



EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E A SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *BACILLUS VELEZENSIS* UPF-1

Elisandra M. Pimentel¹; Jorge A. V. Costa¹; Luciane M. Colla¹; Aline Dettmer¹

¹Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Passo Fundo, RS, Brasil.
139442@upf.br.

Palavras-Chave: Fósforo solúvel, ácidos orgânicos, nutrição vegetal.

Introdução

A agricultura contemporânea enfrenta o desafio de ampliar a produção de alimentos em um cenário de crescimento populacional, limitação de recursos naturais, degradação dos solos e maior ocorrência de condições ambientais adversas. Embora fertilizantes minerais sejam essenciais para sustentar a produtividade agrícola, seu uso intensivo ou pouco eficiente pode elevar os custos de produção e contribuir para perdas de nutrientes e impactos ambientais. Nesse contexto, o manejo biológico baseado na utilização de microrganismos benéficos apresenta-se como uma estratégia complementar para promover sistemas agrícolas mais eficientes, sustentáveis e resilientes (Wang *et al.*, 2025; Knežević *et al.*, 2025).

Os microrganismos promotores de crescimento de plantas atuam por diferentes mecanismos, incluindo a síntese de fitormônios, a fixação biológica de nitrogênio, a produção de sideróforos, o antagonismo a fitopatógenos e a transformação de nutrientes pouco disponíveis em formas assimiláveis pelas plantas. Entre esses mecanismos, destaca-se a solubilização de fosfatos, processo que pode aumentar a disponibilidade de fósforo e favorecer seu aproveitamento pelas culturas, contribuindo para maior eficiência no uso de fertilizantes fosfatados (Sebastian *et al.*, 2021; Shahid *et al.*, 2021; Pan; Cai, 2023).

O fósforo é um macronutriente essencial ao metabolismo vegetal, participando de processos como transferência de energia, fotossíntese, constituição de membranas e síntese de ácidos nucleicos. Apesar de sua importância, apenas uma fração do fósforo total presente no solo permanece em formas prontamente assimiláveis, pois os íons fosfato podem ser adsorvidos às partículas minerais ou precipitados com cátions. Em solos ácidos, sua disponibilidade é frequentemente limitada pela associação com ferro e alumínio, enquanto, em condições de maior alcalinidade, pode ocorrer a formação de fosfatos de cálcio pouco solúveis (Mosela *et al.*, 2022; Vitorino *et al.*, 2024).

A solubilização microbiana de fosfatos inorgânicos ocorre principalmente pela produção de ácidos orgânicos e pela liberação de prótons durante o metabolismo celular. A redução do pH, associada à quelação ou complexação dos cátions ligados ao fosfato, como Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , desloca o equilíbrio químico e favorece a liberação de fósforo para a fase solúvel (Pan; Cai, 2023). A eficiência da solubilização de fosfato varia entre linhagens microbianas e é influenciada por fatores como composição do meio, fontes de nutrição, pH e tempo de cultivo, que também podem modificar o crescimento e a atividade metabólica das células (Pan; Cai, 2023; Wang *et al.*, 2023).



Entre os microrganismos de interesse agrícola, espécies do gênero *Bacillus* destacam-se pela capacidade de formar endósporos, sobreviver a condições ambientais adversas e produzir metabólitos relacionados à promoção do crescimento vegetal. *Bacillus velezensis* apresenta características promissoras para o desenvolvimento de inoculantes microbianos, incluindo capacidade de crescimento em diferentes meios e a solubilização de fontes inorgânicas de fosfato (Mosela *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2025; Vitorino *et al.*, 2024). A aplicação tecnológica desse microrganismo depende da definição de condições que promovam tanto a solubilização de fosfato quanto a manutenção da viabilidade celular.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da composição do meio e do pH inicial sobre o crescimento celular e a solubilização de fosfato por *Bacillus velezensis* UPF-1, visando identificar condições que conciliem crescimento celular satisfatório e liberação de fósforo solúvel no meio.

Material e Métodos

Foram avaliados dois meios de cultivo previamente selecionados para *Bacillus velezensis* UPF-1. O meio 1 foi composto por sacarose e extrato de levedura, nas concentrações de 8,67 e 7,83 g·L⁻¹, respectivamente, enquanto o meio 2 foi composto por glicerol e extrato de levedura, nas concentrações de 11,30 e 5,85 g·L⁻¹, respectivamente. O experimento foi conduzido em delineamento fatorial completo 2 x 2, constituído pelos dois meios de cultivo e pelos valores de pH inicial 6,0 e 7,0, com coletas após 24, 48 e 72 h de cultivo.

