



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
BIOAGRO - INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA À
AGROPECUÁRIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ANÁLISE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO CERRADO E SEUS EFEITOS
NO CULTIVO DA SOJA EM PRESENÇA DE METAL

Documento assinado digitalmente
 **MATEUS FERREIRA SANTANA**
Data: 03/02/2025 18:53:56-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Mateus Ferreira Santana
(Orientador)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências da disciplina BIO 499 – Trabalho de
Conclusão de Curso

Documento assinado digitalmente
 **SUELEN CHAVES FERNANDES**
Data: 03/02/2025 19:33:59-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Suelen Chaves Fernandes
(Aluna)

Viçosa - MG
2025

SUELEN CHAVES FERNANDES

ANÁLISE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO CERRADO E SEUS EFEITOS
NO CULTIVO DA SOJA EM PRESENÇA DE METAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte das
exigências da disciplina BIO 499 – Trabalho de
Conclusão de Curso

APROVADA em 31 de janeiro de 2025.

Dra. Patrícia Roseira Fontes
(Patrícia Fontes)

Msc. Alexia Suelen Fernandes
(Alexia Suelen Fernandes)

Prof. Dr. Mateus Ferreira Santana
(Mateus Ferreira Santana)

VIÇOSA - MG
2025

*Dedico este trabalho à minha família amada,
minha fonte de vida.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1 Escolha dos isolados bacterianos.....	8
3.2 Pré-seleção dos isolados por meio da avaliação da resistência a metais.....	8
3.3 Seleção dos isolados por meio da concentração inibitória mínima (CIM).....	9
3.4 Análise de genes possivelmente envolvidos no processo de tolerância e biorremediação dos isolados bacterianos a metais.....	9
3.5 Ensaio <i>in vivo</i> de inoculação dos isolados a sementes de soja plantadas em solo ácido contendo alumínio.....	10
3.5.1 Preparo de cultura microbiana e tratamento de sementes.....	10
3.5.2 Experimento <i>in vivo</i> conduzido em casa de vegetação.....	10
3.6 Análise de raízes utilizando o software WinRHIZO.....	11
3.7 PCR em Tempo Real (qPCR) e análise de dados.....	12
4. RESULTADOS.....	12
4.1 Análise da resistência a metais.....	12
4.2 Determinação da concentração inibitória mínima de metais.....	13
4.3 Análises genômicas de genes de resistência a metais.....	14
4.4 Análise dos efeitos da inoculação dos isolados <i>Acidobacteriota</i> sp. (AB23), <i>Paraburkholderia</i> sp., <i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Leifsonia</i> sp. e <i>Bacillus siamensis</i> em sementes de soja cultivadas em solo com alta concentração de alumínio.....	16
4.5 PCR em Tempo Real (qPCR).....	17
5. DISCUSSÃO.....	17
6. CONCLUSÃO.....	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
8. MATERIAIS SUPLEMENTARES.....	23

RESUMO

FERNANDES, Suelen Chaves, Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2025.

Análise do potencial de biorremediação de metais por bactérias isoladas do Cerrado e seus efeitos no cultivo de soja. Orientador: Mateus Ferreira Santana.

O clima tropical estacional e as características do relevo do Cerrado favoreceram o desenvolvimento agrícola da região. Nesse cenário, a soja se tornou uma das principais produções agrícolas dessa área. No entanto, os solos ácidos, típicos do Cerrado, dificultam a disponibilidade de nutrientes e intensificam a toxicidade do alumínio, o que prejudica o crescimento das plantas. A biorremediação mediada por microrganismos surge como alternativa sustentável para a resolução desse problema. Nesse estudo, bactérias isoladas do solo do Cerrado foram selecionadas quanto a capacidade de tolerar zinco, ferro, lítio e alumínio. De 20 isolados, apenas 7 cresceram na concentração de 4mM de todos os metais, sendo eles: *Klebsiella michiganensis*, *Paraburkholderia* sp., *Leifsonia* sp., *Bacillus siamensis*, e *Acidobacteriota* spp. (AB20, AB23 e AB60). Genomas relacionados aos 7 isolados foram analisados quanto à presença de genes de tolerância ao zinco e ferro. Os genomas sequenciados de *K. michiganensis*, *Leifsonia* sp. e *B. siamensis* também foram analisados quanto à presença dos genes de resistência ALUI1 e SmtA. Os resultados indicaram a presença de genes relacionados a bomba de efluxo, captação e homeostase do ferro e do zinco. O gene ALUI1 foi identificado em *K. michiganensis* e *B. siamensis* e o gene SmtA foi identificado em *K. michiganensis*. Nos estudos *in vivo*, os isolados *K. michiganensis*, *Paraburkholderia* sp., *Leifsonia* sp., *B. siamensis*, e *Acidobacteriota* sp. (AB23) foram inoculados em sementes de soja plantadas em solo do Cerrado. Os isolados AB23, *Paraburkholderia* sp. e *K. michiganensis* impediram a germinação da semente, enquanto os isolados *Leifsonia* sp. e *B. siamensis*, permitiram seu crescimento, mesmo que sem diferenças significativas entre o controle. A expressão dos genes SAM e PAL foi analisada entre a soja inoculada com *Leifsonia* sp., *B. siamensis* e o controle. A expressão do gene SAM não foi diferente entre os tratamentos e o controle. Por outro lado, o gene PAL foi mais expresso na soja inoculada com *Leifsonia* sp. Os resultados indicam um efeito negativo da bactéria na soja, quando exposta ao alumínio. Novos ensaios devem ser realizados para elucidar a possível relação entre o mecanismo bacteriano de detoxificação de alumínio e um produto final tóxico para espécies vegetais.

