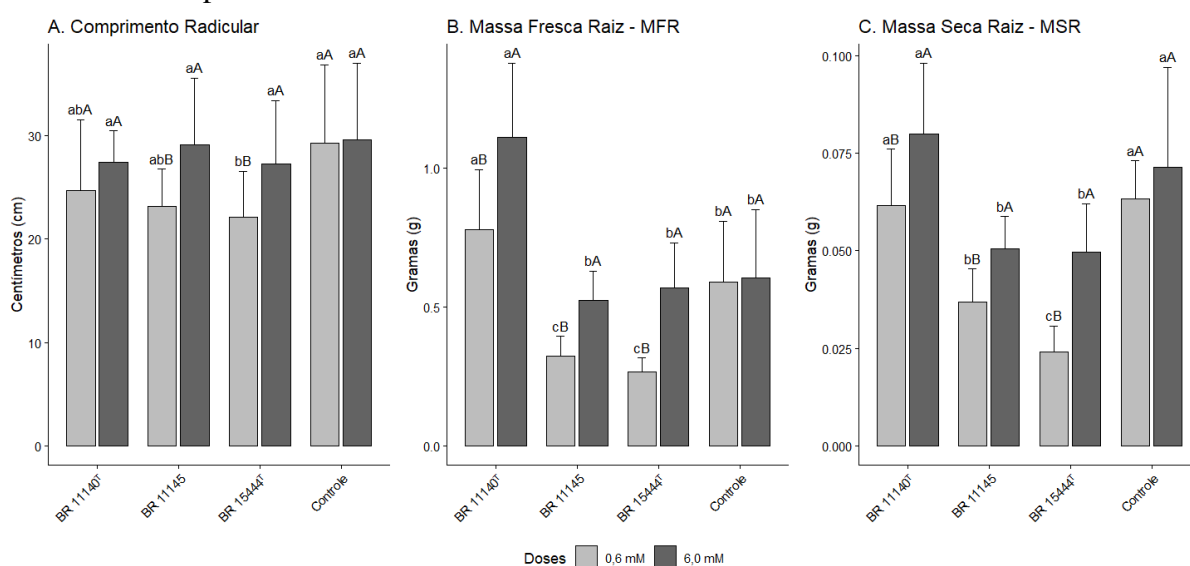
No sistema radicular, a disponibilidade de N foi o fator preponderante, porém a estirpe BR 15444 reafirmou seu impacto negativo sob baixa dosagem de N, apresentando as menores médias de comprimento e massa seca radicular (Figura 30). Esse comprometimento da raiz explica o menor desempenho da parte aérea, evidenciando que a interação negativa microrganismo-hospedeiro inicia-se pela limitação da área de exploração do solo (Tabela 13).

Tabela 13 – Resumo da análise de variância (ANOVA) de componentes radiculares de plantas de braquiária inoculadas com estirpes de *Nitrospirillum* spp. sob duas doses de nitrogênio (0,6 mM e 6,0 mM).

Fonte de Variação	Comprimento (cm)	MFR (g)	MSR (g)
Blocos	49,47 ns	0,0031 ns	0,0004 ns
Dose de N (D)	299,98 *	1,0837 *	0,0065 *
Tratamentos (T)	96,60 *	1,4607 *	0,0068 *
Interação D x T	37,92 ns	**0,1205 ***	0,0003 ns
Resíduo	34,73	0,0342	0,0002
CV (%)	22,16	31,03	25,92

(*) Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; (ns) Não significativo. CV: Coeficiente de Variação. Os valores representam o Quadrado Médio de cada fonte de variação.

Figura 30 – Atributos radiculares de plantas de *B. decumbens* em resposta à inoculação com estirpes de *Nitrospirillum* spp. selecionadas e níveis contrastantes de nitrogênio mineral. (A) Comprimento radicular; (B) Massa fresca da raiz; (C) Massa seca da raiz. Médias seguidas por letras minúsculas comparam as estirpes dentro da mesma dose de N. Letras maiúsculas comparam as doses de N para a mesma estirpe (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras verticais indicam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os resultados do Experimento III, apesar da ausência de diferenças estatísticas, indicaram que numericamente o fornecimento de 6,0 mM de N proporcionou um ambiente melhor para o desenvolvimento da braquiária.

Portanto, definiu-se a dose de 6,0 mM de N para a condução do Experimento IV, visando avaliar o desempenho das demais estirpes, onde o objetivo é maximizar a eficiência do uso do nitrogênio e acelerar o desenvolvimento inicial das plantas para o estabelecimento precoce da pastagem.

4.3.5 Análises do Experimento IV– Responsividade de plantas de Braquiária Inoculadas com Estirpes de *Nitrospirillum* spp.

O potencial de promoção de crescimento vegetal pelas estirpes de *Nitrospirillum* spp. em plantas de braquiária manifestou-se de forma mais acentuada nos padrões de biomassa e arquitetura do sistema radicular. Os resultados dos dados do Experimento IV (Apêndice G) indicam que as estirpes possibilitaram alterações significativas na partição de biomassa e no desenvolvimento radicular, mesmo sob a aplicação de uma dose elevada de nitrogênio (6,0 mM de N).

4.3.5.1 BIOMASSA E DESENVOLVIMENTO DA PARTE AÉREA

As análises de variância revelaram efeitos altamente significativos ($p < 0,01$) para a variável Massa Fresca da parte Aérea (MFA), indicando que a inoculação pode ter atuado como agente modulador do vigor vegetativo inicial da braquiária. Entretanto, não foram observadas variações estatísticas para as demais variáveis biométricas e de acúmulo de massa seca na parte aérea (Tabela 14).

Tabela 14 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para parâmetros de biomassa e morfológicos de Braquiária sob inoculação com *Nitrospirillum* spp. (Dose 6,0 mM de N).

Fonte de Variação	GL	QM (MFA)	QM (MSA)	QM (AP)	QM (NF)	QM (PERF)
Blocos	5	0,1125 ns	0,0212 ns	61,17 ns	0,2803 ns	0,2803 ns
Tratamentos	10	0,3156 **	0,0164 ns	64,63 ns	0,7727 ns	0,2379 ns
Resíduo	50	0,1108	0,0113	78,48	1,4886	0,147
Média Geral	-	2,46	0,57	37,31	4,75	0,39
CV (%)	-	13,52	18,51	23,73	25,65	97,32

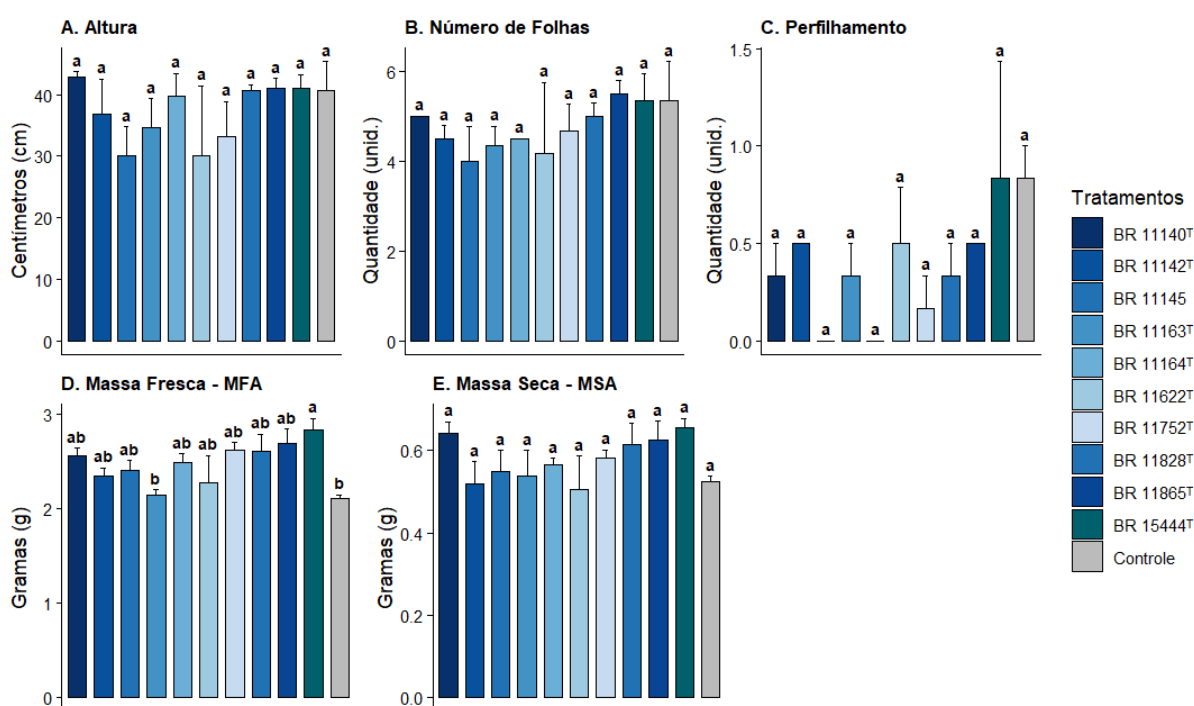
QM: Quadrado Médio; MFA: Massa Fresca Aérea (g); MSA: Massa Seca Aérea (g); AP: Altura de Planta (cm); NF: Número de Folhas; PERF: Perfilhamento. ns: não significativo; **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

A resposta positiva observada para MFA, em contraste com a estabilidade da Massa Seca de parte Aérea (MSA) e dos parâmetros morfológicos (altura e número de folhas), sugere que o benefício da inoculação com estirpes como a BR 15444 (2,84 g) pode estar relacionado com mecanismos fisiológicos de hidratação e turgidez celular (figura 31D). Essa hipótese é reforçada pela presença do aparato genético (gene *mmtN*) em *Nitrospirillum iridis* (BR 15444/DSM22198), associado à biossíntese de dimetilsulfoniopropionato (DMSP), um composto que atua na regulação osmótica e na proteção contra estresses abióticos, contribuindo para a

retenção de água e a manutenção da turgidez celular, conforme demonstrado por Li, Todd & Yu *et al.* (2023).

A ausência de variação estatística para altura (AP) e número de folhas (NF) pode indicar que, sob elevada disponibilidade de nitrogênio mineral (6,0 mM de N) a inoculação não priorizou modificações estruturais na arquitetura da parte aérea. Nesse cenário, o incremento isolado na massa fresca (MFA) sugere que a ação bacteriana promoveu ganhos de ordem fisiológica, possivelmente associados à otimização do status hídrico e à manutenção da turgidez celular. Essa resposta sinaliza uma maior eficiência no uso da água pelas plantas inoculadas, resultando em um maior acúmulo de biomassa fresca sem a necessidade de expansão morfológica dos órgãos aéreos (Figura 31).

Figura 31 – Parâmetros morfológicos de parte aérea em plantas de braquiária inoculadas com estirpes de *Nitrospirillum* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A resposta positiva da MFA, em contraste com a estabilidade da MSA e dos parâmetros morfológicos, sugere que o benefício da inoculação com a estirpe BR 15444 decorre de sua adaptação evolutiva a microambientes rizosféricos de alta disponibilidade hídrica, uma vez que foi isolada da rizosfera de *Iris ensata* var. *spontanea*, espécie típica de ambientes úmidos (Chung *et al.*, 2015). Do ponto de vista genômico, essa adaptação é corroborada pela presença

do gene *mmtN* associado a um gene de *non-ribosomal peptide synthase* (NRPS) em *N. iridis*. Esse arranjo genético sugere a capacidade de síntese de *dimetilsulfoniopropionato* (DMSP), um eficiente osmoprotetor que atua na regulação osmótica e na proteção contra estresses abióticos (Li, Jinmei; Todd; Yu, 2024; Payet *et al.*, 2024; Zheng *et al.*, 2020). Desta forma, a produção de DMSP possivelmente otimizou o status hídrico da braquiária, resultando em tecidos mais hidratados e, conseqüentemente, no maior acúmulo de massa fresca observado.

4.3.5.2 COMPONENTE RADICULAR E ESTRATÉGIA DE CRESCIMENTO

Diferentemente da parte aérea, a análise de variância para o sistema radicular apresentou efeito significativo dos tratamentos sobre o acúmulo de biomassa, mas não sobre o comprimento radicular (Tabela 15).

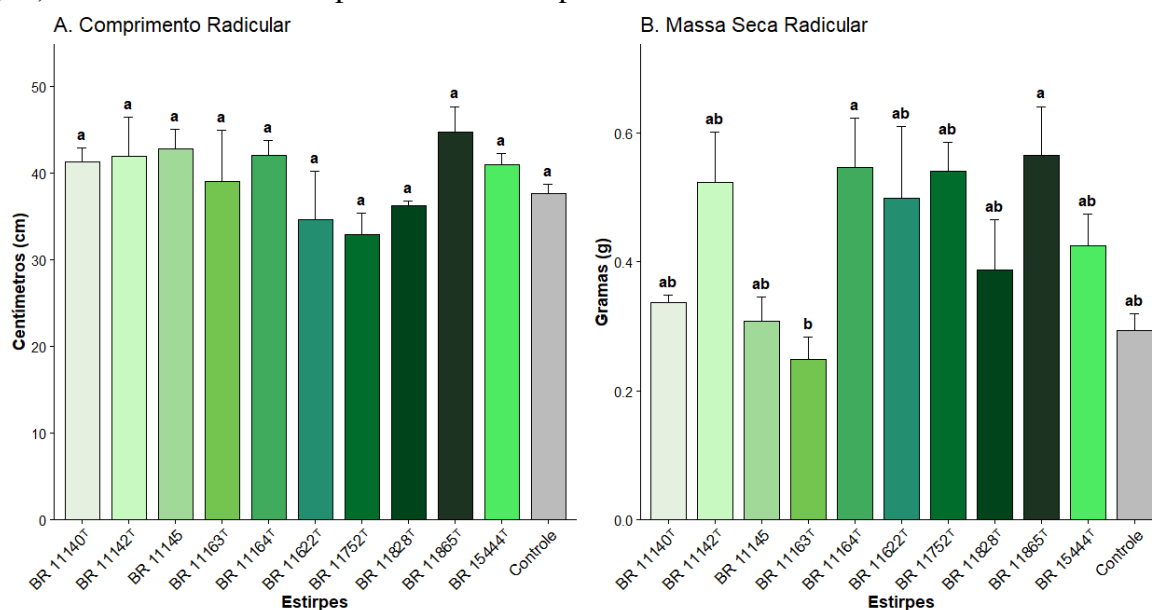
Tabela 15 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para parâmetros radiculares de Braquiária sob inoculação com *Nitrospirillum* spp. (Dose 6,0 mM de N).

