

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA**

**MARCUS VINICIUS DA SILVA RODRIGUES**

**ANÁLISE GENÔMICA E FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

**DISSERTAÇÃO**

**CORNÉLIO PROCÓPIO**

**2025**

**MARCUS VINICIUS DA SILVA RODRIGUES**

**ANÁLISE GENÔMICA E FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

**Genomic and phylogenetic analysis of plant growth-promoting bacteria**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Bioinformá-  
tica da Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Profa. Dra. Glaucia Maria  
Bressan

Coorientador(a): Prof. Dr. Admilton  
Gonçalves de Oliveira Junior

**CORNÉLIO PROCÓPIO**

**2025**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es).

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.





Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Cornélio Procópio Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Nome do Departamento ou da Coordenação  
Mestrado em Bioinformática



## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

MARCUS VINICIUS DA SILVA RODRIGUES

### **ANÁLISE GENÔMICA E FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Bioinformática.

Data de aprovação: 12 de Março de 2025

Dra. Glaucia Maria Bressan, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Elisangela Aparecida Da Silva Lizzi, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Ulisses Nunes Da Rocha, Doutorado - Helmholtz Centre For Environmental Research

A Folha de Aprovação assinada encontra-se no  
Departamento de Registros Acadêmicos da UTFPR – Câmpus Cornélio Procópio

## RESUMO

RODRIGUES, Marcus Vinicius da Silva. **Análise genômica e filogenética de bactérias promotoras de crescimento de plantas.** 2025. 101 f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Cornélio Procópio, 2024.

A bioinformática tem se consolidado como uma área de pesquisa essencial na biologia moderna, facilitando a análise de grandes volumes de dados biológicos gerados pelas tecnologias de sequenciamento de nova geração. Esse campo interdisciplinar combina biologia, ciência da computação e estatística para interpretar dados complexos, fornecendo compreensões fundamentais em diversas áreas, como genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica. Desta maneira, o presente estudo tem como objetivo analisar as características genômicas de bactérias promotoras de crescimento de plantas, através da montagem e anotação de seus genomas, assim como de análises filogenéticas e metabólicas comparativas. O foco principal é a produção de metabólitos primários e secundários, com especial destaque para a identificação de genes de interesse e a subsequente validação *in vitro*. Iniciou-se a pesquisa com a seleção das linhagens a partir do acervo do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, seguida pelo cultivo, extração de DNA e sequenciamento. Todos os 14 genomas das linhagens da mesma espécie disponíveis no banco de dados do NCBI, no período da pesquisa, também foram selecionados para as análises subsequentes. A metodologia então avançou para a montagem e anotação dos genomas. Essas etapas são complementadas por análises filogenéticas, que incluem a construção de árvores filogenéticas com base em genomas completos por método de máxima verossimilhança, utilizando parâmetro de *bootstrap* e sequências de 16S rRNA e inferência bayesiana com suporte de *bootstrap* e probabilidade a posteriori, além de uma análise comparativa do proteoma das bactérias do acervo. O perfil metabólico das linhagens bacterianas foi investigado por mineração de genes *in silico*, seguido pela avaliação da atividade microbiana através de testes de solubilização de potássio e fosfato *in vitro*. O estudo proporciona uma análise abrangente das linhagens de *Bacillus nitratireducens* LABIM48, LABIM49, LABIM50, LABIM51 e LABIM53, destacando sua estreita relação genômica, filogenética e metabólica. Os resultados deste trabalho indicam uma alta conservação genômica entre as linhagens, sugerindo uma origem comum e evolução genética conservada. Análises filogenéticas confirmaram que todas as linhagens pertencem à mesma espécie, *Bacillus nitratireducens*. As análises dos genes essenciais, acessórios e únicos, evidenciou um pangenoma aberto e em crescente adaptação, indicada pela quantidade de novos genes e os diferentes locais de coleta das bactérias utilizadas. Concluindo, a análise metabólica revelou potencial para produção de diversos compostos bioativos, enquanto os testes *in vitro* confirmaram a capacidade de solubilização de fosfato e potássio, corroborando as previsões feitas pela análise computacional dos ácidos orgânicos.

**Palavras-chave:** Bioinformática. Microbiologia. Bioinsumos. Inovação.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Marcus Vinicius da Silva. **Genomic and phylogenetic analysis of plant growth-promoting bacteria**. 2025. 101 p. Dissertation (Master's Degree in Bioinformatics) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Cornélio Procópio, 2024.

Bioinformatics has established itself as an essential research field in modern biology, facilitating the analysis of large volumes of biological data generated by next-generation sequencing technologies. This interdisciplinary field combines biology, computer science, and statistics to interpret complex data, providing fundamental insights into various areas such as genomics, proteomics, transcriptomics, and metabolomics. Thus, the present study aims to analyze the genomic characteristics of plant growth-promoting bacteria through genome assembly and annotation, as well as comparative phylogenetic and metabolic analyses. The main focus is on the production of primary and secondary metabolites, with particular emphasis on the identification of genes of interest and subsequent *in vitro* validation. The research began with the selection of bacterial strains from the collection of the Microbial Biotechnology Laboratory, followed by cultivation, DNA extraction, and sequencing. Additionally, all 14 genomes of strains of the same species available in the NCBI database during the study period were selected for subsequent analyses. The methodology then advanced to genome assembly and annotation. These steps were complemented by phylogenetic analyses, including the construction of phylogenetic trees based on complete genomes using the maximum likelihood method with bootstrap parameters and 16S rRNA sequences through maximum likelihood and Bayesian inference with bootstrap support and posterior probability, along with a comparative analysis of the bacterial proteome from the collection. The metabolic profile of the bacterial strains was investigated through *in silico* gene mining, followed by the assessment of microbial activity via *in vitro* potassium and phosphate solubilization tests. The study provides a comprehensive analysis of *Bacillus nitratireducens* strains LABIM48, LABIM49, LABIM50, LABIM51, and LABIM53, highlighting their close genomic, phylogenetic, and metabolic relationships. The results of this study indicate a high degree of genomic conservation among the strains, suggesting a common origin and conserved genetic evolution. Phylogenetic analyses confirmed that all strains belong to the same species, *Bacillus nitratireducens*. The analysis of essential, accessory, and unique genes revealed an open and increasingly adaptive pangenome, as indicated by the number of new genes and the different collection sites of the bacteria used. In conclusion, the metabolic analysis revealed the potential for the production of various bioactive compounds, while *in vitro* tests confirmed the phosphate and potassium solubilization capacity, supporting the predictions made by the computational analysis of organic acids.

**Keywords:** Bioinformatics. Microbiology. Bioinputs. Innovation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Método de montagem de sobreposições – Overlap Layout Consensus.....	18
Figura 2 - Ilustração do método de montagem de Brujin.....	19
Figura 3 - Ilustração do método de montagem híbrida.....	20
Figura 4 - Árvore filogenética das espécies de <i>Bacillus</i> baseada nas sequências do gene 16S rRNA construída utilizando o método de neighbor-joining.....	22
Figura 5 - Agrupamento filogenômico representado usando valores de distância pareados entre 178 genomas de <i>Bacillus</i> spp. ....	23
Figura 6 - <i>Bacillus nitratireducens</i> – Microscópio óptico com aumento de 1000x.....	26
Figura 7 - Exemplificação de marcadores genéticos.....	28
Figura 8 - Esquema do complexo ribossômico e do gene 16S rRNA.....	28
Figura 9 - Ilustração da disponibilidade de potássio no solo.....	29
Figura 10 - Apresentação esquemática de solubilização de fosfato por Bactérias Solubilizadoras de Fosfato.....	31
Figura 11 - Mapa genômico circular de LABIM53, destacando conteúdo GC, skew GC, comparações de identidade com LABIM48-51, e genes de solubilização de potássio e fosfato.....	46
Figura 12 - Heatmap de similaridade genômica das linhagens de <i>Bacillus nitratireducens</i> .....	49
Figura 13 - Árvore filogenética de <i>Bacillus nitratireducens</i> baseada em genomas completos construída utilizando o método de máxima verossimilhança.....	52
Figura 14 - Árvore filogenética de <i>Bacillus nitratireducens</i> baseada nas sequências dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i> construída utilizando os métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana.....	53
Figura 15 - Árvore filogenética de <i>Bacillus nitratireducens</i> baseada em proteoma construída utilizando o método de máxima verossimilhança.....	54
Figura 16. Relação entre genes totais e conservados, número de genes (eixo y) e número de genomas (eixo x).....	56
Figura 17. Número de genes específicos de linhagem em função do número de genomas.....	58
Figura 18. Regiões codificadores de metabólitos primários e agrupamentos gênicos: Acetate to butyrate, Arginine to hydrogen, Fumarate to succinate e Histidine to glutamate.....	62
Figura 19. Regiões codificadores de metabólitos primários e agrupamentos gênicos: NADH dehydrogenase, Nitrate reductase e 2Arginine to putrescine.....	63
Figura 20. Regiões codificadores de metabólitos primários e agrupamentos gênicos: Pyruvate to acetate-formate, 2Thiamine pyrophosphate.....	63
Figura 21 - Regiões codificadores de metabólitos secundários e agrupamentos gênicos: Betalactone, Lanthipeptide, LAP e Lassoepptide.....	64
Figura 22 - Regiões codificadores de metabólitos secundários e agrupamentos gênicos: NISiderophore, NRP-metallophore, NRPS, Ranthipeptide.....	65
Figura 23 - Regiões codificadores de metabólitos secundários e agrupamentos gênicos: 2RIPP e Terpene.....	66
Figura 24 - Solubilização de fosfato das linhagens de <i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM48 (A), LABIM49 (B), LABIM50 (C), LABIM51 (D) e LABIM53 (E).....	71
Figura 25 - Solubilização de potássio das linhagens de <i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM48 (A), LABIM49 (B), LABIM50 (C), LABIM51 (D) e LABIM53 (E).....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Caracterização das 19 linhagens de <i>Bacillus nitratireducens</i> avaliadas.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 2 - Agrupamento 1 entre as bactérias originais da pesquisa e as depositadas com livre acesso no repositório do NCBI.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 3 - Agrupamento 2 entre as bactérias originais da pesquisa e as depositadas com livre acesso no repositório do NCBI.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 4. Relação da distribuição geográfica das linhagens depositadas.....</b>	<b>59</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	10
1.2	OBJETIVOS	12
1.2.1	Objetivo Geral	12
1.2.2	Objetivos Específicos	12
1.3	JUSTIFICATIVA	13
1.4	ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
2.1	AGRICULTURA MODERNA	15
2.2	GENÔMICA	17
2.2.1	MONTAGEM E ANOTAÇÃO DE GENOMAS	18
2.2.2	FILOGÊNIA	21
2.3	<i>Bacillus nitratreducens</i>	23
2.4	MARCADORES GENÉTICOS	27
2.5	SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO	29
2.6	SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO	30
2.7	METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS	32
2.8	ÁCIDOS ORGÂNICOS	34
2.9	TRABALHOS RELACIONADOS	36
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
3.1	BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTES	38
3.2	SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS BACTERIANOS	38
3.3	MONTAGEM E ANOTAÇÃO DE GENOMAS	39
3.4	CONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA	40
3.5	CORE-GENOMA	41
3.6	PERFIL METABÓLICO	42
3.7	POTENCIAL PGPR DE LINHAGENS DE <i>B. nitratreducens</i>	42
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE A – MINERAÇÃO DE GENES RELACIONADOS A SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO E FOSFATO</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE B – PRESENÇA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICE C – PRESENÇA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO</b>	<b>101</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A bioinformática tem se consolidado como uma área de pesquisa essencial na biologia moderna, facilitando a análise de grandes volumes de dados biológicos gerados pelas tecnologias de sequenciamento de nova geração (ALMEIDA e MARTINIS, 2019). Esse campo interdisciplinar combina biologia, ciência da computação e estatística para interpretar dados complexos, fornecendo informações fundamentais em diversas áreas, como genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica (CARROL *et al.*, 2019). A relevância da bioinformática transcende os limites acadêmicos, impactando diretamente setores industriais como a agricultura, a medicina e a biotecnologia, ao proporcionar ferramentas e métodos que aceleram o desenvolvimento de novas soluções e produtos (GRANT *et al.*, 2023)

## 1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Dentro do vasto universo da bioinformática, a genômica de bactérias tem recebido atenção especial. As bactérias desempenham papéis críticos em diversos ecossistemas, incluindo solos agrícolas, onde influenciam diretamente a saúde das plantas e a produtividade das culturas (VUONG *et al.*, 2022) Entre os gêneros bacterianos estudados, *Bacillus* destaca-se por suas propriedades benéficas, como a capacidade de promover o crescimento de plantas, suprimir patógenos e decompor matéria orgânica (YANG *et al.*, 2020). A genômica de *Bacillus* permite não apenas a compreensão dos mecanismos genéticos subjacentes a essas funções, mas também a identificação de novas linhagens com potencial biotecnológico e agrícola (OHAIR *et al.*, 2021)

A filogenia, que estuda as relações evolutivas entre os organismos, é uma ferramenta poderosa na genômica bacteriana (COLEMAN *et al.*, 2021). No caso das bactérias do gênero *Bacillus*, a análise filogenética é fundamental para a classificação das espécies, a compreensão de sua evolução e a identificação de características adaptativas específicas (DION *et al.*, 2020). Técnicas filogenéticas baseadas em sequências de rRNA, como o uso de genes ribossomais 16S, permitem traçar mapas evolutivos detalhados, revelando a história de diversificação e as relações entre diferentes linhagens de *Bacillus*. Esses estudos são cruciais para a seleção de estirpes com características desejáveis para aplicações industriais e agrícolas (CAPUTO *et al.*, 2019; CHURCH *et al.*, 2020).

Além da filogenia, o perfil metabólico das bactérias é um aspecto central para a bioinformática (AFZAL *et al.*, 2019). O metabolismo bacteriano abrange todas as reações bioquímicas que ocorrem no organismo, e o conhecimento detalhado desses processos é vital

para explorar suas capacidades biológicas (ÖZDOĞAN *et al.*, 2022). Em *Bacillus*, o perfil metabólico inclui a produção de enzimas, antibióticos, sideróforos e outros metabólitos secundários que têm aplicações práticas na agricultura, como no controle biológico de pragas e na promoção do crescimento das plantas (CHEVRETTE *et al.*, 2020). A bioinformática permite a análise e a integração de dados metabolômicos, auxiliando na descoberta e otimização de novas vias metabólicas para a produção de bioinsumos (VEZINA *et al.*, 2020).

A produção de bioinsumos, como biofertilizantes e biopesticidas, é uma área promissora em que a bioinformática tem um papel fundamental. *Bacillus spp.*, com suas propriedades benéficas bem documentadas, são frequentemente utilizados na formulação desses produtos (PARAMAR e SINDHU, 2019). A bioinformática facilita a identificação de genes e vias metabólicas envolvidas na produção de compostos bioativos, possibilitando o uso de estirpes de *Bacillus* baseadas na sua eficiência observada *in silico* (CHEN *et al.*, 2022). Essa abordagem biotecnológica é especialmente relevante para a agricultura sustentável, contribuindo para a redução do uso de agroquímicos sintéticos e promovendo práticas agrícolas mais amigáveis ao meio ambiente (OLANIYAN *et al.*, 2022).

No contexto nacional, a produção de soja, milho e feijão é de extrema importância para a economia brasileira (VIDAL *et al.*, 2021). Para ilustrar a soberania nacional na produção de grãos, observa-se culturas como a soja, sendo uma das principais commodities do país, com uma área plantada de 45.235,4 mil hectares e produção de 146.521,8 toneladas em 2023/2024 (CONAB, 2024). Adicionalmente, o Brasil se destaca em culturas como a do milho, com 20.382,2 mil/ha de área plantada e produção de 110.963,7 toneladas na safra de 2023/2024. Além da soja e milho, o feijoeiro-comum também ocupa um espaço significativo na produção agrícola, com 2.860,1 mil/ha e produção de 3.213,5 toneladas na última safra, segundo dados da CONAB. 2024.

A utilização de bioinsumos à base de *Bacillus* pode melhorar a produtividade e a sustentabilidade dessas culturas, promovendo um manejo agrícola mais eficiente e ecológico (GOMES, 2019). A bioinformática, ao acelerar o desenvolvimento de bioinsumos, desempenha um papel crucial na inovação agrícola, alinhando-se com as demandas por uma agricultura mais sustentável e produtiva (SOUZA *et al.*, 2022).

Dessa forma, a bioinformática não apenas enriquece o conhecimento científico sobre a genômica e a biologia de *Bacillus*, mas também impulsiona avanços práticos na produção agrícola (ARROYO, 2020; BARROS *et al.*, 2023). A integração dessas áreas do conhecimento promete revolucionar a forma como é realizado o cultivo e manejo destas culturas, com impactos positivos para a economia e o meio ambiente (NASCIMENTO *et al.*,

2022; TSOTETSI *et al.*, 2022).

## 1.2 OBJETIVOS

Nesta seção, são descritos os objetivos geral e específicos deste trabalho.

### 1.2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo analisar as características genômicas de bactérias promotoras de crescimento de plantas, através da montagem e anotação de seus genomas, assim como de análises filogenéticas e metabólicas. O foco principal é a produção de metabólitos primários e secundários, com especial destaque para identificação de genes de interesse e a subsequente validação *in vitro*.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram determinados para atingir o objetivo geral e sendo eles:

- Realizar a montagem e anotação dos genomas das bactérias promotoras de crescimento de plantas.
- Realizar análises filogenéticas para entender as relações evolutivas entre as diferentes linhagens bacterianas estudadas.
- Conduzir análises metabólicas para compreender os perfis metabólicos das bactérias e sua relação com o crescimento de plantas.
- Identificar genes de interesse envolvidos na produção de metabólitos primários e secundários com potencial impacto no crescimento de plantas.
- Realizar análises *in silico* para predição e caracterização funcional dos genes identificados
- Validar *in vitro* a expressão e atividade dos genes de interesse, demonstrando seu papel na promoção do crescimento de plantas.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho justifica-se pelo potencial de utilizar análises computacionais para explorar e compreender as características das bactérias promotoras de crescimento de plantas. Essas bactérias desempenham um papel no desenvolvimento vegetal, oferecendo uma abordagem para aumentar a produtividade agrícola e promover a sustentabilidade (JALAL *et al.*, 2024).

A análise genômica, filogenética e metabólica dessas bactérias tem como objetivo fornecer dados sobre suas capacidades funcionais e suas aplicações na agricultura (WANG *et al.*, 2024). O uso de ferramentas computacionais permite uma análise da composição genética e metabólica, revelando padrões e relações que podem ser explorados para otimizar seu desempenho como promotoras de crescimento de plantas (HSIEH *et al.*, 2024).

A montagem e anotação de genomas, aliadas a análises filogenéticas, proporcionam uma compreensão da composição gênica e das relações evolutivas entre as bactérias estudadas (RAVIN *et al.*, 2024). Dessa forma, a identificação e caracterização de genes e vias metabólicas associadas as características de interesse são facilitadas pela capacidade computacional de análise de dados genômicos e metabólicos (KURAL *et al.*, 2024).

Avaliar a capacidade das bactérias promotoras de crescimento de plantas para realizar funções específicas, como a solubilização de nutrientes ou a produção de compostos bioativos, é essencial para entender seu potencial na promoção da saúde das plantas e na melhoria da produção agrícola (LI *et al.*, 2024). Portanto, ao empregar abordagens computacionais para analisar dados biológicos complexos, espera-se compreender os caminhos para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis na agricultura (GUERRERO-EGIDO *et al.*, 2024).

A motivação para este trabalho reside na necessidade de utilizar abordagens computacionais para explorar e aproveitar o potencial agrícola das bactérias promotoras de crescimento de plantas. Ao integrar a capacidade computacional com o conhecimento biológico, espera-se contribuir para o avanço e desenvolvimento de soluções eficazes para os desafios enfrentados na agricultura moderna.

### 1.4 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Neste capítulo, discute-se o contexto no qual este trabalho se insere, as motivações que impulsionaram sua realização e os objetivos que se pretende alcançar.

No Capítulo 2, são apresentados os principais conceitos relacionados à

bioinformática, microbiologia e bioinsumos, com ênfase nas bactérias promotoras de crescimento de plantas. Esta revisão é realizada considerando estudos recentes que utilizaram abordagens computacionais para análise de dados genômicos, filogenéticos e metabólicos dessas bactérias.

No Capítulo 3, é delineada a metodologia adotada neste estudo, incluindo a descrição das tecnologias e ferramentas utilizadas, a seleção e aquisição dos dados, os métodos de análise genômica, filogenética e metabólica empregados, bem como as validações realizadas.

O Capítulo 4 apresenta os resultados e discussão das análises realizadas, demonstrando as características genômicas, filogenéticas e metabólicas das bactérias estudadas, com o uso de tabelas e medidas estatísticas para ilustrar o desempenho das análises computacionais.

Por fim, no Capítulo 5, a conclusão deste estudo é apresentada, destacando o alcance dos objetivos propostos, sugerindo perspectivas futuras, apresentando o cronograma seguido e detalhando os trabalhos que se encontram em elaboração.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo aborda os principais conceitos relacionados à bioinformática, microbiologia e bioinsumos, com uma descrição detalhada das bactérias promotoras de crescimento de plantas e suas características genômicas, filogenéticas e metabólicas. Em seguida, são apresentados os estudos recentes que utilizaram abordagens computacionais para análise de dados genômicos, filogenéticos e metabólicos dessas bactérias, fornecendo um panorama das metodologias e resultados obtidos na classificação e caracterização dessas bactérias.

### 2.1 AGRICULTURA MODERNA

A produção agrícola mundial é fortemente dominada por algumas culturas principais, entre as quais a soja e o milho se destacam significativamente (CINTRA *et al.*, 2020). A soja, por exemplo, é uma das culturas mais importantes globalmente, com uma produção que atingiu aproximadamente 370 milhões de toneladas em 2022, de acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura). Os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina são os principais produtores, refletindo a importância da soja não apenas na alimentação, mas também como fonte de óleo e proteína para rações animais (XIMENES e COÊLHO, 2023).

Outro exemplo marcante é o milho, cuja produção mundial alcançou cerca de 1,2 bilhões de toneladas no mesmo ano. Esse cereal é amplamente cultivado em países como os Estados Unidos, a China e o Brasil, sendo utilizado tanto para consumo humano quanto para alimentação animal e produção de etanol. No contexto brasileiro, a soja e o milho são igualmente cruciais. O Brasil se destaca como o segundo maior produtor mundial de soja, com uma colheita que ultrapassou 150 milhões de toneladas em 2022/23, principalmente nos estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul. Já a produção de milho no país foi de cerca de 115 milhões de toneladas em 2021/22, com os estados de Mato Grosso, Paraná e Goiás liderando a produção (COÊLHO, 2021; BARBOSA *et al.*, 2023).

A elevada produtividade dessas culturas está intimamente ligada ao uso intensivo de fertilizantes (OGINO *et al.*, 2020). Em 2022, o consumo global de fertilizantes nitrogenados foi de aproximadamente 110 milhões de toneladas, fosfatados em torno de 47 milhões de toneladas e potássicos cerca de 37 milhões de toneladas (MAGALHÃES *et al.*, 2022;

MENEGAT *et al.*, 2022; PNF, 2021). No Brasil, esse consumo atingiu cerca de 40 milhões de toneladas, demonstrando uma grande dependência de fertilizantes importados para manter a produtividade agrícola (OGINO e GASQUES, 2023; PNF, 2021).

Paralelamente, os biofertilizantes têm emergido como uma alternativa sustentável aos fertilizantes químicos (FERRAZZA *et al.*, 2024). Esses produtos naturais melhoram a fertilidade do solo e a produtividade das plantas, utilizando organismos vivos como bactérias, fungos e algas. Em 2022, o mercado global de biofertilizantes foi estimado em cerca de USD 1,6 bilhões, com uma expectativa de crescimento anual de 12% até 2028 (PNF, 2021). No Brasil, o uso de biofertilizantes também está crescendo, com um mercado que movimenta milhões de dólares, refletindo um interesse crescente por práticas agrícolas mais sustentáveis (INPI, 2023).

Os inoculantes e Bactérias solubilizadores de nutrientes como potássio e fósforo, além dos fixadores de nitrogênio, representam uma inovação importante dentro deste campo de biofertilizantes (HII *et al.*, 2020; TALLAPRAGADA e MATTHEW, 2021; SOUMARE *et al.*, 2020). Os inoculantes são preparados contendo bactérias benéficas que promovem o crescimento das plantas através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a solubilização de fósforo e potássio, o que pode reduzir a necessidade de fertilizantes químicos (RAJAWAT *et al.*, 2019; NAGRALE *et al.*, 2023). Bactérias como *Bacillus spp.* são particularmente eficazes na solubilização de fósforo e potássio, tornando esses nutrientes mais disponíveis para as plantas. Estudos indicam que a aplicação de *Bacillus spp.* pode aumentar a disponibilidade de fósforo no solo em porcentagens significativas, além de promover o crescimento das plantas através da produção de fitohormônios (AFZAL *et al.*, 2023; ABDELGALIL *et al.*, 2022).

A fixação biológica de nitrogênio é especialmente relevante para leguminosas como a soja, utilizando bactérias como *Rhizobium spp.*, que aumentam a disponibilidade de nitrogênio no solo, resultando em maior produtividade das culturas (GOYAL *et al.*, 2021). Espécies do gênero *Bacillus*, como *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*, são conhecidas por sua capacidade de produzir enzimas que degradam matéria orgânica, solubilizam fósforo e potássio, além de promoverem o crescimento das plantas (SUN *et al.*, 2020; MORENO *et al.*, 2022).

Portanto, a agricultura moderna, especialmente em um país agrícola como o Brasil, está cada vez mais integrando tecnologias avançadas e sustentáveis para maximizar a produtividade e manter a saúde do solo (BARBA e SANTOS, 2020). A combinação do uso de

fertilizantes convencionais com biofertilizantes e inoculantes representa um caminho promissor para uma agricultura mais sustentável e eficiente (CHÁVEZ *et al.*, 2020). Essas práticas não apenas aumentam a eficiência dos nutrientes no solo, mas também reduzem a dependência de insumos químicos, promovendo uma agricultura mais resiliente e ambientalmente amigável (NOSHEEN *et al.*, 2021).

## 2.2 GENÔMICA

A genômica, como parte da biotecnologia de bioprodutos, tem desempenhado um papel vital na transformação da indústria, impulsionando uma revolução na forma como exploramos e utilizamos os recursos naturais para a produção de uma ampla gama de produtos úteis (GUTTMACHER e COLLINS, 2003). Desde os primeiros esforços para sequenciar e mapear o DNA de organismos inteiros até as tecnologias mais avançadas de engenharia genômica, a área em questão tem sido uma força motriz por trás dos avanços na manipulação genética e na produção de bioprodutos (YERO *et al.*, 2022).

Uma das principais áreas em que a genômica tem feito contribuições significativas é no melhoramento de bactérias de interesse para a produção de bioprodutos (VUONG *et al.*, 2022). Ao decifrar o código genético dessas bactérias, os cientistas podem identificar genes específicos que controlam a produção de compostos de interesse, como enzimas, metabólitos e biopolímeros (YANG *et al.*, 2020). Esses genes podem então ser alvo de manipulação genética, utilizando técnicas como o mapeamento de Locus de Características Quantitativas (QTLs) e os Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS), para aumentar a produção desses compostos ou melhorar suas propriedades, tornando-os mais eficientes e comercialmente viáveis (TAM *et al.*, 2019; SOOD *et al.*, 2023).

A genômica também desempenha um papel fundamental na seleção de linhagens promissoras de Bactérias para a produção de bioprodutos (OHAIR *et al.*, 2021). Utilizando tecnologias de marcadores moleculares, os pesquisadores podem caracterizar o germoplasma, identificar genes de interesse agrônômico e selecionar linhagens com base em características genéticas específicas. Isso permite o desenvolvimento de bactérias mais eficientes e produtivas, acelerando o processo de desenvolvimento de novos bioprodutos (YILDIZ *et al.*, 2022).

Além da produção de uma variedade de outros bioprodutos, incluindo biomateriais, biocombustíveis, enzimas industriais e produtos químicos renováveis (GRANJA-TRAVEZ *et*

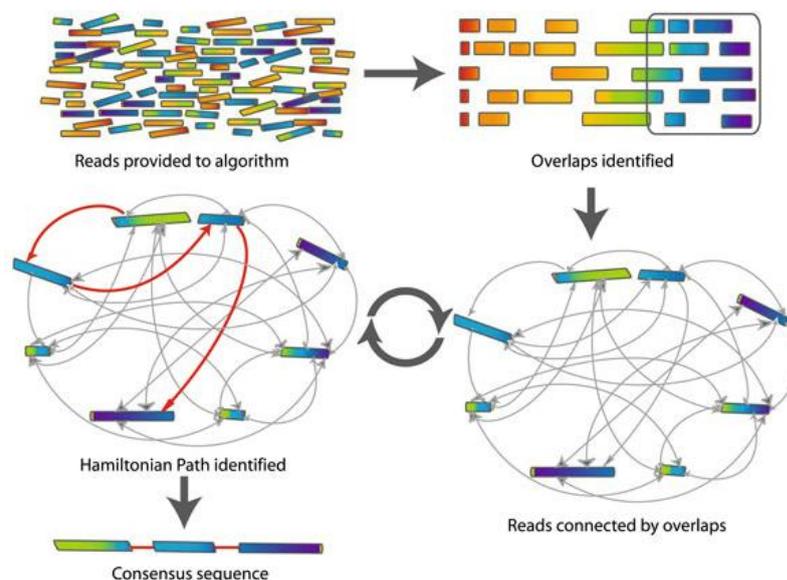
*al.*, 2020). Ao compreender e manipular o genoma completo de organismos, os cientistas podem criar produtos biológicos inovadores e sustentáveis, contribuindo para uma economia mais verde e ecologicamente consciente (BAPTISTA *et al.*, 2022).

### 2.2.1 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DE GENOMAS

A montagem e anotação de genomas é uma etapa fundamental no estudo da genômica. Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA, tornou-se possível gerar grandes volumes de dados genômicos em um curto período de tempo (KAPLI *et al.*, 2020). No entanto, esses dados brutos geralmente consistem em pequenos fragmentos de sequências, o que torna necessário o processo de montagem para reconstruir o genoma completo do organismo em estudo (GIANI *et al.*, 2020).