O meio basal foi composto por MgSO₄ (0,5 g·L⁻¹), KCl (0,3 g·L⁻¹) e NaCl (0,2 g·L⁻¹), acrescido das respectivas fontes nutricionais selecionadas e respectivas concentrações. Após o ajuste do pH, os meios foram esterilizados a 121 °C por 20 min. A solução de L-triptofano foi preparada separadamente, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm e adicionada assepticamente ao meio após o resfriamento, na concentração final de 0,3 g·L⁻¹. O fosfato tricálcico [Ca₃(PO₄)₂], utilizado como fonte insolúvel de fósforo, foi adicionado na concentração de 5 g·L⁻¹ após exposição à radiação ultravioleta por 40 min, em camada fina e sob condições assépticas.

Os meios foram inoculados com 1% (v/v) de pré-inóculo padronizado de *B. velezensis* UPF-1, correspondente a aproximadamente 10⁷ UFC·mL⁻¹, e incubados a 28 °C e 170 rpm em agitador orbital (Marconi, MA 420-PLAT/MISTA). Após 24, 48 e 72 h, foram coletadas amostras para determinação do crescimento celular e do fósforo solúvel. O crescimento celular foi avaliado por contagem de unidades formadoras de colônia, e os resultados foram expressos em log₁₀ UFC·mL⁻¹.

Para a quantificação do fósforo solúvel, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante analisado pelo método colorimétrico de Murphy e Riley (1962). A absorbância foi determinada a 880 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Biospectro, SP-22), e a concentração foi calculada por curva padrão de KH₂PO₄ (R² = 0,9955), sendo os resultados expressos em mg·L⁻¹. Controles não inoculados, preparados e incubados nas mesmas condições, foram utilizados para corrigir a contribuição de fósforo solúvel proveniente dos componentes do meio.

Os ensaios foram realizados em duplicata, e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Em cada tempo de coleta, os dados foram submetidos separadamente à análise de variância, considerando os efeitos do meio de cultivo, do pH inicial e da interação

entre esses fatores sobre o crescimento celular e a concentração de fósforo solúvel. Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A influência dos meios 1 e 2 e dos valores de pH inicial sobre o crescimento celular e a solubilização de fosfato por *Bacillus velezensis* UPF-1 foi avaliada após 24, 48 e 72 h de cultivo. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Crescimento celular e concentração de fósforo solúvel de *Bacillus velezensis* UPF-1 em função do meio de cultivo, do pH inicial e do tempo de incubação.

Meio de cultivo	pH inicial	Tempo (h)	Crescimento celular ($\log_{10}$ UFC $\cdot$ mL $^{-1}$)	Fósforo solúvel (mg $\cdot$ L $^{-1}$)
Meio 1	6,0	24	8,13 $\pm$ 0,06	205,00 $\pm$ 1,85
Meio 1	6,0	48	8,04 $\pm$ 0,06	212,26 $\pm$ 2,67
Meio 1	6,0	72	7,87 $\pm$ 0,04	233,46 $\pm$ 2,67
Meio 1	7,0	24	8,24 $\pm$ 0,04	155,46 $\pm$ 4,11
Meio 1	7,0	48	8,07 $\pm$ 0,04	216,72 $\pm$ 2,46
Meio 1	7,0	72	7,94 $\pm$ 0,02	222,10 $\pm$ 3,08
Meio 2	6,0	24	8,98 $\pm$ 0,02	162,68 $\pm$ 5,95
Meio 2	6,0	48	8,16 $\pm$ 0,02	200,28 $\pm$ 11,50
Meio 2	6,0	72	7,99 $\pm$ 0,02	224,82 $\pm$ 1,85
Meio 2	7,0	24	9,02 $\pm$ 0,03	168,16 $\pm$ 2,46
Meio 2	7,0	48	8,16 $\pm$ 0,02	181,08 $\pm$ 10,06
Meio 2	7,0	72	8,04 $\pm$ 0,06	189,50 $\pm$ 1,03

Fonte: Autores, 2026.

Nota: Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão de duplicatas. Meio 1: sacarose e extrato de levedura, nas concentrações de 8,67 e 7,83 g $\cdot$ L $^{-1}$, respectivamente; Meio 2: glicerol e extrato de levedura, nas concentrações de 11,30 e 5,85 g $\cdot$ L $^{-1}$, respectivamente.

Os resultados indicaram comportamentos distintos entre as duas respostas avaliadas. O meio 2 favoreceu o crescimento celular, especialmente nas primeiras 24 h, enquanto o meio 1 apresentou melhor desempenho para a solubilização de fosfato. Ao longo das avaliações, observou-se redução do crescimento celular e aumento da concentração de fósforo solúvel na maioria das condições, comportamento compatível com a continuidade da atividade metabólica após a fase de crescimento mais expressiva e com a transição da cultura para a fase estacionária (Madigan *et al.*, 2016).