Fonte de Variação	GL	QM (CR)	QM (MSR)
Blocos	5	78,31 ns	0,0374 ns
Tratamentos	10	82,38 ns	0,0807 **
Resíduo	50	61,02	0,0227
Média Geral	-	37,31	0,39
CV (%)	-	20,08	36,44

QM: Quadrado Médio; MSR: Massa Seca Radicular (g). ns: não significativo; **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Por outro lado, o teste de Tukey ($p < 0,05$) indicou que nenhuma estirpe diferiu estatisticamente do controle quanto à Massa seca radicular – MSR. O tratamento controle posicionou-se no grupo ab, juntamente com a maioria das estirpes. Apenas a BR 11163 apresentou MSR significativamente inferior às demais estirpes de maior média (BR 111865 e BR 11164), mas o controle não se diferenciou de nenhum tratamento (Figura 32B).

Figura 4 – Parâmetros radiculares (Comprimento e MSR) de Braquiária (44 DAS) sob inoculação com *Nitrospirillum* spp. Letras indicam grupos estatísticos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A ausência de resposta no comprimento radicular, associada à variação significativa na MSR entre as estirpes de *Nitrospirillum* spp. (embora sem diferenças em relação ao controle), pode indicar uma possível alteração qualitativa na arquitetura radicular para alguns tratamentos. As BR 11164 e 11865 apresentaram as maiores médias numéricas de MSR, indicando uma possível tendência no acúmulo de biomassa, além de terem sido estatisticamente superiores à BR 11163. Por outro lado, as estirpes BR 11163 e BR 11145, para as quais dispomos de dados detalhados de arquitetura radicular (WinRHIZO), apresentaram os maiores valores de RLVem comparação ao controle, sugerindo raízes mais finas e maior densidade de comprimento radicular por unidade de volume (Figura 33G). Esse comportamento é compatível com a hipótese de que bactérias rizosféricas promotoras de crescimento podem aumentar a ramificação e a densidade radicular sem grande aumento no comprimento axial (Radhakrishnan; Krishnasamy, 2024). A inoculação, com esses organismos, pode induzir ao aumento de massa seca radicular e ramificação lateral, reforçando a ideia de mudança de investimento de crescimento axial para radial e ramificado (Dong *et al.*, 2025).

4.3.5.3 ARQUITETURA RADICULAR – ANÁLISE WINRHIZO

A caracterização dos sistemas radiculares, das BR 11140, 11145, 11163, 15444 e Controle, realizadas via software WinRHIZO, permitiu identificar que os estímulos ao

crescimento vegetal promovido pela inoculação das estirpes de *Nitrospirillum* spp. não foram traduzidos em incrementos lineares de comprimento ou na complexidade da rede de ramificações radiculares. Em vez disso, os dados apontam para uma biomodulação específica, protagonizada pelas estirpes BR 11145, caracterizada pelo ajuste da espessura dos tecidos e pela otimização da densidade ocupacional no substrato (Tabela 16).

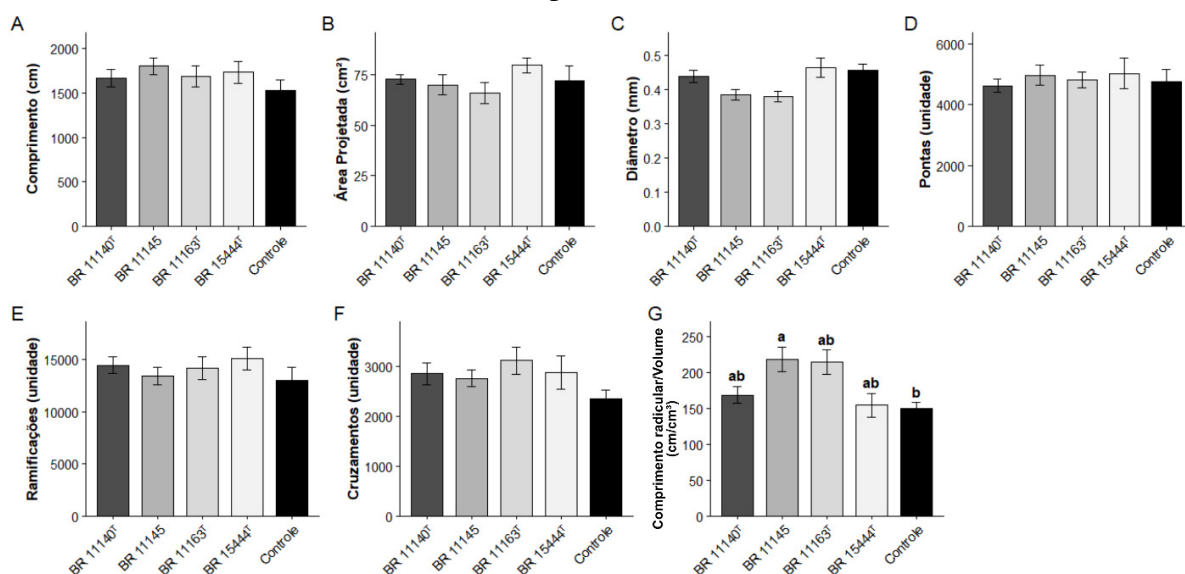
Tabela 16 – Valores do Quadrado médio da análise de variância dos parâmetros morfológicos detalhados (WinRHIZO) de Braquiária sob inoculação com *Nitrospirillum* spp. (Dose 6,0 mM de N).

Fonte de Variação	GL	Comp.	Área Proj.	Diâm.	Pontas	Ram.	Cruz.	DCR
Tratamento (QM)	4	59884,84 ns	148,27 ns	0,0097 *	167567,5 ns	4235015,90 ns	478410,20 ns	6492,73 *
Bloco (QM)	5	193876,81	275,44	0,0006	1878144	17351983,20	975676,90	406,25
Resíduo (QM)	20	43923,04	123,05	0,0028	520532,6	3764487,5	202728,80	1469,79
Média Geral	-	1686,82	71,96	0,42	4843,6	14027,18	2783,95	180,80
CV (%)	-	12,42	15,42	12,68	14,90	13,83	16,17	21,20

Comp.: Comprimento; Diâm.: Diâmetro; Ram.: Ramificações; Cruz.: Cruzamentos; DCR (Densidade de Comprimento Radicular) = Comprimento (cm)/ Volume radicular(cm³); GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação. Significância: * $p < 0,05$; ns: não significativo pelo teste F. Os valores no corpo da tabela referem-se aos Quadrados Médios (QM).

A análise de variância indicou efeito significativo da inoculação sobre o diâmetro médio ($p = 0,028$) e o índice de comprimento radicular por volume (RLV, $p = 0,010$), mas não sobre as demais variáveis (Figura 33). Contudo, o teste de Tukey ($p < 0,05$) foi conservador: não detectou diferenças entre tratamentos para o diâmetro (Figura 33C) enquanto para a RLV indicou que a estirpe BR 11145 (218,07 cm/cm³) superou o controle (149,63 cm/cm³), com a BR 11163 assumindo posição intermediária (213,90 cm/cm³) (Figura 33G).

Figura 33 – Atributos morfológicos radiculares de braquiária inoculada com estirpes de *Nitrospirillum* spp. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais indicam o erro padrão da média ($n=6$).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A ausência de significância estatística para o comprimento total, área projetada e índices de complexidade radicular (pontas, ramificações e cruzamentos) indica que a estrutura básica da rede radicular permaneceu estável até aos 44 dias de condução do experimento. No entanto, o incremento no RLV, promovido especialmente pela BR 11145, sugere que a resposta biológica à inoculação foi voltada na reorganização da biomassa radicular (Figura 33G).

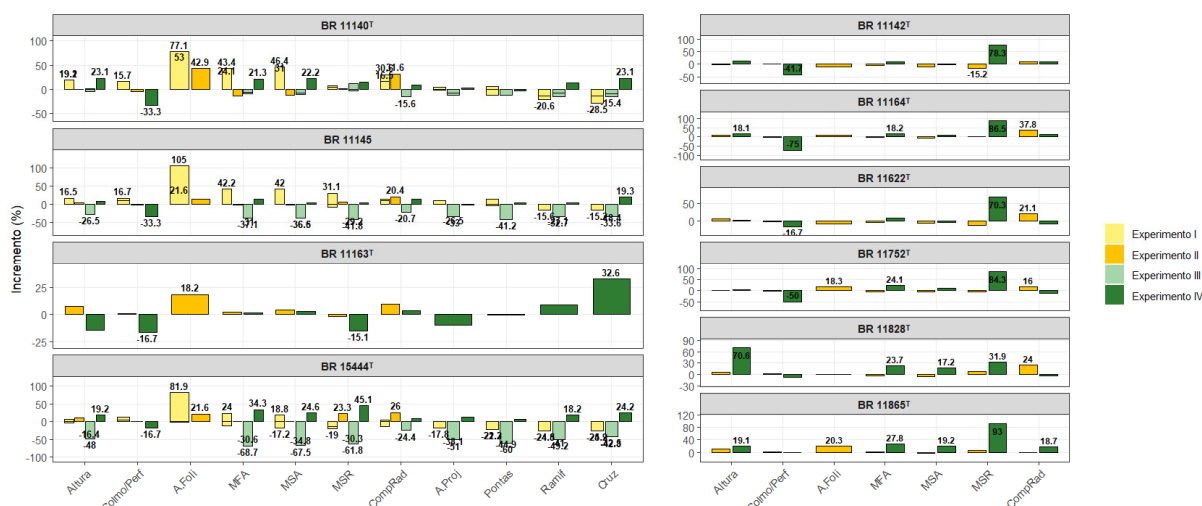
Do ponto de vista fisiológico, esse afinamento é uma estratégia de aumento de eficiência: a planta maximiza a área de contato com o solo e a absorção de nutrientes, característica marcante de plantas que otimizam o metabolismo radicular sob a influência de bactérias promotoras de crescimento (Fantozzi *et al.*, 2024; Grover *et al.*, 2021; Sanaei *et al.*, 2025; Valente Lima *et al.*, 2021).

4.3.6 Integração dos Incrementos Percentuais e Análise Descritiva dos Perfis Respostas das Estirpes

Análise exploratória dos incrementos médios: A análise dos incrementos médios, integrando as variáveis e experimentos, apresentou um panorama na variabilidade do desempenho das estirpes de *Nitrospirillum* spp. nas duas culturas avaliadas. De modo geral, observou-se a predominância de incrementos positivos para a maioria das variáveis

relacionadas ao crescimento vegetal, indicando o potencial das estirpes de *Nitrospirillum* como promotoras de crescimento (Figura 34).

Figura 5 – Integração de incrementos percentuais médios (%) por estirpe de *Nitrospirillum* spp. nas variáveis analisadas em experimentos realizado na cultura do milho (tons amarelos) e na cultura da braquiária (tons verdes). Valores de incremento > 0 indicam efeito promotor de crescimento em relação ao controle.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Na cultura do milho (Tabela 17), as estirpes BR 11140 e BR 11145 apresentaram os maiores incrementos médios positivos (12,5% e 11,4%, respectivamente), com destaque para ganhos em altura, área foliar e massas secas da parte aérea. As estirpes BR 11164, BR 11163 e BR 11865 também mostraram incrementos positivos, porém de menor magnitude (entre 5,5% e 6,7%). Por outro lado, a estirpe BR 11142 exibiu desempenho médio negativo (-4,4%), indicando um efeito numérico desfavorável na maioria das variáveis.

Na braquiária (tabela 17), o panorama foi substancialmente diferente. As estirpes BR 11865^T (29,6%), BR 11828^T (21,9%) e BR 11164 (11,2%) destacaram-se como as mais promissoras, com ganhos expressivos especialmente em biomassa radicular (MSR) e RLV. A estirpe BR 11145, embora tenha mostrado bom desempenho no milho, apresentou incremento médio negativo na braquiária (-16,4%), evidenciando forte especificidade hospedeira. A estirpe BR 15444 também exibiu desempenho consistentemente negativo nesta cultura (-20,8%), corroborando os resultados da ANOVA que indicaram seu efeito antagônico sob baixa disponibilidade de nitrogênio.

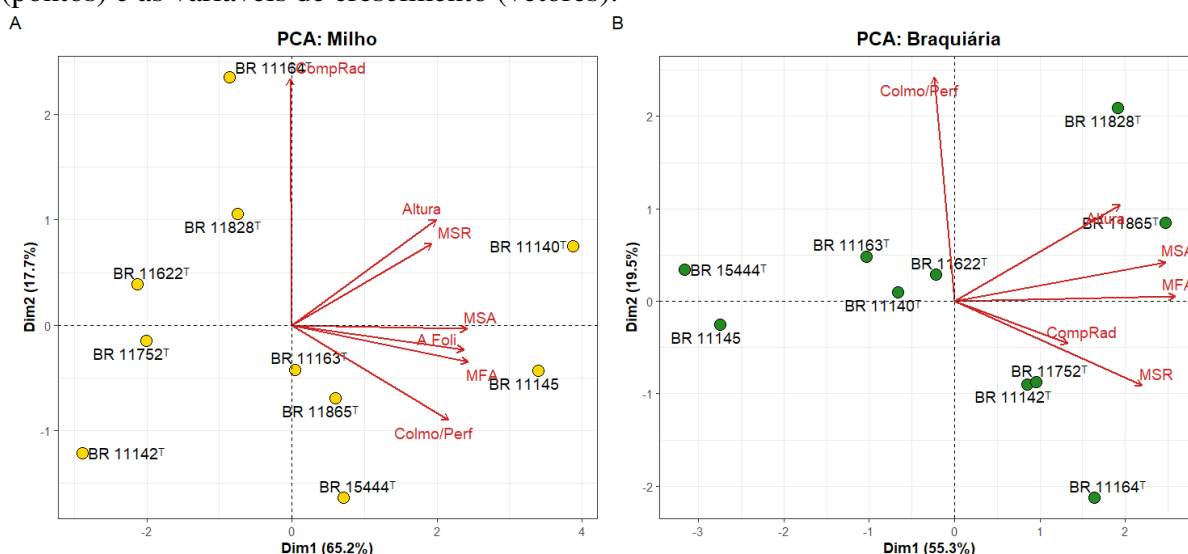
Tabela 17 – Média dos incrementos percentuais (%) por estirpe e por cultura, integrando todas as variáveis avaliadas nos experimentos com milho (Experimentos I e II) e braquiária (Experimentos III e IV).