A montagem de genomas envolve a reconstrução dos fragmentos de sequência em uma ordem correta, de modo a representar o genoma completo do organismo (VAN CAMP *et al.*, 2020). Existem diferentes abordagens e algoritmos para realizar essa tarefa, e a escolha depende do tipo de sequenciamento utilizado, a complexidade do genoma e a disponibilidade de recursos computacionais. Métodos como montagem de sobreposições (Figura 1), montagem de De Bruijn (Figura 2) e montagem híbrida (Figura 3) são comumente utilizados para montar genomas de bactérias, plantas, animais e humanos (HALIM *et al.*, 2020; RIZZI *et al.*, 2019; STELLA, 2023).

**Figura 1 - Método de montagem de sobreposições – Overlap Layout Consensus.**



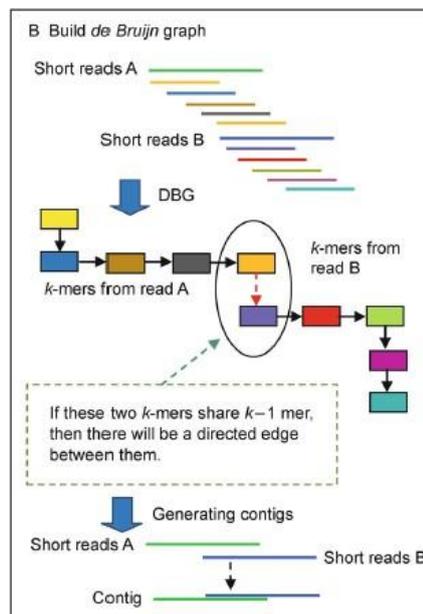
Fonte: Commins *et al.* (2009).

*Overlap Layout Consensus* (OLC) é um método utilizado na montagem de genomas,

que visa construir um consenso entre os fragmentos de DNA sobrepostos (também conhecidos como *reads*) para produzir um genoma completo ou uma sequência contígua de DNA (também chamada de *contig*) (LIU *et al.*, 2021). Neste método, as *reads* são inicialmente sobrepostas umas às outras para identificar regiões semelhantes. Em seguida, um grafo de sobreposição é criado, onde cada nó representa uma *read* e as arestas entre os nós representam as sobreposições entre as *reads* (RUAN e LI, 2020).

O OLC busca identificar caminhos ou cadeias de sobreposições que conectam as *reads*, criando assim *contigs*. Durante esse processo, as sobreposições entre as *reads* são avaliadas quanto à sua qualidade e confiabilidade (NAŁĘCZ-CHARKIEWICZ e NOWAK, 2022). Uma vez que as sobreposições são identificadas e validadas, os *contigs* são construídos combinando as *reads* de acordo com essas sobreposições. Esse processo é repetido várias vezes até que todos os *contigs* sejam construídos e unidos em uma única sequência contígua, representando o genoma ou a região genômica de interesse (VASER e ŠIKIĆ, 2021).

**Figura 2 - Ilustração do método de montagem de Bruijn.**

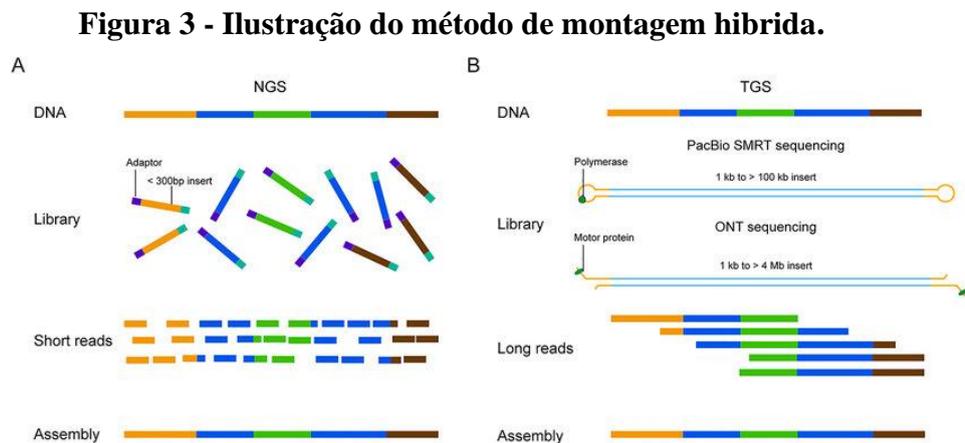


Fonte: Liao et al. (2018).

O método de De Bruijn é uma abordagem comumente usada na montagem de genomas que se baseia na decomposição das *reads* de sequenciamento em fragmentos menores, chamados de *k*-mers, e na construção de um grafo de De Bruijn para representar as relações entre esses *k*-mers (RAUTIAINEN e MARSCHALL, 2021). Neste método, as *reads* de sequenciamento são divididas em todos os possíveis *k*-mers de comprimento *k*, onde *k* é

um parâmetro definido pelo pesquisador. Esses *k-mers* são então representados como nós em um grafo, com arestas conectando *k-mers* que têm sobreposição de  $(k-1)$  bases (BŘINDA *et al.*, 2021).

Uma vez que o grafo de De Bruijn é construído, ele é percorrido para identificar caminhos que representam sequências contíguas de bases no genoma. Esses caminhos são então combinados para formar *contigs*, que são sequências contíguas de bases que podem representar partes do genoma original (BANKEVICH *et al.*, 2022).



Fonte: Chen e He (2021).

A montagem híbrida é uma abordagem na montagem de genomas que combina informações de diferentes tipos de dados de sequenciamento, como dados de sequenciamento de nova geração (NGS) e sequenciamento de terceira geração (*long-read sequencing*). O principal objetivo da montagem híbrida é superar as limitações individuais de cada tecnologia de sequenciamento (GENOVA *et al.*, 2021). Por exemplo, o sequenciamento de NGS produz *reads* curtas com alta cobertura, mas pode ter dificuldades em resolver repetições longas ou complexas, enquanto o sequenciamento de terceira geração produz *reads* mais longas, mas com menor precisão. Ao combinar essas tecnologias, a montagem híbrida busca obter uma montagem mais completa e precisa do genoma-alvo (HAGHSHENAS *et al.*, 2020).

O processo de montagem híbrida geralmente começa com a montagem das *reads* curtas de NGS usando algoritmos de sobreposição, como o método de De Bruijn ou OLC. Em seguida, as *reads* longas de sequenciamento de terceira geração são utilizadas para preencher lacunas entre os *contigs* produzidos pela montagem de NGS (CHEN *et al.*, 2020). Para isso, as *reads* longas são alinhadas aos *contigs* produzidos pela montagem de NGS, ajudando a conectar e estender os *contigs*, especialmente em regiões difíceis de serem resolvidas apenas

com *reads* curtas. Essa integração das duas tecnologias de sequenciamento permite superar as limitações individuais de cada uma e produzir uma montagem mais completa e precisa do genoma de interesse (MAIO *et al.*, 2019).

Após a montagem, o próximo passo é a anotação do genoma, que consiste em identificar e caracterizar os elementos funcionais, como genes, regiões regulatórias e elementos repetitivos (HOFF *et al.*, 2019). A anotação de genes envolve a identificação de regiões codificadoras de proteínas (exons), introns, regiões promotoras e terminadores. A anotação também inclui a identificação de RNAs não codificadores (ncRNAs), como microRNAs, *long non-coding* RNAs (lncRNAs) e RNA de transferência (tRNA) (ARMSTRONG *et al.*, 2019).

Para realizar a anotação de genomas de forma eficiente e precisa, são utilizadas abordagens computacionais que combinam evidências de homologia, predição de estrutura de proteínas, expressão gênica e análise de conservação evolutiva (DUNN *et al.*, 2019; SALZBERG, 2019). Ferramentas e bancos de dados bioinformáticos, como BLAST, HMMER, Busco, Prokka e UniProt, são amplamente utilizados para auxiliar nesse processo (EJIGU e JUNG, 2020; LARRALDE e ZELLER, 2023; UNIPROT CONSORTIUM, 2019).

A montagem e anotação de genomas são passos críticos no estudo da biologia molecular e têm amplas aplicações em diferentes áreas, incluindo biotecnologia, medicina, conservação de espécies e agricultura (MENG *et al.*, 2019). Com a contínua evolução das tecnologias de sequenciamento e análise computacional, espera-se que a montagem e anotação de genomas se tornem cada vez mais acessíveis e precisas, impulsionando ainda mais a pesquisa em genômica e biologia molecular (XU *et al.*, 2019; HO *et al.*, 2020).

### 2.2.2 FILOGÊNI

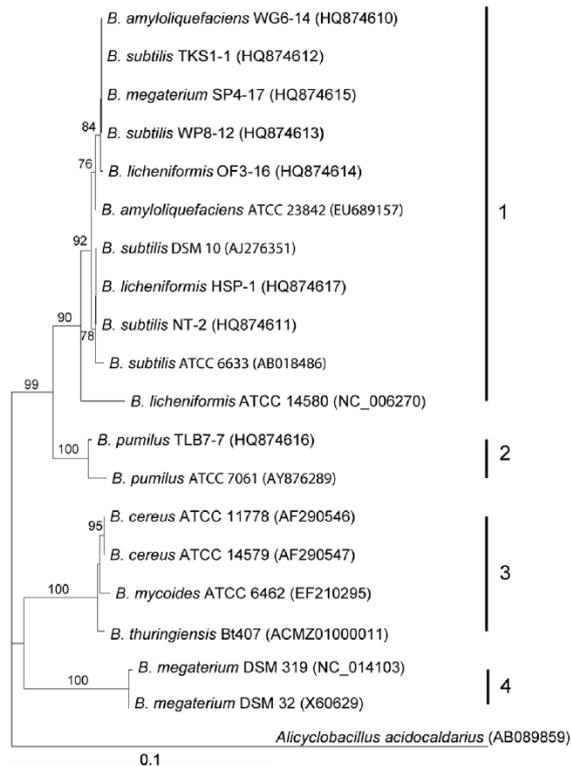
A filogenia é um campo essencial da biologia que estuda as relações evolutivas entre organismos, utilizando informações genéticas, morfológicas e outras características para reconstruir a história evolutiva da vida na Terra (COLEMAN *et al.*, 2021). Desde o desenvolvimento das primeiras técnicas de filogenia baseadas na anatomia comparativa por Darwin, até os modernos métodos moleculares e computacionais, a filogenia tem desempenhado um papel fundamental na compreensão da diversidade biológica e na reconstrução da árvore da vida (GREENLON *et al.*, 2019).

As técnicas tradicionais de filogenia, como a análise de características morfológicas e anatômicas, foram a base inicial para a reconstrução de árvores filogenéticas. No entanto,

esses métodos enfrentaram desafios, especialmente em grupos taxonômicos onde a morfologia é altamente variável ou convergente (DION *et al.*, 2020). Com o advento da biologia molecular, a filogenia molecular tornou-se uma abordagem dominante, utilizando sequências de DNA e proteínas para inferir as relações evolutivas entre os organismos (CAPUTO *et al.*, 2019).

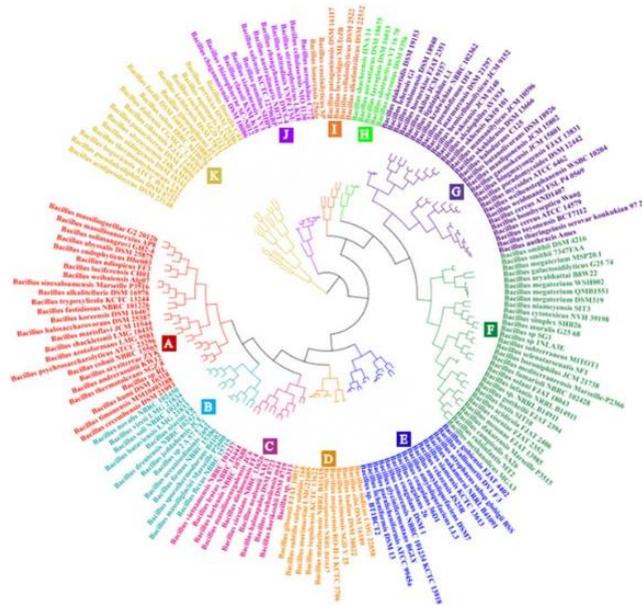
Técnicas moleculares como a análise de sequências de genes específicos, como o gene ribossômico 16S para bactérias e arqueias (Figura 4), ou o gene do citocromo c oxidase para animais, têm sido amplamente utilizadas na filogenia molecular (JOHNSON *et al.*, 2019). Adicionalmente, o sequenciamento de genomas inteiros e o desenvolvimento de métodos computacionais avançados, como a análise de filogenômica, permitiram a reconstrução de árvores filogenéticas (Figura 5) em uma escala global, abrangendo uma ampla gama de organismos e grupos taxonômicos (SAKOPARNIG *et al.*, 2021).

**Figura 4 - Árvore filogenética das espécies de *Bacillus* baseada nas sequências do gene 16S rRNA construída utilizando o método de neighbor-joining.**



Fonte: Huang et al. (2012).

**Figura 5 - Agrupamento filogenômico representado usando valores de distância pareados entre 178 genomas de *Bacillus* spp.**



Fonte: Khurana et al. (2020).

A filogenia não é apenas uma ferramenta para entender as relações evolutivas entre os organismos, mas também desempenha um papel fundamental em muitos outros aspectos da biologia e da pesquisa científica (CINAR *et al.*, 2022). Por exemplo, a filogenia é frequentemente utilizada em estudos de sistemática e taxonomia, para classificar e nomear novas espécies com base em suas relações evolutivas (NARANJO-ORTIZ e GABALDÓN, 2019). A filogenia também é fundamental em áreas como biologia da conservação, onde a compreensão das relações evolutivas pode informar estratégias de conservação e manejo de espécies ameaçadas (CUNHA *et al.*, 2021).

No entanto, a reconstrução precisa das árvores filogenéticas pode ser desafiadora, especialmente em grupos taxonômicos complexos ou onde a história evolutiva foi marcada por eventos de especiação rápida ou hibridização (MOREL *et al.*, 2021). O uso de diferentes métodos e modelos na análise filogenética pode levar a resultados conflitantes, destacando a importância da avaliação crítica dos dados e da utilização de abordagens múltiplas na inferência filogenética (PUTTICK *et al.*, 2019).

### 2.3 *Bacillus nitratireducens*

As *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR) são bactérias que habitam a rizosfera e desempenham um papel essencial na promoção do crescimento das plantas

(GÜLER e ÖĞÜTCÜ, 2024). Elas têm atraído atenção significativa por seu potencial em melhorar a saúde e a produtividade das plantas, especialmente em contextos agrícolas (SOLOMON *et al.*, 2023).

Essas bactérias promovem o crescimento das plantas por vários mecanismos. Um dos principais é a fixação de nitrogênio, realizada por bactérias como *Rhizobium* e *Azotobacter*, que convertem o nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pelas plantas, como amônia ou nitrato (RODRÍGUEZ *et al.*, 2024). Além disso, os PGPR produzem fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, essenciais para o crescimento vegetal. Por exemplo, *Azospirillum* spp. sintetiza auxinas que estimulam o alongamento das raízes e a formação de novos órgãos (RANJAN *et al.*, 2024).

Outro mecanismo importante é a solubilização de fosfatos. Bactérias como *Bacillus* e *Pseudomonas* convertem fosfatos insolúveis em formas que as plantas podem absorver, o que é crucial para a nutrição das plantas, especialmente em solos com baixos níveis de fosfato disponível (JENSEN *et al.*, 2024). Alguns PGPR produzem compostos antibióticos que ajudam a controlar patógenos de solo e liberam enzimas que facilitam a decomposição de materiais orgânicos, melhorando a saúde do solo e a disponibilidade de nutrientes (BAJIMAYA *et al.*, 2022).

Os PGPR têm mostrado resultados promissores em diversas culturas, como trigo, milho, soja e arroz, aumentando o crescimento e a produtividade das plantas (GHOSH *et al.*, 2024). No entanto, a eficácia desses microrganismos pode variar com as condições ambientais e a interação com a planta hospedeira (SATHEESH *et al.*, 2024). A pesquisa continua a se concentrar na identificação e seleção de cepas eficazes e na compreensão dos mecanismos de ação, buscando melhorar a consistência dos resultados e explorar a combinação de PGPR com outras práticas de manejo sustentável (CHOUHAN *et al.*, 2022).

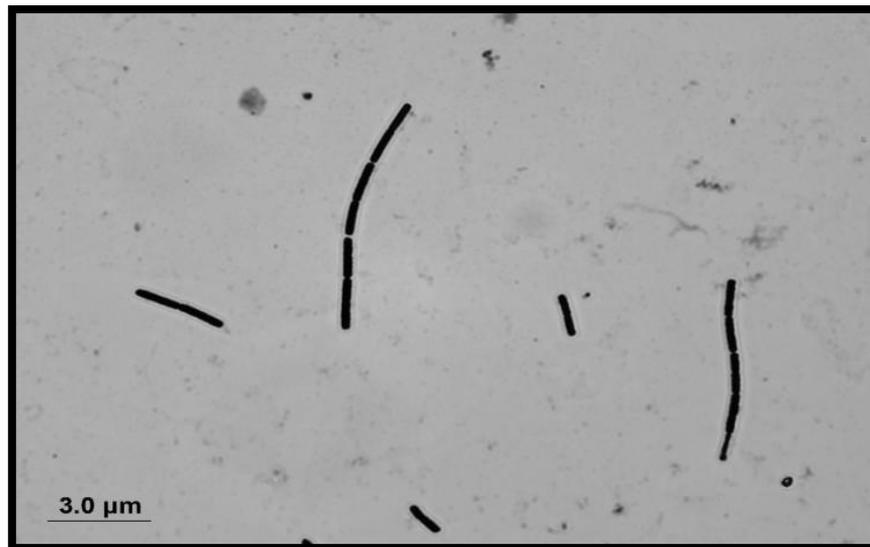
Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, formadoras de esporos e amplamente distribuídas em diversos ambientes, incluindo solo, água, ar e alimentos (MELO *et al.*, 2021). Essas bactérias têm uma importância significativa em vários campos, como indústria, agricultura e biotecnologia, devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas e compostos bioativos (ARROYO, 2020; BARROS *et al.*, 2023). Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por sua resistência, atribuída à formação de esporos, que permitem a sobrevivência em condições adversas, como altas temperaturas e falta de nutrientes (RABINOVITCH e OLIVEIRA, 2020). *B. subtilis*, por exemplo, é um modelo amplamente estudado para processos de esporulação e resistência bacteriana (LEÓN *et al.*, 2023).

Muitas espécies de *Bacillus* são utilizadas na produção de enzimas industriais. Sabe-se que *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, são exploradas na produção de amilases e proteases, respectivamente, que são aplicadas em detergentes, alimentos e indústria têxtil (NGALIMAT *et al.*, 2021; MURAS *et al.*, 2021). *B. thuringiensis* é notável por seu uso como biopesticida, devido à produção de proteínas tóxicas específicas que afetam larvas de insetos (NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Na agricultura, espécies de *Bacillus* desempenham um papel importante na promoção de práticas sustentáveis (TSOTETSI *et al.*, 2022). *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* também são frequentemente utilizados como bioinsumos para fertilizantes e agentes de controle biológico, ajudando a promover o crescimento de plantas e a proteger contra patógenos de solo (SU *et al.*, 2020; SABATÉ e BRANDÁN, 2022). Esses bacilos podem promover a saúde das plantas através da produção de fitohormônios, solubilização de nutrientes e supressão de doenças, contribuindo significativamente para a agricultura sustentável e a redução do uso de produtos químicos nocivos (XUE *et al.*, 2021).

Na microbiologia agrícola, *B. nitratireducens* (Figura 6) é uma espécie bacteriana identificada como um organismo redutor de nitrato e gram-positivas em forma de bastonete. Suas células são alongadas e variam em tamanho, geralmente de 1,0 a 1,5 micrômetros de largura e 2,7 a 3,0 micrômetros de comprimento (PATEL *et al.*, 2023). Em culturas, descrita como filamentosa, significa que suas células têm a tendência de se agruparem em filamentos ou cadeias longas, semelhantes a fios finos, variando em cor de branco-creme a amarelado, dependendo das condições de crescimento (LIU *et al.*, 20217).

**Figura 6 - *Bacillus nitratireducens* – Microscópio óptico com aumento de 1000x.**



Fonte: A autoria própria (2025).

Uma das características distintivas de *B. nitratireducens* é sua capacidade de utilizar nitrato como aceptor final de elétrons em processos de respiração anaeróbia. Isso significa que a bactéria pode reduzir nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e, em seguida, a nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ), contribuindo assim para a ciclagem de nitrogênio em ambientes anaeróbios (LIU *et al.*, 2023).

Estudos recentes têm explorado o potencial de *B. nitratireducens* em diversas aplicações biotecnológicas e ambientais. Por exemplo, devido à sua capacidade de reduzir nitrato, esta bactéria tem sido investigada como uma alternativa para a remediação de águas contaminadas por nitrato, um poluente comum em ambientes agrícolas e industriais (PATEL *et al.*, 2023). Subsequentemente, a capacidade de *B. nitratireducens* de metabolizar compostos nitrogenados também levanta questões sobre seu papel em ciclos biogeoquímicos naturais, como o ciclo do nitrogênio (KARGAR *et al.*, 2021). Estudos de ecologia microbiana têm explorado a distribuição e a atividade de *B. nitratireducens* em diferentes ambientes, incluindo solos, sedimentos aquáticos e sistemas de tratamento de águas residuais (ABBAS *et al.*, 2020).

A genômica comparativa tem sido uma ferramenta importante para entender a filogenia, genômica e diversidade metabólica de *B. nitratireducens* em comparação com outras espécies de *Bacillus*. A análise de sequências genômicas pode fornecer uma compreensão sobre os mecanismos moleculares subjacentes à redução de nitrato, bem como identificar genes e vias metabólicas únicas associadas a essa capacidade (PENG *et al.*, 2017).

## 2.4 MARCADORES GENÉTICOS

Os marcadores genéticos, essenciais em diversas áreas da biologia, desempenham um papel fundamental ao permitir a identificação, caracterização e seleção de características específicas de organismos (FRANCO-DUARTE *et al.*, 2019). Eles constituem ferramentas valiosas que contribuem para avanços significativos em campos como genética, biotecnologia, medicina e conservação (DECKERS *et al.*, 2020).

Em genética de populações, os marcadores genéticos são frequentemente utilizados para investigar a estrutura e a diversidade genética dentro de uma espécie (HOHENLOHE *et al.*, 2021). Essa análise permite compreender a distribuição de variantes genéticas e as relações evolutivas entre populações. Por exemplo, podem ser aplicados em estudos para avaliar a variabilidade genética de populações de animais ameaçados de extinção, fornecendo informações cruciais para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável (VON THADEN *et al.*, 2020).

Na medicina, os marcadores genéticos têm um impacto significativo no diagnóstico precoce e na prevenção de doenças genéticas (QUINLAN *et al.*, 2020). Através de testes genéticos, é possível identificar mutações associadas a condições hereditárias, determinar o risco genético de um indivíduo para desenvolver determinadas doenças e personalizar o tratamento com base no perfil genético do paciente (XIANG *et al.*, 2019). Essa abordagem, conhecida como medicina genômica, está revolucionando a prática clínica e contribuindo para uma medicina mais personalizada e eficaz (WANG *et al.*, 2022).

Nos campos da microbiologia e biotecnologia, os marcadores genéticos (Figura 7) desempenham um papel crucial na pesquisa e produção de bioprodutos utilizando bactérias (AFZAL *et al.*, 2019). Esses marcadores são empregados para identificar, caracterizar e selecionar as linhagens mais adequadas para a produção de compostos desejados, garantindo a pureza e a consistência das culturas utilizadas (ÖZDOĞAN *et al.*, 2022). Subsequentemente, são essenciais para rastrear linhagens ao longo do processo de produção, monitorando possíveis contaminações e garantindo a qualidade dos produtos finais (RILLING *et al.*, 2019).

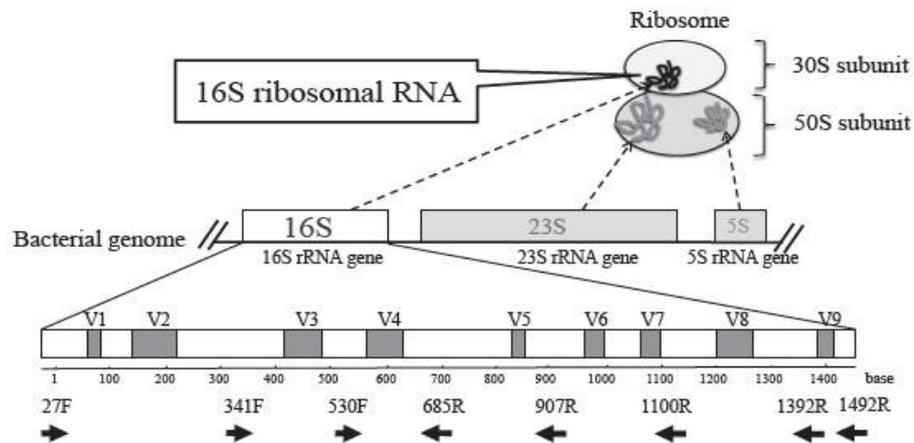
**Figura 7 - Exemplificação de marcadores genéticos.**

single nucleotide polymorphism	ATTGGCCTTAACCC <b>C</b> CGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACCC <b>T</b> CGATTATCAGGAT
insertion-deletion variant	ATTGGCCTTAACCC <b>GAT</b> CCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACCC <b>---</b> CCGATTATCAGGAT
inversion variant	ATTGGCCTT <b>AACCCCG</b> ATTATCAGGAT ATTGGCCTT <b>CGGGGGT</b> TATTATCAGGAT
microsatellite	ATTGGCCTTAA <b>CACACACAC</b> AGGAT ATTGGCCTTAA <b>CACACA</b> ----GGAT
copy number variant	ATT <b>GGCCTTA ... GGCCTTA ...</b> ACCCCGATA ATT <b>GGCCTTA ... -----</b> ACCCCGATA

Fonte: Brahmachari et al. (2013).

Um exemplo relevante de marcador genético é o gene 16S rRNA (Figura 8), amplamente utilizado na identificação bacteriana. Esse gene, altamente conservado entre as bactérias, possui regiões variáveis que permitem a diferenciação entre diferentes espécies (CHURCH *et al.*, 2020). A análise do gene 16S rRNA facilita a identificação e classificação taxonômica de bactérias, auxiliando na seleção de linhagens adequadas para a produção de bioprodutos e contribuindo para o avanço da biotecnologia aplicada (ABELLAN-SCHENEYDER *et al.*, 2021).

**Figura 8 - Esquema do complexo ribossômico e do gene 16S rRNA.**



Fonte: Fukuda et al. (2016).

Em síntese, os marcadores genéticos representam uma ferramenta versátil e poderosa que impulsiona avanços significativos em várias áreas da ciência e tecnologia, promovendo o desenvolvimento de terapias personalizadas, estratégias de conservação ambiental e produtos

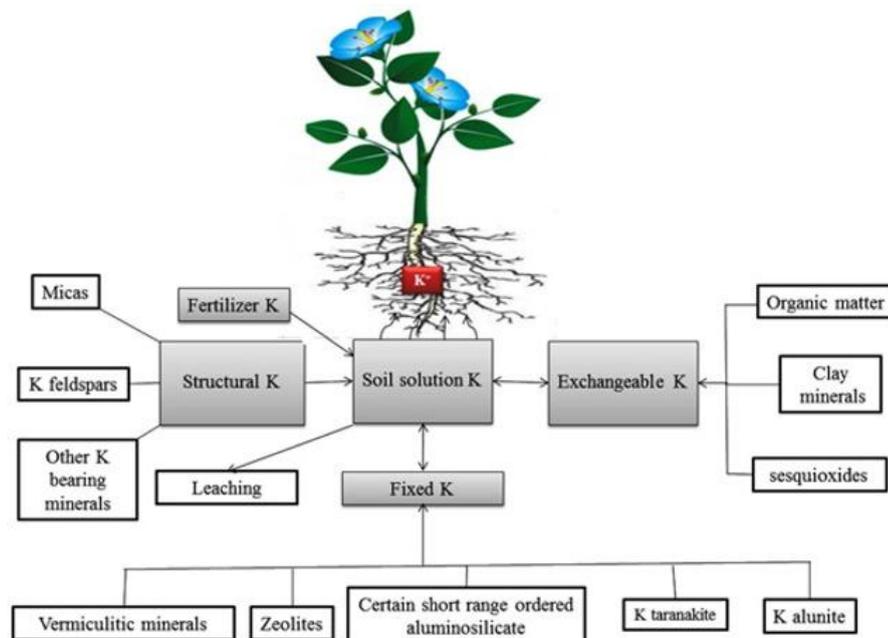
biológicos inovadores (CHUKWU *et al.*, 2019).

## 2.5 SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO

A solubilização de potássio é um processo importante na ciclagem de nutrientes no solo, que envolve a conversão de formas insolúveis de potássio em formas solúveis que podem ser facilmente absorvidas pelas plantas (Figura 9) (ALI *et al.*, 2021). Este processo é facilitado por microrganismos conhecidos como solubilizadores de potássio, que secretam ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, ácido oxálico e ácido acético, capazes de solubilizar minerais de potássio presentes no solo (WANG *et al.*, 2022).

Numerosos estudos têm demonstrado o papel significativo dos solubilizadores de potássio na promoção do crescimento das plantas e no aumento da disponibilidade de potássio no solo (BAHADUR *et al.*, 2019; RAJI e THANGAVELU, 2021; SUN *et al.*, 2020). Por exemplo, a inoculação de bactérias solubilizadoras de potássio em cultivos agrícolas tem sido associada a um aumento na absorção de potássio pelas plantas, resultando em melhorias na produtividade e qualidade das culturas (KAUR *et al.*, 2021).

**Figura 9 - Ilustração da disponibilidade de potássio no solo.**



Fonte: Sparks e Huang (1985).

Adicionalmente, a solubilização de potássio por bactérias também pode desempenhar um papel importante na sustentabilidade agrícola, reduzindo a dependência de fertilizantes

químicos (BASHIR *et al.*, 2019). O uso de solubilizadores de potássio como parte de estratégias de manejo de nutrientes pode contribuir para a redução dos custos de produção e para a preservação do meio ambiente, minimizando a lixiviação de nutrientes e a contaminação de recursos hídricos (SATTAR *et al.*, 2019).

No entanto, é importante considerar que a eficácia da solubilização de potássio por bactérias pode variar dependendo das condições ambientais, composição do solo e interações com outros organismos do solo (IMRAN *et al.*, 2020). Subsequentemente, a identificação e caracterização de solubilizadores de potássio eficazes é essencial para o desenvolvimento de produtos biológicos e bioinsumos que possam ser aplicados de forma eficaz em sistemas agrícolas (PARMAR e SINDHU, 2019). O uso de técnicas de bioinformática e de biologia molecular pode ajudar na identificação de genes e vias metabólicas envolvidas na solubilização de potássio por bactérias, permitindo a seleção e manipulação de linhagens microbianas com maior capacidade de solubilização (CHEN *et al.*, 2022).