Palavras-chave: alumínio; toxicidade; interação microrganismo-planta; bioinformática..

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado ocupa cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados do território brasileiro, estando localizado, predominantemente, no Planalto Central (Coutinho, 2016). É considerado um hotspot da biodiversidade, contendo grande riqueza de espécies endêmicas (Sawyer *et al.*, 2018), e citado como a “caixa d'água do Brasil”, por possuir nascentes que abastecem diversas bacias do país. O clima dessa região é o tropical estacional e a precipitação média anual varia entre 1.000 mm e 1.800 mm, concentrando 80% das chuvas na estação úmida que ocorre de outubro a abril (Coutinho, 2016). A temperatura média anual fica em torno de 22°C e 23°C, com as máximas absolutas mensais podendo chegar a mais de 40°C (Silva *et al.*, 2021). Tais características de clima e relevo, assim como a implantação de novas políticas de desenvolvimento para a região, favoreceram uma expansão agrícola que se iniciou a partir dos anos 1970 (De Farias; Zamberlan, 2014), tornando o Cerrado um importante locus para o cultivo de soja (*Glycine max L.*), além de abrigar outras culturas economicamente importantes, como algodão e milho. No entanto, a acidez também é uma característica dos solos altamente intemperizados das Savanas Brasileiras ou Cerrados (Klink; Machado, 2005), o que ainda configura um desafio para a agricultura moderna.

Em solos com pH baixo ocorre a redução na biodisponibilidade de nutrientes como magnésio e cálcio, além de um aumento da solubilização de alumínio, que pode atingir concentrações tóxicas às plantas (Lira-Martins, 2022). O alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre (Haynes, 2016), e a toxicidade causada por ele é considerada um dos fatores limitantes mais importantes na produção agrícola em todo o mundo (Rahman; Upadhyaya, 2021). As formas naturais de Al são relativamente estáveis e não interagem com os processos biológicos dos organismos vivos. Entretanto, à medida que o pH do solo é reduzido abaixo de 5,5, o Al é solubilizado em formas tóxicas (Gupta; Gaurav; Kumar, 2013). Concentrações de Al^{3+} no solo acima de 1,0 cmolc/dm³ são consideradas tóxicas para muitas culturas, afetando negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Prezotti; Martins, 2013).

Diante disso, é sabido que as plantas nativas utilizam estratégias de resistência que lhes permitem evitar os efeitos prejudiciais ao crescimento, reprodução ou funções metabólicas (Kochian *et al.*, 2015). Contudo, a fitotoxicidade causada pelo alumínio afeta negativamente outras espécies, como a soja. Sua toxicidade é associada principalmente a danos na parte compreendida entre a região meristemática e de alongação das raízes, resultando em um sistema radicular reduzido e danificado que limita a absorção de água e

nutrientes minerais (Li *et al.* 2024). Esses efeitos podem ser explicados ao analisar a interação desse metal com a parede celular dessa região, pois a ligação forte e rápida do Al pode alterar suas propriedades estruturais e mecânicas (Kochian; Pineros; Hoekenga, 2005). Além disso, também foram identificados impactos negativos do alumínio em outras estruturas celulares, como o citoesqueleto (Grabski; Schindler, 1995) e o DNA (Kochian; Hoekenga; Pineros, 2004).

Para contornar esses efeitos adversos do alumínio nas plantas se faz necessário o tratamento do solo. O tratamento usualmente utilizado consiste no aumento do pH do solo pela adição do calcário agrícola, no processo denominado calagem. Contudo, a adição do calcário encarece a lavoura e sua extração causa diversos impactos ambientais (Neto; Ramalho, 2010). Ademais, quando o calcário é incorporado ao solo, ele sofre reações químicas que geram a produção de CO₂, o qual é parcialmente liberado para a atmosfera (West; McBride, 2005), somado aos demais poluentes produzidos em seu processo de extração e transporte. Além disso, o tratamento da camada superficial do solo apresenta limitações, uma vez que o alumínio pode ser encontrado em camadas inferiores (Spehar, 1994), o que restringiria o crescimento profundo das raízes de plantas suscetíveis, dificultando o acesso à água e nutrientes. Portanto, torna-se necessário a adoção de soluções sustentáveis e eficazes para enfrentar os desafios relacionados ao cultivo de soja nos solos ácidos e com alta disponibilidade de alumínio no Cerrado.