Cultura Estirpe	Milho	Braquiária
	Incremento médio (%)	
BR 11140 ^T	12,50	-1,30
BR 11142 ^T	-4,36	12,00
BR 11145	11,40	-16,40
BR 11163 ^T	5,62	-0,73
BR 11164 ^T	6,74	11,20
BR 11622 ^T	-0,80	8,83
BR 11752 ^T	2,07	10,30
BR 11828 ^T	4,18	21,90
BR 11865 ^T	5,45	29,60
BR 11544 ^T	-0,46	-20,80

Os valores representam a média aritmética dos incrementos percentuais de todas as variáveis mensuradas para cada estirpe dentro de cada cultura. Incrementos positivos indicam efeito promotor de crescimento em relação ao controle.

Análise de Componentes principais dos incrementos: A Análise de Componentes Principais (PCA) permitiu identificar padrões estruturais na resposta das estirpes, sintetizando a variabilidade dos dados em eixos principais de variação. A distribuição das estirpes no espaço multivariado evidenciou a formação de agrupamentos distintos, refletindo similaridade nos perfis de resposta. Estirpes posicionadas no mesmo quadrante apresentaram comportamento funcional semelhante, enquanto aquelas localizadas em regiões opostas indicaram respostas contrastantes (Figura 37).

Figura 35 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos incrementos percentuais para as culturas do milho (A) e da braquiária (B). O gráfico biplot mostra a relação entre as estirpes (pontos) e as variáveis de crescimento (vetores).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Para a cultura do milho (Figura 37A), os dois primeiros componentes principais explicaram 82,8% da variância total, com a Dimensão 1 (65,2%) fortemente associada às variáveis de biomassa (MFA, MSA, A.Foli) e à Altura. As estirpes BR 11140, BR 11145, BR 15444 e BR 11865 posicionaram-se no quadrante positivo dessa dimensão, sendo classificadas como promotoras de crescimento. As demais estirpes (BR 11142, BR 11163, BR 11164, BR 11622, BR 11752 e BR 11828) situaram-se no quadrante negativo, indicando incrementos médios desfavoráveis ou neutros no conjunto das variáveis analisadas.

Para a braquiária (Figura 37B), os dois primeiros componentes explicaram 74,8% da variância total, com a Dimensão 1 (55,3%) correlacionada positivamente com MFA, MSA, MSR e Altura. O *biplot* permitiu classificar as estirpes em quatro perfis funcionais: i) alto desempenho geral (BR 11828 e BR 11865), posicionadas no quadrante superior direito, associadas a altos incrementos tanto em parte aérea quanto em sistema radicular; ii) foco em biomassa/raiz (BR 11164, BR 11142 e BR 11752), localizadas no quadrante inferior direito, com ganhos prioritariamente em biomassa radicular; iii) investimento em parte aérea (BR 11140, BR 11163, BR 11622 e BR 15444), situadas no quadrante superior esquerdo, com efeitos mais direcionados à parte aérea; e iv) baixo desempenho geral (BR 11145), isolada no quadrante inferior esquerdo, com incrementos negativos na maioria das variáveis.

Os resultados obtidos a partir das análises exploratória e multivariada evidenciam que as estirpes avaliadas apresentam comportamento funcional diverso, podendo ser classificadas em

diferentes perfis de promoção de crescimento. A análise descritiva dos incrementos percentuais, embora não substitua os testes de inferência estatística, apresentou tendências que complementam os resultados das ANOVAs.

Os padrões observados na análise de incrementos confirmam a especificidade da interação estirpe-hospedeiro como um dos principais determinantes da eficácia da inoculação. A estirpe BR 11145, por exemplo, mostrou-se promissora para o milho, mas apresentou desempenho consistentemente negativo na braquiária, indicando que seu potencial de promoção de crescimento não foi universal e depende de fatores da planta hospedeira (Bashan & de-Bashan, 2010; Santos et al., 2020). Resultado semelhante foi observado para BR 11140, que, embora tenha apresentado os maiores incrementos em parte aérea no milho, teve desempenho apenas moderado na braquiária. Por outro lado, estirpes como BR 11865 e BR 11828 destacaram-se consistentemente na braquiária, com ganhos expressivos em biomassa radicular e índice de comprimento radicular por volume.

4.4 CONCLUSÕES

A análise integrada dos bioensaios laboratoriais e dos experimentos em ambiente protegido permitiu caracterizar a interação entre as estirpes de *Nitrospirillum* spp. em plantas de milho híbrido (Cultivares SHS 5050 e AG PRO2 8088) e plantas de braquiária (*B. decumbens* cv. *basillisk*), sob diferentes condições, sendo o sistema radicular o principal sítio de resposta à inoculação. Embora a maioria das variáveis clássicas de crescimento não tenha apresentado diferenças estatisticamente significativas, respostas mais sutis foram detectadas.

No bioensaio, a interação planta x bactéria não promoveu diferenças estatisticamente significativas sobre os parâmetros de crescimento. A análise de componentes principais revelou apenas um gradiente contínuo de vigor, sem formação de agrupamentos. Tendências numéricas indicaram que as estirpes BR 11142^T, BR 11163^T e BR 11828^T apresentaram os maiores incrementos relativos em comprimento radicular total (CRT = 46 ~55%), enquanto a BR 11140^T destacou-se no peso seco radicular e a BR 11142^T no RLV. A relação entre a biossíntese de compostos indólicos e a resposta fenotípica confirmou que o potencial *in vitro* não se reflete linearmente em produção de crescimento.

Experimentos I e II: A cultivar SHS 5050 foi selecionada por apresentar superioridade em vigor aéreo e arquitetura radicular (maior número de cruzamentos). A inoculação não promoveu efeitos significativos, com exceção de tendências numéricas para BR 11140^T (altura e número de folhas) e BR 11145 (diâmetro do colmo). No Experimento II, a ANOVA indicou efeito sobre o comprimento radicular ($p < 0,01$), mas o teste de Tukey mostrou que nenhuma estirpe diferiu estatisticamente do controle.

Com relação aos Experimentos III e IV: A disponibilidade de nitrogênio foi determinante: sob baixa dose (0,6 mM N), a estirpe BR 15444^T foi antagônica; sob dose adequada (6,0 mM N), BR 11140^T e BR 11145 mantiveram desempenho equivalente ao controle. No Experimento IV, a parte aérea respondeu apenas na massa fresca (MFA), com destaque numérico para BR 15444^T. A análise de arquitetura radicular (WinRHIZO) revelou que o RLV foi a única variável com diferença estatística, com BR 11145 superando o controle e BR 11163^T apresentando posição intermediária, indicando que a inoculação promoveu raízes mais finas e maior densidade de comprimento radicular sem aumentar o comprimento total ou a ramificação.

A análise descritiva dos incrementos médios na cultura do milho, as estirpes mais promissoras foram as BR 11140^T (12,5%) e BR 11145 (11,4%); na braquiária, destacaram-se

BR 11865^T (29,6%), BR 11828^T (21,9%) e BR 11164^T (11,2%). A PCA dos incrementos permitiu classificar as estirpes na braquiária em quatro perfis funcionais: alto desempenho geral (BR 11828^T e BR 11865^T), foco em biomassa/raiz (BR 11164^T, BR 11142^T e BR 11752^T), investimento em parte aérea (BR 11140^T, BR 11163^T, BR 11622^T e BR 15444^T) e baixo desempenho geral (BR 11145). Esses padrões complementam as análises de variância e orientam a seleção racional de estirpes para cada cultura.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização fisiológica em milho e braquiária, permitiu avançar na compreensão das interações entre estirpes do gênero *Nitrospirillum* spp. e plantas cultivadas de milho e braquiária, revelando que o repertório funcional dessas bactérias pode ser traduzido em respostas agronômicas, embora tais respostas sejam dependentes do genótipo vegetal, da disponibilidade de nitrogênio, do estágio fenológico e da estirpe específica.

A ausência de significância estatística na maioria das variáveis clássicas de crescimento não invalida os efeitos biológicos observados. Pelo contrário, as tendências consistentes identificadas na análise descritiva dos incrementos percentuais e na PCA indicam que a resposta à inoculação ocorre em níveis mais sutis, frequentemente associados à reorganização da arquitetura radicular (RLV) e à especificidade da interação estirpe-hospedeiro. Esse padrão reforça a necessidade de incorporar análises complementares (incrementos, PCA) em estudos de prospecção de bactérias promotoras de crescimento, especialmente quando o poder estatístico é limitado pelo número reduzido de repetições.

Em síntese, o gênero *Nitrospirillum* apresenta estratégias funcionais diversificadas, que vão desde a prontidão no estabelecimento radicular inicial (BR 11828^T) até a otimização da exploração do substrato por meio do afinamento radicular (BR 11145 e BR 11163^T), passando por efeitos sobre a parte aérea (BR 11140^T). Os resultados obtidos aprofundam o conhecimento sobre a ecologia funcional do gênero *Nitrospirillum* e sua interação com plantas cultivadas, apresentando estratégias de promoção de crescimento dependentes dos hospedeiros e das condições nutricionais.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELHALIM, H. M.; HAMED, R. R.; EL SANGRY, D. A. M.; RADWAN, K. H. Characterization and isolation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase-producing, plant growth-promoting rhizobacteria from the rhizosphere of Egyptian wheat cultivars for improved drought resilience. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e285457, 2024.
- ALEMNEH, A. A.; ZHOU, Y.; RYDER, M. H.; DENTON, M. D. Is phosphate-solubilizing ability in plant growth-promoting rhizobacteria isolated from chickpea linked to their ability to produce ACC deaminase? **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 2416–2432, 2021.
- ALI, M.; AHMED, I.; TARIQ, H.; ABBAS, S.; ZIA, M. H.; MUMTAZ, A.; SHARIF, M. Growth improvement of wheat (*Triticum aestivum*) and zinc biofortification using potent zinc-solubilizing bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1140454, 2023.
- ALMAZROUEI, L. M.; PURAYIL, G. P.; ALNUAIMI, L. S.; BARHUMI, A. I.; ELAMEEN, A. J.; IBRAHIM, S. M.; ELNAHHAS, R. B.; ABUQAMAR, S. F.; EL-TARABILY, K. A. Rhizosphere-competent actinobacterial consortium alleviates salinity stress in tomato through plant growth-promoting traits and ACC deaminase activity. **BMC Plant Biology**, v. 25, n. 1, p. 1443, 2025.
- ALMEIDA, F. M.; HEINRICHS, R. MARTINEZ, F. R.; SILVA, M. B. P.; PAGLIARI, P. H.; SOARES-FILHO, C. V. Recovery of degraded Urochloa pasture: effects of polyhalite on dry mass accumulation and macronutrient dynamics. **Agronomy**, v. 15, n. 10, p. 2300, 2025.
- ANDRADE, R. A.; PORTO, M. O.; CAVALI, J.; FERREIRA, E.; BERGAMIN, A. C.; SOUZA, F. R.; AGUIAR, I. S. *Azospirillum brasilense* e fosfato natural reativo no estabelecimento de forrageira tropical. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 146–154, 2019.
- ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; CARVALHO, A. F.; RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. S.; SILVA, L. H. M. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, p. 1940–1948, 2010.
- ARAÚJO, E. V. B.; MAJOLO, C.; LIMA, I. G.; SANTOS, J. P.; MUNIZ, A. W. Solubilização de fosfatos e potássio por bactérias rizosféricas: uma revisão. **Nativa**, v. 12, n. 4, p. 843–852, 2024.
- ARORA, P. TABSSUM, R.; GUPTA, A. P.; KUMAR, S.; GUPTA, S. Optimization of indole acetic acid produced by plant growth promoting fungus, aided by response surface methodology. **Heliyon**, v. 10, n. 14, p. e34356, 2024.
- AUERBACH, I. D.; SORENSEN, C.; HANSMA, H. G.; HOLDEN, P. A. Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3809–3815, 2000.
- BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 666–681, 2009.

BAHARUDIN, N. F.; OSMAN, N. I. Plant development, stress responses, and secondary metabolism under ethylene regulation. **Plant Stress**, v. 7, p. 100146, 2023.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233–266, 2006.

BALDANI, J. I.; FERREIRA, N. S.; SCHWAB, S.; REIS, V. M.; SOARES, L. H. B.; SIMÕES-ARAUJO, J. L.; DOURADO, F. S.; BACH, E.; CAMACHO, N. N.; OLIVEIRA, A. M.; ALVES, B. J. R.; SILVA, A. L.; ROSSI, C. N.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. F.; ZILLI, J. E. *Nitrospirillum viridazoti* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing species isolated from grasses. **Current Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 144, 2024.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413–431, 2014.

BAPTISTELLA, J. L. C.; ANDRADE, S. A. L.; FAVARIN, J. L.; MAZZAFERA, P. *Urochloa* in tropical agroecosystems. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 2020.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – A critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77–136, 2010.

BELLO, L.; FERREIRA, A. L.; CÉSAR, R. L. **Inoculante para fixação de nitrogênio para cana é lançado pela Basf e Embrapa**, 2018.

BHAT, M. A.; MISHRA, A. K.; JAN, S.; BHAT, M. A.; KAMAL, M. A.; RAHMAN, S.; SHAH, A. A.; JAN, A. T. Plant growth-promoting rhizobacteria in plant health: a perspective study of the underground interaction. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 629, 2023.

BHINU, V. S. Insight into biofilm-associated microbial life. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 15–21, 2006.

BOLFE, E. L.; VICTORIA, D. C.; SANO, E. E.; BAYMA, G.; MASSRUHÁ, S. M. F. S.; OLIVEIRA, A. F. Potential for agricultural expansion in degraded pasture lands in Brazil based on geospatial databases. **Land**, v. 13, n. 2, p. 200, 2024.

BRAZ, R. R.; NAHAS, E. Synergistic action of both *Aspergillus niger* and *Burkholderia cepacea* in co-culture increases phosphate solubilization in growth medium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 332, n. 1, p. 84–90, 2012.

CABRAL, C. E. A.; CABRAL, L. S.; BONFIM-SILVA, E. M.; CARVALHO, K. S.; KROTH, B. E.; CABRAL, C. H. A. Resposta da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu a fertilizantes nitrogenados associados ao fosfato natural reativo. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n. 1, p. 66-72, 2016.