Desta forma, entende-se que a solubilização de potássio por bactérias desempenha um papel importante na ciclagem de nutrientes no solo e na promoção do crescimento das plantas (DING *et al.*, 2021). O entendimento dos mecanismos envolvidos na solubilização de potássio e o desenvolvimento de estratégias de manejo de nutrientes baseadas em solubilizadores de potássio têm o potencial de contribuir significativamente para a sustentabilidade agrícola e para a segurança alimentar global (OLANIYAN *et al.*, 2022).

## 2.6 SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO

A solubilização de fosfato é um processo crucial no ciclo do fósforo no ambiente e tem implicações significativas para a agricultura sustentável e a gestão de recursos naturais (ALAYLAR *et al.*, 2020). A compreensão do papel das bactérias na solubilização de fosfato começou a se desenvolver no início do século XX. Pesquisas pioneiras demonstraram que certas bactérias poderiam mobilizar fosfato insolúvel, tornando-o disponível para plantas (GOLDSTEIN, 1986).

Em 1903, Beyerinck e Winogradsky foram alguns dos primeiros a identificar Bactérias capazes de solubilizar fosfato, destacando a importância desses organismos no ciclo do fósforo (PHILIPPOT *et al.*, 2024). Nas décadas seguintes, a pesquisa se expandiu, identificando diversos gêneros de bactérias e fungos com essa capacidade (DEVI e SAINI, 2020). Foi durante os anos 1950 e 1960 que a ciência começou a reconhecer plenamente o potencial dessas bactérias para aplicação agrícola, com a identificação de espécies bacterianas

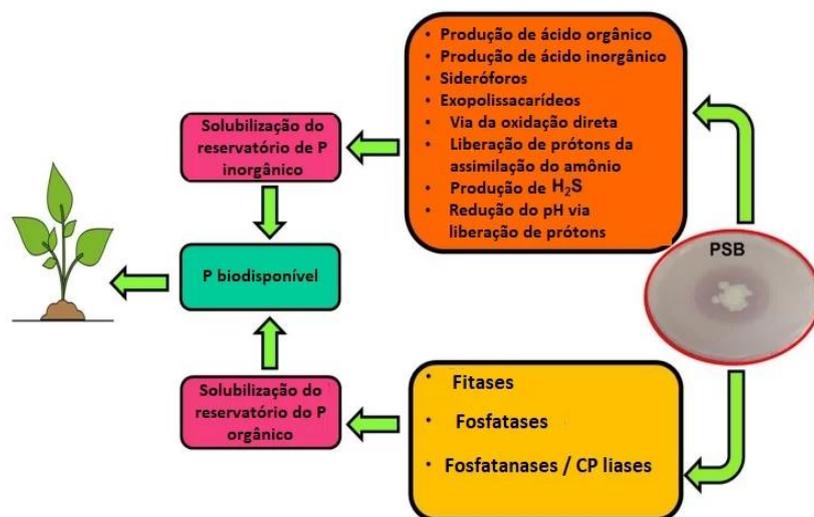
como solubilizadoras de fosfato, incluindo as do gênero *Bacillus* (IQBAL *et al.*, 2023).

Nesta etapa do trabalho, a solubilização de fosfato é um campo de pesquisa bem estabelecido, com enfoque significativo na agricultura sustentável. A eficiência do uso de fertilizantes fosfatados é baixa, com apenas cerca de <30% do fósforo aplicado sendo diretamente utilizado pelas plantas (LUZ e BRITO, 2022). As bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB - *Phosphate Solubilizing Bacteria*) são investigadas como uma alternativa ou complemento aos fertilizantes químicos, ajudando a liberar o fosfato insolúvel presente no solo (Figura 10) (RAWAT *et al.*, 2021).

Assim, o gênero *Bacillus* é amplamente estudado devido à sua capacidade de solubilizar fosfato. Bactérias deste gênero são Gram-positivas, formadoras de esporos, e amplamente distribuídas no solo (AHMAD *et al.*, 2021). Elas solubilizam fosfato através da produção de ácidos orgânicos como ácido lático, ácido acético e ácido cítrico, que quelam os cátions ligados ao fosfato, liberando-o na forma solúvel (MAŽYLYTĖ *et al.*, 2022).

Espécies notáveis do gênero *Bacillus* incluem *B. megaterium*, uma das primeiras espécies reconhecidas por sua capacidade de solubilizar fosfato, produzindo grandes quantidades de ácidos orgânicos (LIN *et al.*, 2023). *B. subtilis*, conhecido por sua robustez e capacidade de sobrevivência em condições adversas, também é eficiente na solubilização de fosfato (GUPTA *et al.*, 2022); e *B. amyloliquefaciens*, outra espécie comumente estudada, que além da solubilização de fosfato, também promove o crescimento das plantas através da produção de fitohormônios (MPANGA *et al.*, 2020).

**Figura 10 - Apresentação esquemática de solubilização de fosfato por Bactérias Solubilizadoras de Fosfato.**



Fonte: Rawat *et al.* (2020).

As bactérias do gênero *Bacillus* utilizam vários mecanismos para solubilizar fosfato.

A excreção de ácidos orgânicos é o principal mecanismo pelo qual estas bactérias solubilizam fosfatos insolúveis (ZHAO *et al.*, 2022). Estes ácidos baixam o pH do solo, liberando fosfato. Além disso, algumas espécies produzem enzimas fosfatases que liberam fósforo de compostos orgânicos. Elas também liberam compostos sideróforos, que são quelantes de ferro e podem ajudar na solubilização de fosfato (ZHONG *et al.*, 2021; ABAWARI *et al.*, 2020)

Pesquisas recentes focam na aplicação de consórcios microbianos contendo *Bacillus* e outros PSMs para aumentar a eficiência do uso de fósforo em sistemas agrícolas (TIMOFEEVA *et al.*, 2022). Neste sentido, estudos mostram que a inoculação de solos com *Bacillus* pode aumentar significativamente a disponibilidade de fósforo e, conseqüentemente, a produtividade das culturas (ABDELMOTELEB e GONZALES-MENDOZA, 2020). Adicionalmente, o desenvolvimento de biofertilizantes baseados em *Bacillus* tem ganhado atenção devido à sua sustentabilidade e eficácia. Convergindo com a evolução do conhecimento, a biotecnologia moderna também está explorando a engenharia genética para aumentar as capacidades solubilizadoras dessas bactérias [LUO *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2020).

Desta forma, a solubilização de fosfato por bactérias do gênero *Bacillus* representa uma área promissora para a agricultura sustentável (KHAN *et al.*, 2022). Com uma base histórica sólida e dados atuais que demonstram sua eficácia, essas bactérias continuam a ser um foco crucial para pesquisas e aplicações práticas (KUMAR *et al.*, 2021). A integração de *Bacillus* em práticas agrícolas tem o potencial de reduzir a dependência de fertilizantes químicos e melhorar a saúde do solo, promovendo um uso mais eficiente dos recursos naturais (SHAHID *et al.*, 2021).

## 2.7 METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS

Os metabólitos primários e secundários têm aplicações significativas na agricultura, especialmente em culturas como soja, milho, trigo e cana-de-açúcar (AHMED *et al.*, 2024). No contexto agrícola, o metabolismo primário inclui compostos fundamentais que promovem o crescimento e a saúde das plantas, enquanto o metabolismo secundário envolve compostos que conferem vantagens adaptativas em ambientes específicos (BASIT *et al.*, 2024).

A arginina, um aminoácido essencial no metabolismo primário, é convertida em hidrogenocarbonato através de vias que incluem a produção de citrulina no ciclo da ureia (MICHIMORI *et al.*, 2024). Esse processo é crucial para a desintoxicação do amônio, um subproduto tóxico do metabolismo de proteínas. A desintoxicação eficiente do amônio melhora a saúde das plantas e otimiza seu crescimento, impactando positivamente a

produtividade de culturas como soja e milho (OCHIENG *et al.*, 2023). A saúde das plantas é vital para obter colheitas abundantes e de alta qualidade, especialmente em grandes extensões de terra cultivadas com trigo e cana-de-açúcar (SAVARY, 2023).

O piruvato, outro intermediário central no metabolismo energético, pode ser convertido em acetato e formiato através da via de fermentação formiato acetil-CoA transferase, especialmente importante em organismos anaeróbios (KIRST *et al.*, 2022). Em ambientes de cultivo onde a oxigenação do solo pode ser limitada, como em solos compactados ou alagados, a capacidade das plantas de metabolizar eficientemente o piruvato é essencial (YEMELYANOV *et al.*, 2023). Culturas como milho e cana-de-açúcar, que muitas vezes enfrentam essas condições, beneficiam-se diretamente de processos metabólicos eficientes que suportam seu crescimento e desenvolvimento (NÄGELE *et al.*, 2022).

A redutase de nitrato catalisa a redução de nitrato a nitrito, um passo fundamental no ciclo do nitrogênio, permitindo que plantas e outros organismos utilizem o nitrogênio disponível no solo (WU *et al.*, 2023). O ciclo do nitrogênio é vital para a fertilidade do solo e a nutrição das plantas (KOCH e SESSITSCH, 2024). A disponibilidade adequada de nitrogênio é crucial para o desenvolvimento saudável de culturas como soja e trigo, que demandam altos níveis desse nutriente para crescerem vigorosamente. A utilização eficiente de nitrogênio pode levar a colheitas mais robustas e à sustentabilidade das práticas agrícolas (MARKAD, 2024).

No ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), a conversão de fumarato em succinato é catalisada pela fumarase, sendo uma via central no metabolismo energético e na produção de ATP (CURTOLO e ARANTES, 2023). A produção eficiente de ATP é crucial para o crescimento e a resistência das plantas a estresses ambientais. Plantas de milho e cana-de-açúcar, que frequentemente enfrentam desafios climáticos e de solo, dependem de vias metabólicas eficientes para manter sua saúde e produtividade (SAMSAMI e AMIRI, 2024). A energia gerada por esses processos permite que as plantas cresçam de forma robusta, mesmo em condições adversas (PEREZ *et al.*, 2022).

Além dos metabólitos primários, compostos produzidos no metabolismo secundário, como os peptídeos antibióticos e sideróforos, têm aplicações importantes na agricultura (ZHANG *et al.*, 2024). Sideróforos, como petrobactina e bacilibactina, quelam ferro e facilitam sua absorção por bactérias e plantas, especialmente sob condições de limitação de ferro (SINGH *et al.*, 2023). Esse processo é essencial para a saúde das culturas de soja e trigo, que precisam de ferro para funções metabólicas críticas. A melhoria da disponibilidade de ferro pode levar a plantas mais saudáveis e produtivas (SHARMA *et al.*, 2019).

Lipopeptídeos antifúngicos como a fengicina, produzida por *Bacillus* spp., têm atividade significativa contra patógenos de plantas (HUSSAIN *et al.*, 2024). A aplicação de fengicina em campos de soja e milho pode ajudar a proteger as plantas contra doenças fúngicas, melhorando a saúde geral das culturas e aumentando o rendimento das colheitas (CHAMBERLAIN *et al.*, 2021). A proteção eficaz contra patógenos é uma estratégia crucial para manter a produtividade agrícola e reduzir as perdas pós-colheita (KAUR *et al.*, 2022).

Em resumo, os ácidos orgânicos e outros compostos produzidos no metabolismo primário e secundário oferecem uma gama de benefícios para a agricultura, especialmente em culturas chave como soja, milho, trigo e cana-de-açúcar (BOCSO e BUTNARIU, 2022). Esses compostos melhoram a disponibilidade de nutrientes, a resistência a estresses ambientais e a proteção contra patógenos, contribuindo para práticas agrícolas mais eficientes e sustentáveis (WILDER *et al.*, 2021). A integração desses metabólitos nas estratégias de manejo agrícola pode levar a colheitas mais saudáveis, produtivas e economicamente viáveis (OH *et al.*, 2023).

## 2.8 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Ácidos orgânicos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* desempenham papéis variados e importantes no metabolismo bacteriano, com diversas aplicações potenciais na agricultura, especialmente em culturas como soja, milho, trigo e cana-de-açúcar (KOILYBAYEVA *et al.*, 2023). Por exemplo, o ácido oxálico, produzido por várias espécies desse gênero, é conhecido por sua capacidade de solubilizar minerais, melhorando a disponibilidade de fósforo no solo (SETIAWATI *et al.*, 2022). Essa solubilização aumenta a disponibilidade de nutrientes essenciais, promovendo a saúde do solo e facilitando a absorção de nutrientes pelas plantas. Em culturas como soja e milho, a maior disponibilidade de fósforo pode resultar em um crescimento mais vigoroso e uma produtividade mais elevada (MARPAUNG *et al.*, 2023).

O ácido málico, envolvido no ciclo do ácido cítrico, também é produzido por *Bacillus* (MEYER, 2023; WEI *et al.*, 2021). Esse ácido ajuda na acidificação do ambiente, o que pode beneficiar a supressão de patógenos do solo. A redução da presença de patógenos contribui diretamente para a saúde das plantações, incluindo o trigo e a cana-de-açúcar. Plantas saudáveis têm maior capacidade de resistir a doenças, resultando em colheitas mais abundantes e de melhor qualidade (YADAV *et al.*, 2024; CORATO, 2020).

Adicionalmente, o ácido pirúvico, um intermediário chave no metabolismo

energético, é produzido por diversas cepas de *Bacillus*. Esse ácido influencia a produção de uma variedade de compostos bioquímicos que podem atuar como promotores de crescimento vegetal (JEEVITHA *et al.*, 2023). Na soja e no milho, a presença de tais compostos pode estimular o desenvolvimento radicular e a absorção de nutrientes, resultando em plantas mais robustas e produtivas (YADAV *et al.*, 2021). A promoção do crescimento radicular é especialmente benéfica para culturas como a cana-de-açúcar, que dependem de um sistema radicular forte para a absorção eficiente de água e nutrientes (SHARMA *et al.*, 2020).

O ácido succínico, produzido por certas cepas de *Bacillus*, também apresenta várias aplicações agrícolas. Este ácido é um intermediário importante na biossíntese de compostos valiosos que podem atuar como bioestimulantes (KUMAR *et al.*, 2024). Em culturas como trigo e milho, a aplicação de ácido succínico pode melhorar a resistência ao estresse hídrico e aumentar a eficiência no uso de nutrientes, resultando em plantas mais resilientes e produtivas (KHAN *et al.*, 2024).

A produção de ácido glucônico, resultante da oxidação da glicose, é outra característica importante das bactérias *Bacillus*. Esse ácido auxilia na solubilização de minerais e contribui para a saúde do solo (HINDERSAH *et al.*, 2019). Em culturas como soja e trigo, a maior solubilização de minerais como ferro e manganês pode melhorar a disponibilidade desses nutrientes para as plantas, resultando em um crescimento mais saudável e uma produtividade maior (WANG *et al.*, 2024).

O ácido cítrico, embora mais frequentemente associado a fungos, também pode ser produzido por algumas cepas de *Bacillus*. Esse ácido é crucial no ciclo do ácido cítrico e pode ajudar na solubilização de fosfatos, tornando-os mais acessíveis para culturas como milho e cana-de-açúcar (REENA *et al.*, 2022). A maior disponibilidade de fosfatos pode resultar em um crescimento mais vigoroso e em uma melhor qualidade dos grãos e caules, essenciais para a produtividade dessas culturas (JENSEN *et al.*, 2024).

Além desses ácidos, a glicose desidrogenase (gcd) e a pirroloquinolina quinona (pqq) desempenham um papel crucial na produção de ácido glucônico. A glicose desidrogenase catalisa a oxidação da glicose, enquanto a pirroloquinolina quinona atua como cofator essencial (RAJ *et al.*, 2024). Essa complexidade das vias metabólicas bacterianas mostra como a produção de ácido glucônico pode ser otimizada para melhorar a solubilização de minerais e a saúde do solo, beneficiando diretamente culturas como soja, milho, trigo e cana-de-açúcar (PASOTTI *et al.*, 2024).

Em resumo, os ácidos orgânicos produzidos por *Bacillus* oferecem uma gama de benefícios para a agricultura, especialmente em culturas chave como soja, milho, trigo e cana-

de-açúcar (KHAN *et al.*, 2022). A melhoria na disponibilidade de nutrientes, a supressão de patógenos do solo e a promoção do crescimento radicular são apenas algumas das maneiras pelas quais esses ácidos podem aumentar a produtividade e a saúde das plantações, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes (SANTOSH *et al.*, 2024).

## 2.9 TRABALHOS RELACIONADOS

Estudos sobre a sequência completa de genomas de cepas de *Bacillus* têm se tornado cada vez mais frequentes devido ao seu potencial biotecnológico, especialmente em aplicações agrícolas. Vários trabalhos têm se concentrado na caracterização genômica de diferentes espécies próximas, visando compreender melhor suas capacidades de promover o crescimento das plantas (KWON *et al.*, 2021).

O artigo "Complete Genome Sequencing of *Bacillus velezensis* WRN014, and Comparison with Genome Sequences of other *Bacillus velezensis* Strains" relata a sequenciação completa do genoma da cepa WRN014 de *Bacillus velezensis*, isolada em campos de banana na China, e a compara com 45 outras cepas da mesma espécie. Análises filogenéticas indicaram dois clados próximos entre as cepas estudadas, e a análise de SNPs mostrou diversificação genômica local, enquanto clusters de genes produtores de metabólitos secundários foram amplamente distribuídos entre as cepas. Este estudo sublinha o potencial de *Bacillus velezensis* WRN014, assim como de outras cepas, para ser usada como rizobactéria promotora de crescimento de plantas e biopesticida. A variabilidade genômica observada sugere adaptação a diferentes nichos ecológicos e condições ambientais, destacando uma capacidade robusta para bioprospecção e aplicação em biotecnologia agrícola, contribuindo para o desenvolvimento de soluções sustentáveis na agricultura (WANG *et al.*, 2019).

O estudo "Use of *Bacillus* as a Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Improve Phosphate and Potassium Availability in Acidic and Saline Soils" avalia o uso de *Bacillus spp.* para melhorar a disponibilidade de fósforo e potássio em solos ácidos e salinos. Três isolados de *Bacillus* foram testados (*Bacillus velezensis*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*) e demonstraram eficácia na dissolução de fósforo e potássio em condições salinas. *Bacillus velezensis* aumentou significativamente a disponibilidade de fosfato em solos ácidos e salinos. Ademais, todos os isolados produziram hormônio ácido indolacético (IAA) e diversos ácidos orgânicos, melhorando a nutrição das plantas e potencializando o crescimento em solos desafiadores. O estudo conclui que *Bacillus spp.* podem ser uma

alternativa sustentável para aumentar a produtividade agrícola em solos de baixa fertilidade (SETIAWATI *et al.*, 2022).

O artigo "*Bacillus subtilis* promotes plant phosphorus (P) acquisition through P solubilization and stimulation of root and root hair growth" investiga como a bactéria *Bacillus subtilis* facilita a absorção de fósforo pelas plantas, solubilizando fósforo do solo e estimulando o crescimento das raízes e dos pelos radiculares. As análises de bioinformática caracterizaram geneticamente a bactéria, identificando genes envolvidos na solubilização do fósforo e na promoção do crescimento radicular, além de analisar a expressão gênica e o impacto na microbiota do solo. O estudo sugere que a aplicação de *Bacillus subtilis* pode melhorar a nutrição das plantas e aumentar a produtividade agrícola, especialmente em solos deficientes em fósforo (JENSEN *et al.*, 2024).

O artigo "Potassium Solubilizing and Mobilizing Microbes: Biodiversity, Mechanisms of Solubilization, and Biotechnological Implication for Alleviations of Abiotic Stress" explora a importância dos microrganismos solubilizadores de potássio na agricultura sustentável, destacando como eles melhoram a disponibilidade de nutrientes essenciais para as plantas, protegem contra patógenos e ajudam a superar estresses ambientais. A bioinformática desempenha um papel fundamental nesse campo ao analisar genomas para identificar genes envolvidos na solubilização de potássio, estudar mecanismos moleculares através de técnicas como transcriptômica e proteômica, e otimizar o uso de biofertilizantes em diferentes condições de estresse, contribuindo para práticas agrícolas mais eficientes e sustentáveis (KOUR *et al.*, 2020).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os métodos utilizados neste trabalho para analisar as bactérias de interesse do LABIM. São descritos os processos de cultivo, extração do DNA e sequenciamento dessas bactérias. Em seguida, são detalhados os procedimentos de montagem e anotação de genomas. O capítulo também aborda a construção filogenética, análise do core-genoma e perfil metabólico das bactérias. Por fim, são apresentadas a avaliação da atividade microbiana e a caracterização química, utilizando diferentes ferramentas computacionais e métodos de análise.

#### 3.1 BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTES

As linhagens microbianas utilizadas neste estudo foram selecionadas a partir do acervo microbiológico do LABIM (Laboratório de Biotecnologia Microbiana) devido à sua importância para a pesquisa. O LABIM está localizado em Londrina - PR, dentro da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sendo reconhecido por sua expertise e contribuições significativas para o campo da microbiologia agrícola.

As linhagens foram prospectadas na região de Pontal do Paraná - PR, em 20 de Janeiro de 2020. As coordenadas geográficas do ponto de coleta das bactérias são latitude - 25°36'06.2"S e longitude - 48°23'20.8"W. Essa cuidadosa seleção das linhagens garantiu a qualidade e a relevância dos dados obtidos para a pesquisa em questão.

#### 3.2 SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS BACTERIANOS

As cinco linhagens investigadas foram cultivadas em meios de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) previamente, e uma colônia de cada amostra foi inoculada em Caldo Triptona Soja (TSB) em shaker, 150 rpm a 28 ° C durante 18 horas. O DNA foi extraído utilizando o kit de extração DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a pureza e padrão das bandas, foram observados em gel de eletroforese e utilizando Nanodrop, o DNA extraído foi então enviado para sequenciamento no Helmholtz Centre for Environment Research (UFZ) em Leipzig - Alemanha, utilizando tecnologia de sequenciamento da plataforma MiSeq (BPI-Biotechnology Research and Innovation) com o MiSeq Reagent V2 Micro (300 ciclos). Após a conclusão do sequenciamento, as leituras cruas das cinco linhagens bacterianas foram depositadas no *National Center for Biotechnology*

*Information* (NCBI).

### 3.3 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DE GENOMAS

Os dados de sequenciamento obtidos foram submetidos a um processo detalhado de montagem de genomas utilizando uma série de ferramentas de bioinformática. Primeiramente, o TRIMMOMATIC v0.39 foi empregado para realizar a trimagem dos dados brutos, removendo sequências de baixa qualidade e adaptadores, com um filtro de qualidade Phred estabelecido em 30. Em seguida, os contigs foram montados a partir dos dados trimados utilizando o SPADES v3.13, um software especializado em montagem de genomas que utiliza abordagens de grafos de Bruijn.

Após a montagem inicial dos contigs, cada montagem foi confrontada com o banco de dados GenBank. Nesse processo, um fragmento de DNA de cada montagem foi utilizado como consulta para uma busca de similaridade, utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), permitindo uma identificação preliminar do gênero e espécie das linhagens. Os resultados com identidade e cobertura superiores a 90% foram então selecionados para prosseguir com a análise.

Em seguida, os genomas correspondentes às linhagens identificadas foram obtidos no Genbank Datasets e submetidos à ferramenta OAT v.0.9 (Orthologous Average Nucleotide Identity Tool). Esta ferramenta é utilizada para a identificação precisa de linhagens bacterianas, calculando parâmetros como GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator) e ANI (Average Nucleotide Identity), que são critérios comuns para a delimitação de espécies bacterianas. Para fins deste estudo, foram estabelecidos critérios de identidade superiores a 95% em ambas as medidas como um limiar para a confirmação das linhagens estudadas.

Com as linhagens devidamente identificadas, prosseguiu-se com os próximos passos do processo de montagem e anotação dos genomas. O MeDuSa v1.0 foi empregado para aprimorar a qualidade das montagens, realizando o alinhamento dos contigs com um genoma de referência relacionado, identificado previamente como descrito anteriormente. Em seguida, a ferramenta RagTag v2.1 foi utilizada para fechar gaps na montagem, realizando um realinhamento dos contigs à referência, gerando scaffolds e preenchendo gaps na montagem, garantindo uma montagem mais completa e precisa dos genomas, enquanto eventuais gaps restantes serão fechados manualmente com o auxílio da ferramenta CLC Genomics v24.0.

Após a montagem dos genomas, prosseguiu-se com a anotação dos genes e

elementos genômicos presentes. Para isso, utilizou-se a ferramenta PROKKA v1.14.6, reconhecida por sua capacidade de realizar anotações automáticas em genomas bacterianos. O PROKKA identificou e anotou genes, RNAs e outras características genômicas, fornecendo uma visão abrangente da composição genética das linhagens.

Complementarmente, a qualidade das montagens obtidas foi avaliada utilizando o QUAST v5.2, uma ferramenta de avaliação de qualidade de montagens de genoma. Foram calculadas métricas como quantidade de contigs, tamanho do maior contig e N50, proporcionando uma avaliação objetiva da qualidade das montagens em relação aos genomas de referência. Para garantir a completude dos genomas montados, utilizou-se a ferramenta BUSCO v5.7.1, que compara os genomas montados com um banco de dados de genes conservados universalmente. Isso permitiu uma avaliação mais precisa da integridade dos genomas em relação aos genes esperados em um genoma completo e funcional.

Subsequentemente, as cinco linhagens bacterianas foram depositadas no NCBI. O depósito de dados genômicos em repositórios públicos, como o NCBI, inclui anotações detalhadas que descrevem a estrutura genética das bactérias estudadas. Essas anotações fornecem informações sobre a localização precisa de cada gene no genoma, seu tipo, função e características estruturais. Esses dados são cruciais para interpretar os dados genômicos e conduzir análises adicionais.

Dessa forma, a combinação cuidadosa destas ferramentas de bioinformática permitiram não apenas a montagem e anotação precisa dos genomas das linhagens de *Bacillus*, mas também uma avaliação detalhada de sua qualidade e completude. Esses dados fornecerão uma base sólida para as análises subsequentes e para o entendimento mais aprofundado da biologia e potencial agrícola dessas linhagens microbianas.

### 3.4 CONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

Após identificar previamente linhagens relacionadas a *B. nitratireducens* através de buscas no banco de dados do NCBI usando o BLAST e OAT, como mencionado, foi realizado o *download* dos genomas completos dessas linhagens no *GenBank Datasets*. Este passo é crucial para obter os dados necessários para análises filogenéticas posteriores. Os genomas completos fornecem uma visão abrangente da composição genética das linhagens, permitindo uma comparação detalhada entre elas.

Em seguida, os genomas completos foram submetidos à análise no TYGS (*Type Strain Genome Server*), uma plataforma especializada em análises taxonômicas e

filogenéticas baseadas em genomas completos de bactérias. Utilizando algoritmos como RAxML (*Randomized Accelerated Maximum Likelihood*) e FastME (*Fasta Minimum Evolution*) (MEIER-KOLTHOFF e GÖKER, 2019), o TYGS construiu uma árvore filogenética, levando em consideração os genomas completos das linhagens. Parâmetros como *bootstrap support* foram usados para avaliar a robustez das relações filogenéticas inferidas.

Adicionalmente, para complementar a análise filogenética, também utilizou-se sequências dos genes 16S rRNA e gyrB. Essas sequências foram submetidas a análises de máxima verossimilhança (*software* IQtree no phylous) e inferência bayesiana (*software* Mr Bayes) para a construção de árvores filogenéticas. Essas árvores foram avaliadas com base nas distribuições de probabilidade a posteriori obtidas por simulação de Monte Carlo em Cadeias de Markov (MCMC) via *Gibbs sampling* (HUELSENBECK, JP, e F. RONQUIST. 2001), fornecendo informações adicionais sobre as relações evolutivas entre as linhagens, considerando a similaridade entre as sequências de 16S rRNA e gyrB.

Por fim, uma análise do proteoma das linhagens de *B. nitratireducens* e suas linhagens filogeneticamente relacionadas também foi realizada utilizando o TYGS. Essa análise comparativa do proteoma permitiu uma investigação mais detalhada das relações filogenéticas com base nas proteínas codificadas pelos genomas, fornecendo informações adicionais sobre a evolução e as diferenças dessas linhagens bacterianas. Esse conjunto de análises filogenéticas, baseadas em diferentes abordagens e ferramentas de bioinformática, forneceu uma visão abrangente das relações evolutivas e taxonômicas de *B. nitratireducens*, enriquecendo o entendimento sobre sua biologia.

### 3.5 CORE-GENOMA

Para a análise do core-genoma das bactérias promotoras de crescimento de plantas, o *software* Prokka foi utilizado para anotação dos genes, enquanto o Roary foi empregado para caracterização destes mesmos genes, em todas as linhagens. Reconhecido por sua eficiência na construção de pangenomas a partir de genomas bacterianos previamente anotados, o Roary agrupou os genes anotados em famílias de genes ortólogos, definindo o core-genoma como o conjunto de genes compartilhados por todas as linhagens bacterianas investigadas. Também permitiu a análise de pangenomas, incluindo a identificação de genes acessórios, presentes em algumas, mas não em todas as linhagens.

Complementarmente, foram identificados os locais de origem das 19 linhagens estudadas no presente trabalho de acordo com informações disponíveis no NCBI, a fim de

correlacionar a presença de genes essenciais, acessórios e únicos entre as bactérias e o ambiente de coleta das amostras, possibilitando inferir possíveis justificativas para aquisição de novos genes.

### 3.6 PERFIL METABÓLICO

Para caracterizar o perfil metabólico das linhagens de *B. nitratireducens*, seguiu-se uma abordagem que incluiu análises de bioinformática detalhadas, como mineração de dados na literatura e comparação genômica. Inicialmente, foram utilizados o GUTSMASH e o ANTISMASH, duas ferramentas de bioinformática reconhecidas por sua eficácia na identificação de *loci* biossintéticos em genomas bacterianos. O GUTSMASH foi utilizado para analisar metabólitos primários, enquanto o ANTISMASH investigou metabólitos secundários, permitindo a identificação e anotação de *clusters* de genes envolvidos na produção de compostos diversos, como antibióticos e toxinas.