A biorremediação mediada por microrganismos apresenta-se como uma alternativa promissora para enfrentar diversos desafios ambientais contemporâneos. Esse processo representa uma abordagem eficiente, ecologicamente e economicamente viável para transformar contaminantes em formas menos nocivas (Sonune, 2021). Os mecanismos utilizados pelos microrganismos no processo de biorremediação são diversos, podendo envolver a bioacumulação, biolixiviação, biossorção, biotransformação e biomineralização (Verma.; Kuila, 2019). O uso de bactérias já foi documentado como possível alternativa para a descontaminação de solos com compostos do petróleo (Jabbar *et al.*, 2022), misturas de diesel e biodiesel (Hidalgo, *et al.*, 2024) e pesticidas (Raffa; Chiampo, 2021). No que tange aos metais, a utilização de bactérias em áreas contaminadas com cobre (Andreazza, *et al.*, 2013) e zinco (Khan, *et al.*, 2022) também vem sendo estudada. Para o alumínio, embora já se tenha estudos sobre a resistência de alguns isolados bacterianos a esse elemento (Kurniawan; Purwanti; Titah, 2018), a literatura ainda carece de dados sobre seu potencial de ser biorremediado por bactérias em solos agricultáveis, de modo a permitir o crescimento vegetal.

Para atingir esse propósito, o uso de técnicas moleculares de microbiologia tem sido empregado através da análise do genoma bacteriano. Essas abordagens permitem a investigação dos transcritos, metabólitos, genes e proteínas de comunidades microbianas naturais *in situ* (Shekhar; Godheja; Modi., 2020). A análise do genoma também possibilita a seleção, *in silico*, de isolados com potencial de biorremediação, através da identificação de genes de interesse possivelmente envolvidos nesse processo. Para o alumínio, o sequenciamento de genes relacionados à tolerância desse metal em bactérias já vem sendo realizado desde 1997 (Jo *et al.*, 1997). Entretanto, essa abordagem não se limita apenas a estudos sobre a descontaminação desse elemento, mas também se estende a outros metais que representam desafios significativos para a agricultura devido ao seu potencial de contaminação dos solos. Como exemplo destes, podemos citar o zinco, que pode ser introduzido no solo pelo uso de fertilizantes (Ramalho; Amaral Sobrinho; Velloso, 2000), o ferro, proveniente da contaminação por rejeitos de mineração (Li *et al.*, 2021) e o lítio, que pode contaminar o solo a partir do descarte inadequado de lixo eletrônico e resíduos de mineração (Franzaring *et al.*, 2018; Li; Achal, 2020). Dessa forma, com o objetivo de identificar soluções sustentáveis para a limitação do cultivo de soja no Cerrado devido às altas concentrações de metais no solo, especialmente o alumínio, foi avaliada a utilização de bactérias bem como seu potencial de biorremediação em associação ao cultivo dessa cultura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Escolha dos isolados bacterianos

Foram utilizados 20 isolados bacterianos (Materiais Suplementares, tabela 1) pertencentes ao estoque da bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Todos foram isolados do solo do Cerrado mineiro.

3.2 Pré-seleção dos isolados por meio da avaliação da resistência a metais

Colônias dos 20 isolados, recém-cultivadas em Reasoner's 2A (Reasoner; Geldreich, 1985) acrescido de ágar 15 g.L⁻¹ foram diluídas em 1.000 µl de solução salina 0,85% com auxílio de alça de repicagem. Alíquotas de 5 µl da solução de cada isolado foram inoculadas em quadrados de 1.7 cm, previamente marcados com caneta

esferográfica, em placa de Petri (140 x 15 mm) contendo diferentes meios de cultivo: Ágar Nutriente, Ágar Mueller Hinton ou VL55.

Os meios foram suplementados individualmente com soluções de Etilenodiaminotetraacetato de ferro (FeEdta), sulfato de zinco (ZnSO₄), cloreto de alumínio (AlCl₃) e cloreto de lítio (LiCl) na concentração de 4mM. Essas soluções foram preparadas dissolvendo os sais em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração usando membrana Milipore 0.22 µm x 25 mm. Para o controle, as bactérias foram inoculadas em meio de cultura sem suplementação. Cada condição experimental foi realizada com duas repetições técnicas.

Mantidas em incubação a 28°C, foi observado o aparecimento de colônias nas placas durante 7 dias para os isolados de crescimento rápido, e 14 dias para os isolados de crescimento lento. Esse crescimento foi fotografado para todos os isolados, com exceção de 3 pertencentes ao filo *Acidobacteriota*. Nesses casos, a aparência translúcida das colônias nos meios suplementados dificultou a captura de imagens de qualidade com as câmeras disponíveis. Sete isolados que apresentaram melhor crescimento em concentração inibitória mínima (CIM) de 4mM na maioria dos metais foram selecionados para estudos posteriores.