O pH inicial também influenciou a resposta de solubilização, com tendência de maiores concentrações de fósforo solúvel em pH 6,0, principalmente após 72 h. Esse comportamento é compatível com a maior dissolução do fosfato tricálcico em condições mais ácidas. No entanto, a condição que proporcionou maior crescimento celular não coincidiu com aquela que resultou na maior concentração de fósforo solúvel, evidenciando a necessidade de avaliar conjuntamente as duas respostas na seleção da condição de cultivo.

Para verificar os efeitos do meio de cultivo e do pH inicial em cada coleta, os dados foram submetidos à análise de variância, considerando os efeitos principais e a interação entre os fatores. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise de variância dos efeitos do meio de cultivo e do pH inicial sobre o crescimento celular e a concentração de fósforo solúvel de *Bacillus velezensis* UPF-1 em diferentes tempos de cultivo.

Tempo (h)	Fator de variação	Crescimento celular F	Crescimento celular p	Fósforo solúvel F	Fósforo solúvel p
24	Meio	656,00	< 0,0001	27,69	0,0062
	pH	4,80	0,0927	61,97	0,0014
	Meio × pH	0,90	0,3992	96,55	0,0006
48	Meio	16,40	0,0155	18,39	0,0128
	pH	0,30	0,6101	1,76	0,2554
	Meio × pH	0,30	0,6101	4,54	0,1002
72	Meio	19,10	0,0120	161,46	0,0002
	pH	5,50	0,0798	206,98	0,0001
	Meio × pH	0,10	0,7759	54,52	0,0018

Fonte: Autores, 2026.

Nota: GL dos fatores = 1; GL do erro = 4 em cada tempo de avaliação. Valores em negrito indicam efeito significativo pelo teste F ($p < 0,05$). Meio 1: sacarose e extrato de levedura; Meio 2: glicerol e extrato de levedura.

A análise de variância mostrou que o meio de cultivo influenciou significativamente o crescimento celular em todos os períodos avaliados ($p < 0,05$), enquanto o pH inicial e a interação meio × pH não apresentaram efeito significativo sobre essa resposta. Esse comportamento indica que, nas condições estudadas, a composição nutricional teve maior influência sobre a viabilidade celular do que o pH inicial. O meio 2, contendo glicerol, favoreceu principalmente o crescimento nas primeiras 24 h, evidenciando que a fonte de carbono e sua combinação com o extrato de levedura afetaram a concentração de células cultiváveis.

Para a concentração de fósforo solúvel, o comportamento variou entre os períodos avaliados. Após 24 h, foram observados efeitos significativos do meio, do pH inicial e da interação meio × pH ($p < 0,05$), indicando que a resposta ao pH dependeu da composição nutricional. Em 48 h, apenas o meio de cultivo apresentou efeito significativo, enquanto, após 72 h, o meio, o pH e a interação entre esses fatores voltaram a influenciar a concentração de fósforo solúvel. A significância da interação em 24 e 72 h demonstra que os fatores não devem ser interpretados isoladamente.

A composição do meio exerce influência nesse processo porque diferentes fontes de carbono podem modificar as vias metabólicas, a produção de ácidos orgânicos e a relação entre formação de biomassa e atividade solubilizadora (Pan; Cai, 2023). Neste estudo, o meio 2 favoreceu principalmente o crescimento celular inicial, enquanto o meio 1, contendo sacarose, apresentou maior desempenho para a liberação de fósforo solúvel. Isso demonstra



que a maior densidade celular não correspondeu necessariamente à maior capacidade de solubilização, uma vez que essa resposta depende também do metabolismo e dos compostos produzidos pela bactéria. Estudos com *Bacillus velezensis* também mostram que a capacidade de solubilizar fosfato pode variar de acordo com a linhagem e com as condições de cultivo, mesmo quando há crescimento microbiano satisfatório (Mosela *et al.*, 2022; Pan; Cai, 2023).

O pH inicial 6,0 esteve associado às maiores concentrações finais de fósforo solúvel, principalmente após 72 h. Esse resultado pode estar relacionado à maior dissolução do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em condições mais ácidas, somada à acidificação promovida pelo metabolismo bacteriano (Pan; Cai, 2023; Vitorino *et al.*, 2024). Entretanto, como a interação meio $\times$ pH foi significativa nesse período, o efeito do pH deve ser interpretado em conjunto com a composição do meio, e não como um fator independente.