CAPRIA, A.; SINGH, I.; ZMASEK, C.; LEFKOWITZ, E. J.; SCHEUERMANN, R. BV-BRC zoonosis or reverse zoonosis example. In: MULEY, V. Y. (org.). **Computational virology**. New York: Springer, 2025. p. 143–163.

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Produção de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos e tecnológicos da promoção do crescimento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (org.). ***Azospirillum* sp.:** fisiologia celular, interações vegetais e pesquisa agrônômica na Argentina. Argentina, 2008. p. 61–86.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440–459, 2014.

CASTALDI, S.; VALKOV, V. T.; RICCA, E.; CHIURAZZI, M.; ISTICATO, R. Use of halotolerant *Bacillus amyloliquefaciens* RHF6 as a bio-based strategy for alleviating salinity stress in *Lotus japonicus* cv. Gifu. **Microbiological Research**, v. 268, p. 127274, 2023.

CASTILLO, P.; MOLINA, R.; ANDRADE, A.; VIGLIOCCO, A.; ALEMANO, S.; CASSÁN, F. D. Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: the genus *Azospirillum*. In: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (org.). **Handbook for *Azospirillum*:** technical issues and protocols. Springer, 2015. p. 115–138.

CHAI, L.; ZABURDAEV, V.; KOLTER, R. How bacteria actively use passive physics to make biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 121, n. 40, p. e2403842121, 2024.

CHENG, Y.; NARAYANAN, M.; SHI, X.; CHEN, X.; LI, Z.; MA, Y. Phosphate-solubilizing bacteria: their agroecological function and optimistic application for enhancing agro-productivity. **Science of the Total Environment**, v. 901, p. 166468, 2023.

CHUNG, E. J.; PARK, T. S.; KIM, K. H.; JEON, C. O.; LEE, H.-I.; CHANG, W.-S.; ASLAM, Z.; CHUNG, Y. R. Erratum to: *Nitrospirillum irinus* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from the rhizosphere soil of Iris and emended description of the genus *Nitrospirillum*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 6, p. 1495–1496, 2015.

COELHO, A. E.; SANGOI, L.; MORAES, R. F.; SAPUCAY, M. J. L. C.; FRANCHINI, J. C. DEBIASI, H.; BALBINOT JÚNIOR, A. A. Biomass and protein in ruzigrass intercropped with maize subjected to plant densities and nitrogen fertilization. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. e03296, 2023.

COSTA, N. L.; MORAES, A.; CARVALHO, P. C. F.; MAGALHÃES, J. A. Acúmulo de forragem e morfogênese de *Trachypogon plumosus* sob níveis de fósforo. **Pubvet**, v. 10, n. 5, p. 388–393, 2016.

COZZOLINO, V.; MONDA, H.; SAVY, D.; DI MEO, V.; VINCI, G.; SMALLA, K. Cooperation among phosphate-solubilizing bacteria, humic acids and arbuscular mycorrhizal fungi induces soil microbiome shifts and enhances plant nutrient uptake. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 31, 2021.

CRUZ, N.; DIAS, D.; FRIES, D.; JARDIM, R.; SOUSA, B.; PIRES, A.; RAMOS, B. Alternatives for the recovery and renewal of degraded pastures. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 28, p. 15–35, 2022.

DAVIES, P. J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action**. Springer, 2004. 776 p.

DAWAR, K.; DAWAR, A.; TARIQ, M.; MIAN, I. A.; MUHAMMAD, A.; FARID, L.; KHAN, S.; KHAN, K.; FAHAD, S.; DANISH, S.; AL-GHAMDI, A. A.; ELSHIKH, M. S.; TAHZEEB-UL-HASSAN, M. Enhancing nitrogen use efficiency and yield of maize (*Zea mays* L.) through ammonia volatilization mitigation and nitrogen management approaches. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 74, 2024.

DE ALMEIDA LEITE, R.; MARTINS DA COSTA, E.; CABRAL MICHEL, D.; AMARAL LEITE, A.; OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; LIMA, W.; KONSTANTINIDIS, K. T.; SOUZA MOREIRA, F. M. Genomic insights into organic acid production and plant growth promotion by different species of phosphate-solubilizing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 10, p. 311, 2024.

DE ANDRADE, L. A.; SANTOS, C. H. B.; FREZARIN, E. T.; SALES, L. R.; RIGOBELLO, E. C. Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1088, 2023.

DIAS, A. C.; REIS, V. M.; SANTOS, L. A. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de milho inoculadas com dois gêneros de bactérias diazotróficas**. p. 13–15. 2021.

DOMINGUES DUARTE, C. F.; CECATO, U.; TRENTA BISERRA, T.; MAMÉDIO, D.; GALBEIRO, S. *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras: revisión. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 11, n. 1, p. 223–240, 2020.

DONG, L.; HU, S. XU, H.; BAI, X.; PAN, Z.; DONG, A.; CAI, J.; YU, X. Drought-growth promoting bacteria enhance drought tolerance by improving root conformation of *Caragana microphylla*. **Rhizosphere**, v. 34, p. 101095, 2025.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DUARTE, C. F. D.; CECATO, U.; HUNGRIA, M.; FERNANDES, H. J.; BISERRA, T. T.; GALBEIRO, S.; TONIATO, A. K. B.; SILVA, D. R. Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilisation. **Crop & Pasture Science**, v. 71, n. 1, p. 82–89, 2020.

DUARTE, C. F. D.; CECATO, U.; HUNGRIA, M.; FERNANDES, H. J.; BISERRA, T. T.; MAMÉDIO, D.; GALBEIRO, S.; NOGUEIRA, M. A. Inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em *Urochloa ruziziensis*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e630985978, 2020.

DUSHKU, E.; KOTZAMANIDIS, C.; KARGAS, A.; FANARA-LOLOU, M.-E.; GIANTZI, V.; KRYSTALLIDOU, E.; ZDRAGAS, A.; MALOUSHI, A. Unveiling the genetic basis of biochemical pathways of plant growth promotion in *Bacillus pumilus* and *Bacillus pseudomycoides*. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 9, p. 100419, 2025.

ELLERMANN, M.; ARTHUR, J. C. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 105, p. 68–78, 2017.

EMANUELE, J. J.; HEASLEY, C. J.; FITZPATRICK, P. F. Purification and characterization of the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase expressed in *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 1, p. 241–248, 1995.

ETESAMI, H. The dual nature of plant growth-promoting bacteria: benefits and potential risks for sustainable agriculture. **Environmental Advances**, v. 10, p. 1–12, 2025.

ETESAMI, H.; GLICK, B. R. Bacterial indole-3-acetic acid: a key regulator for plant growth, plant–microbe interactions, and agricultural adaptive resilience. **Microbiological Research**, v. 281, p. 127602, 2024.

FALLER, L.; LEITE, M. F. A.; KURAMAE, E. E. Enhancing phosphate-solubilising microbial communities through artificial selection. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 1649, 2024.

FANTOZZI, D.; MONTAGNOLI, A.; TRUPIANO, D.; DI MARTINO, P.; SCIPPA, G. S.; AGOSTO, G.; CHIATANTE, D.; SFERRA, G. A systematic review of studies on fine and coarse root traits measurement: towards the enhancement of urban forests monitoring and management. **Frontiers in Forests and Global Change**, v. 7, 2024.

FAO. **Hunger numbers stubbornly high for three consecutive years as global crises deepen**: UN report. 2024.

FAROOQI, M. Q. U.; NAWAZ, G.; WANI, S. H.; CHOUDHARY, J. R.; RANA, M.; SAH, R. P.; AFZAL, M.; ZAHRA, Z.; GANIE, S. A.; RAZZAQ, A.; REYES, V. P.; MAHMOUD, E. A.; ELANSARY, H. O.; EL-ABEDIN, T. K. Z.; SIDDIQUE, K. H. M. Recent developments in multi-omics and breeding strategies for abiotic stress tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

FENDRICH, R. C.; SILVA, M. B.; MARRIEL, I. E. Agronomic efficiency of a new liquid inoculant formulated with a mixture of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 in corn (*Zea mays* L.). **Microorganisms**, v. 13, n. 10, p. 2403, 2025.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt**: Pacote Experimental Designs (Portuguese). Versão 1.2.2. 2014.

FERREIRA, J. P.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. **Método para detecção e quantificação da atividade de ACC deaminase em bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia.

FERREIRA, T. C.; CUNHA, A. L. A. *Bacillus* spp. como promotores de resistência vegetal: seca, salinidade e patógenos habitantes do solo em áreas áridas. **Revista de Agroecologia no Semiárido**, v. 4, n. 5, p. 1, 2020.

FOX, J.; WEISBERG, S.; PRICE, B.; ADLER, D.; BATES, D.; BAUD-BOVY, G.; BOLKER, B.; ELLISON, S.; FIRTH, D.; FRIENDLY, M.; GORJANC, G.; GRAVES, S.; HEIBERGER, R.; KRIVITSKY, P.; LABOISSIERE, R.; MAECHLER, M.; MONETTE, G.; MURDOCH, D.; NILSSON, H.; OGLE, D.; PROCTOR, I.; RIPLEY, B.; SHORT, T.; VENABLES, W.; WALKER, B.; WINSEMIUS, D.; ZEILEIS, A.; **R-CORE. car: Companion to Applied Regression**. Versão 3.1-5. 2025.

FRANCIOLI, D.; KAMPOURIS, I. D.; KUHL-NAGEL, T.; BABIN, D.; SOMMERMAN, L.; BEHR, J. H.; CHOWDHURY, S. P.; ZRENNER, R.; MORADTALAB, N.; SCHLOTER, M.; GEISTLINGER, J.; LUDEWIG, U.; NEUMANN, G.; SMALLA, K.; GROSCH, R.. Microbial inoculants modulate the rhizosphere microbiome, alleviate plant stress responses, and enhance maize growth at field scale. **Genome Biology**, v. 26, n. 1, p. 148, 2025.

FREITAS, F. M. M.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. F.; VIDAL, M. S.; ZILLI, J. É. Recursos genéticos microbianos: uma abordagem integrada aplicada ao gênero *Nitrospirillum*. **BIOINFO**, v. 5, seção 10, p. 104–110, 2025.

GAO, J.; ZHUANG, S.; ZHANG, W. Advances in plant auxin biology: synthesis, metabolism, signaling, interaction with other hormones, and roles under abiotic stress. **Plants**, v. 13, n. 17, p. 2523, 2024.

GARCÍA-FRAILE, P.; MENÉNDEZ, E.; RIVAS, R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 183–205, 2015.

GERUM, Á. F. A. A.; SANTANA, M. A.; BALDAS, M. A. S.; SANTOS, I. S. **Bioinsumos: tendência de crescimento no Brasil**. 2023.

GIRI, S.; VIRK, V. Root-driven hormones and plant growth-promoting rhizobacteria as natural biostimulants for sustainable crop growth. **Discover Plants**, v. 2, n. 1, p. 360, 2025.

GLAUSER, G.; MARTI, G.; VILLARD, N.; DOYEN, G. A.; WOLFENDER, J.-L.; TURLINGS, T. C. J.; ERB, M. Induction and detoxification of maize benzoxazinones by insect herbivores. **The Plant Journal**, v. 68, n. 5, p. 901–911, 2011.

GOMES, E. A.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; GODINHO, B. T. V.; SOUSA, S. M. **Mecanismos das bactérias promotoras do crescimento de plantas na mitigação dos efeitos do déficit hídrico**. 2022.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192–195, 1951.

GROVER, M.; BODHANKAR, S.; SHARMA, A.; SHARMA, P.; SINGH, J.; NAIN, L. PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 618230, 2021.

GUIMARÃES, G. S.; RONDINA, A. B. L.; SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Pointing out opportunities to increase grassland pastures productivity via microbial inoculants: attending the society's demands for meat production with sustainability. **Agronomy**, v. 12, n. 8, p. 1748, 2022.

GUPTA, A.; RAI, S.; BANO, A.; SHARMA, S.; KUMAR, M.; BINSUWAIDAN, R.; KHAN, M. S.; UPADHYAY, T. K.; ALSHAMMARI, N.; SAEED, M.; PATHAK, N. ACC deaminase produced by PGPR mitigates the adverse effect of osmotic and salinity stresses in *Pisum sativum* through modulating antioxidant activities. **Plants**, v. 11, n. 24, p. 3419, 2022.

GUPTA, G.; VIRKHARE, U.; NIMBULKAR, P.; JOGAIAH, S.; KHARE, E.; DUTTA, A.; KHER, D. Role of zinc-solubilizing bacteria as biostimulants for plant growth promotion and sustainable agriculture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 141, p. 102996, 2026.

GUREEVA, M. V.; GUREEV, A. P. Molecular mechanisms determining the role of *Azospirillum* in plant adaptation to environmental stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9122, 2023.

HAMDALI, H.; BOUIZGARNE, B.; HAFIDI, M.; LEBRIHI, A.; VIROLLE, M. J.; OUHDOUCH, Y. Screening for rock phosphate-solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, v. 38, n. 1, p. 12–19, 2008.

HANIF, M. S.; TAYYAB, M.; BAILLO, E. H.; ISLAM, M. M.; ISLAM, W.; LI, X. Plant microbiome technology for sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024.

HART, R. 8 bilhões de humanos: quais são as previsões até 2030. **Forbes Brasil**, 2022.

HE, M.; CHEN, S.; MENG, L.; DAN, X.; WANG, W.; ZHU, Q.; CAI, Z.; ZHANG, J.; NARDI, P.; MÜLLER, C. Maize genotypes regulate the feedbacks between maize nitrogen uptake and soil nitrogen transformations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 188, p. 109251, 2024.

HEGDE, G. M.; PREMCHAND, U.; RAGHAVENDRA, M. **The potential of siderophores in biological control in plant diseases**. Asia Pacific Biofertilizer and Biopesticide Information Platform, 2025.

HERPELL, J. B.; ALICKOVIC, A.; DIALLO, B.; SCHINDLER, F.; WECKWERTH, W. Phyllosphere symbiont promotes plant growth through ACC deaminase production. **The ISME Journal**, v. 17, n. 8, p. 1267–1277, 2023.