3.3 Seleção dos isolados por meio da concentração inibitória mínima (CIM)

A tolerância dos isolados bacterianos selecionados foi testada por meio da inoculação de culturas recém-cultivadas em Reasoner's 2A acrescido de ágar 15 g.L⁻¹ e VL55 a placas suplementadas individualmente com diferentes metais nas concentrações 0 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM, 14 mM e 16 mM. O pH dos meios Mueller Hinton e R2A foi ajustado para 4.8 para o cloreto de alumínio (AlCl₃) e o etilenodiaminotetraacetato de ferro (FeEDTA). Para o sulfato de zinco (ZnSO₄), o pH dos mesmos meios foi ajustado para 7.2. Já para o cloreto de lítio (LiCl), o pH dos meios Mueller Hinton e VL55 foi ajustado para 5.5. As placas foram incubadas a 28°C e monitoradas quanto ao crescimento das colônias por 7 dias para os isolados de crescimento rápido e por 14 dias para os de crescimento lento.

3.4 Análise de genes possivelmente envolvidos no processo de tolerância e biorremediação dos isolados bacterianos a metais

Foram realizadas análises genômicas relacionadas aos 5 isolados selecionados a partir da CIM. Utilizando os genomas dos isolados *Bacillus siamensis*, *Klebsiella michiganensis* e *Leifsonia* sp. foi realizado um BLASTp com a sequência depositada no National Center for Biotechnology Information (NCBI) do gene ALUI1, relacionado a tolerância ao alumínio (Jo *et al.*, 1997) e do gene SmtA, que pode exercer um papel essencial na homeostase e resistência de metais, especialmente o zinco (Blindauer. *et al.*, 2001). O alinhamento dos genes retirados do NCBI e a sequência correspondente encontrada nos genomas sequenciados foi realizado pelo software MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) e a imagem foi gerada pelo software Jalview. Essa análise foi limitada aos genomas mencionados, uma vez que foram os únicos entre os isolados selecionados que tiveram seu sequenciamento realizado.

O software PLaBAs foi utilizado para analisar tanto os genomas de *B. siamensis*, *K. michiganensis* e *Leifsonia* sp., quanto 91 genomas do gênero *Paraburkholderia* e 61 genomas do filo *Acidobacteriota* depositados no NCBI. Devido a grande quantidade de genes relacionados ao ferro, para o gênero *Paraburkholderia* e o filo *Acidobacteriota*, foram analisados apenas aqueles que mais estavam presentes dentre os genomas (em >50%). A análise teve como objetivo encontrar genes possivelmente envolvidos na tolerância dos metais zinco e ferro. Não foram incluídos lítio e alumínio na busca, pois são poucos os genes descritos para esses metais, e o software utilizado provavelmente não os identificaria.

3.5 Ensaio *in vivo* de inoculação dos isolados a sementes de soja plantadas em solo ácido contendo alumínio

3.5.1 Preparo de cultura microbiana e tratamento de sementes

Os isolados *Klebsiella michiganensis*, *Leifsonia* sp., *Acidobacteriota* sp. (AB23), *Paraburkholderia* e *Bacillus siamensis* foram reativados em placa de Petri contendo o meio de cultura Reasoner's 2A sólido e mantidos a 28°C até a visualização do surgimento de colônias. Com auxílio de alça de repicagem, parte da massa celular microbiana das placas de cada isolado foi transferida individualmente para frascos erlenmeyer contendo 30 ml de meio de cultura Reasoner's 2A. Os erlenmeyer foram incubados em shaker a 28°C e 150 rpm até que os isolados atingissem uma

concentração de células viáveis equivalente a 10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colônia) para posterior inoculação nas sementes de soja.

Antes da inoculação, as sementes de soja (BMX TORPEDO 541X56 RSF I2X) foram desinfetadas superficialmente em capela de exaustão por aproximadamente 16 horas. Essa desinfecção foi realizada em uma peneira sobre um béquer contendo uma mistura de 97 ml de hipoclorito de sódio e 3 ml de ácido clorídrico (37%) e envoltos em plástico filme. A partir da mistura dos compostos, houve a formação de gás cloro (Cl_2). Esse gás é letal para microrganismos (Al-Sa'ady *et al.*, 2020), e, portanto, irá esterilizar a superfície das sementes.

As sementes desinfetadas foram adicionadas a tubos falcon previamente esterilizados contendo 30 ml da cultura bacteriana durante 1 hora. O controle negativo foi adicionado a tubos Falcon contendo 30 ml de meio de cultura Reasoner's 2A líquido nas mesmas condições dos tratamentos.