Posteriormente, realizou-se uma mineração extensiva na literatura científica para identificar genes relacionados à solubilização de potássio e fosfato (Quadro A1 – Anexo). Essa abordagem permitiu acessar conhecimentos prévios e selecionar genes de interesse conhecidos por desempenharem funções específicas nessas vias metabólicas. Com os genes de interesse, consultou-se o banco de dados UNIPROT para obter informações adicionais sobre suas funções, sequências de aminoácidos e anotações funcionais. O UNIPROT forneceu detalhes cruciais para compreender melhor a função e a estrutura dos genes identificados, enriquecendo a análise.

Por fim, realizou-se uma comparação genômica utilizando a ferramenta tBLASTn, que nos permitiu verificar a presença, a conservação e a similaridade dos genes de interesse nas linhagens de *B. nitratireducens* deste estudo. Essa análise comparativa nos ajudou a entender a composição genômica das linhagens e a avaliar suas capacidades metabólicas específicas.

### 3.7 POTENCIAL PGPR DE LINHAGENS DE *B. nitratireducens*

Para avaliar a atividade microbiana das linhagens de *B. nitratireducens*, foram conduzidos testes de solubilização sólida de potássio e fosfato ao longo de um período de um mês, mantendo uma temperatura constante de 28°C. Cada teste foi realizado em duplicata, utilizando 5 placas de Petri por tratamento.

Inicialmente, os meios de cultura específicos para cada teste foram preparados de acordo com as formulações estabelecidas: Aleksandrov (ALEK) para solubilização de potássio e NBRIP para solubilização de fosfato. O meio ALEK foi preparado conforme a formulação de Aleksandrov (1967). O meio NBRIP foi composto seguindo a receita descrita por Nautiyal (1999).

Em seguida, os isolados foram inoculados nos meios de cultura correspondentes, garantindo uma distribuição homogênea das células. As placas de Petri foram cuidadosamente fechadas e incubadas a 28°C durante o período de um mês. Durante esse tempo, foi realizada avaliação do crescimento e capacidade metabólica das linhagens bacterianas.

Diariamente durante o período de incubação, as placas de Petri foram examinadas para avaliar os resultados dos testes. Avaliou-se a formação de halo ao redor das colônias bacterianas no teste de solubilização de potássio, indicando a capacidade de solubilização desse elemento. No teste de solubilização de fosfato, foram avaliadas alterações na coloração do meio de cultura, além do halo ao redor das colônias, indicando a solubilização do fosfato presente.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados e discussão deste estudo. Inicialmente, são descritos os processos de montagem e anotação de genomas das bactérias de interesse. Em seguida, detalha-se a construção filogenética e a análise do perfil metabólico. O capítulo também aborda a avaliação da atividade microbiana. Uma análise comparativa dos resultados também é discutida.

As informações das características genômicas, assim como o número de acesso dos 19 *B. nitratireducens* e 1 *B. proteolyticus* estão expostas na Tabela 1. De acordo com os resultados de anotação de qualidade da montagem dos genomas do *software* QCAST, os genomas sequenciados e montados de *B. nitratireducens* LABIM48, LABIM49, LABIM50, LABIM 51 E LABIM53, apresentam, tamanho total do genoma de 5.842.495 pares de bases (pb), maior *contig* com 5.253.779 pb, L50 1 e conteúdo médio de G + C de 35.18 % (LABIM48); tamanho total do genoma de 5.772.751 pb, maior *contig* com 5.156.678 pb, L50 1, e conteúdo médio de G + C de 35.18 % (LABIM49); tamanho total do genoma de 5.873.418 pb, maior *contig* com 5.228.846 pb, L50 1 e conteúdo médio de G + C de 35.16 % (LABIM50); tamanho total do genoma de 5.805.898 pb, maior *contig* 5.240.551 pb, L50 1 e conteúdo médio G + C 35.23 % (LABIM51) e por fim, a linhagem *B. nitratireducens* LABIM53, apresentou tamanho total do genoma de 5.669.018 pb, maior *contig* 5.190.595 pb, L50 1 e conteúdo médio G + C 35.2 %, respectivamente.

O conteúdo G + C dos 19 *B. nitratireducens* variaram de 35.13 a 35.46 %. O tamanho total dos genomas variaram de 5.056.959 a 6.024.475 pb. A quantidade de genes codificadores de proteínas variaram de 5158 a 7067. Isto é, pode ser que o *B. nitratireducens* seja uma espécie recém-formada, por apresentar baixa variação em relação ao tamanho total do genoma, conteúdo médio G + C e quantidade de genes codificadores de proteínas.

**Tabela 1 - Caracterização das 19 linhagens de *Bacillus nitratireducens* avaliadas.**

<b>Linhagem</b>	<b>Tamanho do genoma (pb)</b>	<b>G + C (%)</b>	<b>CDS</b>	<b>Nº de acesso</b>
LABIM48	5.842.495	35.18	6040	-
LABIM49	5.772.751	35.18	5957	-
LABIM50	5.873.418	35.16	6233	-
LABIM51	5.805.898	35.23	7067	-

LABIM53	5.669.018	35.20	5897	JBLFHU000000000
DE0281	5.830.469	35.20	5958	NZ_VEKU00000000.1
DE0018	5.879.417	35.22	5996	NZ_VEMS00000000.1
112MF	5.810.072	35.20	5900	NZ_FNRB00000000.1
4049	5.933.421	35.14	5990	NZ_JAUMJO00000000.1
ATCC6463	6.068.801	35.22	6596	NZ_VKPW00000000
NRS-319	5.979.646	35.13	6075	NZ_JARTIK00000000.1
DE0363	6.040.430	35.15	6213	NZ_VEKC00000000.1
DE0364	6.059.720	35.14	6276	NZ_VEKB00000000.1
HD-50	5.928.555	35.18	6045	NZ_JARLXK00000000.1
JJ1048	5.862.887	35.19	5981	NZ_JBANCC00000000.1
DE0336	5.585.060	35.24	5730	NZ_VEKG00000000.1
N4150	5.056.959	35.46	5158	<u>NZ_CP093844.1</u>
BD-32	5.706.001	35.20	5806	NZ_JARLYH00000000.1
BM02	5.511.760	35.49	5553	<u>NZ_CP047366.1</u>

Fonte: Autoria própria (2025).

A estabilidade do conteúdo de G + C dentro do grupo *Bacillus cereus* tem sido amplamente relatada na literatura, como no estudo de Liu et al. (2017), que descreveram nove novas espécies, entre elas *B. nitratireducens*, com valores de G + C variando entre 35,0% e 35,5%. Esses resultados foram obtidos por meio de análises filogenéticas baseadas em hibridização DNA-DNA digital (dDDH) e Identidade Média de Nucleotídeos (ANI), reforçando a classificação taxonômica desse grupo.

No estudo de Ridella et al. (2024), a caracterização genômica de *B. nitratireducens* revelou um conteúdo de G + C de aproximadamente 35,54%, corroborando os valores previamente descritos e também identificados no presente estudo. Essa estabilidade genômica é um forte indicativo da identidade filogenética da espécie, diferenciando-a de outras próximas dentro do grupo *Bacillus cereus*.

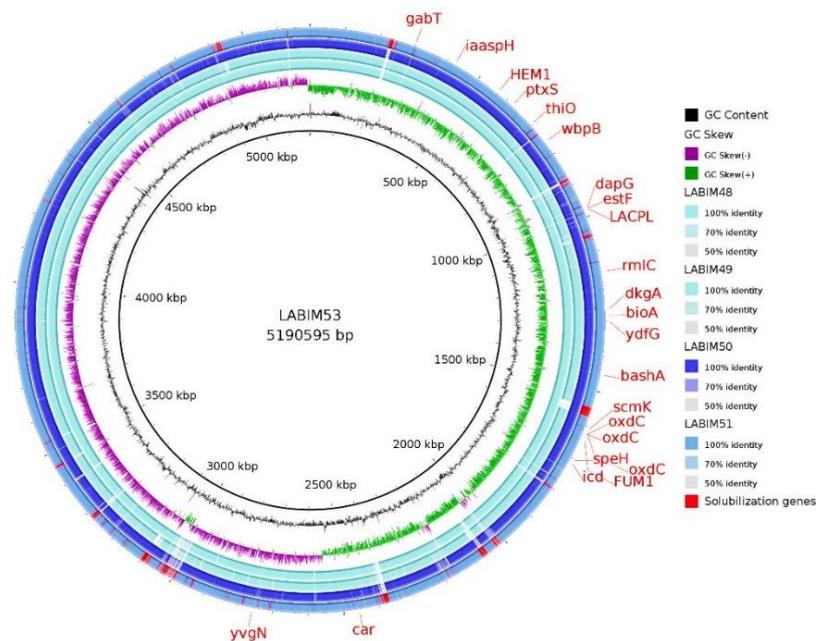
Liu et al. (2017) destacam a importância da análise de ANI e dDDH para discriminação de novas espécies dentro desse grupo, visto que a similaridade genética pode ultrapassar 97% no sequenciamento do gene 16S rRNA, dificultando a diferenciação baseada apenas nessa abordagem. O estudo de Ridella et al. (2024) seguiu essa metodologia, assim

como este estudo, assegurando uma classificação precisa e fundamentada para *B. nitratreducens*.

O BRIGGS foi utilizado para criar um gráfico circular que representa as características dos genomas bacterianos. Neste gráfico (Figura 11), os três anéis internos representam três informações específicas: o tamanho do DNA da linhagem LABIM53, o conteúdo de G + C e a inclinação de G + C. Já os 4 anéis externos representam os genomas das diferentes linhagens, nomeadas como: LABIM48, LABIM49, LABIM50 e LABIM51. Além dessas informações, os genes de solubilização estão destacados no anel mais externo com marcadores vermelhos. Esses genes são responsáveis pelas vias metabólicas da solubilização de potássio e fósforo, desempenhando um papel crucial na capacidade das bactérias de produzir ácidos orgânicos essenciais para a disponibilização de fontes minerais solúveis, facilitando sua absorção e utilização pelas plantas.

Estudos como o de Wang et al. (2022) mostram que a organização do genoma circular permite a identificação de genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários e mecanismos de defesa, fundamentais para o potencial biotecnológico das linhagens bacterianas. No caso do *Bacillus velezensis* WB, a representação do genoma revelou a presença de 13 clusters gênicos relacionados à produção de metabólitos antimicrobianos, incluindo surfactina, fengicina e bacillibactina, compostos essenciais para a atividade antifúngica e a promoção do crescimento vegetal (WANG *et al.*, 2022).

**Figura 11 - Mapa genômico circular de LABIM53, destacando conteúdo GC, skew GC, comparações de identidade com LABIM48-51, e genes de solubilização de potássio e fósforo.**



Fonte: Autoria própria (2025).

A importância da representação circular do genoma também se reflete no estudo de Chen et al. (2022), que analisaram *Bacillus aryabhatai* SK1-7, um solubilizador de potássio. O mapa genômico possibilitou a identificação de genes envolvidos nas vias metabólicas responsáveis pela produção de ácidos orgânicos, fundamentais para a solubilização de potássio e a liberação de nutrientes essenciais para as plantas (CHEN *et al.*, 2022).

Além da identificação funcional dos genes, a visualização do genoma facilita comparações entre linhagens bacterianas. No estudo de Pan et al. (2024), o genoma circular de *Bacillus subtilis* H2 foi utilizado para identificar clusters gênicos responsáveis pela produção de metabólitos antimicrobianos e pelo metabolismo do ácido palmítico, um composto com atividade antifúngica e potencial aplicação na proteção de culturas agrícolas. A análise comparativa revelou que o genoma de *B. subtilis* H2 possui genes específicos que o diferenciam de outras linhagens de *Bacillus*, destacando a importância da organização genômica para a funcionalidade da espécie (PAN *et al.*, 2024).

A visualização do genoma circular de bactérias é fundamental para compreender sua organização genética, dinâmica de replicação e eventos de transferência horizontal. O trabalho de Itaya (2025) destaca o desenvolvimento de um sistema vetorial baseado no genoma de *Bacillus subtilis* capaz de clonar, editar e transmitir genomas sintetizados. Essa abordagem permite manipular grandes segmentos de DNA, ultrapassando as limitações de estabilidade que afetam moléculas >200 kbp em solução líquida. A visualização gráfica e física desses genomas circulares facilita a identificação de regiões de interesse, pontos de inserção e facilita a engenharia genética por recombinação homóloga.

A Figura 12 apresenta uma matriz de similaridade entre diferentes linhagens de *B. nitratreducens*, gerada utilizando o *software* Gegenees. Esta é uma ferramenta usada para comparar genomas em larga escala e visualizar similaridades entre eles, frequentemente representadas em *heatmaps* como este. As porcentagens de similaridade são calculadas com base em comparações de sequências genéticas, e a coloração indica o grau de similaridade, com o verde representando alta similaridade e o gradiente laranja indicando menor similaridade.

A linhagem 1 (112MF) é altamente similar à linhagem 2 (DE0281) e à linhagem 3 (DE0018), com similaridades de 99.9% e 99.2%, respectivamente. Em contraste, ela tem menor similaridade com linhagens como a 14 (DE0336) e a 15 (N4150), com valores de 79.9% e 83.8%, respectivamente. A linhagem 5 (LABIM50) mostra 100% de similaridade com a linhagem 4 (LABIM48), indicando que são idênticas ou muito próximas geneticamente. Esta linhagem apresenta uma similaridade moderada a alta com outras

linhagens, variando de 85.8% a 94.7%.

Jia et al. (2023) demonstraram que a análise de *heatmaps* auxilia na detecção de interações microbianas, permitindo identificar correlações entre perfis metabólicos e produção de compostos de interesse. No estudo, a técnica revelou padrões específicos de coocorrência entre bactérias e arqueias, destacando a influência na composição da microbiota intestinal de vacas e, suas funções metabólicas (JIA *et al.*, 2023). Assim, entende-se que o método de análise exibe identificação fidedigna, justificando a utilização no presente estudo.

A linhagem 10 (JJ1048) é altamente similar às linhagens 11 (HD-50) e 12 (BM02), com similaridades de 100% e 95.4%, respectivamente. No entanto, ela tem menor similaridade com a linhagem 17 (NRS-319), com 72.2%. A linhagem 14 (DE0336) apresenta menor similaridade com muitas outras linhagens, como a 1 (112MF) e a 2 (DE0281), ambas abaixo de 80%. Sua similaridade mais alta é com a linhagem 13 (BD-32), com 84.0%.

A linhagem 19 (DE0364) é altamente similar à linhagem 18 (DE0363), com 99.8%, indicando que são praticamente idênticas. No entanto, ela apresenta baixa similaridade com linhagens como a 7 (LABIM53) e a 8 (LABIM49), ambas abaixo de 83%. De maneira geral, as linhagens parecem agrupar-se em subgrupos de alta similaridade, com pares ou pequenos conjuntos apresentando similaridade próxima de 100%. As cores indicam que a maioria das comparações entre linhagens resulta em similaridades entre 70% e 90%, com alguns casos de similaridade extrema, tanto alta quanto baixa.

No estudo de Xia et al. (2022), a relação entre a distância filogenética e a presença de clusters de genes biossintéticos (BGCs) foi analisada, demonstrando que linhagens filogeneticamente próximas tendem a compartilhar conjuntos similares de genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários. Essa relação direta entre similaridade genômica e potencial biossintético destaca a importância da análise de *heatmaps* para identificar padrões de conservação genética e inferir a capacidade metabólica de diferentes linhagens (XIA *et al.*, 2022).

**Figura 12 - Heatmap de similaridade genômica das linhagens de *Bacillus nitratireducens*.**

Organism	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1: <i>Bacillus nitratireducens</i> 112MF	100.0	99.5	99.6	97.9	95.4	92.6	90.1	85.0	84.8	84.4	84.2	78.3	80.1	76.8	73.0	84.7	85.1	85.2	85.2
2: <i>Bacillus nitratireducens</i> DE0281	99.3	100.0	99.8	98.0	95.7	92.7	90.4	85.1	84.8	84.5	84.2	78.2	80.0	76.8	72.8	84.8	85.0	85.3	85.3
3: <i>Bacillus nitratireducens</i> DE0018	99.2	99.6	100.0	97.9	95.5	92.7	90.2	84.6	84.3	84.4	83.8	77.7	79.6	76.3	72.4	84.7	85.0	85.2	85.2
4: <i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM48	97.3	97.6	97.6	100.0	95.3	92.5	90.1	84.8	84.6	84.2	83.9	77.9	79.7	76.7	72.6	84.5	84.8	85.0	85.0
5: <i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM50	94.4	94.7	94.7	94.7	100.0	93.2	89.3	84.9	84.6	83.2	83.0	77.4	79.2	75.7	72.0	83.7	84.0	84.4	84.4
6: <i>Bacillus nitratireducens</i> 4049	91.2	91.5	91.6	91.7	92.9	100.0	87.8	84.4	84.5	83.0	82.8	77.1	78.8	75.8	71.9	84.2	84.4	84.0	84.0
7: <i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM53	92.3	92.5	92.5	92.6	92.4	91.1	100.0	87.3	86.9	85.3	85.2	79.7	81.3	78.0	74.2	87.2	87.5	87.4	87.4
8: <i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM49	85.5	85.6	85.6	85.7	86.2	86.1	85.8	100.0	96.2	83.8	84.6	77.7	80.5	75.7	72.4	88.1	88.5	89.5	89.5
9: <i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM51	84.7	84.8	84.8	84.9	85.4	85.6	84.8	95.6	100.0	83.1	83.7	77.3	79.7	75.3	72.2	88.2	88.6	88.9	88.9
10: <i>Bacillus nitratireducens</i> JJ1048	84.0	84.2	84.3	84.2	83.7	83.8	83.1	83.2	82.8	100.0	96.7	77.1	79.7	75.4	72.0	84.1	84.1	84.0	84.0
11: <i>Bacillus nitratireducens</i> HD-50	82.7	82.8	82.9	82.8	82.4	82.5	81.7	82.6	82.2	95.4	100.0	76.6	79.3	74.6	71.2	82.7	83.0	82.8	82.8
12: <i>Bacillus nitratireducens</i> BM02	82.7	83.3	83.3	83.3	83.1	83.3	82.8	82.3	82.3	82.5	82.9	100.0	87.2	79.2	77.3	82.4	82.4	82.6	82.6
13: <i>Bacillus nitratireducens</i> BD-32	81.5	81.5	81.6	81.5	81.4	81.4	80.8	81.3	81.1	81.4	82.1	83.4	100.0	75.9	73.9	80.9	81.1	81.2	81.2
14: <i>Bacillus nitratireducens</i> DE0336	79.9	80.0	80.1	80.2	79.6	80.1	79.2	78.3	78.3	78.8	79.0	77.4	77.7	100.0	76.6	80.0	80.3	79.6	79.6
15: <i>Bacillus nitratireducens</i> N4150	83.8	84.3	84.3	84.3	84.2	84.5	83.6	83.1	83.3	83.8	84.0	83.7	83.9	85.0	100.0	83.8	84.0	83.8	83.8
16: <i>Bacillus nitratireducens</i> ATCC6463	83.7	83.9	84.0	84.0	83.6	84.4	84.1	86.6	87.2	83.6	83.3	76.5	78.7	76.0	71.6	100.0	98.1	91.1	91.1
17: <i>Bacillus nitratireducens</i> NRS-319	83.0	83.1	83.2	83.2	82.9	83.6	83.4	86.0	86.6	82.5	82.5	75.7	78.0	75.4	70.9	97.0	100.0	90.0	90.0
18: <i>Bacillus nitratireducens</i> DE0363	82.6	82.8	82.8	82.9	82.8	82.6	82.9	86.3	86.3	81.7	81.7	75.2	77.6	74.2	70.2	89.3	89.3	100.0	99.9
19: <i>Bacillus nitratireducens</i> DE0364	82.5	82.7	82.7	82.8	82.7	82.5	82.8	86.2	86.2	81.6	81.6	75.2	77.5	74.2	70.0	89.3	89.3	99.8	100.0

Fonte: Autoria própria (2025).

Estudos comparativos entre espécies do gênero *Bacillus* mostraram que a variação genômica pode estar diretamente relacionada a fatores ecológicos e funcionais. Owusu-Darko et al. (2020) realizaram uma análise filogenômica detalhada de *Bacillus sporothermodurans*, comparando seu genoma com o de outras espécies do grupo *B. subtilis* e *B. cereus*. O estudo revelou que *B. sporothermodurans* possui um conjunto distinto de genes associados à resistência térmica, o que sugere que variações na similaridade genômica podem refletir adaptações específicas a ambientes extremos (OWUSU-DARKO et al., 2020). Este cenário passa a ser passível de observação no grupo de bactérias utilizadas no presente estudo, a partir da interpretação da Figura 12, junto a Tabela 2, a seguir.

As sequências dos genomas de *B. nitratireducens*LABIM48, LABIM49, LABIM50, LABIM51 e LABIM53 foram comparadas com outras 14 sequências genômicas disponíveis no *Genbank Datasets* e, para os valores digitais de hibridização do DNA-DNA (dDDh), com valores de proximidade superior a 95%, houveram dois agrupamentos para diferenciação intraespecífica, como visto nas Tabelas 2 e 3 a diante:

**Tabela 2 - Agrupamento 1 entre as bactérias originais da pesquisa e as depositadas com livre acesso no repositório do NCBI.**

Linhagens estudadas	Referências	dDDh (%)
LABIM48	DE0281	99.6
LABIM48	DE0018	99.6

LABIM48	112MF	99.5
LABIM48	LABIM50	97.8
LABIM48	4049	96.2
LABIM48	LABIM53	95.6
LABIM50	DE0281	97.9
LABIM50	DE0018	97.8
LABIM50	112MF	97.7
LABIM50	LABIM48	97.8
LABIM50	4049	96.7
LABIM53	DE0281	95.8
LABIM53	DE0018	95.8
LABIM53	112MF	95.6

Fonte: A autoria própria (2025).

Para o segundo agrupamento, não houve valores de dDDh superiores a 95 % com nenhuma linhagem comparada do banco de dados mencionado anteriormente, assim como também não houve proximidade entre as demais linhagens originais da pesquisa, como LABIM48, LABIM50 e LABIM53, formando-o apenas entre as linhagens LABIM49 e LABIM51.

A importância do dDDH% na taxonomia bacteriana é amplamente reconhecida. Ser et al. (2020) realizaram a caracterização genômica de *Bacillus* sp. MUM116, isolado de solos intertidais, utilizando dDDH% para diferenciar essa linhagem de outras do mesmo gênero. O estudo revelou que *B. MUM116* possuía menos de 90% de similaridade com outras linhagens conhecidas, demonstrando que este isolado representa uma possível nova espécie dentro do gênero *Bacillus* (SER et al., 2020). A ausência de valores de dDDH superiores a 95% entre algumas linhagens de *B. nitratireducens* no estudo atual sugere um fenômeno similar, indicando que estas podem apresentar características genômicas diferenciadas.

O uso do dDDH% também tem sido crucial na identificação de linhagens com aplicações biotecnológicas. Ayangbenro e Babalola (2020) analisaram *Bacillus cereus* NWUAB01, uma linhagem isolada de solo contaminado por metais pesados. A comparação genômica revelou a presença de genes envolvidos na resistência a metais como cádmio e chumbo, o que torna essa linhagem um potencial candidato para bioremediação (AYANGBENRO; BABALOLA, 2020). No contexto de *B. nitratireducens*, a identificação de linhagens geneticamente distintas através do dDDH% pode indicar potenciais variações

funcionais, como diferenças na capacidade de solubilização de nutrientes ou produção de metabólitos secundários.

**Tabela 3 - Agrupamento 2 entre as bactérias originais da pesquisa e as depositadas com livre acesso no repositório do NCBI.**

<b>Linhagens estudadas</b>	<b>Referências</b>	<b>dDDh (%)</b>
LABIM49	LABIM51	96.2

Fonte: Autoria própria (2025).

O aspecto relevante é a relação entre a distância genômica e a produção de compostos bioativos, como corrobora o estudo de Pramod et al. (2021). Estudaram *Bacillus subtilis* A1, isolado de solo litorâneo, e demonstraram que sua análise genômica, baseada em técnicas como dDDH%, revelou uma forte correlação entre a proximidade genética e a capacidade de produzir metabólitos antimicrobianos, como surfactina e fengicina (PRAMOD et al., 2021). Isto é, a proximidade dos resultados de dDDH indicam que o subgrupo pode compartilhar do mesmo potencial para biotecnologia, na produção de compostos de interesse.

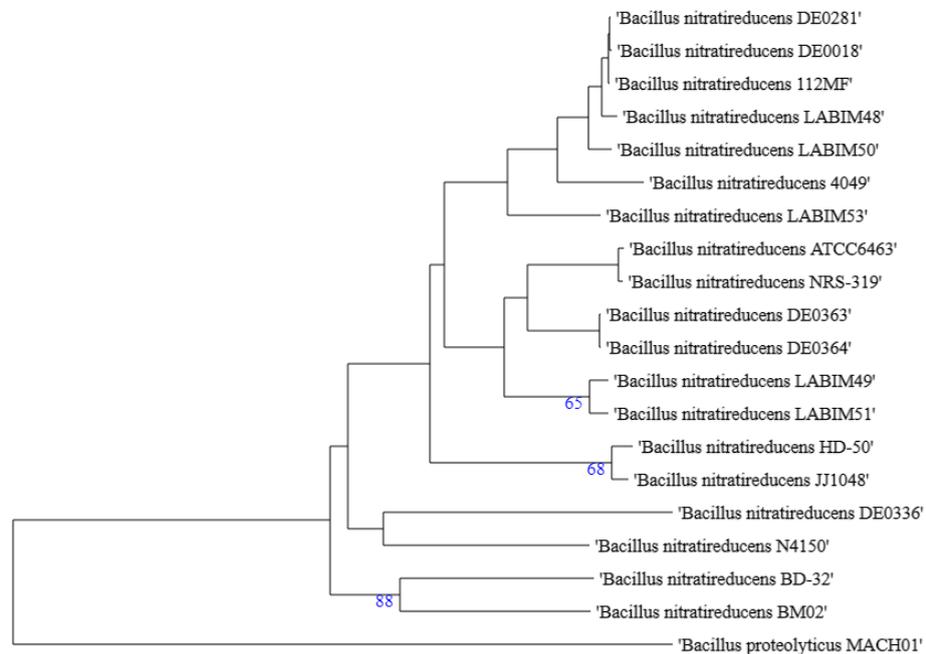
A análise filogenética conduzida com 19 linhagens de *B. nitratreducens* e 1 linhagem de *B. proteolyticus* para enraizar as árvores revelou que todas as linhagens estudadas são de fato da mesma espécie, *B. nitratreducens*. Esta conclusão foi alcançada utilizando três abordagens distintas: genomas completos (Figura 13), gene 16S rRNA (Figura 14) e, adicionalmente, foi realizada a análise do proteoma, para identificar similaridade entre os perfis metabólicos (Figura 15).

Os 19 genomas de *B. nitratreducens* incluíram 14 linhagens obtidas do *GenBank Datasets* e 5 linhagens originais da pesquisa. A análise filogenética baseada em genomas completos utilizou métricas como *Average Nucleotide Identity* (ANI) e *DNA-DNA Hybridization* (DDH), que demonstraram alta similaridade entre todas as linhagens de *B. nitratreducens*, confirmando que pertencem à mesma espécie. A árvore filogenética resultante mostrou que essas linhagens formam um grupo coeso, indicando uma origem comum recente e uma evolução genética conservada.

A importância dessas métricas na taxonomia bacteriana já foi demonstrada em diversos estudos. Sakoparnig et al. (2021) discutem como a reconstrução de árvores filogenéticas baseadas em genomas completos reflete padrões de recombinação e estrutura populacional em bactérias. O estudo demonstra que, embora a recombinação seja frequente, o ANI e o dDDH% são métodos robustos para inferir relações evolutivas, desde que aplicados a

conjuntos de dados suficientemente grandes e diversificados (SAKOPARNIG *et al.*, 2021).

**Figura 13 - Árvore filogenética de *Bacillus nitratireducens* baseada em genomas completos construída utilizando o método de máxima verossimilhança.**

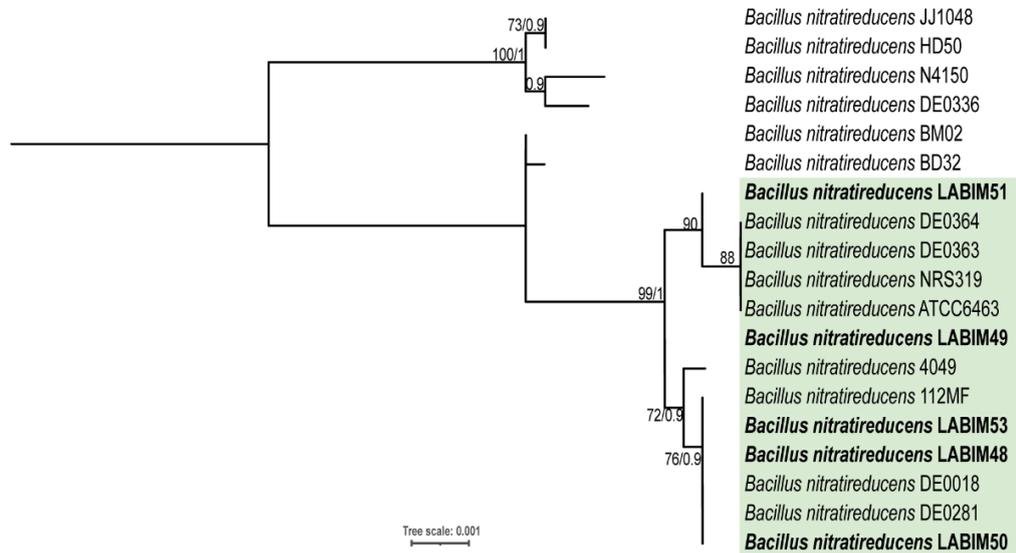


Fonte: Autoria própria (2025).

Outro aspecto relevante é a padronização dos métodos para construção de árvores filogenéticas. Shakya *et al.* (2020) desenvolveram um fluxo de trabalho para análise filogenética baseada em genoma completo, destacando a importância de métricas como ANI e dDDH% na diferenciação entre linhagens próximas. O estudo enfatiza que a combinação dessas métricas com a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) resulta em filogenias precisas e robustas, minimizando o impacto de erros de montagem genômica (SHAKYA *et al.*, 2020).

A análise baseada nos genes 16S rRNA e *gyrB*, realizada através dos métodos de inferência clássica usando estimadores de máxima verossimilhança e por métodos de inferência bayesiana, usando simulação MCMC. As sequências de 16S rRNA e *gyrB* das linhagens foram alinhadas e comparadas, revelando pouca variação e confirmando que todas as linhagens compartilham uma elevada similaridade neste marcador genético universalmente conservado entre bactérias. Este resultado é consistente com a classificação taxonômica de todas as linhagens como *B. nitratireducens*.