HÖRDT, A.; LÓPEZ, M. G.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; SCHLEUNING, M.; WEINHOLD, L.-M.; TINDALL, B. J.; GRONOW, S.; KYRPIDES, N. C.; WOYKE, T.; GÖKER, M. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal**, v. 50, n. 3, p. 346–363, jun. 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense***: redução na adubação nitrogenada de cobertura e mitigação na emissão de gases de efeito estufa. 2022.

HUNGRIA, M.; RIBEIRO, R. A.; NOGUEIRA, M. A. Draft genome sequences of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for grasses and legumes in Brazil. **Genome Announcements**, v. 6, n. 20, p. e00393-18, 2018.

HUNGRIA, M.; RONDINA, A. B. L.; NUNES, A. L. P.; ARAUJO, R. S.; NOGUEIRA, M. A. Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. **Plant and Soil**, v. 463, n. 1, p. 171–186, 2021.

HWANG, B. K. *et al.* Isolation and antifungal activity of phenylacetic acid from *Streptomyces humidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3739–3745, 2001.

IKIZ, B.; DASGAN, H. Y.; GRUDA, N. S. Utilizing the power of plant growth promoting rhizobacteria on reducing mineral fertilizer, improved yield, and nutritional quality of Batavia lettuce in a floating culture. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 1616, 2024.

JACINTHO, H. **Como o Brasil se tornou líder mundial em bioinsumos**. 2022.

JALAL, A.; FURLANI JÚNIOR, E.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Interaction of zinc mineral nutrition and plant growth-promoting bacteria in tropical agricultural systems: a review. **Plants**, v. 13, n. 5, p. 571, 2024.

JALAL-UD-DIN, S.; ELAHI, N. N.; MUBEEN, F. Significance of zinc-solubilizing plant growth-promoting rhizobacterial strains in nutrient acquisition, enhancement of growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1446064, 2024.

JAN, M.; MUHAMMAD, S.; JIN, W.; ZHONG, W.; ZHANG, S.; LIN, Y.; ZHOU, Y.; LIU, J.; LIU, H.; MUNIR, R.; YUE, Q.; AFZAL, M.; WANG, G. Modulating root system architecture: cross-talk between auxin and phytohormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 2024.

JANK, L.; BARRIOS, S. C.; VALLE, C. B. do; SIMEÃO, R. M.; ALVES, G. F. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132–1137, 2014.

KAMATH, A.; SHARMA, A.; SHUKLA, A.; PARMAR, P.; PATEL, D. Fortifying plant fortresses: siderophores in defense against *Cercospora* leaf spot disease in *Vigna radiata* L. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2025.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **factoextra**: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7, 2020.

KHATUN, M. A.; HOSSAIN, M. M.; BARI, M. A.; ABDULLAHIL, K. M.; PARVEZ, M. S.; ALAM, M. F.; KABIR, A. H. Zinc deficiency tolerance in maize is associated with the up-regulation of Zn transporter genes and antioxidant activities. **Plant Biology**, v. 20, n. 4, p. 765–770, 2018.

KHOSRAVI, H. *et al.* Biofertilizers containing PGPR in Iran: progress and prospects. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 7, p. 100268, 2024.

KIM, K.-H.; LEE, B.-M. Effects of climate change and drought tolerance on maize growth. **Plants**, v. 12, n. 20, p. 3548, 2023.

KIM, Y. *et al.* Identification of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis*. **Current Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 312–317, 2004.

KRIECHBAUMER, V.; PARK, W. J.; PIOTROWSKI, M.; MEELEY, R. B.; GIERL, A.; GLAWISCHNIG, E. Maize nitrilases have a dual role in auxin homeostasis and beta-cyanoalanine hydrolysis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 15-16, p. 4225–4233, 2007.

KUNKEL, B. N.; LUDWIG-MÜLLER, J.; MA, K.-W. Editorial: The role of auxin in plant-microbe interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 2024.

KURT, P. O. Field-based evaluation of multi-strain PGPR to improve *Zea mays* yield and soil nutrient dynamics in semi-arid of Türkiye. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 22553, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-07643-w.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 529–533, 2002.

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

LEE, C.-Y.; HARPER, C. P.; LEE, S. G.; QI, Y.; CLAY, T.; AOI, Y.; JEZ, J. M.; KASAHARA, H.; BLODGETT, J. A. V.; KUNKEL, B. N. Investigating the biosynthesis and roles of the auxin phenylacetic acid during *Pseudomonas syringae*–*Arabidopsis thaliana* pathogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 2024.

LENTH, R. V.; PIASKOWSKI, J.; BANFAI, B.; BOLKER, B.; BUERKNER, P.; GINÉ-VÁZQUEZ, I.; HERVÉ, M.; JUNG, M.; LOVE, J.; MIGUEZ, F.; RIEBL, H.; SINGMANN, H. **Emmeans**: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. Versão 2.0.1. 2023.

LEUBA, V.; LETOURNEAU, D. Auxin activity of phenylacetic acid in tissue culture. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 9, n. 1, p. 71–76, 1990.

LI, A.; JIN, K.; ZHANG, Y.; et al. Root exudates and rhizosphere microbiota in responding to long-term continuous cropping of tobacco. **Scientific Reports**, London, v. 14, p. 11274, 2024.

LI, J.; TODD, J.; YU, Z. The production of dimethylsulfoniopropionate by bacteria with mmtN linked to non-ribosomal peptide synthase gene. **Environmental Technology**, v. 45, n. 24, p. 5016–5024, 2024.

LI, P.; LIU, J.; SALEEM, M.; LI, G.; LUAN, L.; WU, M.; LI, Z. Reduced chemodiversity suppresses rhizosphere microbiome functioning in the mono-cropped agroecosystems. **Microbiome**, v. 10, n. 1, p. 108, 2022.

LI, S.; WANG, H. Y.; ZHANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Z.; SHEN, R. F.; ZHU, X. F. Auxin is involved in cadmium accumulation in rice through controlling nitric oxide production and the ability of cell walls to bind cadmium. **Science of the Total Environment**, v. 904, p. 166644, 2023.

LIN, S.-Y.; HAMEED, A.; SHEN, F.-T.; LIU, Y.-C.; HSU, Y.-H.; SHAHINA, M.; LAI, W.-A.; YOUNG, C.-C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 6, p. 1149–1162, 2014.

LIU, K.; DENG, F.; ZENG, F.; CHEN, Z.-H.; QIN, Y.; CHEN, G. Plant growth-promoting rhizobacteria improve drought tolerance of crops: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 105, n. 3, p. 567–581, 2025.

LIU, Z.; HUANG, T.; SHI, Q.; DENG, Z.; LIN, S. Catechol siderophores framed on 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine from *Streptomyces varsoviensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

LOPES, L. D.; FUTRELL, S. L.; BERGMAYER, E.; HAO, J.; SCHACHTMAN, D. P. Root exudate concentrations of indole-3-acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) affect maize rhizobacterial communities at specific developmental stages. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 99, n. 3, 2023.

LUO, D.; SHI, J.; LI, M.; CHEN, J.; WANG, T.; ZHANG, Q.; YANG, L.; ZHU, N.; WANG, Y. Consortium of phosphorus-solubilizing bacteria promotes maize growth and changes the microbial community composition of rhizosphere soil. **Agronomy**, v. 14, n. 7, p. 1535, 2024.

MA, Y.; ZHANG, Y.; XU, J.; QI, J.; LIU, X.; GUO, L.; ZHANG, H. Research on the mechanisms of phytohormone signaling in regulating root development. **Plants**, v. 13, n. 21, p. 3051, 2024.

MACHADO, L. A. Z.; GARCIA, R. A.; CONCENÇO, G. **Estabelecimento de pastagem em consórcio com soja**. v. 54, 2023.

MACIEL-RODRÍGUEZ, M.; MORENO-VALENCIA, F. D.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. The role of plant growth-promoting bacteria in soil restoration: a strategy to promote agricultural sustainability. **Microorganisms**, v. 13, n. 8, p. 1799, 2025.

MARIANO, D. **Python para bioinformática**: fundamentos de programação para bioinformática e biologia computacional. São Paulo: Novatec Editora, 2025. 508 p.

MASHIGUCHI, K.; HISANO, H.; TAKEDA-KAMIYA, N.; *et al.* Agrobacterium tumefaciens enhances biosynthesis of two distinct auxins in the formation of crown galls. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 1, p. 29–37, 2019.

MAYER, A. M. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. **Nature**, v. 182, n. 4650, p. 1670–1671, 1958.

MENDES, G. O.; DA SILVA, N. M. R. M.; ANASTÁCIO, T. C.; *et al.* Solubilização de minerais fosfatados em função da concentração de ácidos orgânicos. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 930–939, 2015.

MENDIBURU, F. **Agricolae**: Statistical Procedures for Agricultural Research. Versão 1.3-7. 2023.

MILLER-FLEMING, L.; OLIN-SANDOVAL, V.; CAMPBELL, K.; RALSER, M. Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 21, p. 3389–3406, 2015.

MONNAPPA, A. K.; DWIDAR, M.; SEO, J. K.; HUR, J.-H.; MITCHELL, R. J. *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 3811, 2014.

MONTAGU, M. The future of plant biotechnology in a globalized and environmentally endangered world. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, p. e20190040, 2020.

MORRIS, D. A.; JOHNSON, C. F. Regulation of auxin transport in pea (*Pisum sativum* L.) by phenylacetic acid. **Planta**, v. 172, n. 3, p. 408–416, 1987.

MOVIMENTO ECONÔMICO. **Brasil é líder mundial em uso de biofertilizantes e biodefensivos**. 2024.

MUMTAZ, M. Z.; AHMAD, M.; ZAFAR-UL-HYE, M.; SAQIB, M.; AKHTAR, M. F. U. Z.; ZAHEER, M. S. Seed-applied zinc-solubilising *Bacillus* biofertilisers improve antioxidant enzyme activities, crop productivity, and biofortification of maize. **Crop & Pasture Science**, v. 73, n. 5, p. 503–514, 2022.

MUSAZADE, E.; MRISHO, I. I.; FENG, X. Auxin metabolism and signaling: integrating independent mechanisms and crosstalk in plant abiotic stress responses. **Plant Stress**, v. 18, p. 101034, 2025.

NAAMALA, J.; SMITH, D. L. Relevance of plant growth promoting microorganisms and their derived compounds, in the face of climate change. **Agronomy**, v. 10, n. 8, p. 1179, 2020.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 33, n. 11, p. 197, 2017.

OLIVEIRA, A. A.; TORRES, F. E.; SANTOS, É. F.; RODRIGUES, A. M.; SILVA, R. A.; SILVA, G. N.; GARCIA, F. P.; MAGRI, T. A. Nitrogênio e formas de aplicação de *Azospirillum brasilense* em milho cultivado em solo arenoso. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e56411335819, 2022.

OLIVEIRA, J. A.; LOURENÇO, F. M. S.; FEITOSA, D. G.; CERESINI, P. C.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Bioprospecção de bactérias solubilizadoras de fosfato em solos com diferentes fertilidades. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 45, n. 1, p. 271–286, 2024.

OLSON, R. D.; ASSAF, R.; BRETTIN, T.; *et al.* Introducing the bacterial and viral bioinformatics resource center (BV-BRC). *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D678–D689, 2023.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 7–8, 2018.

OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; SANTOYO, G.; GLICK, B. R. Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 606, 2023.

ORTEGA-ORTEGA, Y.; SARMIENTO-LÓPEZ, L. G.; BAYLÓN-PALOMINO, A.; *et al.* *Enterobacter* sp. DBA51 produces ACC deaminase and promotes plant growth under greenhouse condition. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 6, p. 100207, 2024.

ORTIZ-GARCÍA, P.; PÉREZ-ALONSO, M.-M.; GONZÁLEZ ORTEGA-VILLAIZÁN, A.; *et al.* The indole-3-acetamide-induced Arabidopsis transcription factor MYB74 decreases plant growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. **Journal of Visualized Experiments (JoVE)**, n. 47, p. 2437, 2011.

OWEN, D.; WILLIAMS, A. P.; GRIFFITH, G. W.; WITHERS, P. J. A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41–54, 2015.

PAN, L.; CAI, B. Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2904, 2023.

PANKIEVICZ, V. C. S.; DO AMARAL, F. P.; ANÉ, J.-M.; STACEY, G. Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 5, p. 491–498, 2021.

PAN, L.; CAI, B. Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2904, 2023.

PANG, Z.; CHEN, J.; WANG, T.; GAO, C.; LI, Z.; GUO, L. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 621276, 2021.

PANHWAR, Q. A.; JUSOP, S.; NAHER, U. A.; *et al.* Application of potential phosphate-solubilizing bacteria and organic acids on phosphate solubilization from phosphate rock in aerobic rice. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 272409, 2013.

PANTOJA-GUERRA, M.; VALERO-VALERO, N.; RAMIREZ, C. A. The auxin-like effect of substrate and auxin sensitivity of plant modulate the PGPR activity of *Lysinibacillus pinottii* sp. nov. PB211. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 165, 2024.

PAYET, R. D.; CARVALHO, M. S.; SMITH, A. G.; BULL, A. T.; GREEN, R. T.; LEE, H.; JOHNSON, M. P.; BROWN, S. D.; WALKER, B. J.; TODD, J. D. Elucidation of *Spartina* dimethylsulfoniopropionate synthesis genes enables engineering of stress tolerant plants. **Nature Communications**, v. 15, p. 8568, 2024.

PEDERSEN, T. L. **Patchwork**: The Composer of Plots. R package version 1.3.2.9000, 2025.

PEER, L. A.; BHAT, M. Y.; LONE, A. A.; DAR, Z. A.; MIR, B. A. Genetic, molecular and physiological crosstalk during drought tolerance in maize (*Zea mays*): pathways to resilient agriculture. **Planta**, v. 260, n. 4, p. 81, 2024.

PEREIRA, S. I. A.; ABREU, D.; MOREIRA, H.; VEGA, A.; CASTRO, P. M. L. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) melhoram o crescimento e a eficiência do uso de nutrientes no milho em condições de déficit hídrico. **Heliyon**, v. 6, n. 10, p. e05106, 2020.

PEREYRA, C. M.; DAL LAGO, C. C.; CREUS, C. M.; PEREYRA, M.; A. *Azospirillum baldaniorum* Sp245 inoculation affects cell wall and polyamine metabolism in cucumber roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 370, p. fnad005, 2023.

PEREZ, V. C.; ZHAO, H.; LIN, M.; KIM, J. Occurrence, function, and biosynthesis of the natural auxin phenylacetic acid (PAA) in plants. **Plants**, v. 12, n. 2, 2023.