3.5.2 Experimento *in vivo* conduzido em casa de vegetação

O experimento foi conduzido com tubetes de aproximadamente 180g contendo solo do Cerrado, coletado da Floresta Nacional de Paraopeba, Minas Gerais, Brasil, e areia na proporção 1:1. O solo coletado na Floresta Nacional de Paraopeba foi submetido a análises químicas e físicas pelo Laboratório de Análise de Solo da Universidade Federal de Viçosa (Materiais Suplementares, Tabela 2). A mistura contendo este solo, recebeu sementes de soja inoculadas individualmente com os isolados AB23, *Bacillus siamensis*, *Leisonia* sp., *Paraburkholderia* sp. e *Klebsiella michiganensis*. Para o controle, o solo do Cerrado recebeu sementes não inoculadas. Além disso, em outra condição experimental a soja foi plantada em solo de barranco, areia e substrato na proporção 2:2:1, sem a inoculação de bactérias.

Em cada um dos 7 tubetes de cada condição experimental e do controle, foram plantadas duas sementes de soja, previamente desinfetadas e inoculadas com os isolados bacterianos. Após a germinação, todos os tubetes foram desbastados. As condições experimentais foram realizadas para avaliar o potencial de biorremediação dos isolados selecionados em solo contendo alumínio, visando promover o crescimento da soja.

O experimento foi conduzido até o estágio V3 da soja (terceiro nó e terceira folha trifoliolada), e finalizado com o recolhimento das raízes e da parte aérea para avaliação do comprimento e massa fresca. As raízes foram armazenadas para teste

posterior no software WinRHIZO Regent Instruments Inc., Quebec City, QC, Canada (Arsenault *et al.*, 1995). Após esse teste elas seguiram o mesmo procedimento da parte aérea, que foi mantida em estufa a 60°C por 2 dias para a determinação de suas massas secas.

Análises estatísticas dos dados obtidos em cada condição foram submetidas ao software R, avaliadas por EasyANOVA (ARNHOLD, 2013), nível de significância $\alpha = 0,05$, e teste para análise Skott knott.

3.6 Análise de raízes utilizando o software WinRHIZO

As raízes foram coletadas a partir da soja crescida em estufa na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Elas foram lavadas para retirada do solo, colocadas em recipiente plástico de cerca de 200ml, imersas em solução de álcool 20% e mantidas em câmara fria para evitar a desidratação até a realização do teste, 24 horas após a colheita. As raízes de cada amostra foram retiradas da solução e, após serem cuidadosamente secas com papel toalha, foram escaneadas utilizando o software WinRHIZO. As medições das raízes quanto a área da superfície, comprimento, diâmetro, volume e comprimento por volume foram realizadas durante o processo de escaneamento.

Os dados obtidos em cada condição foram analisados estatisticamente utilizando o software R, com avaliação pelo EasyANOVA (ARNHOLD, 2013), adotando-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ e o teste de comparação múltipla de Skott knott.

3.7 PCR em Tempo Real (qPCR) e análise de dados

O reagente Trizol foi usado na extração do RNA de 8 amostras do trifólio da soja macerado em nitrogênio criogênico líquido, provenientes do grupo controle e de 2 tratamentos (soja inoculada com *Leifsonia* sp. e com *Bacillus siamensis* em solo do Cerrado), seguindo as instruções do fabricante. A integridade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,5% de agarose, acrescido de brometo de etídio) e posterior quantificação no espectrofotômetro Nanodrop. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase livre de RNase (Promega, Fitchburg, WI, EUA) e avaliadas quanto a presença de DNA por PCR utilizando o primer endógeno FBOX (AGATAGGGAAATTGTGCAGGT). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, Fitchburg, WI, EUA),

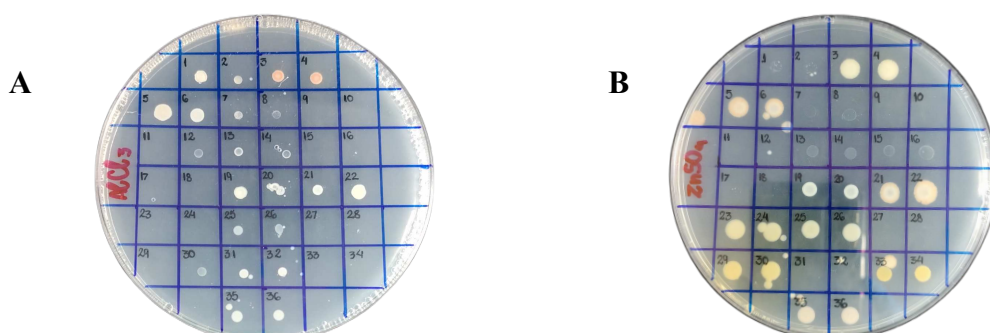
com a seguinte programação: 25°C por 5 min, 42°C por 90 min e 70°C por 5 min. O cDNA foi confirmado por PCR utilizando o mesmo primer endógeno citado anteriormente.