**Figura 14 - Árvore filogenética de *Bacillus nitratireducens* baseada nas sequências dos genes 16S rRNA e gyrB construída utilizando os métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana.**



Fonte: Autoria própria (2025).

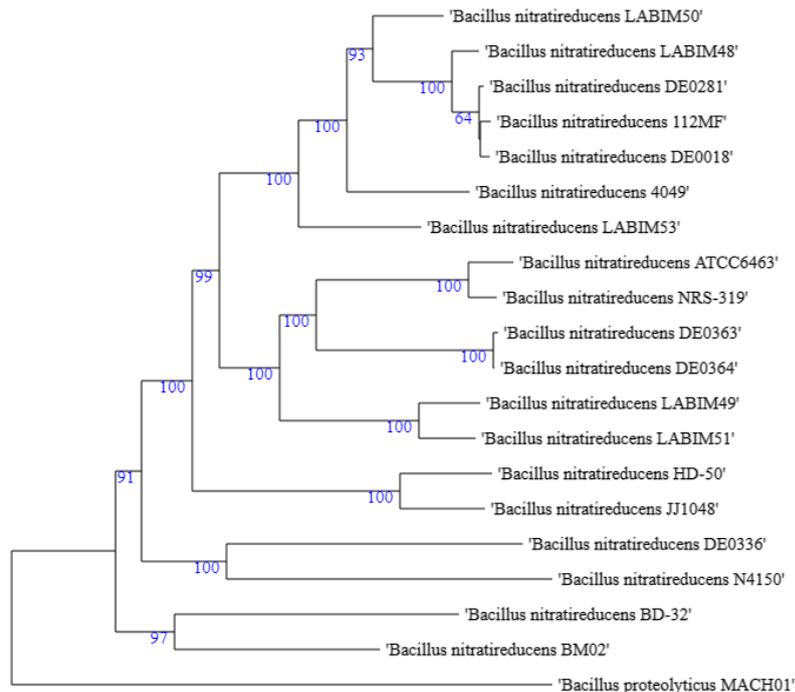
A utilização do gene 16S rRNA na construção de árvores filogenéticas é um procedimento consolidado na microbiologia sistemática. Alyousif (2022) demonstrou que a análise molecular baseada na sequência do 16S rRNA foi essencial para a caracterização e diferenciação de espécies do gênero *Bacillus* isoladas de solos no Iraque. O estudo revelou que *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* foram as espécies mais predominantes, evidenciando a robustez desse gene como marcador genético para análise taxonômica (ALYOUSIF, 2022).

No entanto, o uso exclusivo do 16S rRNA pode apresentar limitações, especialmente em linhagens filogeneticamente próximas. Zalma e El-Sharoud (2021) destacam que a diferenciação entre algumas espécies do gênero *Bacillus* pode ser dificultada pela conservação do gene 16S rRNA. Para superar essa limitação, o estudo utilizou genes adicionais, como *gyrA* e *rpoB*, que forneceram maior resolução filogenética, permitindo a separação de grupos genéticos distintos dentro da mesma espécie (ZALMA; EL-SHAROUD, 2021).

Além da escolha dos genes, a metodologia utilizada para a inferência filogenética tem um papel crucial na acurácia das análises. O estudo de Iskandar et al. (2021) aplicou o método de inferência bayesiana na construção de árvores filogenéticas para identificar bactérias com potencial para biorremediação. Esse método probabilístico permitiu uma análise mais robusta das relações evolutivas entre os isolados, proporcionando uma

representação mais confiável da filogenia bacteriana (ISKANDAR *et al.*, 2021). Portanto, a análise combinada dos genes 16S rRNA e *gyrB*, associada aos métodos filogenéticos baseados em inferência bayesiana e máxima verossimilhança, fortalece a classificação taxonômica das linhagens de *B. nitratireducens*.

**Figura 15 - Árvore filogenética de *Bacillus nitratireducens* baseada em proteoma construída utilizando o método de máxima verossimilhança.**



Fonte: Autoria própria (2025).

Por fim, a análise do proteoma, que envolveu a comparação de sequências de proteínas ortólogas com aplicação do método de máxima verossimilhança como máxima verossimilhança, também suportou a conclusão de que todas as linhagens compartilham de perfis metabólicos semelhantes. As proteínas comparadas mostraram um alto grau de conservação, reforçando as relações evolutivas próximas entre as linhagens.

A análise proteômica tem sido amplamente utilizada na caracterização de linhagens bacterianas e suas funções metabólicas. Swarge *et al.* (2020) realizaram uma investigação detalhada da dinâmica proteômica e transcriptômica durante a germinação de esporos de *Bacillus subtilis*, demonstrando que a conservação proteica entre linhagens é essencial para garantir a continuidade dos processos metabólicos ao longo do ciclo de vida bacteriano. O estudo identificou 322 proteínas diferencialmente expressas entre esporos e células vegetativas, sugerindo que a estabilidade do proteoma é crucial para a sobrevivência e adaptação bacteriana (SWARGE *et al.*, 2020).

Adicionalmente, a abordagem proteômica tem sido aplicada para elucidar a resposta bacteriana a diferentes condições ambientais e de estresse. Gangola et al. (2021) analisaram o proteoma de *Bacillus cereus* sob estresse de pesticidas e em condições normais, identificando proteínas diferencialmente expressas associadas à degradação de xenobióticos e mecanismos de defesa celular. A conservação de proteínas essenciais sob diferentes condições ambientais sugere que linhagens do gênero *Bacillus* mantêm perfis metabólicos robustos e adaptáveis, o que reforça os achados do estudo sobre *B. nitratireducens* (GANGOLA et al., 2021).

Outro exemplo do uso da proteômica na caracterização funcional de *Bacillus* é o estudo de Khorramnejad et al. (2020), que combinou análises genômicas e proteômicas para identificar novas proteínas pesticidas em *Bacillus thuringiensis*. O estudo demonstrou que a análise proteômica pode revelar proteínas específicas envolvidas em interações ecológicas, além de auxiliar na descoberta de novos genes de interesse biotecnológico (KHORRAMNEJAD et al., 2020). Desta forma, a análise proteômica se mostra essencial na diferenciação funcional e na compreensão da estabilidade metabólica das linhagens bacterianas. No caso de *B. nitratireducens*, a alta similaridade entre as proteínas analisadas reforça sua identidade taxonômica e indica que essas linhagens compartilham vias metabólicas conservadas.

No presente estudo, *B. proteolyticus* foi utilizado como outgroup para enraizar as árvores filogenéticas. Isso significa que, nas árvores resultante, *B. proteolyticus* aparece em um ramo distinto e externo, enquanto todas as linhagens de *B. nitratireducens* formam um clado separado e bem definido. Este uso do outgroup ajudou a identificar a direção evolutiva e a estabelecer a posição das linhagens de *B. nitratireducens* dentro da árvore filogenética.

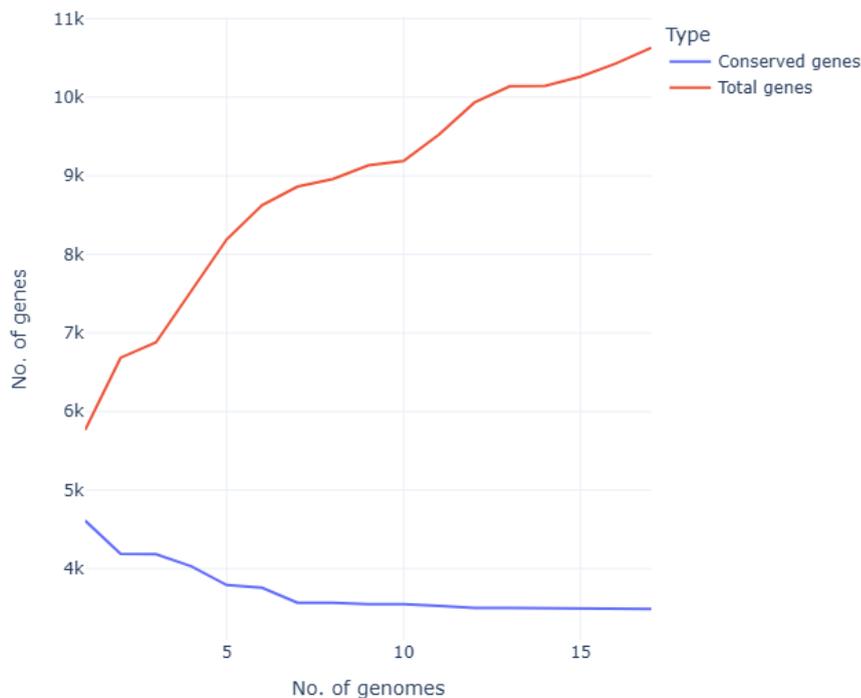
Em resumo, a convergência dos resultados obtidos através de análises de genomas completos, 16S rRNA e proteoma fornece uma evidência robusta de que as 19 linhagens analisadas pertencem à mesma espécie, *B. nitratireducens* e, compartilham de um perfil metabólico próximo. A utilização de *B. proteolyticus* como outgroup foi crucial para enraizar a árvore e confirmar a monofilia das linhagens de *B. nitratireducens*, destacando a precisão e a complementaridade das diferentes abordagens filogenéticas empregadas no estudo.

A análise do pangenoma de 19 cepas da espécie *Bacillus nitratireducens* revelou uma diversidade genética significativa, refletida na distribuição dos genes entre as diferentes categorias do pangenoma. O número total de genes identificados foi de 12.677, classificados em três grupos principais: core, acessório e específicos de cepa.

O número total de genes identificados na análise do pangenoma de *B. nitratireducens* (12.677 genes) sugere que essa espécie apresenta um pangenoma aberto, semelhante ao

observado em *Bacillus subtilis* e *Bacillus velezensis*. A abertura do pangenoma indica que novas linhagens podem continuar adquirindo genes por meio de transferência horizontal (HGT), aumentando sua diversidade funcional e adaptabilidade ambiental (WANG *et al.*, 2024).

**Figura 16. Relação entre genes totais e conservados, número de genes (eixo y) e número de genomas (eixo x).**



Fonte: Próprio autor (2025).

A análise do pangenoma de *B. nitratireducens* revelou uma significativa diversidade genética, refletida na distribuição dos genes entre as três categorias do pangenoma. O total de 3.491 genes do *core genome*, presente em todas as 19 cepas analisadas, representa a base genética essencial da espécie, incluindo genes fundamentais para funções metabólicas e manutenção celular. Esses achados corroboram a literatura sobre pangenomas bacterianos, que destaca a estabilidade e conservação dos genes essenciais para a sobrevivência das espécies (CHORDIA GOLCHHA *et al.*, 2024).

O conceito de pangenoma, introduzido por Tettelin *et al.* (2005), tem sido amplamente utilizado para compreender a diversidade genômica de microrganismos, diferenciando os genes essenciais (*core genome*) dos genes acessórios e específicos de cepa. Estudos recentes demonstram que o tamanho do *core genome* pode variar entre diferentes espécies bacterianas, sendo maior em organismos filogeneticamente próximos e menor em linhagens que ocupam nichos ecológicos distintos (CHORDIA GOLCHHA *et al.*, 2024).

A estabilidade do *core genome* de *B. nitratireducens* sugere que a espécie mantém um conjunto conservado de genes essenciais para processos celulares básicos, como metabolismo energético, replicação do DNA e síntese proteica. Essa característica é observada em outras bactérias do gênero *Bacillus*, cujos estudos apontam que a manutenção desses genes é essencial para a sobrevivência em diferentes ambientes (SIMONSEN, 2021).

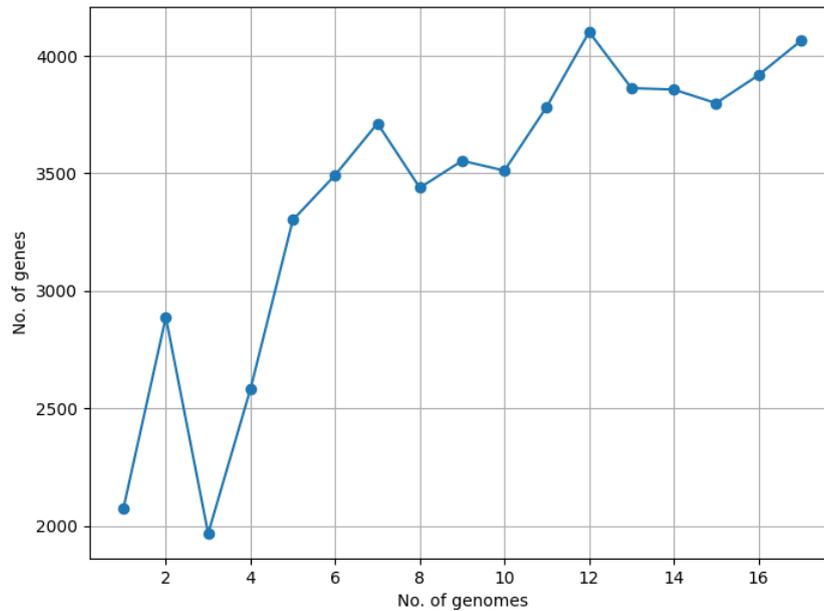
Os genes acessórios, que são compartilhados por algumas, mas não todas as cepas, totalizaram 5.118 genes. Essa fração compreende genes que podem estar relacionados a adaptações ambientais, resistência a estresses específicos e especializações metabólicas. A presença desses genes indica uma plasticidade genômica dentro da espécie, permitindo sua adaptação a diferentes condições ambientais.

A análise comparativa do pangenoma de *Bacillus nitratireducens* com outras linhagens do gênero *Bacillus* também destaca o papel dos genes acessórios, que representam uma parte significativa do genoma e conferem vantagens adaptativas específicas. Estudos indicam que genes acessórios frequentemente estão associados à produção de metabólitos secundários, fatores de virulência e mecanismos de resistência a antibióticos, permitindo que essas linhagens colonizem nichos distintos e desempenhem funções especializadas (ALENEZI *et al.*, 2021).

A comparação com pangenomas de outras espécies demonstra a relevância dos genes acessórios na adaptação a condições ambientais específicas. Em um estudo sobre *Bradyrhizobium diazoefficiens*, Simonsen (2021) demonstrou que a evolução do pangenoma é influenciada por fatores ambientais, levando à retenção seletiva de genes acessórios essenciais para a sobrevivência em solos com diferentes condições de acidez, temperatura e salinidade. Essa plasticidade genética também pode estar presente em *B. nitratireducens*, permitindo sua adaptação a nichos específicos por meio da aquisição de genes acessórios via transferência horizontal de genes (CHOUDOIR *et al.*, 2023).

A análise do pangenoma de *Bacillus nitratireducens* revelou um total de 4.069 genes específicos entre as linhagens, ou seja, genes que aparecem exclusivamente em uma única bactéria analisada. Esses genes representam eventos potenciais de aquisição recente, frequentemente associados à HGT, um mecanismo crucial para a adaptação bacteriana a diferentes ambientes e condições seletivas (IQBAL *et al.*, 2021).

**Figura 17. Número de genomas em função do número de genes.**



Fonte: Próprio autor (2025).

Estudos indicam que a presença de genes específicos de cepa pode conferir vantagens seletivas significativas, como resistência a antibióticos, fatores de virulência e especializações metabólicas. Por exemplo, a análise do pangenoma de *Bacillus pumilus* mostrou que genes exclusivos estavam associados a clusters biossintéticos secundários responsáveis por metabolitos com atividade antimicrobiana e promotora de crescimento vegetal (IQBAL *et al.*, 2021). De forma semelhante, *Bacillus velezensis* apresenta genes específicos voltados para a produção de moléculas antifúngicas, conforme observado na análise de seu pangenoma e ensaios de docking molecular (KADIRI *et al.*, 2023)

A grande quantidade de genes específicos em *B. nitratireducens* sugere uma alta plasticidade genética dentro da espécie. Isso pode estar relacionado à adaptação a nichos ecológicos distintos e ao desenvolvimento de novas funções biológicas. Estudos anteriores demonstraram que a variabilidade genômica entre linhagens de *Bacillus* é altamente influenciada pelo ambiente em que as cepas são isoladas. Em *Bacillus anthracis*, por exemplo, a análise do pangenoma revelou a existência de genes exclusivos capazes de atuar como marcadores genéticos para diferenciação da espécie em relação a outras do grupo *Bacillus cereus* (ZORIGT *et al.*, 2024).

No contexto de *B. nitratireducens*, a presença desses genes específicos sugere uma potencial especialização funcional, possivelmente relacionada à solubilização de nutrientes, biocontrole e resistência a fatores ambientais adversos. Essa hipótese é corroborada por estudos que demonstram que *Bacillus* pode adquirir genes especializados que melhoram sua capacidade

de sobrevivência em solos agrícolas, facilitando sua aplicação como biofertilizante e agente de biocontrole (KADIRI *et al.*, 2023)

A análise do pangenoma de *Bacillus nitratreducens* pode ser correlacionada com o Tabela 4, que apresenta a distribuição geográfica das linhagens depositadas, permitindo compreender a relação entre variabilidade genética e os diferentes ambientes de coleta. A presença de uma fração significativa de genes acessórios e específicos de cepa sugere que a diversidade ambiental pode ter impulsionado a aquisição de genes por meio de transferência horizontal, possibilitando a adaptação das linhagens a distintos nichos ecológicos.

**Tabela 4. Relação da distribuição geográfica das linhagens depositadas**

<b>Linhagem</b>	<b>Local de coleta</b>
LABIM48	BRA: Pontal do Paraná, Paraná
LABIM49	BRA: Pontal do Paraná, Paraná
LABIM50	BRA: Pontal do Paraná, Paraná
LABIM51	BRA: Pontal do Paraná, Paraná
LABIM53	BRA: Pontal do Paraná, Paraná
DE0281	<a href="#">USA: North Carolina, Durham</a>
DE0018	USA: North Carolina, Durham
112MF	USA: <a href="#">Berkeley, Califórnia</a>
4049	Colombia: Togui panela production plant
ATCC6463	-
NRS-319	-
DE0363	USA: North Carolina, Durham
DE0364	USA: North Carolina, Durham
HD-50	-
JJ1048	USA: Alabama
DE0336	USA: North Carolina, Durham
N4150	Germany: long-term fertilization experiment Paulinenaue
BD-32	Trinidad and Tobago: Trinidad, Talparo
BM02	Taiwan: Taichung city

Fonte: Próprio autor (2025).

O core genome, composto por 3.491 genes, representa as funções essenciais da espécie e se mantém conservado independentemente da origem geográfica das amostras, enquanto os genes acessórios e específicos refletem a plasticidade genômica característica de um pangenoma aberto. As linhagens foram coletadas em locais distintos, como ambientes agrícolas da Alemanha e Colômbia, e regiões costeiras do Brasil, o que pode ter favorecido a aquisição diferencial de genes relacionados a características adaptativas específicas, como tolerância a sais em linhagens marinhas ou resistência a fertilizantes em linhagens de solos

cultiváveis. A predominância de genes não essenciais compartilhados por algumas, mas não todas as cepas, reforça a ideia de que fatores ecológicos e geográficos influenciam diretamente a composição genética da espécie. Esse contexto destaca a importância de considerar a variabilidade ambiental na análise do pangenoma, sugerindo que a contínua aquisição de novos genes pode ser um fator determinante para a sobrevivência e o sucesso ecológico de *Bacillus nitratireducens* em diferentes habitats.

Estudos recentes sobre pangenomas de *Bacillus* demonstram a influência do ambiente na composição genética das populações. Segundo Wu et al. (2021), a seleção de linhagens pode impactar a análise do pangenoma, pois a inclusão de cepas geneticamente distintas pode alterar a percepção sobre a diversidade genômica. Ademais, Swiecicka et al. (2021), demonstram que, para *Bacillus mycoides*, fatores ecológicos como a composição do solo e pressões antropogênicas impactam diretamente a diversidade genômica. No estudo do *B. nitratireducens*, a coleta de amostras em ambientes agrícolas da Alemanha e Colômbia, e regiões costeiras do Brasil, reforça a hipótese de que a pressão ambiental influencia a aquisição diferencial de genes.

A predominância de genes não essenciais compartilhados por algumas, mas não todas as cepas, sugere que fatores ecológicos e geográficos desempenham um papel crucial na estruturação do pangenoma. Estudos com *Bacillus subtilis* demonstram que a presença de elementos móveis, como profagos, pode contribuir para a diversificação genômica e influenciar a dinâmica evolutiva da espécie (STEFANIC et al., 2025).

A integração entre análises de pangenoma e metagenoma pode oferecer percepções adicionais sobre a dinâmica evolutiva e funcional de *B. nitratireducens*. Conforme Zhong et al. (2021), essa abordagem permite compreender como as interações ecológicas moldam a composição genômica das populações microbianas. A interação entre fatores ambientais e a aquisição de genes é um fator determinante para a sobrevivência e sucesso ecológico de *B. nitratireducens* em diferentes habitats.

Assim, a análise do pangenoma de *B. nitratireducens* reforça a importância da diversidade ambiental na composição genômica da espécie, indicando que a pressão seletiva imposta pelos diferentes habitats influencia diretamente a dinâmica de aquisição e manutenção de genes. Estudos adicionais utilizando integração de metagenomas podem aprofundar a compreensão sobre os mecanismos que regem a diversificação genômica e a adaptação ecológica da espécie.

A ferramenta GUTSMASH foi utilizada para realizar a análise das regiões codificadoras de metabólitos primários em todas as cinco linhagens estudadas (Figura 16, 17 e

18). GUTSMASH é uma ferramenta bioinformática projetada para identificar e prever a presença de vias biossintéticas de metabólitos em genomas bacterianos. Essa ferramenta combina dados genômicos com algoritmos de previsão para detectar agrupamentos de genes responsáveis pela síntese de metabólitos específicos.

Segundo Andreu et al. (2021), essa plataforma combina algoritmos de predição com bases de dados genômicas para identificar vias metabólicas conhecidas e potenciais vias não descritas anteriormente. A ferramenta permite prever até 41 vias metabólicas distintas, incluindo aquelas envolvidas na produção de energia e na biossíntese de moléculas essenciais, auxiliando no entendimento da organização metabólica dos microrganismos analisados (ANDREU *et al.*, 2021). No contexto de *B. nitratireducens*, a identificação dessas vias pode indicar sua relevância para processos biotecnológicos, como a biofertilização e a solubilização de nutrientes no solo.

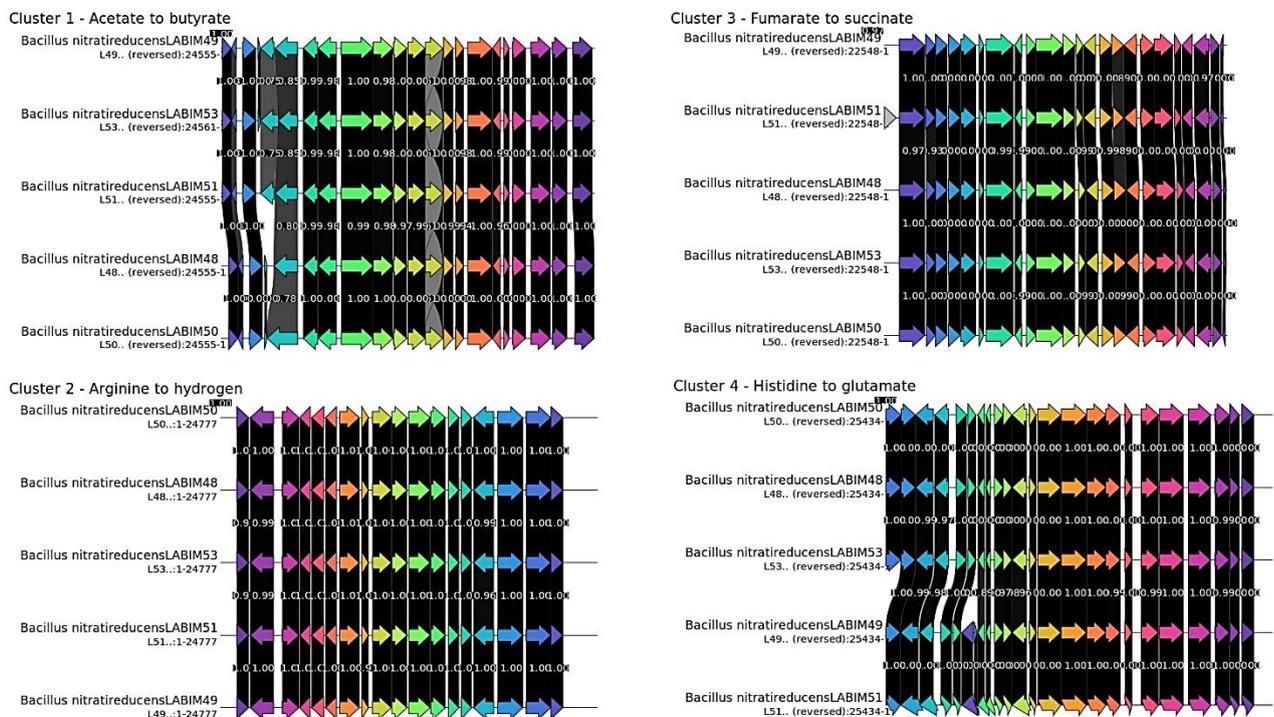
A análise identificou onze regiões codificadoras de metabólitos primários nas cinco linhagens avaliadas. Essas regiões são responsáveis pela produção de diversos metabólitos essenciais para a célula. Entre os metabólitos identificados estão: Arginina<sup>2</sup> Hidrogenocarbonato, Piruvato<sup>2</sup>Acetato-formiato, Metabolismo TPP AA, Redutase de Nitrato, Operon HutHGIU Histidina<sup>2</sup>Glutamato, Fumarato<sup>2</sup>Succinate, Putrescina<sup>2</sup>Espermidina, Desidrogenase NADH I e Acetato<sup>2</sup>Butirato.

Estudos metabolômicos demonstram que a identificação de vias metabólicas primárias é essencial para caracterizar a funcionalidade de linhagens bacterianas. Kharnaior e Tamang (2022) realizaram um estudo metagenômico e metabolômico de microrganismos presentes em alimentos fermentados, revelando a presença de 216 sub-vias metabólicas associadas à produção de metabólitos essenciais para a sobrevivência bacteriana. A presença de metabólitos como fumarato e putrescina indica a importância dessas vias para o metabolismo energético e a regulação do ciclo do nitrogênio, respectivamente, o que corrobora a relevância dos compostos identificados em *B. nitratireducens* (KHARNAIOR; TAMANG, 2022).

Complementarmente, cabe discutir as enzimas que participam das vias metabólicas identificadas, como por exemplo a que reduz nitrato a nitrito, um passo vital no ciclo do nitrogênio, e o operon HutHGIU que converte histidina em glutamato, essencial para a síntese de proteínas e o metabolismo de nitrogênio. As enzimas também catalisam a conversão de fumarato em succinato no ciclo do ácido cítrico, convertem putrescina em espermidina para a síntese de poliaminas, e a Desidrogenase NADH I, uma enzima chave na cadeia de transporte de elétrons e produção de ATP. A via metabólica que converte acetato em butirato é

importante para a produção de ácidos graxos de cadeia curta. Entre os onze agrupamentos identificados, oito estão diretamente envolvidos nas seguintes funções e vias metabólicas: arginina para hidrogenocarbonato, piruvato para acetato-formiato, redutase de nitrato, histidina para glutamato, ramo redutivo da leucina, desidrogenase NADH I, acetato para butirato e arginina para putrescina. Essas vias são essenciais para o metabolismo celular, fornecendo energia, precursores biossintéticos e regulando o ciclo de nitrogênio e a síntese de poliaminas. A identificação dessas regiões codificadoras é crucial para entender o metabolismo primário das linhagens estudadas.

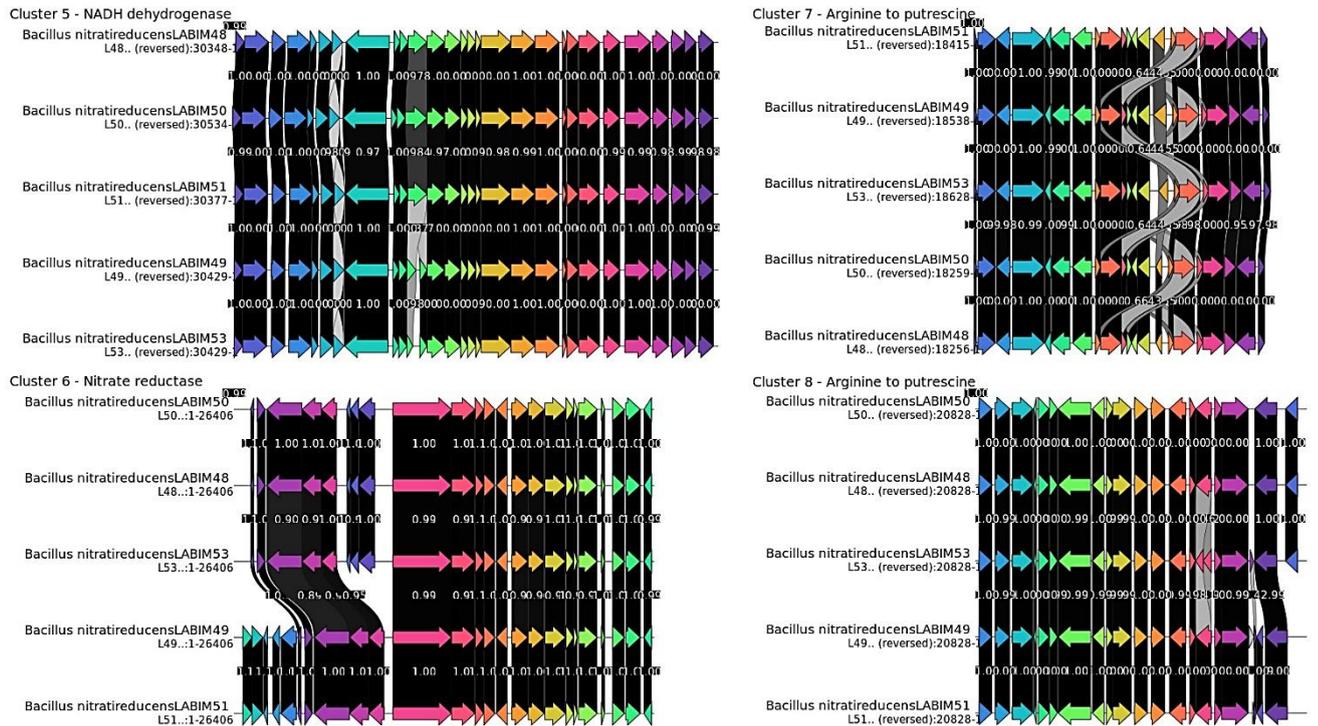
**Figura 18. Regiões codificadoras de metabólitos primários e agrupamentos gênicos: Acetate to butyrate, Arginine to hydrogen, Fumarate to succinate e Histidine to glutamate.**



Fonte: Autoria própria (2025).