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, R.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; FERNÁNDEZ, F. J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 1, p. 127–131, 2007.

PINC, M. M.; CIONE JUNIOR, D. A.; BAZZANELLA NETO, M.; POLLI, E.; DALMAGRO, M.; DONADEL, G.; OTÊNIO, J. K.; ALBERTON, O. Crescimento e nutrição da *Urochloa brizantha* cv. Marandu inoculada com bactéria promotora de crescimento vegetal e sob diferentes doses de nitrogênio. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e7309108925, 2020.

PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; SAAVEDRA-ROMÁN, G.; MORENO-VALENCIA, F. D.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A. The role of plant growth-promoting bacteria in soil restoration: a strategy to promote agricultural sustainability. **Preprints**, n. 2025040097, 2025.

PORTUGAL, J. R.; ARF, O.; PERES, A.; GITTI, D.; GARCIA, N. F. Coberturas vegetais, doses de nitrogênio e inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho no Cerrado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 4, 2017.

POSIT TEAM. **RStudio**: Integrated Development Environment for R. Boston, MA: Posit Software, PBC, 2025.

PRABHU, N.; BORKAR, S.; GARG, S. Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. In: MEENA, S. N.; NAIK, M. M. (org.). **Advances in Biological Science Research**. Academic Press, 2019. p. 161–176.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Versão 4.5.2. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025.

RADHAKRISHNAN, N.; KRISHNASAMY, C. Isolation and characterization of salt-stress-tolerant rhizosphere soil bacteria and their effects on plant growth-promoting properties. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 24909, 2024.

RATHOR, P.; UPADHYAY, P.; ULLAH, A.; GORIM, L. Y.; THILAKARATHNA, M. S. Humic acid improves wheat growth by modulating auxin and cytokinin biosynthesis pathways. **AoB Plants**, v. 16, n. 2, p. pla018, 2024.

REGENT INSTRUMENTS. **WinRHIZO Pro**: image analysis system for root measurement. Versão 2016a. Quebec: Regent Instruments Inc., 2016.

REHAN, M.; ALHARBI, S. A.; ABDELRAHMAN, M.; ALI, A. M.; IBRAHIM, M. F. M.; EL-ESAWI, M. A. Performance of plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from sandy soil on growth of tomato. **Plants**, v. 12, n. 8, p. 1588, 2023.

REIS, V. M.; ALVES, B. J. R.; HARTMANN, A.; JAMES, E. K.; ZILLI, J. E. Beneficial microorganisms in agriculture: the future of plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 1–3, 2020.

RÍOS-RUIZ, W. F.; TARRILLO-CHUJUTALLI, R. E.; ROJAS-GARCÍA, J. C.; TUANAMA-REÁTEGUI, C.; POMPA-VÁSQUEZ, D. F.; ZUMAETA-ARÉVALO, C. A. The biotechnological potential of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) cultivations in the San Martin region, Peru. **Plants**, v. 13, n. 15, p. 2075, 2024.

ROCHA, E. C.; TERRA, A. B. C.; OLIVEIRA, T. E.; ARAÚJO, B. A.; SILVA, N. C. D.; REZENDE, A. V.; FLORENTINO, L. A. Utilização de bactérias diazotróficas associativas em áreas de pastagens: alternativa para mitigação dos gases do efeito estufa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e20911527939, 2022.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 302, n. 1, p. 249–261, 2008.

RODRIGUES, F. J.; BARCAROL, M. A.; ADAMS, C. R.; KLEIN, C.; BERWANGER, A. L. Eficiência agrônômica da cultura do milho sob diferentes fontes de nitrogênio em cobertura. **Uniciências**, v. 22, n. 2, p. 66–70, 2018.

ROSOLEM, C. A.; STEINER, F. Effects of soil texture and rates of K input on potassium balance in tropical soil. **European Journal of Soil Science**, v. 68, n. 5, p. 658–666, 2017.

SAHA, R.; SAHA, N.; DONOFRIO, R. S.; BESTERVELT, L. L. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013.

SAMAVAT, S.; VOZHDEHNAZARI, M. S.; KENESHLOO, F.; ZARE, A. G.; ALIABADI, A. A.; NOSRATABAD, A. F.; SHIRAZI, Z. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance phosphorus uptake and growth in *Populus nigra* under P-deficient soils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 136, n. 12, p. 1xaf306, 2025.

SANAEI, A.; VAN DER PLAS, F.; CHEN, H.; DAVIDS, S.; ECKHARDT, S.; HENNECKE, J.; KAHL, A.; MÖLLER, Y.; RICHTER, R.; SCHÜTZE, J.; WIRTH, C.; WEIGELT, A. Tree growth is better explained by absorptive fine root traits than by transport fine root traits. **Communications Biology**, v. 8, n. 1, p. 313, 2025.

SÁNCHEZ-PARRA, B.; FRERIGMANN, H.; PÉREZ-ALONSO, M.-M.; *et al.* Characterization of four bifunctional plant IAM/PAM-amidohydrolases capable of contributing to auxin biosynthesis. **Plants**, v. 3, n. 3, p. 324–347, 2014.

SANT'ANNA, F. H.; ALMEIDA, L. G. P.; CECAGNO, R.; *et al.* Genomic insights into the versatility of *Azospirillum amazonense*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 409, 2011.

SANTOS, A. F. J. *et al.* Cacti-associated rhizobacteria from Brazilian Caatinga biome induce maize growth promotion and alleviate abiotic stress. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 15, n. 3, e8221, 2020.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 205, 2019.

SANTOS-TORRES, M.; ROMERO-PERDOMO, F.; MENDOZA-LABRADOR, J.; GUTIÉRREZ, Angelica Y.; VARGAS, C.; CASTRO-RINCON, E.; CARO-QUINTERO, A.; URIBE-VELEZ, D.; ESTRADA-BONILLA, G. A. Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. **Rhizosphere**, v. 17, p. 100290, 2021.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282–285, 1995.

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 1, p. 25–41, 2018.

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLEY, L.; BURMØLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.

SCHEIDT, W.; PEDROZA, I. C. P.; FONTANA, J.; MELEIRO, L. A. C.; SOARES, L. H. B.; REIS, V. M. Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology. **Plant and Soil**, v. 451, p. 75–87, 2019.

SCHNEIDER, E. A.; KAZAKOFF, C. W.; WIGHTMAN, F. Gas chromatography-mass spectrometry evidence for endogenous auxins in pea seedlings. **Planta**, v. 165, n. 2, p. 232–241, 1985.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 407–414, 2014.

SCHWAB, S.; HIRATA, E. S.; AMARAL, J. C. A.; SILVA, C. G. N. da; FERREIRA, J. P.; SILVA, L. V.; ROUWS, J. R. C.; ROUWS, L. F. M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Quantifying and visualizing *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC in sugarcane after using different inoculation methods. **Plant and Soil**, v. 488, n. 1, p. 197–216, 2023.

SCHWAB, S.; TERRA, L. A.; BALDANI, J. I. Genomic characterization of *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC, a nitrogen-fixing bacterium isolated from surface-sterilized sugarcane stems. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 293, n. 4, p. 997–1016, 2018.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for siderophore detection. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.

SHAHID, M.; FARAH, M. A.; AL-ANAZI, K. M.; KOOLMAN, L. Zinc-based amendments and Zn-solubilizing beneficial bacteria mitigate lead-induced toxicity in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 2025.

SHAHZAD, A.; SIDDIQUE, A.; FERDOUS, S.; AMIN, M. A.; QIN, M.; ASLAM, U.; NAEEM, M.; BASHIR, T.; SHAKOOR, A. Heavy metals mitigation and growth promoting effect of endophytic *Agrococcus terreus* in maize plants under zinc and nickel contaminated soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

SETHI, G.; BEHERA, K. K.; SAYYED, R.; *et al.* Enhancing soil health and crop productivity: the role of zinc-solubilizing bacteria. *Plant Growth Regulation*, v. 105, n. 3, p. 601–617, 2025.

SICA, P. S.; SHIRATA, E. S.; RIOS, F. A.; BIFFE, D. F.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; ESTRADA, K. R. F. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. S. Impact of N-fixing bacterium *Nitrospirillum amazonense* on quality and quantitative parameters of sugarcane under field condition. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 12, p. 1870–1875, 2020.

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 3, p. 317–329, 2010.

SINGH, A. P.; KANWAR, R.; PANDEY, A. K. **Jasmonates regulate auxin-mediated root growth inhibition in response to rhizospheric pH in *Arabidopsis***. bioRxiv, Seção New Results, p. 2023.08.22.554241, 22 ago. 2023.

SINGH, R.; MONNAPPA, A. K.; HONG, S.; MITCHELL, R. J.; JANG, J. Effects of carbon dioxide aerosols on the viability of *Escherichia coli* during biofilm dispersal. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 13766, 2015.

SILVA, A. P. L.; SILVA, L. F. C.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Initial growth response of twelve *Saccharum* Complex genotypes to inoculation using *Nitrospirillum viridazoti*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 49, 2025.

SILVA, F. C.; RODRIGUES, V. A.; SANTOS, B. R.; RIBEIRO, V. P.; BINI, D.; SOUZA, F. F.; SANTOS, F. C.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A. **Efeitos de métodos de aplicação do inoculante composto por bactérias solubilizadoras de fosfato na produção e nutrição do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2024. 11 p.

SILVA, S. Y. A. M.; ZILLI, J. É.; LISBOA, F. M.; ALVES, G. C.; ZATORRE, N. P.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; RIBEIRO, S. A.; SILVA, C. S. R. A.; SILVA, A. P. L.; ALVES, B. J. R. Evidence of the role of plant growth-promoting bacteria in mitigating N₂O emissions from maize cultivation. **Agronomy**, v. 15, n. 12, p. 2856, 2025.

SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; *et al.* Azospirillum brasilense produces phenylacetic acid using the key enzyme for IAA biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1803–1810, 2005.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.

SRITHAWORN, M.; JAROENTHANYAKORN, J.; TANGJITJAROENKUN, J.; *et al.* Zinc solubilizing bacteria and their potential as bioinoculant. **PeerJ**, v. 11, p. e15128, 2023.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium associated with grasses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.

STRÖM, L.; OWEN, A. G.; GODBOLD, D. L.; JONES, D. L. Organic acid behaviour in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 15, p. 2125–2133, 2001.

SWARNAKAR, S.; CHAKRABORTY, A. P. *Bacillus pumilus*: a potent IAA producing plant growth-promoting rhizobacteria with in vitro PGP traits and antagonism against *Fusarium equiseti*. **Discover Plants**, v. 2, n. 1, p. 183, 2025.

SUGAWARA, S.; MASHIGUCHI, K.; TANAKA, K.; *et al.* Distinct characteristics of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 8, p. 1641–1654, 2015.

SUN, H.; ZHANG, J.; LIU, W.; *et al.* Identification and engineering of indole-3-acetic acid pathways in *Paenibacillus polymyxa*. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 81, 2022.

TABASSUM, N.; SHAFIQ, M.; FATIMA, S.; TAHIR, S.; TABASSUM, B.; ALI, Q.; JAVED, M. A. Genome-wide in silico analysis of ethylene biosynthesis gene family in *Musa acuminata* L. and their response under nutrient stress. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 558, 2024.

TANG, J.; LI, Y.; ZHANG, L.; MU, J.; JIANG, Y.; FU, H.; ZHANG, Y.; CUI, H.; YU, X.; YE, Z. Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms. **Microorganisms**, Basel, v. 11, n. 8, p. 2077, 2023.

TARIQ, H.; SUBRAMANIAN, S.; GEITMANN, A.; SMITH, D. L. *Bacillus* and *Paenibacillus* as plant growth-promoting bacteria in soybean and cannabis. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, 2025.

TIMOFEEVA, A. M.; GALYAMOVA, M. R.; SEDYKH, S. E. Bacterial siderophores: classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3065, 2022.

UPADHYAY, V. K.; GANGOLA, S.; TAJ, G.; GAURAV, K.; RANI, A.; KUMAR, S.; GARG, S.; GUPTA, G.; ALI, H.; SIDDIQUI, S.; ALAMRI, S. A. M.; MITTAL, A.; ALRUMMAN, S. A.; PANDEY, M. Zinc-solubilizing bacterial consortia: a promising approach for zinc biofortification of crops. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 2025.

VALENTE LIMA, J.; TINOCO, R. S.; OLIVARES, F. L.; CHIA, G. S.; MELO JÚNIOR, J. A. G.; SILVA, G. S. Rhizobacteria modify root architecture and improve nutrient uptake in oil palm seedlings despite reduced fertilizer. **Rhizosphere**, v. 19, p. 100420, 2021.

VORONTSOVA, M.S. Revision of some Malagasy forage grasses and their relatives within *Brachiaria*, *Echinochloa*, *Moorochloa* and *Urochloa*. **Candollea**, v. 77, n. 2, p. 199–236, 2022.

VORWERK, S.; BIERNACKI, S.; HILLEBRAND, H.; JANZIK, I.; MÜLLER, A.; WEILER, E. W.; PIOTROWSKI, M. Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3 gene cluster. **Planta**, Berlin, v. 212, n. 4, p. 508–516, 2001.

VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13–24, 2016.

WANG, L.; CHEN, Y.; NIU, D.; TANG, M.; AN, J.; XUE, S.; LIU, X.; GAO, H. Improvements for tissue-chopping-based immunofluorescence staining method of chloroplast proteins. **Plants**, v. 12, n. 4, p. 841, 2023.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. 2. ed. Cham: Springer, 2016.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. New York, NY: Springer New York, 2009.

WICKHAM, H.; AVERICK, M.; BRYAN, J.; CHANG, W.; D'AGOSTINO MC GOWAN, L.; FRANÇOIS, R.; GROLEMUND, G.; HAYES, A.; HENRY, L.; HESTER, J.; KUHN, M.; LIN, P. T.; MILLER, E.; MILTON BACHE, S.; MÜLLER, K.; OOMS, J.; ROBINSON, D.; SEIDEL, D.; SPINU, V.; TAKAHASHI, K.; VAUGHAN, D.; WILKE, C.; WOO, K.; YUTANI, H. Welcome to the tidyverse. **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p. 1686, 2019.

WICKHAM, H.; FRANÇOIS, R.; HENRY, L.; MÜLLER, K.; VAUGHAN, D. **dplyr**: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.2.0. 2023a.