Para a análise de dados, empregou-se o método de quantificação absoluta por curva-padrão a fim de analisar os níveis de expressão de mRNA. Para cada gene avaliado foi realizada a curva-padrão e análise da eficiência. Os dados obtidos de Ct para as amostras foram substituídos nas respectivas equações de regressão linear obtidas para cada gene. A normalização das quantificações obtidas para cada gene deu-se pela divisão dessas pela quantificação do gene endógeno (FBOX). O resultado final das análises corresponde à média dos valores obtidos. As análises estatísticas foram realizadas para comparação dos níveis de expressão dos genes PAL e SAM em soja inoculada e plantada em solo do Cerrado e no controle (soja não inoculada e plantada em solo do Cerrado). Para isso, foi utilizado o pacote EasyANOVA (ARNHOLD, 2013), nível de significância $\alpha = 0,05$, e teste para análise Skott knott.

3. RESULTADOS

4.1 Análise da resistência a metais

No meio contendo alumínio apenas os isolados *Klebsiella michiganensis*, *Paraburkholderia* sp., *Leifsonia* sp., *Bacillus siamensis*, e os pertencentes ao filo *Acidobacteriota* (AB20, AB23 e AB60) cresceram (Figura 1A), sendo este o metal mais tóxico a 4 mM. Por esse motivo, esses isolados foram selecionados para testes posteriores. No meio contendo zinco houve o crescimento de 14 isolados, sendo que os seguintes não cresceram: *Bacillus velezensis* (Parna 22/3R), *Dyella* sp., *Caulobacter* sp., *Bacillus bombysepticus* (S1/10) e *Monashia* sp (Figura 1B). No meio contendo ferro, apenas o isolado *Dyella* sp. não cresceu (Figura 1C), e no meio contendo lítio todos os isolados cresceram (Figura 1 D), sendo esses dois últimos os metais menos tóxicos na concentração testada.



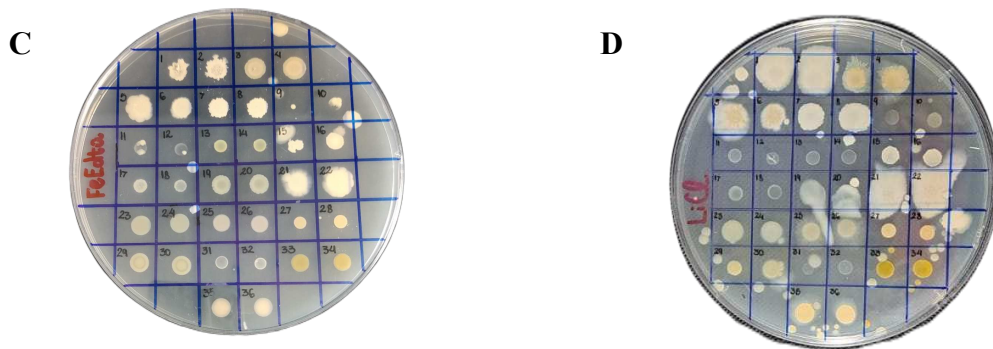


Figura 1: Isolados inoculados em placa de Petri contendo meio suplementado por AlCl_3 (A), ZnSO_4 (B), FeEdta (C) e LiCl (D) na concentração de 4 mM. Cada isolado e sua respectiva duplicata técnica está representado dentro de quadrados identificados por números, sendo 1 e 2: Parna 22/3R; 3 e 4: E4; 5 e 6: Parna 5/10; 7 e 8: Parna 23/34; 9 e 10: Parna 12/2; 11 e 12: Parna 23/22; 13 e 14: Parna 22/21; 15 e 16: S1/10; 17 e 18: 10/4; 19 e 20: Parna 10/16; 21 e 22: Parna 5/6; 23 e 24: Parna 5/22; 25 e 26: E1/6; 27 e 28: Soy 15; 29 e 30: 21M; 33 e 34: 23/8; 35 e 36: 22/4R.

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima de metais

No meio contendo alumínio os isolados pertencentes ao filo *Acidobacteriota* (AB23, AB20 e AB60) e o isolado *Bacillus siamensis*, cresceram a partir de 4 mM. Esses isolados continuaram a crescer até a concentração máxima de 16 mM, reduzindo o tamanho da colônia com o aumento da concentração do metal. No meio contendo zinco, todos os isolados resistiram a concentrações maiores que 4 mM, contudo, apenas os isolados *Klebsiella michiganensis*, *Paraburkholderia* sp. e AB23 cresceram na concentração máxima. No meio contendo ferro, todos os isolados cresceram na concentração máxima testada, com exceção do AB60, que teve o crescimento limitado a 10 mM. No meio contendo lítio, todos os isolados cresceram em todas as concentrações, sendo este o metal menos tóxico.