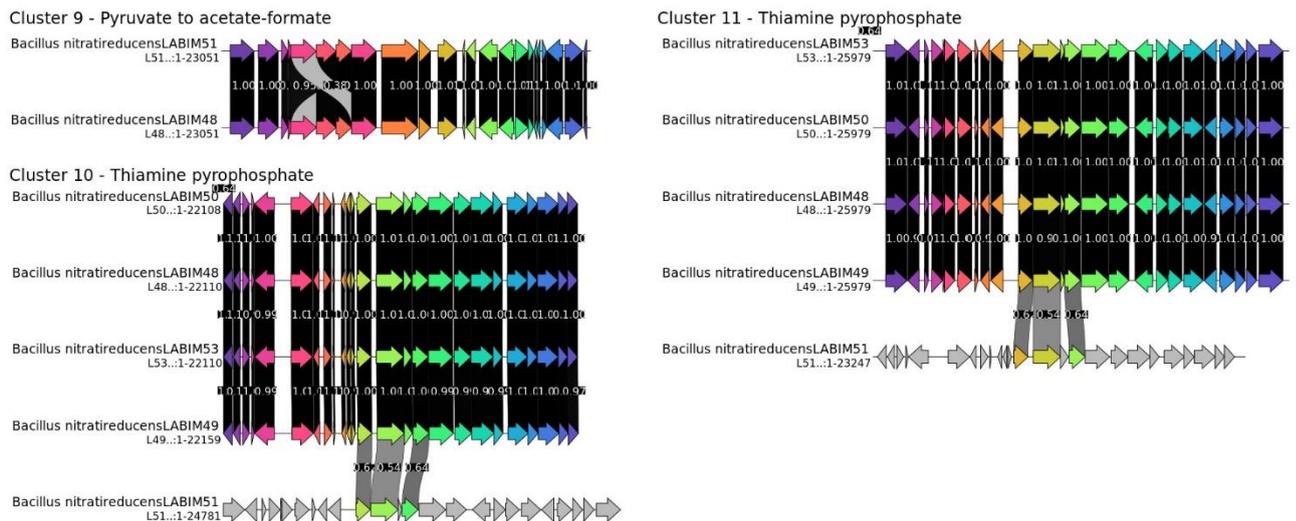
O estudo das vias metabólicas em diferentes linhagens bacterianas também é crucial para identificar adaptações ecológicas e funcionais. Caro-Astorga et al. (2020) demonstraram que *Bacillus cereus* apresenta rearranjos metabólicos distintos dependendo do seu estado fisiológico, como a transição entre células planctônicas e a formação de biofilmes. Essas alterações incluem o reforço de vias de síntese de aminoácidos e compostos de defesa, permitindo que as bactérias ajustem seu metabolismo primário conforme as condições ambientais (CARO-ASTORGA *et al.*, 2020).

**Figura 19. Regiões codificadoras de metabólitos primários e agrupamentos gênicos: NADH dehydrogenase, Nitrate reductase e 2Arginine to putrescine.**



Fonte: Autoria própria (2025).

**Figura 20. Regiões codificadoras de metabólitos primários e agrupamentos gênicos: Pyruvate to acetate-formate, 2Thiamine pyrophosphate.**



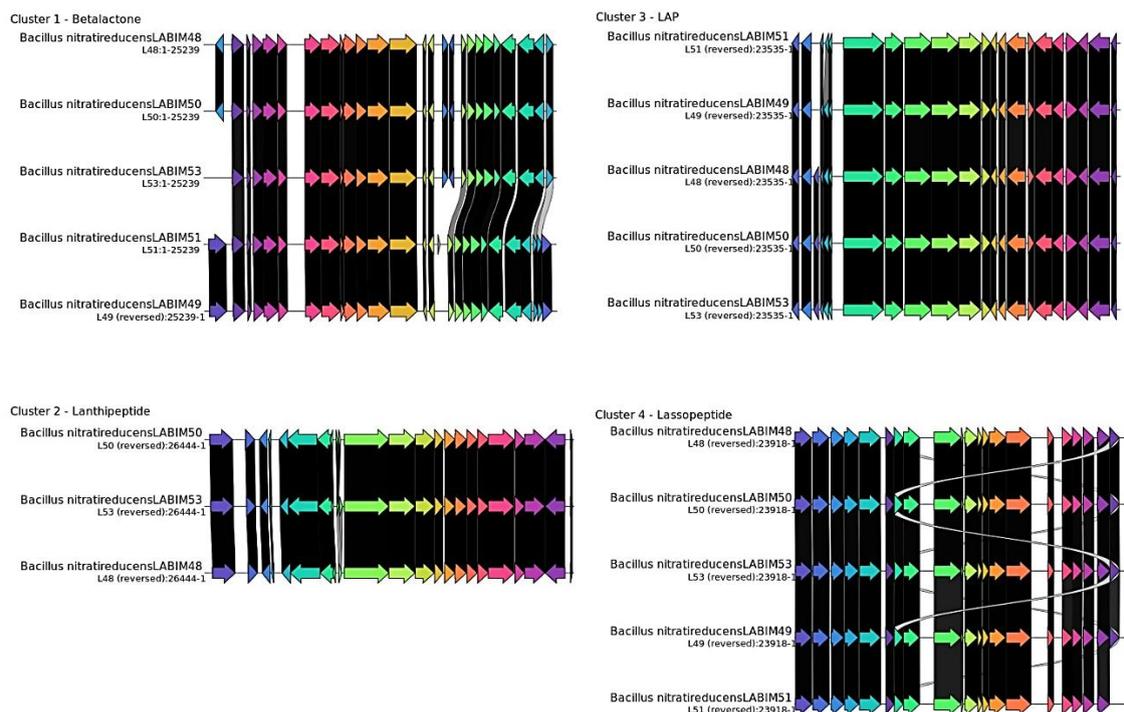
Fonte: Autoria própria (2025).

Bai et al. (2024) destacam que a análise multiômica, incluindo estudos metabólicos, permite explorar a resistência de *Bacillus velezensis* ao estresse nutricional em plantas. A

pesquisa demonstrou que a bactéria se adapta para otimizar a captação e o uso de nutrientes, o que pode ser um indicativo de como *B. nitratireducens* modula seu metabolismo primário para adaptar-se a diferentes condições ambientais, como sabe-se, as linhagens estudadas foram coletadas em lugares distintos, refletindo e reforçando a explicação das características únicas e compartilhadas dentro do grupo analisado.

A análise realizada com a ferramenta antiSMASH para identificar os grupos de metabólitos secundários (Figura 19, 20 e 21) potencialmente produzidos pelas cinco linhagens originais da pesquisa revelou uma diversidade significativa de regiões codificadoras desses compostos. As linhagens LABIM48, LABIM49, LABIM50, LABIM51 e LABIM53 apresentaram uma variedade de regiões responsáveis pela biossíntese de diferentes metabólitos secundários, confirmando um potencial biossintético diverso.

**Figura 21 - Regiões codificadoras de metabólitos secundários e agrupamentos gênicos: Betalactone, Lanthipeptide, LAP e Lassopeptide.**

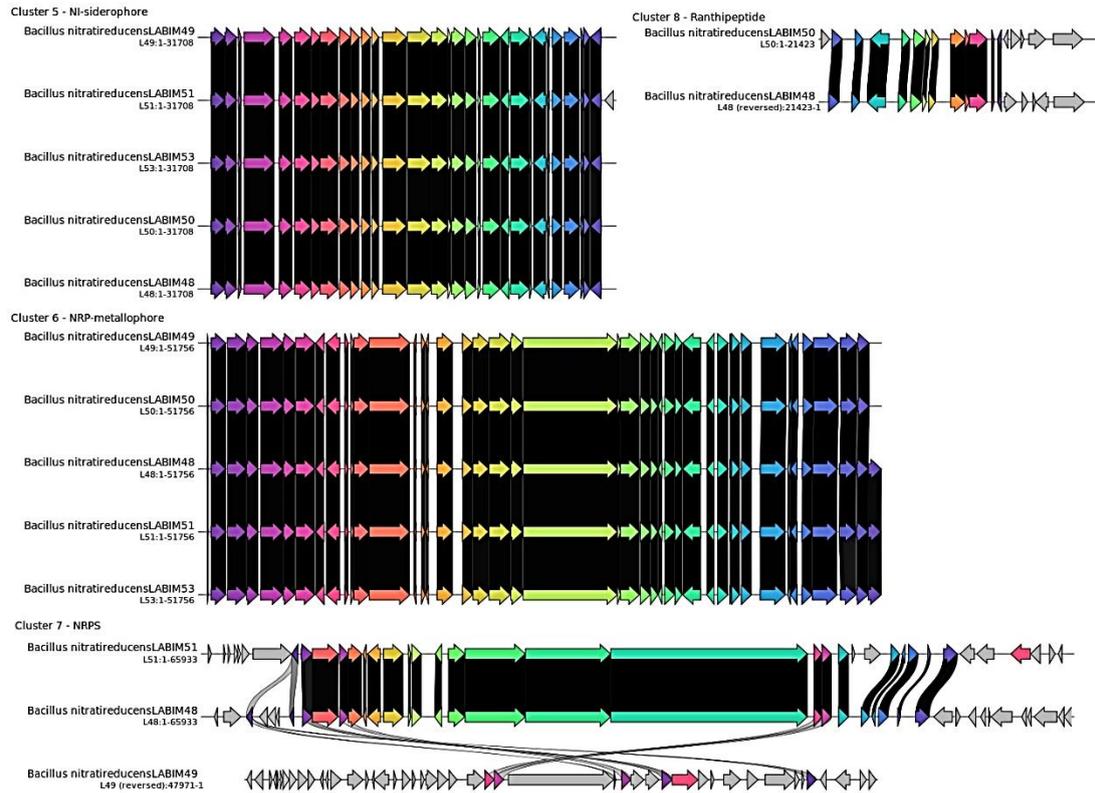


Fonte: Autoria própria (2025).

A produção de metabólitos secundários em *Bacillus* tem sido amplamente estudada devido ao seu potencial para o biocontrole de fitopatógenos e promoção do crescimento vegetal. Abdel-Nasser et al. (2024) identificaram compostos bioativos derivados de *Bacillus cereus* com propriedades antifúngicas e antiaflatoxigênicas, capazes de inibir a produção de aflatoxinas em *Aspergillus flavus* em até 99,98%. Os metabólitos identificados incluíram

compostos voláteis orgânicos e polifenóis, demonstrando a importância da caracterização dessas substâncias para aplicações na segurança alimentar e na proteção de culturas agrícolas (ABDEL-NASSER *et al.*, 2024)

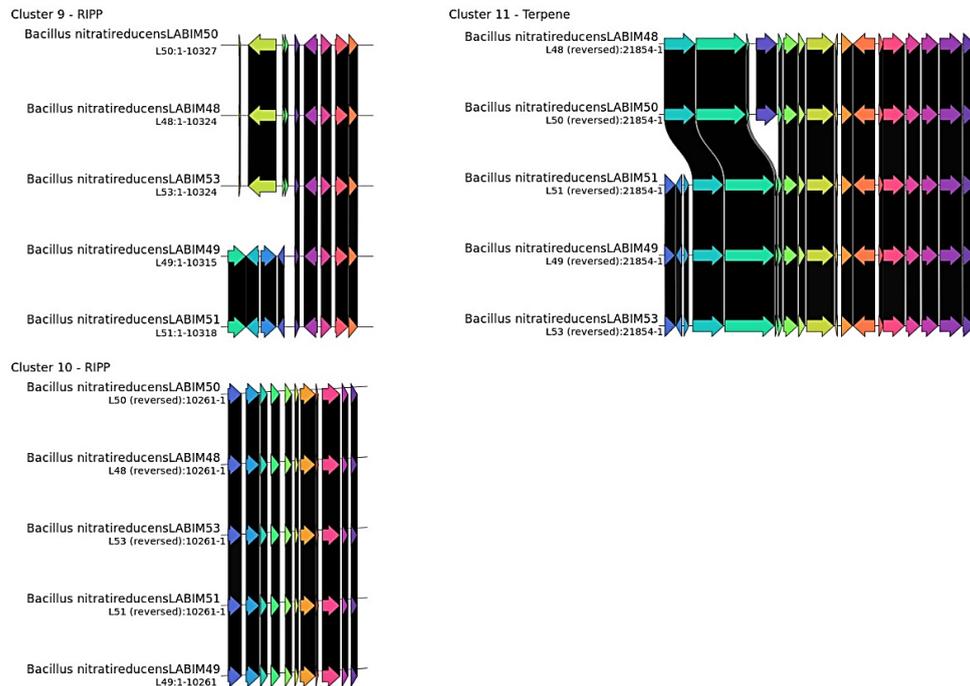
**Figura 22 - Regiões codificadoras de metabólitos secundários e agrupamentos gênicos: Ni-siderophore, NRP-metallophore, NRPS, Ranthipeptide.**



Fonte: Autoria própria (2025).

A diversidade de *clusters* biossintéticos observada nas linhagens de *B. nitratireducens* é consistente com estudos anteriores sobre a biossíntese de metabólitos secundários em *Bacillus*. Thomludi et al. (2021) analisaram os *clusters* metabólicos de *Bacillus halotolerans* e identificaram uma variedade de genes associados à produção de compostos antimicrobianos e promotores de crescimento vegetal. O estudo demonstrou que esses *clusters* desempenham um papel crucial na capacidade antagonista da bactéria contra *Botrytis cinerea* e na indução da defesa vegetal, indicando a importância desses compostos na interação entre bactérias e plantas (THOMLOUDI et al., 2021)

**Figura 23 - Regiões codificadoras de metabólitos secundários e agrupamentos gênicos: 2RIPP e Terpene.**



Fonte: Autoria própria (2025).

Na linhagem LABIM48, foram identificadas nove regiões codificadoras de metabólitos secundários, incluindo um LAP (peptídeo associado a lantipeptídeos), um NI-siderophore (sideróforo de níquel), um NRP-metallophore (metalo-peptídeo não ribossomal), um NRPS (sintetase de peptídeo não ribossomal), dois RiPP-like (peptídeos ribossomais e produtos de proteínas pós-traducionais), um Betalactone (betalactona), um Lanthipeptide-class-i (lantipeptídeo classe I), um Terpene (terpeno) e um Lasso-peptide (lassopeptídeo). Quatro desses agrupamentos estão envolvidos na síntese de petrobactina, bacilibactina, fengicina e paenimodina, indicando a capacidade da linhagem de produzir compostos importantes para a competição microbiana e sobrevivência em ambientes específicos.

A linhagem LABIM49 apresentou oito regiões codificadoras de metabólitos secundários, com um perfil quase idêntico ao da LABIM48, exceto pela ausência de uma região específica adicional. Os agrupamentos incluem LAP, NI-siderophore, NRP-metallophore, NRPS, dois RiPP-like, Betalactone, Terpene e Lasso-peptide, com os mesmos compostos alvo, petrobactina, bacilibactina, fengicina e paenimodina, destacando a consistência na capacidade biossintética entre essas linhagens.

A linhagem LABIM50 apresentou dez regiões codificadoras de metabólitos secundários, adicionando um Ranthipeptide (peptídeo ribossomal associado a lantipeptídeos) ao perfil identificado nas linhagens anteriores. Essa linhagem possui, portanto, uma

capacidade ligeiramente aumentada para a produção de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo os quatro compostos principais mencionados.

Na linhagem LABIM51, foram identificadas oito regiões, novamente com um perfil muito similar às outras linhagens, destacando-se pela presença de NI-siderophore, LAP, NRP-metallophore, NRPS, dois RiPP-like, Betalactone, Terpene e Lasso peptide. A produção de petrobactina, bacilibactina, fengicina e paenimodina continua a ser uma característica comum.

A linhagem LABIM53 apresentou nove regiões codificadoras de metabólitos secundários, refletindo a diversidade observada em LABIM48 e LABIM50, com a inclusão de um Lanthipeptide-class-i e os mesmos compostos alvo principais.

A relação entre os perfis metabólicos e a funcionalidade dos *clusters* biossintéticos em *Bacillus* também foi explorada por Shahid et al. (2021), que caracterizaram metabólitos secundários de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. tequilensis* por meio de espectrometria de massa. O estudo identificou a presença de compostos como surfactinas, iturinas e fengicinas, reforçando a relevância dos lipopeptídeos na bioproteção e colonização de plantas. Essas moléculas apresentam forte atividade antifúngica e contribuem para o controle de patógenos agrícolas, sendo semelhantes aos compostos encontrados nas linhagens de *B. nitratreducens* estudadas (SHAHID et al., 2021)

Nifakos et al. (2021) analisaram o genoma de *Bacillus velezensis* Bvel1 e identificaram 13 *clusters* biossintéticos responsáveis pela síntese de compostos antimicrobianos, como iturina A, fengicina, surfactina e bacilibactina. Esses compostos apresentaram atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, um patógeno agrícola significativo, demonstrando o potencial de *Bacillus* na proteção de culturas agrícolas (NIFAKOS et al., 2021). Assim, a caracterização das regiões biossintéticas de *B. nitratreducens* amplia o entendimento sobre sua diversidade metabólica e aplicações biotecnológicas. A presença de genes associados à produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana reforça o potencial dessas linhagens para uso em biocontrole e biofertilização, fortalecendo sua importância na microbiologia agrícola.

Esses resultados demonstram uma consistência notável nas capacidades biossintéticas entre as linhagens estudadas, com todas exibindo potencial para produzir os metabólitos petrobactina, bacilibactina, fengicina e paenimodina. As variações observadas no número total de regiões codificadoras e na presença destes peptídeos confirmam a diversidade funcional que pode ser explorada para produção de compostos bioativos de interesse.

Os resultados obtidos na mineração *in silico* de ácidos relacionados a solubilização de potássio (Quadro A2 – Anexo) mostram as porcentagens de cobertura e identidade nas

diferentes amostras (LABIM48, LABIM49, LABIM50, LABIM51, LABIM53). Cobertura indica a proporção da sequência de consulta que está alinhada com a sequência alvo, com valores de 100% significando que a totalidade da sequência de consulta foi alinhada com a sequência alvo. A identidade refere-se à precisão do alinhamento entre a sequência de consulta e a sequência alvo, com valores mais altos indicando uma maior correspondência exata de nucleotídeos ou aminoácidos entre as duas sequências.

As análises de identidade revelam que as 5 linhagens apresentam em potencial os mesmos ácidos orgânicos, não se diferenciando entre si, com diferentes níveis de confiabilidade na identificação das sequências alinhadas dos ácidos. O ácido oxálico varia ligeiramente em torno de 25-25.38%, indicando uma confiança moderada. O ácido málico mantém uma identidade constante de 61.46%, sugerindo uma identificação razoavelmente confiável. A glicina apresenta variação entre 32.45% e 32.74%, também com confiança moderada. Por outro lado, o ácido aspártico e o ácido pirúvico mostram alta confiabilidade, com identidades de 67.08% e 79.53%, respectivamente. O ácido tartárico tem uma identidade de 48.54%, indicando uma confiança moderada. O ácido acético varia de 33.58% a 47.53%, mostrando variação na confiança. O succínico mantém uma alta identidade em 64.55%, com ligeira variação. O glucônico e o fumárico exibem identificações muito confiáveis, com 73.72% e variação entre 57.92% e 58.13%, respectivamente. Outros ácidos, como o cítrico, 2-cetoglucônico, ácido láctico, malônico, IAA e 5-aminolevulínico, mostram confiança moderada, com variações em torno de 24.64% a 58.13%. O ácido propiônico não possui dados de identidade, indicando que não foi identificado.

A solubilização de potássio é mediada por ácidos orgânicos produzidos por bactérias do solo, incluindo os ácidos oxálico, málico, cítrico e glucônico. Segundo Olaniyan et al. (2022), esses ácidos desempenham um papel fundamental na liberação do potássio de minerais insolúveis, tornando-o acessível para as plantas. O estudo destaca que a ação de bactérias solubilizadoras pode melhorar a saúde do solo e aumentar a produtividade agrícola ao reduzir a necessidade de fertilizantes sintéticos (OLANIYAN *et al.*, 2022).

Estudos demonstram que a inoculação de bactérias solubilizadoras de potássio pode melhorar significativamente o crescimento das plantas. Imran et al. (2020) avaliaram o efeito da inoculação de *Klebsiella oxytoca* KSB-17 em milho e observaram um aumento expressivo no crescimento das plantas, incluindo incremento de 50% na altura, 73% na biomassa radicular e 154% na absorção de potássio. Esse estudo reforça a importância dos ácidos orgânicos produzidos por KSBs na liberação do potássio do solo e sua consequente absorção pelas plantas (IMRAN *et al.*, 2020).

Outro aspecto relevante é a diversidade das linhagens bacterianas em relação à sua capacidade de solubilização de potássio. Azizah et al. (2020) identificaram diferentes isolados de bactérias endofíticas solubilizadoras de potássio em milho e observaram variações na produção de ácidos orgânicos, tempo e eficiência da solubilização. Os resultados mostraram que algumas linhagens produzem níveis mais elevados de ácidos como o pirúvico e o aspártico, enquanto outras apresentam maior eficiência na produção de ácidos glucônico e cítrico. Essas diferenças podem estar associadas à variabilidade genética entre as linhagens e à sua adaptação a diferentes condições ambientais (AZIZAH *et al.*, 2020).

Em conclusão, ácidos como aspártico, pirúvico e glucônico mostram tanto alta cobertura quanto alta identidade, indicando detecção e identificação muito eficazes. Ácidos como oxálico, málico e cítrico têm alta cobertura, mas identidade moderada, sugerindo que, embora suas sequências sejam amplamente alinhadas, a confiança na identificação correta não é tão alta. O ácido propiônico não foi detectado, e o 5-aminolevulínico apresenta cobertura relativamente baixa. Essa análise oferece uma visão abrangente da eficiência dos métodos analíticos de bioinformática em termos de detecção e identificação de diferentes ácidos nas linhagens analisadas.

Em relação aos resultados obtidos na mineração de ácidos orgânicos relacionados a solubilização de fosfato (Quadro A3 – Anexo), observa-se a mesma variação entre cobertura e identidade para todas as cinco linhagens analisadas.

Para o ácido acético, a cobertura é alta (100%) para as amostras L48, L49, L50 e L53, e um pouco menor para L51 (95%). As identidades variam entre 33.58% e 47.53%, com a maior identidade observada na amostra L51. O ácido cítrico apresenta uma cobertura consistentemente alta de 97% para todas as amostras, com identidades variando ligeiramente entre 32.12% e 32.57%. O ácido glucônico possui uma cobertura quase completa de 99% para todas as amostras e uma identidade alta e constante de 73.72%.

Khourchi et al. (2022) demonstraram que a produção de ácidos orgânicos, em especial o ácido glicólico, está diretamente associada à acidificação do meio e ao aumento da disponibilidade de fósforo a partir de polifosfatos. O estudo destaca que a inoculação de PSB melhora significativamente a aquisição de fósforo por plantas de trigo, aumentando o crescimento radicular e a biomassa vegetal (KHOURCHI *et al.*, 2022).

O ácido málico também apresenta alta cobertura, 98% para todas as amostras, com uma identidade de 61.46%. Em contraste, o ácido oxálico mostra uma cobertura baixa de 31% para todas as amostras, com identidades consistentes em torno de 25% a 25.38%. O ácido tartárico tem uma cobertura alta de 93% para todas as amostras e uma identidade constante de

48.54%. O ácido láctico exibe cobertura alta variando entre 97% e 98%, com identidades entre 38.46% e 38.96%. O ácido succínico possui uma cobertura alta de 97% e identidade variando ligeiramente entre 64.55% e 64.79%.

O ácido carboxílico mostra uma cobertura moderada de 56% e identidades entre 21.58% e 21.88%. O ácido 2-cetoglucônico tem uma cobertura alta de 95% e uma identidade constante de 28.53%. O ácido fórmico apresenta uma cobertura baixa de 31% e uma identidade constante de 25.38%. O ácido fumárico possui cobertura alta de 95% e identidade entre 57.92% e 58.13%. O ácido ascórbico mostra alta cobertura de 98% e identidades variando de 49.08% a 49.80%. O ácido isocítrico tem uma cobertura alta de 99% e identidade de 61.83%.

Os resultados da análise das linhagens de *B. nitratis* indicam uma alta cobertura para ácidos como o cítrico (97%), glucônico (99%) e succínico (97%), demonstrando a relevância dessas bactérias na produção de compostos que as caracterizam como solubilizadoras. Tian et al. (2021) reforçam que os ácidos cítrico e glucônico são os principais agentes de solubilização de fosfato, atuando na liberação de fósforo ligado a íons metálicos, como ferro e alumínio. O estudo destaca que a eficiência dessas bactérias na solubilização depende da produção de ácidos orgânicos e da atividade de fosfatases, ambos fatores essenciais para a ciclagem do fósforo no solo (TIAN *et al.*, 2021).

O ácido malônico exibe cobertura de 93% e identidade constante de 36.17%. O ácido glucurônico possui baixa cobertura, sendo apenas 40% e identidade constante de 26.32%. Finalmente, o ácido butírico tem cobertura de 98% e identidade constante de 34.40%. Isto é, a possível produção de compostos de interesse torna-se passível de observação, considerando os demais resultados da pesquisa.

Corroborando com os resultados vistos nesta pesquisa, Timofeeva et al. (2022) destacam que os microrganismos solubilizadores de fosfato podem atuar como biofertilizantes naturais, reduzindo a necessidade de fertilizantes químicos. O artigo ressalta que a produção de ácidos orgânicos por essas bactérias é um fator chave para a mobilização de fosfatos em solos agrícolas, aumentando a eficiência da absorção de fósforo pelas plantas. A inoculação de PSB no solo tem sido sugerida como uma alternativa sustentável para melhorar a fertilidade e a produtividade agrícola (TIMOFEVA *et al.*, 2022)

Em resumo, ácidos como glucônico, málico, isocítrico e succínico demonstram alta cobertura e identidade em todas as amostras, indicando que as sequências correspondentes desses ácidos são bem conservadas e possuem alta similaridade com as sequências do banco de dados. Por outro lado, ácidos como oxálico, fórmico e glucurônico apresentam baixas

coberturas e identidades, sugerindo que essas sequências são menos conservadas. A uniformidade de ácidos como cítrico e tartárico em termos de cobertura e identidade entre diferentes amostras indica consistência na representação dessas sequências. Esta análise é útil para entender quais ácidos orgânicos são mais conservados e representados nas sequências de referência, auxiliando na seleção de ácidos para estudos de solubilização de fosfato.

Os resultados apresentados nas Figuras 22 e 23 referem-se a testes de solubilização de fosfato (NBRIP) e potássio (ALEK) para diferentes linhagens de bactérias (L48, L49, L50, L51 e L53) ao longo do experimento. Ao analisar os resultados para cada meio de cultivo, é possível identificar padrões distintos.

**Figura 24 - Solubilização de fosfato das linhagens de *Bacillus nitratireducens* LABIM48 (A), LABIM49 (B), LABIM50 (C), LABIM51 (D) e LABIM53 (E).**



Fonte: Autoria própria (2025).

Para NBRIP, que testa a solubilização de fosfato, foi possível observar que a linhagem L48 inicialmente não apresentou resultados nos primeiros dias. No entanto, a partir de 15 dias de análise, houve uma indicação de solubilização, que se torna consistente e confirmada nos dias seguintes até o final da análise. A linhagem L49 inicialmente não apresentou solubilização, com exceção de uma placa que apresentou solubilização aos 10 dias de análise, possivelmente como outlier. A partir de 12 dias de análise, a solubilização foi consistente em todas as placas até o final do estudo. A linhagem L50 também começou sem solubilizar, exceto por uma placa em 11 dias de análise, que também pode ser um outlier, e a partir de 12 dias de análise, a solubilização foi confirmada em todas as placas e se manteve até o final do experimento. A linhagem L51 seguiu um padrão semelhante ao de L50, sem resultados inicialmente e solubilização confirmada a partir de 12 dias de análise. Por fim, a linhagem L53 apresentou solubilização positiva desde o décimo dia de análise.

A solubilização de fosfato pelas PSB ocorre principalmente por meio da secreção de ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico, glucônico e succínico, que diminuem o pH do solo e liberam o P ligado a complexos minerais. Bargaz et al. (2021) destacam que esses ácidos

promovem a liberação de fósforo retido no solo, aumentando sua absorção pelas plantas e melhorando o desenvolvimento radicular (BARGAZ *et al.*, 2021). O artigo ressalta que a ação das PSB pode melhorar significativamente o desempenho das culturas agrícolas, tornando a aplicação de fertilizantes mais eficiente e sustentável.

Convergingo com as expectativas em relação ao potencial uso destas bactérias como bioinsumos de produto agrícola, Wang *et al.* (2022) demonstraram que a inoculação de *Pseudomonas moraviensis* e *Bacillus safensis* em trigo resultou em um aumento significativo na biomassa radicular e na concentração de P disponível no solo. O estudo mostrou que, em comparação com o controle, a inoculação das PSB aumentou a fração de fósforo disponível em até 122%, reduzindo as frações mais estáveis e pouco acessíveis para as plantas (WANG *et al.*, 2022).

A caracterização genômica das linhagens analisadas sugere que as diferenças nos perfis metabólicos podem influenciar o tempo necessário para o início da solubilização de fosfato. Amri *et al.* (2023) destacam que a eficiência da solubilização pode estar relacionada à capacidade das bactérias de produzir e secretar ácidos orgânicos de forma contínua e em quantidades suficientes para alterar a disponibilidade de P no meio (AMRI *et al.*, 2023). Isso pode explicar o comportamento observado no estudo, em que algumas linhagens demoraram mais para iniciar a solubilização.

**Figura 25 - Solubilização de potássio das linhagens de *Bacillus nitratireducens* LABIM48 (A), LABIM49 (B), LABIM50 (C), LABIM51 (D) e LABIM53 (E).**



**Fonte: Autoria própria (2024).**

No contexto do experimento ALEK, destinado a avaliar a capacidade de solubilização de potássio, observou-se que todas as linhagens submetidas ao teste demonstraram solubilização no vigésimo terceiro dia de análise. Este resultado uniforme sugere uma resposta consistente e simultânea entre as diferentes linhagens estudadas, indicando uma resposta positiva em relação à solubilização de potássio nesse estágio específico do experimento.