WICKHAM, H.; FRANÇOIS, R.; HENRY, L.; MÜLLER, K.; VAUGHAN, D. **dplyr**: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.4, 2023b.

WICKHAM, H.; VAUGHAN, D.; GIRLICH, M. **tidyr**: Tidy Messy Data. R package version 1.3.2, 2025.

WIGHTMAN, F.; LIGHTY, D. L. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 55, n. 1, p. 17–24, 1982.

WILKE, C. O. **cowplot**: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for “ggplot2”. Versão 1.2.0. 2020.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; LOZANO, L.; ACOSTA-CRUZ, E.; *et al.* Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497. **Genes**, v. 3, n. 4, p. 576–602, 2012.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, n. 5, p. 707–735, 2005.

XIE, B.; WEI, X.; WAN, C.; ZHAO, W.; SONG, R.; XIN, S.; SONG, K. Exploring the biological pathways of siderophores and their multidisciplinary applications: a comprehensive review. **Molecules**, v. 29, n. 10, p. 2318, 2024.

XIE, X.; XU, Z.; GAN, L.; *et al.* Simultaneous phosphate solubilization by *Staphylococcus succinus* under saline-alkali conditions. **Microbiology Spectrum**, v. 13, n. 9, p. e00490-25, 2025.

YAADESH, S.; TOMAR, G. S.; KAUSHIK, R.; *et al.* *Azospirillum*–*Bacillus* associations and synergistic effects on pearl millet. **3 Biotech**, v. 13, n. 3, p. 90, 2023.

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1059–1065, 2008.

ZAID, D. S.; CAI, S.; HU, C.; *et al.* Comparative genome analysis of *Bacillus velezensis* HNA3. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, p. e02169-21, 2022.

ZHALNINA, K.; LOUIS, P.; DE ANGELIS, K. M. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 470–480, 2018.

ZHANG, C.; ZHEN, Y.; WENG, Y.; *et al.* Microbial metabolism and transport of polyamines. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 57, 2025.

ZHANG, S.; DENG, Z.; BORHAM, A.; *et al.* Significance of soil siderophore-producing bacteria in crop yield. **Horticulturae**, v. 9, n. 3, p. 370, 2023.

ZHANG, T.; JIAN, Q.; YAO, X.; GUAN, L.; LI, L.; LIU, F.; ZHANG, C.; LI, D.; TANG, H.; LU, L. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and quality of several crops. **Heliyon**, v. 10, n. 10, e31553, 2024.

ZHANG, Y.; WANG, E.; FENG, B.; XU, L.; XUE, Y.; CHEN, Y. Siderophore production capability of nitrogen-fixing bacterium GXGL-4A regulates cucumber rhizosphere soil microecology. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 346, 2025.

ZHAO, X.; SHI, Z.; HE, F.; *et al.* Benzoxazinoids biosynthetic gene cluster in maize. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 7460, 2024.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 49–64, 2010.

ZHENG, Y.; WANG, J.; ZHOU, S.; ZHANG, Y.; LIU, J.; XUE, C.-X.; WILLIAMS, B. T.; ZHAO, X.; ZHAO, L.; ZHU, X.-Y.; SUN, C.; ZHANG, H.-H.; XIAO, T.; YANG, G.-P.; TODD, J. D.; ZHANG, X.-H. Bacteria are important dimethylsulfoniopropionate producers in marine aphotic and high-pressure environments. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4658, 2020.

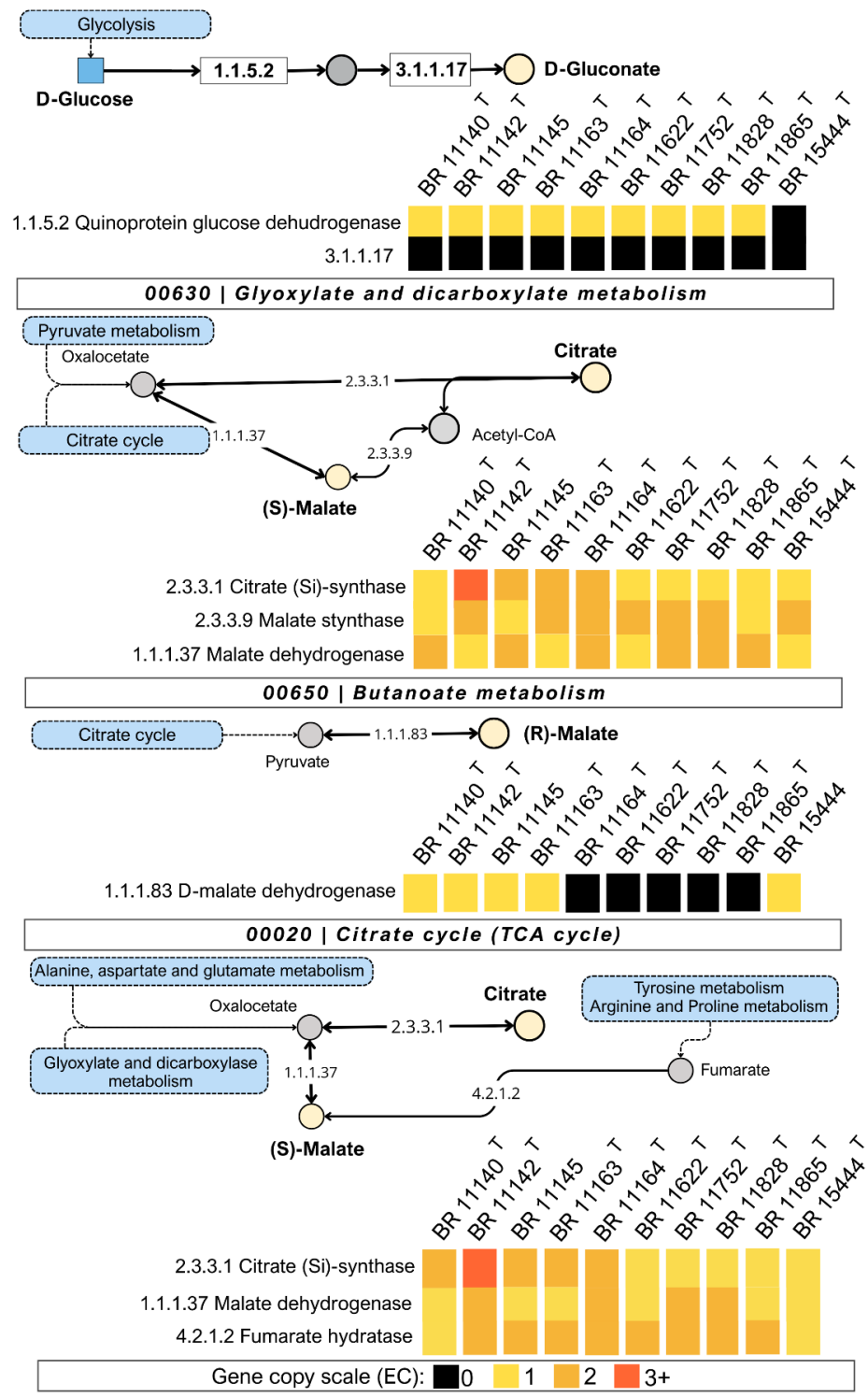
ZHOU, J.; XU, M. Comparative genomics of maize: insights into evolution and function. **Maize Genomics and Genetics**, v. 15, 2024.

ZHOU, S.; RICHTER, A.; JANDER, G. Beyond defense: multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 8, p. 1528–1537, 2018.

ZILLI, J. É.; REIS JÚNIOR, F. B. Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. In: REUNIÃO DA RELARE 19, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: RELARE, 2019. p. 100. 2019.

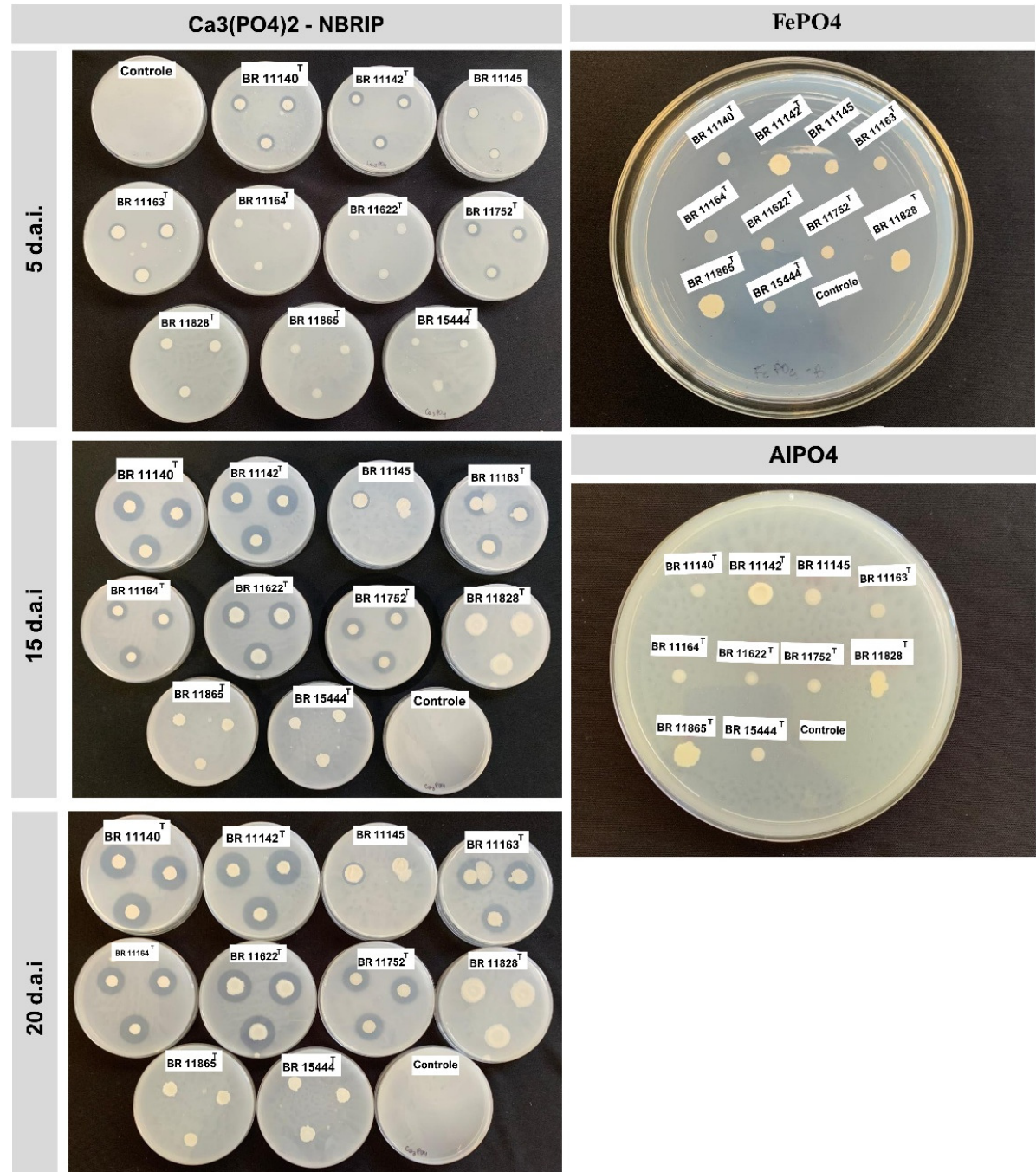
APÊNDICES

APÊNDICE A – HEATMAPS METABÓLICOS COMPLEMENTARES PARA FORMAÇÃO ÁCIDOS ORGÂNICOS



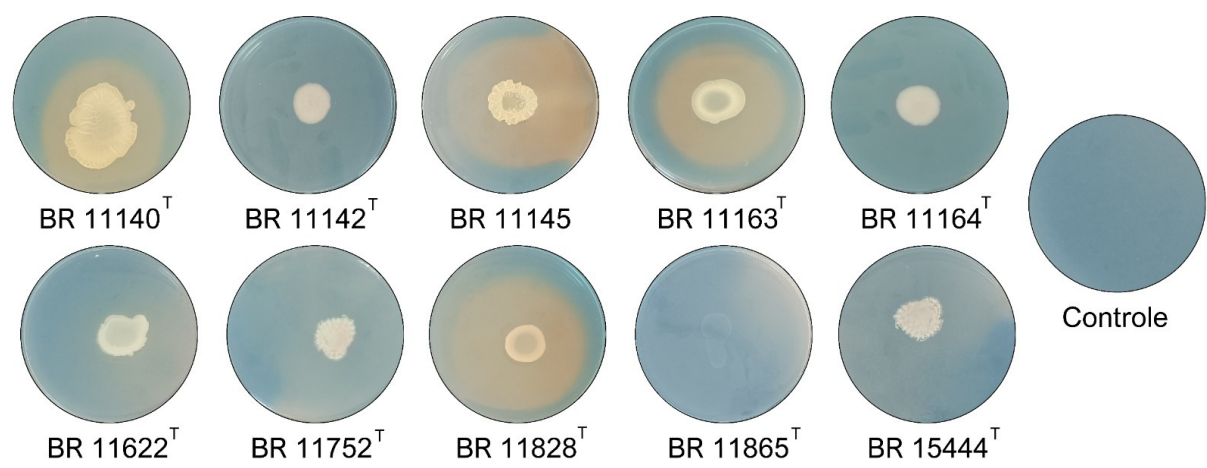
Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE B – PLACAS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FONTES FOSFATADAS