Embora os tempos de cultivo não tenham sido comparados em um mesmo modelo estatístico, a análise descritiva indicou redução do crescimento celular e aumento da concentração de fósforo solúvel nas quatro combinações avaliadas entre 24 e 72 h. Esse comportamento sugere que tempos de cultivo mais longos favoreceram a liberação de fósforo, mas foram acompanhados por diminuição da população cultivável. Em 48 h, observou-se uma condição intermediária entre as duas respostas, com contagens superiores a $8 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ e concentrações elevadas de fósforo solúvel, indicando esse período como promissor para conciliar crescimento celular e solubilização de fosfato.

Conclusões

As condições de cultivo influenciaram de forma distinta o crescimento celular e a solubilização de fosfato por *Bacillus velezensis* UPF-1. O meio contendo glicerol e extrato de levedura favoreceu o crescimento celular, especialmente nas primeiras 24 h, enquanto o meio contendo sacarose e extrato de levedura proporcionou maiores concentrações de fósforo solúvel. O pH inicial apresentou maior influência sobre a solubilização de fosfato do que sobre o crescimento celular, com destaque para o pH 6,0 após 72 h. A ausência de correspondência entre a maior população de células cultiváveis e a maior concentração de fósforo solúvel demonstrou que essas respostas devem ser consideradas conjuntamente na seleção das condições de cultivo. Entre os períodos avaliados, 48 h apresentou uma condição intermediária entre as respostas, mantendo contagens superiores a $8 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ e concentrações elevadas de fósforo solúvel. Assim, os resultados contribuem para a seleção de condições capazes de conciliar crescimento celular e solubilização de fosfato por *B. velezensis* UPF-1.

Agradecimentos

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

Referências

WANG, Z.; ZHAO, Y.; SHAO, J.; WANG, J.; XUN, W.; SUN, X.; XU, Z.; MIAO, Y.; HUANG, G.; LIU, D.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; ZHANG, N. Rhizosphere domestication enhances root colonization and plant growth promotion performance of *Bacillus velezensis* SQR9. **Frontiers in Microbiology**, 16, 1638130, 2025.



KNEŽEVIĆ, M.; DERVIŠEVIĆ, M.; JOVKOVIĆ, M.; JEVDENOVIĆ, G.; MAKSIMOVIĆ, J.; BUNTIĆ, A. Versatile role of *Bacillus velezensis*: Biocontrol of *Fusarium poae* and wireworms and barley plant growth promotion. **Biological Control**, 206, 105789, 2025.

SEBASTIAN, A. M.; UMESH, M.; PRIYANKA, K.; PREETHI, K. Isolation of plant growth-promoting *Bacillus cereus* from soil and its use as a microbial inoculant. **Arabian Journal for Science and Engineering**, 46, 151–161, 2021.

SHAHID, I.; HAN, J.; HANOOQ, S.; MALIK, K. A.; BORCHERS, C. H.; MEHNAZ, S. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 5, 605195, 2021.

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

MOSELA, M.; ANDRADE, G.; MASSUCATO, L. R.; ALMEIDA, S. R. A.; NOGUEIRA, A. F.; LIMA FILHO, R. B.; ZEFFA, D. M.; MIAN, S.; HIGASHI, A. Y.; SHIMIZU, G. D.; TEIXEIRA, G. M.; BRANCO, K. S.; FARIA, M. V.; GIACOMIN, R. M.; SCAPIM, C. A.; GONÇALVES, L. S. A. *Bacillus velezensis* strain Ag75 as a new multifunctional agent for biocontrol, phosphate solubilization and growth promotion in maize and soybean crops. **Scientific Reports**, 12, 15284, 2022.

VITORINO, L. C.; SILVA, E. J.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, I. O.; SANTOS, L. S.; MENDONÇA, M. A. C.; OLIVEIRA, T. C. S.; BESSA, L. A. Effect of a *Bacillus velezensis* and *Lysinibacillus fusiformis*-based biofertilizer on phosphorus acquisition and grain yield of soybean. **Frontiers in Plant Science**, 15, 1433828, 2024.

WANG, J.; ZHAO, S.; XU, S.; ZHAO, W.; ZHANG, X.; LEI, Y.; ZHAI, H.; HUANG, Z. Co-inoculation of antagonistic *Bacillus velezensis* FH-1 and *Brevundimonas diminuta* NYM3 promotes rice growth by regulating the structure and nitrification function of rhizosphere microbiome. **Frontiers in Microbiology**, 14, 1101773, 2023.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. E-book. ISBN 9788582712986.