Estes resultados *in vitro* corroboram os resultados *in silico* obtidos pela mineração dos ácidos orgânicos relacionados à solubilização de potássio e fosfato. A consistência

observada nos testes de solubilização em NBRIP e ALEK apoia as previsões feitas por meio da análise computacional, confirmando a capacidade das linhagens estudadas de solubilizar esses nutrientes essenciais. Em resumo, os resultados para NBRIP indicam que as linhagens de *B. nitratireducens* LABIM48, L49, L50, L51 e L53 apresentaram solubilização consistente. Para ALEK, não houve solubilização nos primeiros dias, entretanto, ocorreu uma mudança positiva ao longo do experimento, onde todas as linhagens apresentaram solubilização. Esses resultados demonstram que a solubilização de fosfato é mais rápida e consistente para as linhagens testadas em NBRIP, enquanto a solubilização de potássio em ALEK tende a ocorrer mais tarde.

A solubilização de potássio ocorre por meio da secreção de ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ácido glucônico, que atuam na liberação do potássio fixado em minerais. Sun et al. (2020) demonstraram que bactérias solubilizadoras de potássio isoladas da rizosfera de *Mikania micrantha* aumentaram significativamente a disponibilidade de potássio no solo e a absorção desse nutriente pelas plantas, promovendo seu crescimento (SUN *et al.*, 2020).

A inoculação de bactérias solubilizadoras de potássio frequentemente tem sido associadas a efeitos positivos no crescimento vegetal. Kaur et al. (2021) demonstraram que a aplicação de *Pseudomonas gessardii* em cultivos de cevada aumentou significativamente o comprimento da parte aérea, a biomassa fresca e seca das plantas, além do conteúdo de clorofila e carotenoides. O estudo também ressaltou que essas bactérias apresentam atividades multifuncionais, como a produção de sideróforos, ácido indolacético (IAA) e solubilização de fósforo, aumentando ainda mais seu potencial como biofertilizantes (KAUR *et al.*, 2021).

Por fim, também corroborando com os resultados deste trabalho, Luo et al. (2024) observaram que a inoculação de bactérias solubilizadoras de potássio alterou a estrutura microbiana do solo e melhorou a absorção de potássio em plantas de milho, evidenciando a importância da microbiota do solo na disponibilização desse nutriente (LUO *et al.*, 2024).

Dessa forma, os resultados obtidos reforçam a importância das bactérias solubilizadoras de potássio e fosfato como bioinsumos promissores para melhorar a fertilidade do solo e reduzir a necessidade de fertilizantes químicos. A compreensão dos mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato e potássio pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo agrícola, promovendo o crescimento das plantas de forma eficiente e ecologicamente responsável.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho forneceu uma análise abrangente das características genômicas, filogenéticas e metabólicas das linhagens de *Bacillus nitratireducens* LABIM48, LABIM49, LABIM50, LABIM51 e LABIM53. Os resultados destacam a estreita relação entre essas linhagens, evidenciada pela alta similaridade genômica, filogenética e metabólica.

A análise genômica revelou uma alta conservação nos genomas dessas linhagens, indicando uma origem comum recente e uma evolução genética conservada. A filogenia baseada em genomas completos, genes *16S rRNA* e *gyrB*, e proteoma confirmou que todas as linhagens são da mesma espécie, *Bacillus nitratireducens*. Adicionalmente, a análise do pangenoma evidenciou a presença de um conjunto gênico central altamente conservado, reforçando a similaridade entre as linhagens. No entanto, a identificação de genes acessórios específicos sugere variações funcionais possivelmente associadas a processos adaptativos em resposta às condições ambientais. Ao correlacionar esses achados com os metadados de localização das amostras, observou-se que fatores ecológicos podem modular a composição do pangenoma, influenciando a retenção de genes associados à adaptação a diferentes nichos.

A análise metabólica identificou regiões codificadoras de metabólitos primários e secundários nessas linhagens, evidenciando a capacidade potencial de produção de uma variedade de compostos bioativos importantes para a sobrevivência e competição microbiana. Adicionalmente, os testes *in vitro* de solubilização de fosfato e potássio corroboraram as previsões feitas pela análise computacional dos ácidos orgânicos, demonstrando a capacidade das linhagens em solubilizar esses nutrientes essenciais.

Como perspectivas de continuidade deste trabalho, espera-se com auxílio de novo sequenciamento, o fechamento dos *gaps* genômicos, apresentando os genomas completos, a fim de proporcionar análises mais extensas dos perfis metabólicos das bactérias estudadas. Assim, também entender quais são as variações dos nucleotídeos (SNPs) que as diferem em capacidade de produção de compostos de interesse e eficiência na solubilização de nutrientes.

Adicionalmente, há também como perspectiva futura a pesquisa idealizada para ser desenvolvida ao longo do doutorado, buscando entender as potencialidades de vírus desconhecidos encontrados em serrapilheira de floresta, além da compreensão das interações ecológicas com o ambiente, que ao longo das coletas, passaram por transformações físico-químicas. Este trabalho envolve diferentes ômicas e o desenvolvimento de ferramentas com uso de *machine* e *deep learning*.

## REFERÊNCIAS

- ABAWARI, R. A.; TUJI, F. A.; YADETE, D. Muleta. Phosphate solubilizing bio-fertilizers and their role in bio-available P nutrient: an overview. **Int. J. Appl. Agric. Sci**, v. 6, n. 6, p. 162, 2020.
- ABBAS, S. Z. et al. Biofloculants produced by bacterial strains isolated from palm oil mill effluent for application in the removal of Eriochrome Black T dye from water. **Polymers**, v. 12, n. 7, p. 1545, 2020.
- ABDELGALIL, S. A. et al. A sustainable and effective bioprocessing approach for improvement of acid phosphatase production and rock phosphate solubilization by *Bacillus haynesii* strain ACP1. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 8926, 2022.
- ABDELMOTELEB, A.; GONZALEZ-MENDOZA, D. Isolation and identification of phosphate solubilizing *Bacillus* spp. from *Tamarix ramosissima* rhizosphere and their effect on growth of *Phaseolus vulgaris* under salinity stress. **Geomicrobiology Journal**, v. 37, n. 10, p. 901-908, 2020.
- ABDEL-NASSER, A. et al. Antifungal, antiaflatoxigenic, and cytotoxic properties of bioactive secondary metabolites derived from *Bacillus* species. **Scientific Reports**, v. 14, p. 16590, 2024. DOI: [10.1038/s41598-024-66700-y](https://doi.org/10.1038/s41598-024-66700-y)
- ABELLAN-SCHNEYDER, I. et al. Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. **Mosphere**, v. 6, n. 1, p. 10.1128/msphere. 01202-20, 2021.
- AFZAL, I. et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological research**, v. 221, p. 36-49, 2019.
- AHMAD, I. et al. Integrated use of phosphate-solubilizing *Bacillus subtilis* strain IA6 and zinc-solubilizing *Bacillus* sp. strain IA16: a promising approach for improving cotton growth. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 1, p. 115-125, 2021.
- AHMED, S.; JAMIL, S.; SIDDIQUI, M. U. A. Secondary metabolites-God gifted arsenal for plants. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 13, n. 1, p. 38-43, 2024.
- ALAYLAR, B. et al. Integration of molecular tools in microbial phosphate solubilization research in agriculture perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-12, 2020.
- ALENEZI, F. N. et al. *Bacillus velezensis*: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal, Biocontrol and Environmental Importance. **Forests**, v. 12, p. 1714, 2021. DOI: [10.3390/f12121714](https://doi.org/10.3390/f12121714)
- ALI, A. M. et al. Effect of potassium solubilizing bacteria (*Bacillus cereus*) on growth and yield of potato. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 411-420, 2021.

ALMEIDA, O. G. G; MARTINIS, Elaine. C. P. Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 69-82, 2019.

ALYOUSIF, N. A. Distribution, occurrence and molecular characterization of *Bacillus*-related species isolated from different soil in Basrah Province, Iraq. **Biodiversitas**, v. 23, n. 2, p. 679-686, 2022. DOI: [10.13057/biodiv/d230209](https://doi.org/10.13057/biodiv/d230209)

AMRI, M. et al. Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. **Microorganisms**, v. 11, p. 783, 2023. DOI: [10.3390/microorganisms11030783](https://doi.org/10.3390/microorganisms11030783)

ANDREU, V. P. et al. The gutSMASH web server: automated identification of primary metabolic gene clusters from the gut microbiota. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. W263–W270, 2021. DOI: [10.1093/nar/gkab353](https://doi.org/10.1093/nar/gkab353)

ARMSTRONG, J. et al. Whole-genome alignment and comparative annotation. **Annual review of animal biosciences**, v. 7, p. 41-64, 2019.

ARROYO, W. F. V. Rol de los microorganismos benéficos en la Agricultura Sustentable. **Journal of the Selva Andina Biosphere**, v. 8, n. 2, p. 67-68, 2020.

AYANGBENRO, A. S.; BABALOLA, O. O. Genomic analysis of *Bacillus cereus* NWUAB01 and its heavy metal removal from polluted soil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 19660, 2020. DOI: [10.1038/s41598-020-75170-x](https://doi.org/10.1038/s41598-020-75170-x)

AZIZAH, H. et al. Isolation and Screening of Phosphate and Potassium Solubilizing Endophytic Bacteria in Maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Life Sciences**, v. 10, p. 165-174, 2020.

BAHADUR, I. et al. Potassium-solubilizing bacteria (KSB): a microbial tool for K-solubility, cycling, and availability to plants. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability: From Theory to Practices**, p. 257-265, 2019.

BAI, Y. et al. Using multi-omics to explore the effect of *Bacillus velezensis* SAAS-63 on resisting nutrient stress in lettuce. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, p. 313, 2024. DOI: [10.1007/s00253-024-13153-y](https://doi.org/10.1007/s00253-024-13153-y)

BAJIMAYA, M. et al. Bioactive Biomolecules from Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: **Antifungal Metabolites of Rhizobacteria for Sustainable Agriculture**. Cham: Springer International Publishing, p. 158-178, 2022.

BANKEVICH, A. et al. Multiplex de Bruijn graphs enable genome assembly from long, high-fidelity reads. **Nature biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1075-1081, 2022.

BAPTISTA, J., P. et al. Antifungal activity and genomic characterization of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* CMRP 4489. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 17401, 2022.

BARBA, R. Y. B.; SANTOS, N. A Bioeconomia no século XXI: Reflexões sobre Biotecnologia e Sustentabilidade no Brasil. **Revista de Direito e Sustentabilidade**, v. 6, n. 2, p. 26-42, 2020.

BARBOSA, F. O. et al. Perspectiva de exportação de soja e milho. 2023.

BARGAZ, A. et al. Benefits of phosphate solubilizing bacteria on belowground crop performance for improved crop acquisition of phosphorus. **Microbiological Research**, v. 252, p. 126842, 2021. DOI: [10.1016/j.micres.2021.126842](https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126842)

BARROS, G. et al. INOCULAÇÃO E CO-INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO BACILLUS, PSEUDOMONAS E AZOSPIRILLUM NO CULTIVO DE MILHO NO NOROESTE PAULISTA. **UNIFUNEC CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR**, v. 12, n. 14, p. 1-13, 2023.

BASHIR, Zaffar; ZARGAR, M. Y.; VISHWAKARMA, Dinesh Kumar. Potassium-solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. **Applied Agricultural Practices for Mitigating Climate Change**, v. 2, p. 17-28, 2019.

BASIT, A. et al. Metabolic engineering of fungal secondary metabolism in plants for stress tolerance. In: **Fungal secondary metabolites**. Elsevier, p. 439-455, 2024.

BOCSO, N.; BUTNARIU, M. The biological role of primary and secondary plants metabolites. **Journal of Nutrition and Food Processing**, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2022.

Brasil. Secretaria Especial de Assuntos Estratégicos Plano Nacional de Fertilizantes 2050 (PNF 2050) Brasília: SAE, 2021 195 p.1v.: il.

BŘINDA, K.; BAYM, M.; KUCHEROV, G. Simplitigs as an efficient and scalable representation of de Bruijn graphs. **Genome biology**, v. 22, p. 1-24, 2021.

CAPUTO, A.; FOURNIER, P.; RAOULT, D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria. **Biology direct**, v. 14, p. 1-9, 2019.

CARO-ASTORGA, J. et al. Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 6, p. 3, 2020. DOI: [10.1038/s41522-019-0112-7](https://doi.org/10.1038/s41522-019-0112-7)

CARROLL, L. M. et al. Characterization of emetic and diarrheal *Bacillus cereus* strains from a 2016 foodborne outbreak using whole-genome sequencing: addressing the microbiological, epidemiological, and bioinformatic challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 144, 2019.

CHÁVEZ, J. E. C.; ARANGUNDI, C. M. E; GARCÍA, G. A. Efectividad de biochar y biofertilizantes en el crecimiento y calidad de plántulas de cacao. **Revista ESPAMCIENCIA**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2020.

CHAMBERLAIN, L. A. et al. Corn-soybean rotation, tillage, and foliar fungicides: Impacts on yield and soil fungi. **Field Crops Research**, v. 262, p. 108030, 2021.

CHEN, Y. et al. Whole-genome sequencing and potassium-solubilizing mechanism of bacillus aryabhattai SK1-7. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 722379, 2022.

CHEN, Z.; ERICKSON, D. L.; MENG, J. Avaliação comparativa de abordagens de montagem híbrida para análises genômicas de patógenos bacterianos usando sequenciamento Illumina e Oxford Nanopore. **Genômica BMC**, v. 1-21, 2020.

CHEVRETTE, M. G. et al. Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. **Natural product reports**, v. 37, n. 4, p. 566-599, 2020.

CHORDIA GOLCHHA, N. et al. Bacterial Pangenome: A Review on the Current Strategies, Tools, and Applications. **Medinformatics**, v. 00, p. 1-13, 2024. DOI: [10.47852/bonviewMEDIN42022496](https://doi.org/10.47852/bonviewMEDIN42022496).

CHOUDOIR, M. J. et al. Pangenomes reveal genomic signatures of microbial adaptation to experimental soil warming. **Springer Nature**, v. 00, p. 1-20, 2023. DOI: 10.1101/2023.03.16.532972

CHOUHAN, G. K. et al. Exploration of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for improving productivity and soil fertility under sustainable agricultural practices. In: **Re-visiting the rhizosphere eco-system for agricultural sustainability**. Singapore: Springer Nature Singapore, p. 245-269, 2022.

CHUKWU, S. C. et al. Marker-assisted selection and gene pyramiding for resistance to bacterial leaf blight disease of rice (*Oryza sativa* L.). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 440-455, 2019.

CHURCH, D. L. et al. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 4, p. 10.1128/cmr.00053-19, 2020.

CINAR, O.; NAKAGAWA, S.; VIECHTBAUER, W. Phylogenetic multilevel meta-analysis: A simulation study on the importance of modelling the phylogeny. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 13, n. 2, p. 383-395, 2022.

CINTRA, P. H. N.; MELO, O. F. P; MENEZES, J. O. S. PRODUÇÃO AGRÍCOLA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE AS MUDANÇAS CLIMÁTICAS E PRODUTIVIDADE DE PLANTAS GRANÍFERAS NO BRASIL. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, 2020.

COÊLHO, J. D. Milho: produção e mercados. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 6, n.210, dez. 2021.

COLEMAN, G. A. et al. A rooted phylogeny resolves early bacterial evolution. **Science**, v. 372, n. 6542, p. eabe0511, 2021.

Acomp. safra brasileira de grãos, Brasília, DF, v.11 – Safra 2023/24, n.10 - Décimo levantamento, p. 1-120, julho 2024.

CORATO, U. Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. **Rhizosphere**, v. 13, p. 100192, 2020.

CUNHA, F.A. G et al. A new species of Amazon freshwater toad-headed turtle in the genus *Mesoclemmys* (Testudines: Pleurodira: Chelidae) from Brazil. **Chelonian Conservation and Biology: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal**, v. 20, n. 2, p. 151-166, 2021.

CURTOLO, F.; ARANTES, G. M. Dissecting Reaction Mechanisms and Catalytic Contributions in Flavoprotein Fumarate Reductases. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 11, p. 3510-3520, 2023.

DECKERS, J. et al. Identifying the pressure points of acute cadmium stress prior to acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 17, p. 6232, 2020.

DEVI, D.; SAINI, N. Chapter-1 History, Scope and Importance of Soil Microbiology. **Chief Editor Dr. RK Naresh**, p. 1, 2020.

DING, Z. et al. Effect of potassium solubilizing bacteria and humic acid on faba bean (*Vicia faba* L.) plants grown on sandy loam soils. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 791-800, 2021.

DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 125-138, 2020.

DUNN, N. A. et al. Apollo: democratizing genome annotation. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 2, p. e1006790, 2019.

EJIGU, G. F.; JUNG, J. Review on the computational genome annotation of sequences obtained by next-generation sequencing. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 295, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS – FAO DATABASE, 2022.

FERRAZZA, S. R. et al. Cultivo de alface americana com o uso de biofertilizantes sobre coberturas vegetais. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 28, n. 1, p. 138-143, 2024.

FRANCO-DUARTE, R. et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 130, 2019.

GANGOLA, S. et al. Differential proteomic analysis under pesticides stress and normal conditions in *Bacillus cereus* 2D. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, e0253106, 2021. DOI: [10.1371/journal.pone.0253106](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253106)

GENOVA, A. et al. Efficient hybrid de novo assembly of human genomes with WENGAN. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 422-430, 2021.

GHOSH, A. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Potential Alternative Tool for Sustainable Agriculture. In: **Updates on Rhizobacteria**. IntechOpen, 2024.

GIANI, A. M. et al. Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 9-19, 2020.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 1, n. 2, p. 51-57, 1986.

GOMES, C. S. Impactos da expansão do agronegócio brasileiro na conservação dos recursos naturais. **Cadernos do Leste**, v. 19, n. 19, 2019.

GOYAL, R. K.; MATTOO, A. K.; SCHMIDT, M. A. Rhizobial–host interactions and symbiotic nitrogen fixation in legume crops toward agriculture sustainability. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 669404, 2021.

GRANJA-TRAVEZ, R. S. et al. Análise genômica funcional de degradadores bacterianos de lignina: diversidade nos mecanismos de oxidação e metabolismo da lignina. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 104, n. 8, pág. 3305-3320, 2020.

GRANT, J. R. et al. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. **Nucleic acids research**, v. 51, n. W1, p. W484-W492, 2023.

GREENLON, A. et al. Global-level population genomics reveals differential effects of geography and phylogeny on horizontal gene transfer in soil bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 30, p. 15200-15209, 2019.

GUERRERO-EGIDO, G. et al. bacLIFE: a user-friendly computational workflow for genome analysis and prediction of lifestyle-associated genes in bacteria. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 2072, 2024.

GÜLER, M.; ÖĞÜTCÜ, H. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from rhizosphere of *Helianthus annuus* L. **int. j. agric. environ. food sci. June**, v. 8, n. 2, p. 412-429, 2024.

- GUPTA, R. et al. Identification, characterization and optimization of phosphate solubilizing rhizobacteria (PSRB) from rice rhizosphere. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 35-42, 2022.
- GUTTMACHER, A. E.; COLLINS, Francis, S. Welcome to the genomic era. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 10, p. 996-998, 2003.
- HAGHSHENAS, E. et al. HASLR: montagem híbrida rápida de leituras longas. **Iciência**, v. 23, n. 8, 2020.
- HALIM, Z. et al. Optimizing the DNA fragment assembly using metaheuristic-based overlap layout consensus approach. **Applied Soft Computing**, v. 92, p. 106256, 2020.
- HII, Y. S. et al. Isolation and characterisation of phosphate solubilizing microorganisms from peat. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101643, 2020.
- HINDERSAH, R. et al. Chemical characteristics of organic-based liquid inoculant of *Bacillus spp.* In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012005, 2019.
- HO, St. S.; URBAN, A, E; MILLS, R., E. Structural variation in the sequencing era. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 3, p. 171-189, 2020.
- HOFF, K. J. et al. Whole-genome annotation with BRAKER. **Gene prediction: methods and protocols**, p. 65-95, 2019.
- HOHENLOHE, P. A.; FUNK, W. C.; RAJORA, O. P. Population genomics for wildlife conservation and management. **Molecular Ecology**, v. 30, n. 1, p. 62-82, 2021.
- HSIEH, Y. E. et al. Comparative analysis of metabolic models of microbial communities reconstructed from automated tools and consensus approaches. **npj Systems Biology and Applications**, v. 10, n. 1, p. 54, 2024.
- HUSSAIN, S. et al. Antifungal potential of lipopeptides produced by the *Bacillus siamensis* Sh420 strain against *Fusarium graminearum*. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 4, p. e04008-23, 2024.
- IMRAN, M. et al. Inoculation of potassium solubilizing bacteria with different potassium fertilization sources mediates maize growth and productivity. **Pak. J. Agric. Sci**, v. 57, p. 1045-1055, 2020.
- INPI. Biofertilizantes. Rio de Janeiro: INPI/AECON-CEPIT, 2023. 71 p. Estudos de Inteligência Estratégica em Inovação, v. 1, dez. 2023.
- IQBAL, S. et al. Classification and multifaceted potential of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* group: a comprehensive review. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 927, 2023.

IQBAL, S.; VOLLMERS, J.; JANJUA, H. A. Genome Mining and Comparative Genome Analysis Revealed Niche-Specific Genome Expansion in Antibacterial *Bacillus pumilus* Strain SF-4. **Genes**, v. 12, n. 1060, p. 1-19, 2021. DOI: [10.3390/genes12071060](https://doi.org/10.3390/genes12071060)

ISKANDAR, A. U. et al. Molecular systematic and phylogenetic analysis of indigenous bacterial isolates with potential as bioremediation agents based on 16S rRNA gene analysis. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 743, 2021. DOI: [10.1088/1755-1315/743/1/012010](https://doi.org/10.1088/1755-1315/743/1/012010)

ITAYA, M. Development of a *Bacillus subtilis* genome vector system that can transmit synthesized genomes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 89, n. 3, p. 347–353, 2025.

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

JEEVITHA, P. et al. Production of pyruvic acid into value-added products using genetically modified microbes. **Valorization of Biomass to Bioproducts**, p. 117-134, 2023.

JENSEN, C. N. G. et al. *Bacillus subtilis* promotes plant phosphorus (P) acquisition through P solubilization and stimulation of root and root hair growth. **Physiologia Plantarum**, v. 176, n. 3, p. e14338, 2024.

JIA, P. et al. *Bacillus subtilis* and *Macleaya cordata* extract regulate the rumen microbiota associated with enteric methane emission in dairy cows. **Microbiome**, v. 11, 2023. DOI: [10.1186/s40168-023-01654-3](https://doi.org/10.1186/s40168-023-01654-3)

JOHNSON, J. S. et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 5029, 2019.

KADIRI, M. et al. Pan-genome analysis and molecular docking unveil the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* VB7 against *Phytophthora infestans*. **Microbiological Research**, v. 268, p. 127277, 2023. DOI: [10.1016/j.micres.2022.127277](https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127277)

KAPLI, P.; YANG, Z.; TELFORD, M. J. Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 7, p. 428-444, 2020.

KARGAR, F. et al. Isolation, identification and in silico study of native cellulase producing bacteria. **Current Proteomics**, v. 18, n. 1, p. 3-11, 2021.

KAUR, S. et al. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 28, n. 2, p. 485-504, 2022.

KAUR, T. et al. Plant growth promotion of barley (*Hordeum vulgare* L.) by potassium solubilizing bacteria with multifarious plant growth promoting attributes. **Plant Science Today**, v. 8, n. sp1, p. 17-24, 2021.

KHAN, N. M. et al. Salicylic Acid with Humic Acid Addition as Potential Hallmarks for Alleviating Drought Stress in Maize Crop and Enhancing Soil Health. **Asian Research Journal of Agriculture**, v. 17, n. 1, p. 10-21, 2024.

KHAN, A. R. et al. *Bacillus* spp. as bioagents: Uses and application for sustainable agriculture. **Biology**, v. 11, n. 12, p. 1763, 2022.

KHARNAIOR, P.; TAMANG, J. P. Metagenomic-Metabolomic Mining of Kinema, a Naturally Fermented Soybean Food of the Eastern Himalayas. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: [10.3389/fmicb.2022.868383](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.868383)

KHORRAMNEJAD, A. et al. Genomics and Proteomics Analyses Revealed Novel Candidate Pesticidal Proteins in a Lepidopteran-Toxic *Bacillus thuringiensis* Strain. **Toxins**, v. 12, 673, 2020. DOI: [10.3390/toxins12110673](https://doi.org/10.3390/toxins12110673)

KHOURLI, S. et al. Phosphate solubilizing bacteria can significantly contribute to enhance P availability from polyphosphates and their use efficiency in wheat. **Microbiological Research**, v. 262, p. 127094, 2022. DOI: [10.1016/j.micres.2022.127094](https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127094)

KIRST, H. et al. Toward a glycol radical enzyme containing synthetic bacterial microcompartment to produce pyruvate from formate and acetate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 8, p. e2116871119, 2022.

KOCH, H.; SESSITSCH, A. The microbial-driven nitrogen cycle and its relevance for plant nutrition. **Journal of Experimental Botany**, p. erae274, 2024.

KOILYBAYEVA, M. et al. Gas chromatography–mass spectrometry profiling of volatile metabolites produced by some *Bacillus* spp. and evaluation of their antibacterial and antibiotic activities. **Molecules**, v. 28, n. 22, p. 7556, 2023.

KUMAR, V. et al. Recent advances in bio-based production of top platform chemical, succinic acid: an alternative to conventional chemistry. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, n. 1, p. 72, 2024.

KUMAR, P. et al. *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 95, 2021.

KURAL, M. et al. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of SPX Domain-Containing Gene Subfamily in Response to Phosphorus-Solubilizing Bacteria in Apple (*Malus domestica*). **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-18, 2024.

KWON, E. et al. Application of comparative genomics in the development of DNA probes to detect *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. **LWT**, v. 142, p. 110996, 2021.

LARRALDE, M.; ZELLER, G. PyHMMER: a Python library binding to HMMER for efficient sequence analysis. **Bioinformatics**, v. 39, n. 5, p. btad214, 2023.

- LEÓN, Y. G. et al. Bacillus subtilis y Trichoderma: Características generales y su aplicación en la agricultura. **TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas**, v. 25, n. 1, p. 1-14, 2023.
- LI, Y. et al. Screening and biodiversity analysis of cultivable inorganic phosphate–solubilizing bacteria in the rhizosphere of Hydrilla verticillata. **Plos one**, v. 19, n. 1, p. e0297047, 2024.
- LIN, L. et al. Transcriptome profiling of genes regulated by phosphate-solubilizing bacteria Bacillus megaterium P68 in potato (Solanum tuberosum L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1140752, 2023.
- LIU, H. et al. SMARTdenovo: a de novo assembler using long noisy reads. **Gigabyte**, v. 2021, 2021.
- LIU, Y. et al. Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2017.
- LIU, Z; AWASTHI, M. K; ZHAO, J; LIU, G; SYED, A; AL-SHWAIMAN, H. A; FANG, J. Unraveling impacts of inoculating novel microbial agents on nitrogen conversion during cattle manure composting: Core microorganisms and functional genes. **Bioresour Technol**. 2023.
- LUO, D. et al. Consortium of Phosphorus-Solubilizing Bacteria Promotes Maize Growth and Changes the Microbial Community Composition of Rhizosphere Soil. **Agronomy**, v. 14, p. 1535, 2024. DOI: [10.3390/agronomy14071535](https://doi.org/10.3390/agronomy14071535)
- LUO, L. et al. Bacillus amyloliquefaciens as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. **Microbiological research**, v. 259, p. 127016, 2022.
- LUZ, J. H. S; BRITO, L. E. M. A EFICIÊNCIA DO USO DE FÓSFORO PODE SER MELHORADA COM O USO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS? UMA REVISÃO. **AGRI-ENVIRONMENTAL SCIENCES**, v. 8, n. 2, p. 13-13, 2022.
- MAIO, N. et al. Comparison of long-read sequencing technologies in the hybrid assembly of complex bacterial genomes. **Microbial genomics**, v. 5, n. 9, p. e000294, 2019.
- MAGALHÃES, C. A. S. et al. The use of biochar-urea pellet formulations to reduced nitrogen losses. **Nativa**, v. 10, n. 2, p. 184-190, 2022.
- MARKAD, A. Role of Nitrogen in Wheat Production System and Nitrogen for Improving Wheat Yield and Quality: A Review. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 46, n. 7, p. 599-609, 2024.
- MARPAUNG, A. E. et al. The role of rhizosphere microbes as phosphate solubilizing bio fertilizers in shallot: a review. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental**

**Science**. IOP Publishing, p. 012003, 2023.

MAŽYLYTĖ, R. et al. Phosphate solubilizing microorganism *Bacillus* sp. MVY-004 and its significance for biomineral fertilizers' development in agrobiotechnology. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 254, 2022.

MELO, T. A. et al. O gênero *Bacillus* aplicado ao controle biológico de doenças de plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e18110917817-e18110917817, 2021.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; GÖKER, M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 2182, 2019.

MENEGAT, S.; LEDO, A.; TIRADO, R. Greenhouse gas emissions from global production and use of nitrogen synthetic fertilisers in agriculture. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2022.

MENG, G. et al. MitoZ: a toolkit for animal mitochondrial genome assembly, annotation and visualization. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 11, p. e63-e63, 2019.

MEYER, F. **Regulatory interactions of enzymes of the citric acid cycle in *Bacillus subtilis***. 2013. Tese de Doutorado. Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen.

MICHIMORI, Y.; YOKOOJI, Y.; ATOMI, H. An energy-conserving reaction in amino acid metabolism catalyzed by arginine synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 121, n. 16, p. e2401313121, 2024.

MOREL, B. et al. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 data is difficult. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 5, p. 1777-1791, 2021.

MORENO, J. G. et al. *Bacillus megaterium* HgT21: A promising metal multiresistant plant growth-promoting bacteria for soil bioremediation. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 5, p. e00656-22, 2022.

MPANGA, I. K. et al. Acquisition of rock phosphate by combined application of ammonium fertilizers and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in maize as affected by soil pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 947-957, 2020.

MURAS, A. et al. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. **Critical reviews in biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 609-627, 2021.

NAGRALE, D. T. et al. PGPR: the treasure of multifarious beneficial microorganisms for nutrient mobilization, pest biocontrol and plant growth promotion in field crops. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 100, 2023.