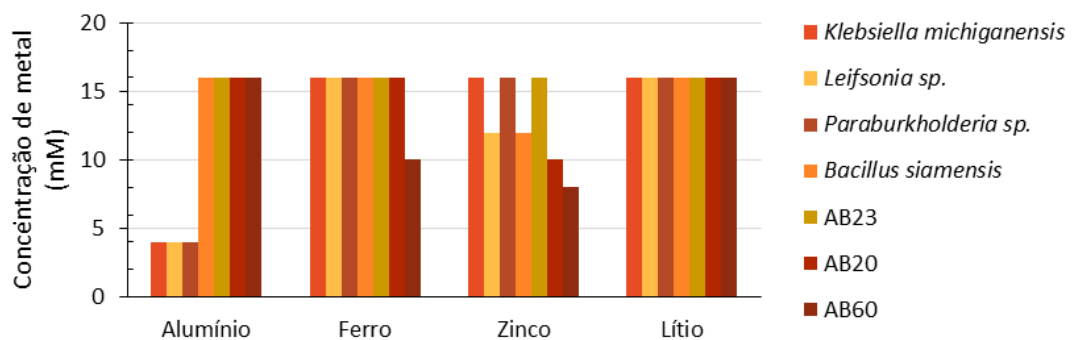


Figura 2: Representação gráfica da resistência a metais por isolados bacterianos. As barras indicam os limites de tolerância ao alumínio, ferro, zinco e lítio para cada isolado.

4.3 Análises genômicas de genes de resistência a metais

Todos os genomas analisados obtiveram genes relacionados a bomba de efluxo, captação e homeostase dos metais zinco e ferro (Figura 3). Dentre os genes relacionados à homeostase, a maioria corresponde a reguladores transcricionais. Genes em que a função não foi identificada foram excluídos da análise.

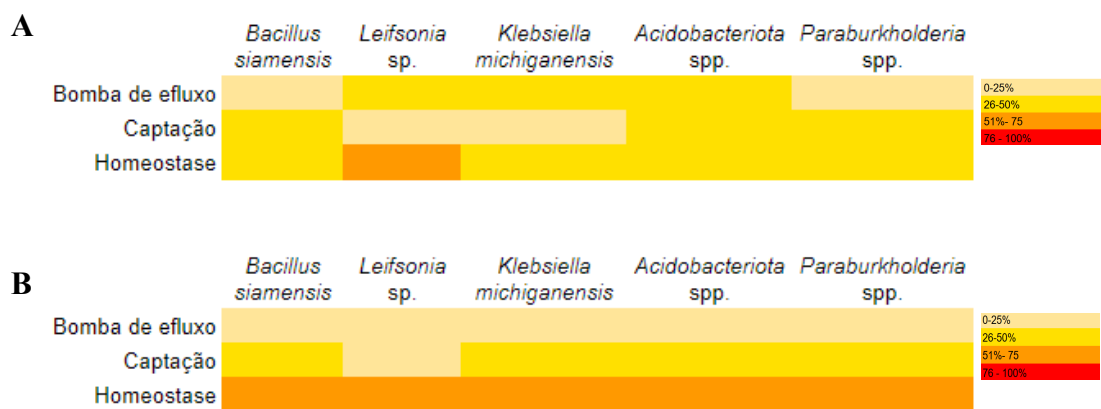


Figura 3: Representação da quantidade de genes associados a zinco e ferro em *Bacillus siamensis*, *Klebsiella michiganensis*, *Leifsonia sp.*, *Acidobacteriota spp.* e *Paraburkholderia spp.* Em (A), genes relacionados ao zinco e em (B) genes relacionados ao ferro. Quanto maior a intensidade das cores quentes, maior a quantidade de genes presentes em cada categoria.

A sequência dos genes ALUI1 e SmtA não foi encontrada em todos os três isolados analisados. Contudo, o ALUI1 obteve correspondência nos genomas de *Bacillus siamensis* e *Klebsiella michiganensis*, e o gene SmtA foi encontrado no genoma de *Klebsiella michiganensis*. Observa-se uma boa identidade nessas correspondências, com e-value extremamente baixos, indicando que o alinhamento não ocorreu ao acaso (Figura 4). Além disso, a conservação entre os aminoácidos é alta (Figuras 5), indicando que podem se tratar de genes homólogos.

Isolado	Gene	Gene ID	Descrição do gene	Identidade	Posição	E- value	Gene genbank
<i>Bacillus siamensis</i>	Resistência ao alumínio	AF022216.1	aluminum resistance protein (ALU1)	74.390	(42141..42800)	8.57e-90	7-cyano-7-deazaguanine synthase
	Metalotioneínas (MTs)	11846843	Putative metallothionein SmtA	-	-	-	-
<i>Klebsiella michiganensis</i>	Resistência ao alumínio	AF022216.1	aluminum resistance protein (ALU1)	56.287	(112206..112901)	4.23e-63	cyano-7-deazaguanine synthase
	Metalotioneínas (MTs)	11846843	Putative metallothionein SmtA	88.672	(231025..231804)	2.14e-167	tRNA 5-carboxymethoxyuridine methyltransferase
<i>Leifsonia</i> sp.	Resistência ao alumínio	AF022216.1	aluminum resistance protein (ALU1)	-	-	-	-
	Metalotioneínas (MTs)	11846843	Putative metallothionein SmtA	-	-	-	-

Figura 4: Resultado do BLASTp realizado entre os genes ALU1, SmtA, e o genoma dos isolados *Bacillus siamensis*, *Klebsiella michiganensis*, *Leifsonia* sp.