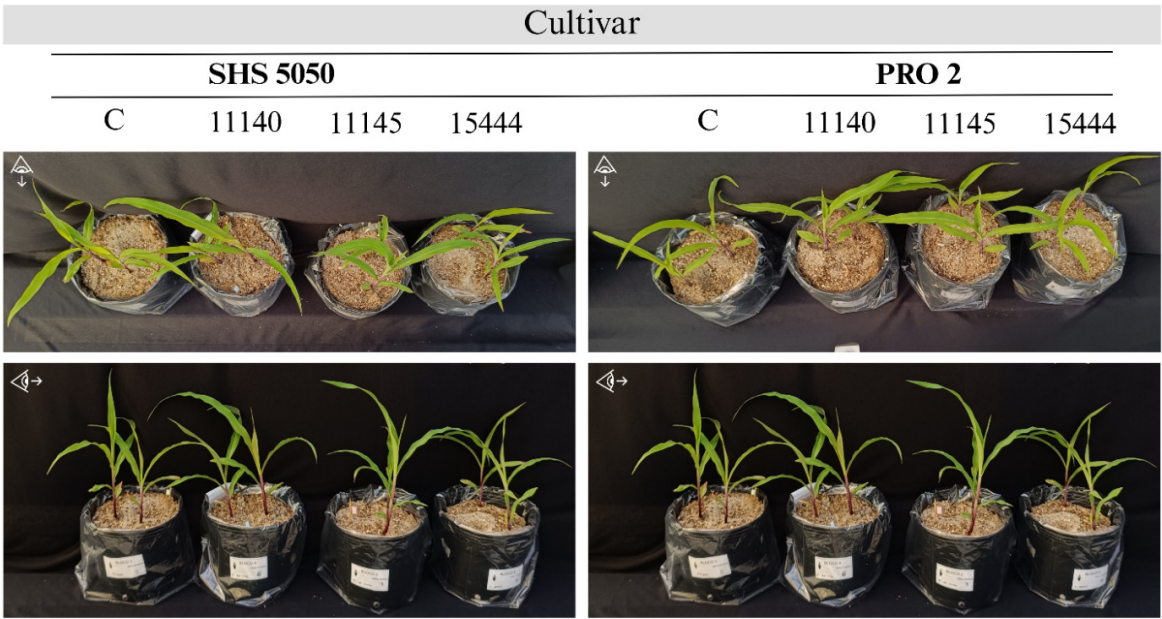
Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE C – PLACAS DE PRODUÇÃO E SIDERÓFOROS



Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE D – CULTIVARES DE PLANTAS DE MILHO HÍBRIDO DO EXPERIMENTO I SOB 30 DIAS DE CONDUÇÃO

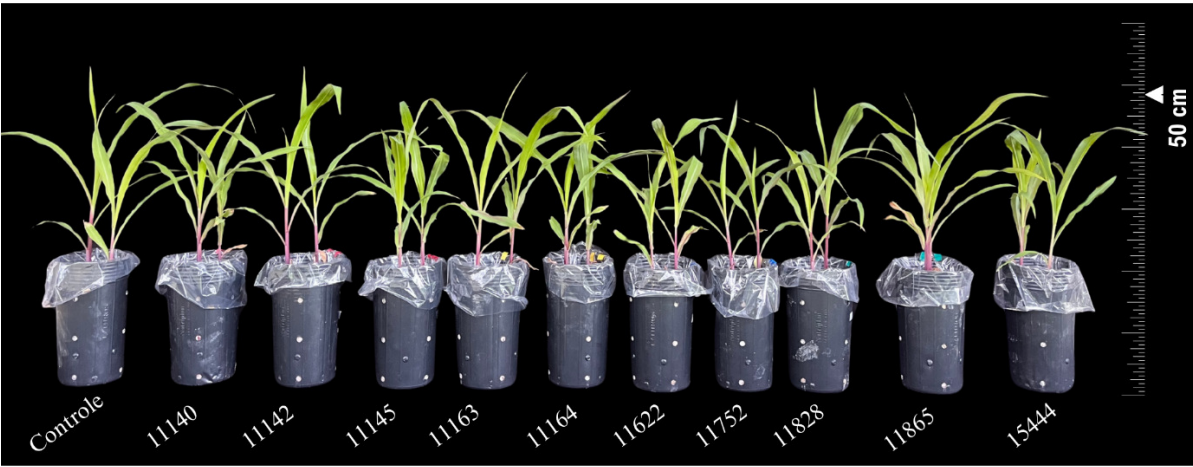


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Sistema radicular das Cultivares de Plantas de Milho híbrido do Experimento I sob 31 dias de condução

Cultivar							
SHS 5050				PRO 2			
C	11140	11145	15444	C	11140	11145	15444
							

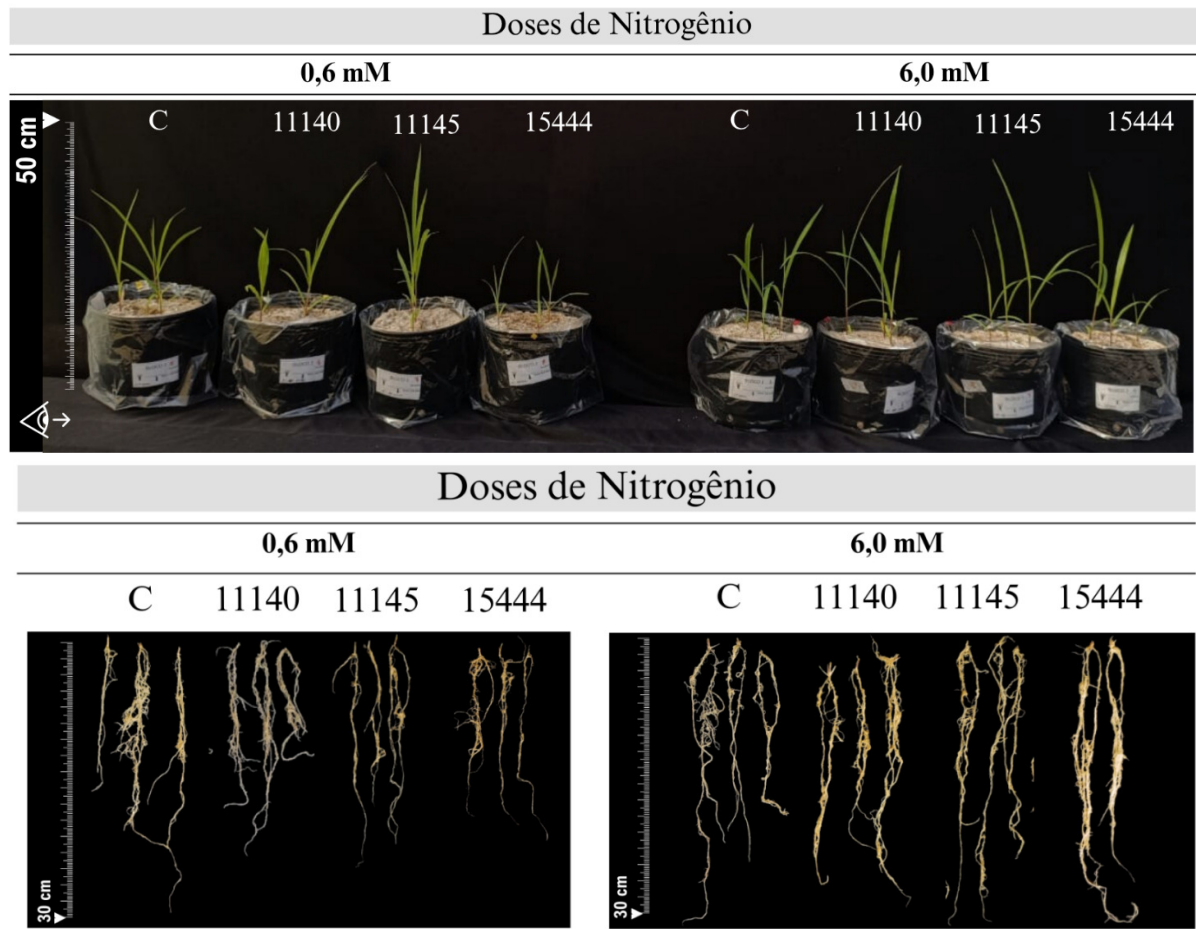
APÊNDICE E – PLANTAS DE MILHO (SHS 5050) INOCULADAS COM ESTIRPES DO GÊNERO *NITROSPIRILLUM* SOB 40 DIAS DE CONDUÇÃO – EXPERIMENTO II



Fonte: Elaborado pelo Autor.

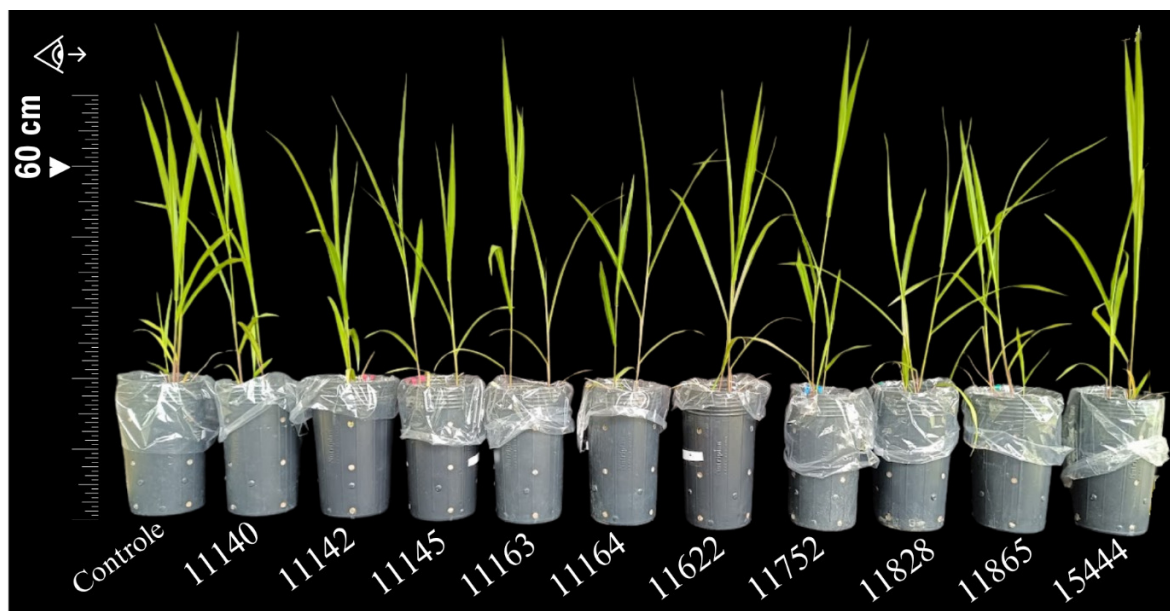
APÊNDICE F – PLANTAS DE BRAQUIÁRIA SOB DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO COM 40 DIAS DE CONDUÇÃO – EXPERIMENTO III

Sistema radicular das cultivares de plantas de Braquiária do Experimento III sob 40 dias de condução



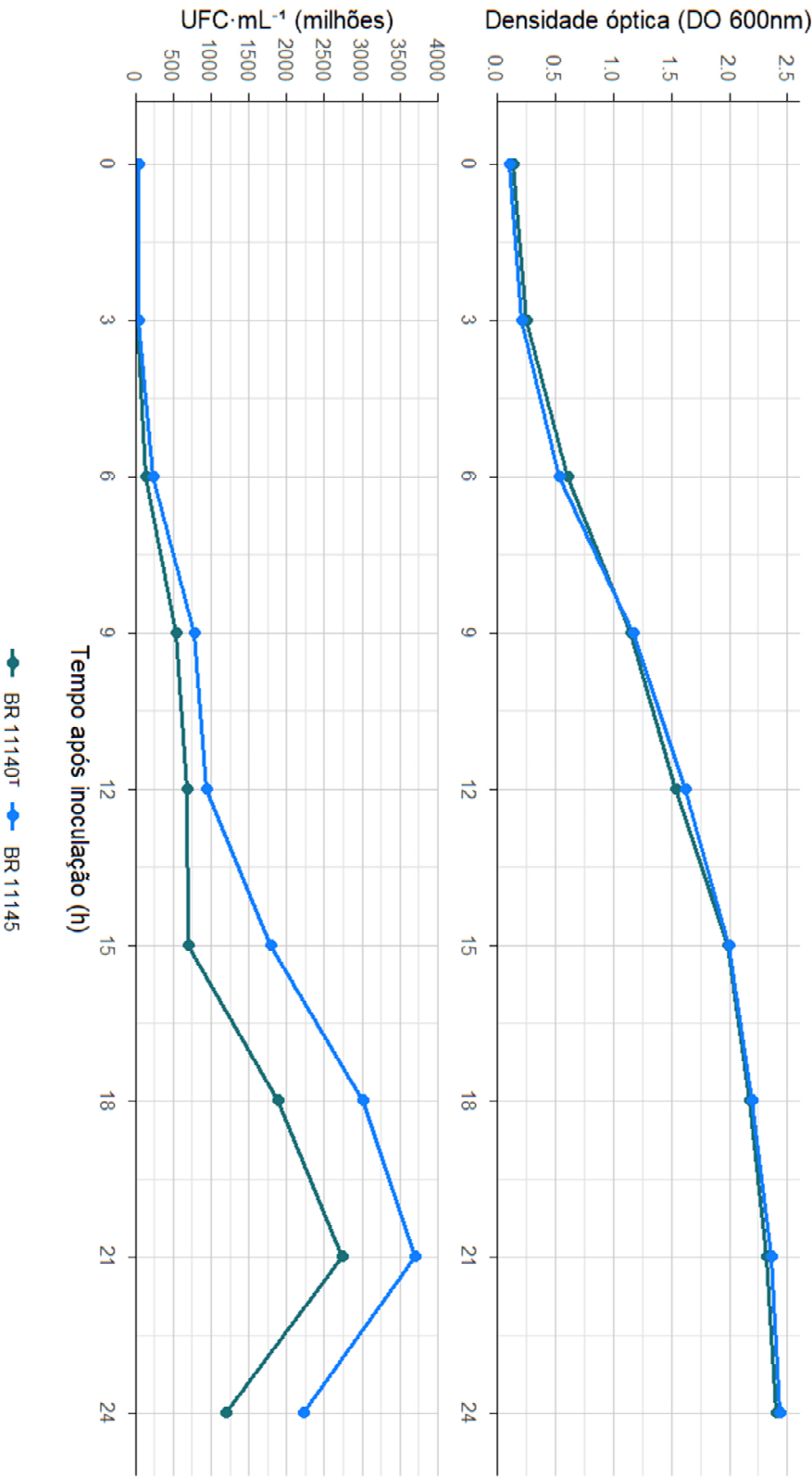
Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE G – PLANTAS DE BRAQUIÁRIA INOCULADAS COM ESTIRPES DO GÊNERO *NITROSPIRILLUM* SOB 44 DIAS DE CONDUÇÃO – EXPERIMENTO IV



Fonte: Elaborado pelo Autor.

APÊNDICE H – CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *NITROSPIRILLUM* SPP. BR 11140^T E BR 11145 EM MEIO BPSACAROSE



Fonte: Elaborado pelo Autor.