NÄGELE, T.; GIBON, Y.; LE HIR, R. Plant sugar metabolism, transport and signalling in challenging environments. **Physiologia Plantarum**, v. 174, n. 5, 2022.

NAŁĘCZ-CHARKIEWICZ, K.; NOWAK, R. M. Algorithm for DNA sequence assembly by quantum annealing. **BMC bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 122, 2022.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews**, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019.

NASCIMENTO, J. et al. Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control**, v. 165, p. 104792, 2022.

NGALIMAT, M. Sy. et al. A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 614, 2021.

NIFAKOS, K. et al. Genomic Analysis and Secondary Metabolites Production of the Endophytic *Bacillus velezensis* Bvel1: A Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* Causing Bunch Rot in Post-Harvest Table Grapes. **Plants**, v. 10, p. 1716, 2021. DOI: [10.3390/plants10081716](https://doi.org/10.3390/plants10081716)

NOSHEEN, S.; AJMAL, I.; SONG, Y. Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. **Sustainability**, v. 13, n. 4, p. 1868, 2021.

OCHIENG, W. A. et al. Transcriptome Analysis of macrophytes' *Myriophyllum spicatum* response to ammonium nitrogen stress using the whole plant individual. **Plants**, v. 12, n. 22, p. 3875, 2023.

OGINO, C. M.; GASQUES, J. G. Fertilizantes: dependência externa e impacto produtivo. 2023.

OH, S. et al. Approach strategies and application of metabolomics to biotechnology in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1192235, 2023.

OHAI, Jo. A. et al. Identificação bioquímica e genômica de novas linhagens termofílicas de *Bacillus licheniformis* YNP1-TSU, YNP2-TSU e YNP3-TSU com potencial na produção de 2, 3-butanodiol a partir da fermentação de resíduos alimentares não estéreis. **Processamento de Alimentos e Bioprodutos**, v. 129, p. 34-45, 2021.

OLANIYAN, F. T. et al. The use of soil microbial potassium solubilizers in potassium nutrient availability in soil and its dynamics. **Annals of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 45, 2022.

OWUSU-DARKO, R. et al. Comparative genome analysis of *Bacillus sporothermodurans* with its closest phylogenetic neighbor, *Bacillus oleronius*, and *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* groups. **Microorganisms**, v. 8, n. 1185, 2020. DOI:

[10.3390/microorganisms8081185](https://doi.org/10.3390/microorganisms8081185)

ÖZDOĞAN, D. K.; AKÇELİK, N.; AKÇELİK, Mustafa. Genetic diversity and characterization of plant growth-promoting effects of bacteria isolated from rhizospheric soils. **Current Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 132, 2022.

PAN, H. et al. Perception of the biocontrol potential and palmitic acid biosynthesis pathway of *Bacillus subtilis* H2 through merging genome mining with chemical analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, p. 4834–4848, 2024. DOI: [10.1021/acs.jafc.3c06411](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06411)

PARMAR, P.; SINDHU, S.. S. The novel and efficient method for isolating potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 2, p. 130-136, 2019.

PASOTTI, L. et al. Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* for the Production of Poly- $\gamma$ -glutamic Acid from Glycerol Feedstock. **Fermentation**, v. 10, n. 6, p. 319, 2024.

PATEL, A.; SINGH, Ra.; GAUR, R. Decolorization of Distillery Effluent by the Novel Bacterial Strain *Bacillus nitratireducens* (B2). **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 17, n. 4, 2023.

PENG, Y. et al. "Inhibition of cucumber *Pythium* damping-off pathogen with zoosporicidal biosurfactants produced by *Bacillus mycoides*", **Journal of Plant Diseases and Protection**, 124(5):481-491, 2017.

PHILIPPOT, L. et al. The interplay between microbial communities and soil properties. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 226-239, 2024.

PEREZ, F. et al. Plants as the first responder to adverse environmental conditions. In: **Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety XIV**. SPIE, p. 39-44, 2022.

PRAMOD, S. et al. Data on the genome of *Bacillus subtilis* A1-Midalam from beach soil. **Data in Brief**, v. 39, 2021. DOI: [10.1016/j.dib.2021.107552](https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107552)

PUTTICK, M. N. et al. Probabilistic methods outperform parsimony in the phylogenetic analysis of data simulated without a probabilistic model. **Palaeontology**, v. 62, n. 1, p. 1-17, 2019.

QUINLAN, E. B. et al. Identifying biological markers for improved precision medicine in psychiatry. **Molecular psychiatry**, v. 25, n. 2, p. 243-253, 2020.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. **CEP**, v. 21040, p. 900, 2020.

RAJ, M. et al. Gluconic acid: strategies for microbial production using organic waste and

applications. **Physical Sciences Reviews**, v. 9, n. 7, p. 2371-2383, 2024.

RAJAWAT, M. V. S. et al. Potassium solubilizing bacteria (KSB). **Microbial interventions in agriculture and environment: volume 3: soil and crop health management**, p. 189-209, 2019.

RAVIN, N. V. et al. Phylogeny and Metabolic Potential of New Giant Sulfur Bacteria of the Family Beggiatoaceae from Coastal-Marine Sulfur Mats of the White Sea. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 6028, 2024.

RAWAT, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49-68, 2021.

RAJI, M.; THANGAVELU, M. Isolation and screening of potassium solubilizing bacteria from saxicolous habitat and their impact on tomato growth in different soil types. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 6, p. 3147-3161, 2021.

RAUTIAINEN, M.; MARSCHALL, T. MBG: Minimizer-based sparse de Bruijn Graph construction. **Bioinformatics**, v. 37, n. 16, p. 2476-2478, 2021.

REENA, R. et al. Insight into citric acid: A versatile organic acid. **Fuel**, v. 327, p. 125181, 2022.

RIDELLA, F. et al. Whole-cell selective oxidation of 5-HMF by sugarcane bagasse isolated *Bacillus nitratreducens*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 59, 2024. DOI: [10.1016/j.bcab.2024.103245](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103245).

RILLING, J. I. et al. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 130, p. 205-219, 2019.

RIZZI, R. et al. Overlap graphs and de Bruijn graphs: data structures for de novo genome assembly in the big data era. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 278-292, 2019.

RUAN, J.; LI, H. Fast and accurate long-read assembly with wtdbg2. **Nature methods**, v. 17, n. 2, p. 155-158, 2020.

SABATÉ, D., C.; BRANDÁN, C. P. *Bacillus amyloliquefaciens* strain enhances rhizospheric microbial growth and reduces root and stem rot in a degraded agricultural system. **Rhizosphere**, v. 22, p. 100544, 2022.

SAKOPARNIG, T.; FIELD, C.; VAN NIMWEGEN, E. Whole genome phylogenies reflect the distributions of recombination rates for many bacterial species. **Elife**, v. 10, p. e65366, 2021.

- SALZBERG, S, L. Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right. **Genome biology**, v. 20, n. 1, p. 92, 2019.
- SAMSAMI, H.; MAALI-AMIRI, R. Global insights into intermediate metabolites: Signaling, metabolic divergence and stress response modulation in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 108862, 2024.
- SANTOSH, S. et al. Fostering Sustainable Agriculture: *Bacillus* spp. as a Key Player in Enhancing Soil Health and Crop Growth. In: **Applications of Bacillus and Bacillus Derived Genera in Agriculture, Biotechnology and Beyond**. Singapore: Springer Nature Singapore, p. 37-54, 2024. 2024.
- SATHEESH, S. et al. Plant-microbe Interactions and their Potential Application in Improving Disease Resistance in Vegetable Crops. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 1011-1027, 2024.
- SATTAR, A. et al. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. **Applied soil ecology**, v. 133, p. 146-159, 2019.
- SAVARY, S.; GLOBAL PLANT HEALTH ASSESSMENT PROJECT (GPHA). A global assessment of the state of plant health. **Plant Disease**, v. 107, n. 12, p. 3649-3665, 2023.
- SER, H. L. et al. Whole genome sequence of MUM116, a *Bacillus* species isolated from intertidal soil. **Progress in Microbes and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, 2020. DOI: [10.36877/pmb.a0000052](https://doi.org/10.36877/pmb.a0000052)
- SETIAWATI, T. C. et al. Use of *Bacillus* as a plant growth-promoting rhizobacteria to improve phosphate and potassium availability in acidic and saline soils. **KnE life sciences**, p. 541–558-541–558, 2022.
- SHAHID, I. et al. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 605195, 2021.
- SHAKYA, M. et al. Standardized phylogenetic and molecular evolutionary analysis applied to species across the microbial tree of life. **Scientific Reports**, v. 10, 2020. DOI: [10.1038/s41598-020-58356-1](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58356-1)
- SHARMA, M. et al. A crosstalk between *Brachypodium* root exudates, organic acids, and *Bacillus velezensis* B26, a growth promoting bacterium. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 575578, 2020.
- SHARMA, S. et al. Foliar application of iron fortified bacteriosiderophore improves growth and grain Fe concentration in wheat and soybean. **Indian journal of microbiology**, v. 59, p. 344-350, 2019.
- SIMONSEN, A. K. Environmental stress leads to genome streamlining in a widely distributed species of soil bacteria. **The ISME Journal**, v. 16, p. 423-434, 2021. DOI: [10.1038/s41396-021-01082-x](https://doi.org/10.1038/s41396-021-01082-x).

SINGH, P. et al. Bacillibactin siderophore induces iron mobilisation responses inside aerobic rice variety through YSL15 transporter. **Rhizosphere**, v. 27, p. 100724, 2023.

SOLOMON, W.; MUTUM, L.; JANDA, T. et al. Potential benefit of microalgae and their interaction with bacteria to sustainable crop production. **Plant Growth Regul**, v. 101, p. 53–65, 2023.

SOOD, U. et al. Técnicas ômicas na decifração de aplicações ambientais, industriais e terapêuticas de micróbios. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 14, p. 1327368, 2023.

SOUMARE, A. et al. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1011, 2020.

SOUZA, F. P.; CASTILHO, T. P. R.; MACEDO, L. O. B. Um marco institucional para os bioinsumos na agricultura brasileira baseado na economia ecológica. **Sustainability in Debate**, v. 13, n. 1, p. 266-285, 2022.

STELLA, A. A. **Montagem e anotação do genoma de *Scaptotrigona postica*, uma importante abelha nativa sem ferrão**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2023.

STEFANIC, P. et al. Ecology of prophage-like elements in *Bacillus subtilis* at global and local geographical scales. **Cell Reports**, v. 44, p. 115197, 2025.

SU, Y. et al. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial cell factories**, v. 19, p. 1-12, 2020.

SUN, F. et al. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. **Global Ecology and Conservation**, v. 23, p. e01141, 2020.

SWARGE, B. et al. Integrative analysis of proteome and transcriptome dynamics during *Bacillus subtilis* spore revival. **mSphere**, v. 5, e00463-20, 2020. DOI: [10.1128/mSphere.00463-20](https://doi.org/10.1128/mSphere.00463-20)

SWIECICKA, I. et al. Pan-genome portrait of *Bacillus mycoides* provides insights into the species ecology and evolution. **Microbiology Spectrum**, v. 9, p. e00311-21, 2021.

TALLAPRAGADA, P.; MATTHEW, T. Potassium solubilizing microorganisms (KSM) a very promising biofertilizers. In: **Agriculturally important microorganisms**. CRC Press, p. 153-174, 2021.

TAM, V.. et al. Benefits and limitations of genome-wide association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 8, p. 467-484, 2019.

- THOMLOUDI, E.-E. et al. Genomic and metabolomic insights into secondary metabolites of the novel *Bacillus halotolerans* Hil4, an endophyte with promising antagonistic activity against gray mold and plant growth promoting potential. **Microorganisms**, v. 9, p. 2508, 2021. DOI: [10.3390/microorganisms9122508](https://doi.org/10.3390/microorganisms9122508)
- TIAN, J. et al. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. **Biology**, v. 10, p. 158, 2021. DOI: [10.3390/biology10020158](https://doi.org/10.3390/biology10020158)
- TIMOFEEVA, A.; GALYAMOVA, M.; SEDYKH, S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. **Plants**, v. 11, n. 16, p. 2119, 2022.
- TSOTETSI, T. et al. Bacillus for plant growth promotion and stress resilience: what have we learned?. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2482, 2022.
- UELZE, L. et al. Typing methods based on whole genome sequencing data. **One Health Outlook**, v. 2, n. 3, 2020. DOI: [10.1186/s42522-020-0010-1](https://doi.org/10.1186/s42522-020-0010-1)
- UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D506-D515, 2019.
- VAN CAMP, P.; HASLAM, D. B.; POROLLO, A. Prediction of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria from whole-genome sequencing data. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 530987, 2020.
- VASER, R.; ŠIKIĆ, M. Time-and memory-efficient genome assembly with Raven. *Nature Computational Science*, v. 1, n. 5, p. 332-336, 2021.
- VEZINA, B.; REHM, B. H. A.; SMITH, A. T. Bioinformatic prospecting and phylogenetic analysis reveals 94 undescribed circular bacteriocins and key motifs. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-16, 2020.
- VIDAL, M. C. et al. Bioinsumos: a construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. **Economic Analysis of Law Review**, v. 12, n. 3, p. 557-574, 2021.
- VON THADEN, A. et al. Applying genomic data in wildlife monitoring: Development guidelines for genotyping degraded samples with reduced single nucleotide polymorphism panels. **Molecular ecology resources**, v. 20, n. 3, p. 662-680, 2020
- VUONG, Pa. et al. Small investments with big returns: environmental genomic bioprospecting of microbial life. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 641-655, 2022.
- WANG, K. et al. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* WB, an isolate from the watermelon rhizosphere: genomic insights into its antifungal effects. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 30, p. 442-444, 2022.

WANG, L. et al. Implementation of preemptive DNA sequence–based pharmacogenomics testing across a large academic medical center: The Mayo-Baylor RIGHT 10K Study. **Genetics in Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1062-1072, 2022.

WANG, Q. et al. Genomics analysis of three phosphorus-dissolving bacteria isolated from Torrey grandis soil. **International Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 361-376, 2024.

WANG, T. et al. Comparative Genomics Unveils Functional Diversity, Pangenome Openness, and Underlying Biological Drivers among *Bacillus subtilis* Group. **Microorganisms**, v. 12, p. 986, 2024. DOI: [10.3390/microorganisms12050986](https://doi.org/10.3390/microorganisms12050986)

WANG, X. et al. Multiple omics revealed the growth-promoting mechanism of *Bacillus velezensis* strains on ramie. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1367862, 2024.

WANG, Y. et al. Isolation of potassium solubilizing bacteria in soil and preparation of liquid bacteria fertilizer from food wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p. 108378, 2022.

WANG, Z. et al. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their abilities of phosphorus solubilization and wheat growth promotion. **BMC Microbiology**, v. 22, p. 296, 2022. DOI: [10.1186/s12866-022-02715-7](https://doi.org/10.1186/s12866-022-02715-7)

WEI, Z. et al. Microbial biosynthesis of L-malic acid and related metabolic engineering strategies: advances and prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 765685, 2021.

WILDER, S. et al. Meeting Agricultural Sustainability through Plant Growth Promoting Bacteria: An Examination of the Mechanisms for Improved Host Uptake of Zinc Nutrient in Maize using Functional Mutants of *Azospirillum brasilense*. **Azospirillum brasilense**, 2021.

WU, H. et al. Toward a high-quality pan-genome landscape of *Bacillus subtilis* by removal of confounding strains. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 1951–1971, 2021.

WU, Y.; LU, K.; XU, L. Progress and prospects of electrochemical reduction of nitrate to restore the nitrogen cycle. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 11, n. 33, p. 17392-17417, 2023.

XIA, L. et al. Biosynthetic gene cluster profiling predicts the positive association between antagonism and phylogeny in *Bacillus*. **Nature Communications**, v. 13, 2022. DOI: [10.1038/s41467-022-28668-z](https://doi.org/10.1038/s41467-022-28668-z)

XIANG, B. et al. Systematic genetic analyses of GWAS data reveal an association between the immune system and insomnia. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 7, n. 7, p. e00742, 2019.

XIMENES, L, F.; COÊLHO, J, D. Agropecuária: Soja. Fortaleza: BNB, ano 8, n. 287, maio 2023.

- XU, L. et al. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W52-W58, 2019.
- XUE, L. et al. Efficiency and mechanism of reducing ammonia volatilization in alkaline farmland soil using *Bacillus amyloliquefaciens* biofertilizer. **Environmental Research**, v. 202, p. 111672, 2021.
- YADAV, M. et al. Malic acid: fermentative production and applications. **Physical Sciences Reviews**, v. 9, n. 1, p. 187-199, 2024.
- YADAV, R. et al. *Bacillus subtilis* CP4, isolated from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi promotes biofortification, yield and metabolite production in wheat under field conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 339-359, 2021.
- YANG, M. et al. The Draft Genome Sequence of *Clostridium butyricum* QXYZ514, a potent bacterium for converting glycerol into fuels and bioproducts in the waste-based biorefinery. **Current Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3371-3376, 2020.
- YERO, D.; JIA, B.; GAO, F. insights in evolutionary and genomic microbiology: 2021. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 915593, 2022.
- YEMELYANOV, V. V.; PUZANSKIY, R. K.; SHISHOVA, M. F. Plant life with and without oxygen: A metabolomics approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 22, p. 16222, 2023.
- YILDIZ, S, Y. et al. Genomic analysis provides new insights into biotechnological and industrial potential of *Parageobacillus thermantarcticus* M1. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 923038, 2022.
- ZALMA, S. A.; EL-SHAROUD, W. M. Diverse thermophilic *Bacillus* species with multiple biotechnological activities are associated within the Egyptian soil and compost samples. **Science Progress**, v. 104, n. 4, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1177/00368504211055277
- ZHANG, Z. et al. Diversity and distribution of biosynthetic gene clusters in agricultural soil microbiomes. **Msystems**, v. 9, n. 4, p. e01263-23, 2024.
- ZHANG, F. et al. Engineering of a genome-reduced strain *Bacillus amyloliquefaciens* for enhancing surfactin production. **Microbial cell factories**, v. 19, p. 1-13, 2020.
- ZHAO, D. et al. Isolation and genome sequence of a novel phosphate-solubilizing rhizobacterium *Bacillus altitudinis* GQYP101 and its effects on rhizosphere microbial community structure and functional traits of corn seedling. **Current Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 249, 2022.
- ZHONG, C. et al. Integrating pan-genome with metagenome for microbial community profiling. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 1458-1466, 2021.

ZHONG, J. et al. Isolation and identification of uranium tolerant phosphate-solubilizing *Bacillus* spp. and their synergistic strategies to U (VI) immobilization. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 676391, 2021.

ZORIGT, T. et al. Pan-genome analysis reveals novel chromosomal markers for multiplex PCR-based specific detection of *Bacillus anthracis*. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, p. 942, 2024. DOI: [10.1186/s12879-024-09817-9](https://doi.org/10.1186/s12879-024-09817-9)

**APÊNDICE A – MINERAÇÃO DE GENES RELACIONADOS A SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO E FOSFATO**

**Quadro A1 - Mineração de genes relacionados as vias metabólicas de produção de ácidos orgânicos para solubilização de potássio e fosfato.**

<b>Genes</b>	<b>Acesso</b>	<b>Referência</b>
<b>Solubilização de potássio</b>		
oxdC	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34714/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34714/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (PRAJAPATI e MODI, 2012); (AHMED <i>et al.</i> , 2020); (KHUONG <i>et al.</i> , 2023)
bshA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P42982/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P42982/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (PRAJAPATI e MODI, 2012)
thiO	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O31616/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O31616/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022);
dapG	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q04795/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q04795/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022);
speH	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34426/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34426/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022);
rmlC	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9HU21/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9HU21/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (ZHANG e KONG, 2014); (PRAJAPATI e MODI, 2012); (BAKSHANDEH <i>et al.</i> , 2017); (AHMED <i>et al.</i> , 2020); (JIAO <i>et al.</i> , 2024); (KHUONG <i>et al.</i> , 2023); (WU <i>et al.</i> , 2023)
estF	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P22862/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P22862/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022);
gabT	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P94427/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P94427/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (PRAJAPATI e MODI, 2012); (BAKSHANDEH <i>et al.</i> , 2017)
yvgN	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O32210/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O32210/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (JIAO <i>et al.</i> , 2024); (KHUONG <i>et al.</i> , 2023)
scmK	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P54950/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P54950/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (ZHANG e KONG, 2014); (PRAJAPATI e MODI, 2012); (BAKSHANDEH <i>et al.</i> , 2017); (AHMED <i>et al.</i> , 2020); (JIAO <i>et al.</i> , 2024); (WU <i>et al.</i> , 2023)
ptxS	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A167V873/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A167V873/entry</a>	(MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (BAKSHANDEH <i>et al.</i> , 2017)
LACPL	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/F9UST3/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/F9UST3/entry</a>	(MEENA <i>et al.</i> , 2016);

		(ETESAMI <i>et al.</i> , 2017)
ydfG	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P39831/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P39831/entry</a>	(MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017)
FUM1	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08417/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08417/entry</a>	(MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (JIAO <i>et al.</i> , 2024)
iaaspH	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O50173/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O50173/entry</a>	(MEENA <i>et al.</i> , 2016); (ETESAMI <i>et al.</i> , 2017); (BAKSHANDEH <i>et al.</i> , 2017); (SAHA <i>et al.</i> , 2016); (DONG <i>et al.</i> , 2019); (KHUONG <i>et al.</i> , 2023); (RALLOS <i>et al.</i> , 2021)
HEM1	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09950/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09950/entry</a>	(KHUONG <i>et al.</i> , 2023)
<b>Solubilização de fósforo</b>		
oxdC	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34714/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34714/entry</a>	(BILLAH <i>et al.</i> , 2019); (RAWAT <i>et al.</i> , 2020); (CHAWNGTHU <i>et al.</i> , 2020); (RFAKI <i>et al.</i> , 2020); (NACCOON <i>et al.</i> , 2020); (LI <i>et al.</i> , 2016); (MENDES <i>et al.</i> , 2013); (GULATI <i>et al.</i> , 2010); (YI <i>et al.</i> , 2008)
bshA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P42982/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P42982/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (SULEMAN <i>et al.</i> , 2018); (CHAWNGTHU <i>et al.</i> , 2020); (BONONI <i>et al.</i> , 2020); (NACCOON <i>et al.</i> , 2020); (LI <i>et al.</i> , 2016); (VYAS and GULATI 2009)
thiO	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O31616/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O31616/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022);
dapG	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q04795/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q04795/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022);
speH	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34426/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/O34426/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022);
rmlC	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9HU21/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9HU21/entry</a>	(BILLAH <i>et al.</i> , 2019); (RAWAT <i>et al.</i> , 2020); (CHAWNGTHU <i>et al.</i> , 2020); (NACCOON <i>et al.</i> , 2020); (LI <i>et al.</i> , 2016)
estF	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P22862/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P22862/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (SULEMAN <i>et al.</i> , 2018); (CHAWNGTHU <i>et al.</i> , 2020); (RFAKI <i>et al.</i> , 2020); (NACCOON <i>et al.</i> , 2020); (DO CARMO <i>et al.</i> , 2020); (TENG <i>et al.</i> , 2019); (LI <i>et al.</i> , 2016); (SEERVINO <i>et al.</i> , 2010)
gabT	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P94427/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P94427/entry</a>	(RAWAT <i>et al.</i> , 2020); (RFAKI <i>et al.</i> , 2020); (TENG <i>et al.</i> , 2019); (SEERVINO <i>et al.</i> , 2010)
Car	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/B2HN69/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/B2HN69/entry</a>	(RAWAT <i>et al.</i> , 2020)
scmK	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P54950/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P54950/entry</a>	(ZHOU <i>et al.</i> , 2022); (SULEMAN <i>et al.</i> , 2018); (RAWAT <i>et al.</i> , 2020); (BONONI <i>et al.</i> , 2020); (RFAKI <i>et al.</i> , 2020); (DO CARMO <i>et al.</i> , 2020);

		(TENG <i>et al.</i> , 2019); (LI <i>et al.</i> , 2016); (MENDES <i>et al.</i> , 2013); (VYAS and GULATI 2009); (SEERVINO <i>et al.</i> , 2010); (YI <i>et al.</i> , 2008); (CHEN <i>et al.</i> , 2006)
ydfG	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P39831/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P39831/entry</a>	(RAWAT <i>et al.</i> , 2020)
dkgA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q46857/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q46857/entry</a>	(RAWAT <i>et al.</i> , 2020); (VYAS and GULATI 2009); (TRIVED and SA 2008)
Icd	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08200/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08200/entry</a>	(CHAWNGTHU <i>et al.</i> , 2020); (TENG <i>et al.</i> , 2019); (LI <i>et al.</i> , 2016); (GULATI <i>et al.</i> , 2010)
bioA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12995/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12995/entry</a>	(BONONI <i>et al.</i> , 2020); (RFAKI <i>et al.</i> , 2020); (SEERVINO <i>et al.</i> , 2010)

**APÊNDICE B – PRESENÇA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO**

**Quadro A2 – Presença de ácidos orgânicos relacionados a solubilização de potássio, identificada através da mineração de genes.**

<i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM48		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Oxalic	31%	25%
Malic	98%	61.46%
Glycine	89%	32.74%
Aspartic	100%	67.08%
Pyruvic	100%	79.53%
Tartaric	93%	48.54%
Acetic	100%	33.58%
Succinic	97%	64.55%
Gluconic	99%	73.72%
Citric	97%	32.35%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Lactic	97%	38.96%
Malonic	93%	36.17%
Fumaric	95%	58.13%
IAA	99%	24.65%
5-aminolevulinic	69%	31.37%
<i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM49		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Oxalic	31%	25.38%
Malic	98%	61.46%
Glycine	89%	32.45%
Aspartic	100%	67.08%
Pyruvic	100%	79.53%
Tartaric	93%	48.54%
Acetic	100%	33.94%
Succinic	97%	64.55%
Gluconic	99%	73.72%
Citric	97%	32.12%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Lactic	98%	38.46%
Malonic	93%	36.17%
Fumaric	95%	58.13%
IAA	99%	24.65%
5-aminolevulinic	69%	31.37%
<i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM50		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Oxalic	31%	25.38%
Malic	98%	61.46%

Glycine	89%	32.74%
Aspartic	100%	67.08%
Pyruvic	100%	79.53%
Tartaric	93%	48.54%
Acetic	100%	33.58%
Succinic	97%	64.55%
Gluconic	99%	73.72%
Citric	97%	32.35%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Lactic	97%	38.96%
Malonic	93%	36.17%
Fumaric	95%	57.92%
IAA	99%	24.65%
5-aminolevulinic	69%	31.37%
<b><i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM51</b>		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Oxalic	31%	25.38%
Malic	98%	61.46%
Glycine	89%	32.45%
Aspartic	100%	67.08%
Pyruvic	100%	79.53%
Tartaric	93%	48.54%
Acetic	95%	47.53%
Succinic	97%	64.55%
Gluconic	99%	73.72%
Citric	97%	32.35%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Lactic	98%	38.46%
Malonic	93%	36.17%
Fumaric	95%	58.13%
IAA	99%	24.65%
5-aminolevulinic	69%	31.37%
<b><i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM53</b>		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Oxalic	31%	25.38%
Malic	98%	61.46%
Glycine	89%	32.74%
Aspartic	100%	67.08%
Pyruvic	100%	79.53%
Tartaric	93%	48.54%
Acetic	100%	33.94%
Succinic	97%	64.79%
Gluconic	99%	73.72%
Citric	97%	32.57%
2-ketogluconic	95%	28.53%

Lactic	97%	38.96%
Malonic	93%	36.17%
Fumaric	95%	58.13%
IAA	99%	24.88%
5-aminolevulinic	69%	31.37%

**APÊNDICE C – PRESENÇA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

**Quadro A3 – Presença de ácidos orgânicos relacionados a solubilização de fosfato, identificada através da mineração de genes.**

<i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM48		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Acetic	100%	33.58%
Citric	97%	32.35%
Gluconic	99%	73.72%
Malic	98%	61.46%
Oxalic	31%	25%
Tartaric	93%	48.54%
Lactic	97%	38.96%
Succinic	97%	64.55%
Carboxylic	56%	21.88%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Formic	31%	25.38%
Fumaric	95%	58.13%
Ascorbic	98%	49.08%
Isocitric	99%	61.83%
Malonic	93%	36.17%
Glucuronic	40%	26.32%
Butyric	98%	34.40%
<i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM49		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Acetic	100%	33.94%
Citric	97%	32.12%
Gluconic	99%	73.72%
Malic	98%	61.46%
Oxalic	31%	25.38%
Tartaric	93%	48.54%
Lactic	98%	38.46%
Succinic	97%	64.55%
Carboxylic	56%	21.58%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Formic	31%	25.38%
Fumaric	95%	58.13%
Ascorbic	98%	49.08%
Isocitric	99%	61.83%
Malonic	93%	36.17%
Glucuronic	40%	26.32%
Butyric	98%	34.40%
<i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM50		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>

Acetic	100%	33.58%
Citric	97%	32.35%
Gluconic	99%	73.72%
Malic	98%	61.46%
Oxalic	31%	25.38%
Tartaric	93%	48.54%
Lactic	97%	38.96%
Succinic	97%	64.55%
Carboxylic	56%	21.88%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Formic	31%	25.38%
Fumaric	95%	57.92%
Ascorbic	98%	49.08%
Isocitric	99%	61.83%
Malonic	93%	36.17%
Glucuronic	40%	26.32%
Butyric	98%	34.40%
<b><i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM51</b>		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Acetic	95%	47.53%
Citric	97%	32.35%
Gluconic	99%	73.72%
Malic	98%	61.46%
Oxalic	31%	25.38%
Tartaric	93%	48.54%
Lactic	98%	38.46%
Succinic	97%	64.55%
Carboxylic	56%	21.58%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Formic	31%	25.38%
Fumaric	95%	58.13%
Ascorbic	98%	49.08%
Isocitric	99%	61.83%
Malonic	93%	36.17%
Glucuronic	40%	26.32%
Butyric	98%	34.40%
<b><i>Bacillus nitratireducens</i> LABIM53</b>		
<b>Ácidos</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidade</b>
Acetic	100%	33.94%
Citric	97%	32.57%
Gluconic	99%	73.72%
Malic	98%	61.46%
Oxalic	31%	25.38%
Tartaric	93%	48.54%
Lactic	97%	38.96%
Succinic	97%	64.79%

Carboxylic	56%	21.58%
2-ketogluconic	95%	28.53%
Formic	31%	25.38%
Fumaric	95%	58.13%
Ascorbic	98%	49.80%
Isocitric	99%	61.83%
Malonic	93%	36.17%
Glucuronic	40%	26.32%
Butyric	98%	34.40%