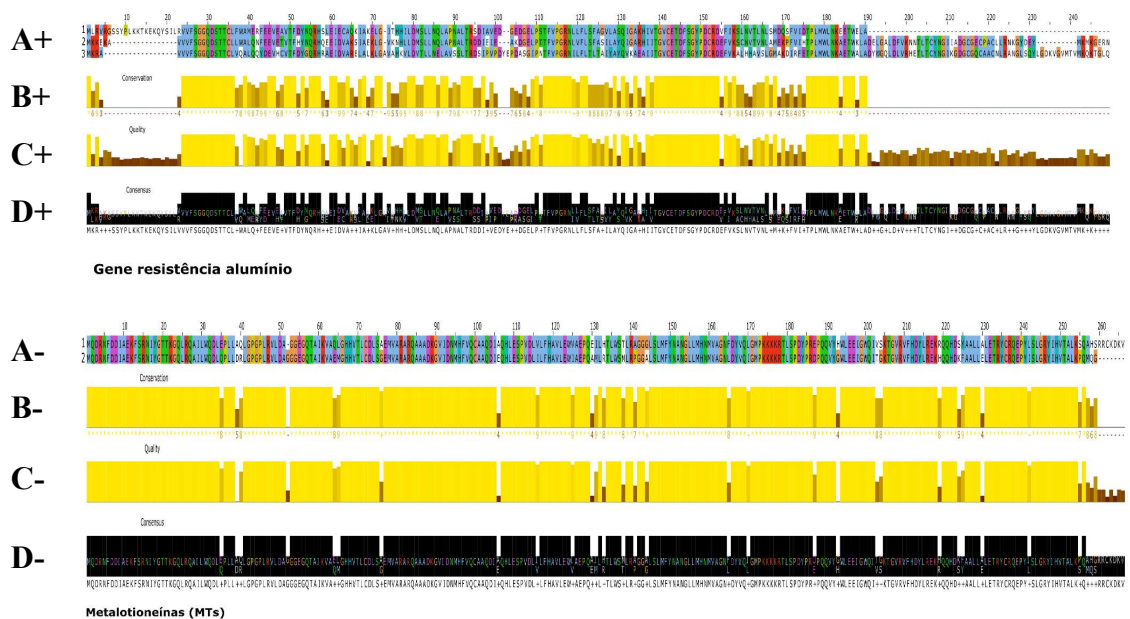


Figura 5: Representação da similaridade entre os aminoácidos encontrados no gene ALU1 (ABCD+) e SmtA (ABCD-) com as seqüências correspondentes dos genomas analisados. Em (A) está representado o alinhamento entre as seqüências. Na linha A+, a fita em 1 representa a seqüência de aminoácidos retirada do NCBI, em 2 a seqüência correspondente encontrada no isolado *Bacillus siamensis* e em 3 a seqüência correspondente do isolado *Klebsiella michiganensis*. Na linha A-, a fita em 1 representa a seqüência retirada no NCBI e em 2 representa a encontrada no genoma de *Klebsiella michiganensis*. Em (B), é representada a conservação entre os aminoácidos, em (C) a qualidade da sobreposição, e em (D) a seqüência consenso.

4.4 Análise dos efeitos da inoculação dos isolados *Acidobacteriota* sp. (AB23), *Paraburkholderia* sp., *Klebsiella michiganensis*, *Leifsonia* sp. e *Bacillus siamensis* em sementes de soja cultivadas em solo com alta concentração de alumínio

As sementes plantadas em solo ácido contendo alumínio, inoculadas com os isolados AB23, *Paraburkholderia* sp. e *Klebsiella michiganensis* não germinaram. Já as sementes inoculadas com os mesmos isolados, mas plantadas em solo de barranco

obtiveram crescimento (Figura 6A). Esse resultado indica o solo como fator diferencial, uma vez que há a inoculação de bactérias nas duas condições experimentais. Ou seja, a influência do alumínio nos isolados foi fator decisivo para o não desenvolvimento da soja. Além disso, as sementes não inoculadas plantadas em solo contendo alumínio sobreviveram (Figura 6B), o que corrobora a indicação de que a presença dos isolados em solo com alumínio contribuiu definitivamente para a inibição do crescimento vegetal.

Ainda assim, os isolados *Leifsonia* sp. e *Bacillus siamensis* possibilitaram o crescimento da soja em solo contendo alumínio (Figura 6B), indicando que o mecanismo de detoxificação de alumínio destes isolados não inibe o crescimento dessa espécie vegetal. Contudo, os parâmetros medidos (comprimento da parte aérea e radicular, massa fresca da parte aérea e radicular e massa seca da parte aérea e radicular) não diferenciam estatisticamente do controle (soja não inoculada plantada em solo com alumínio). Os parâmetros das raízes (área da superfície, comprimento, diâmetro, volume e comprimento por volume) para entre essas duas condições também não diferenciam. Essas análises em conjunto indicam que esses microrganismos não causaram danos às plantas, tampouco proporcionaram ganhos.

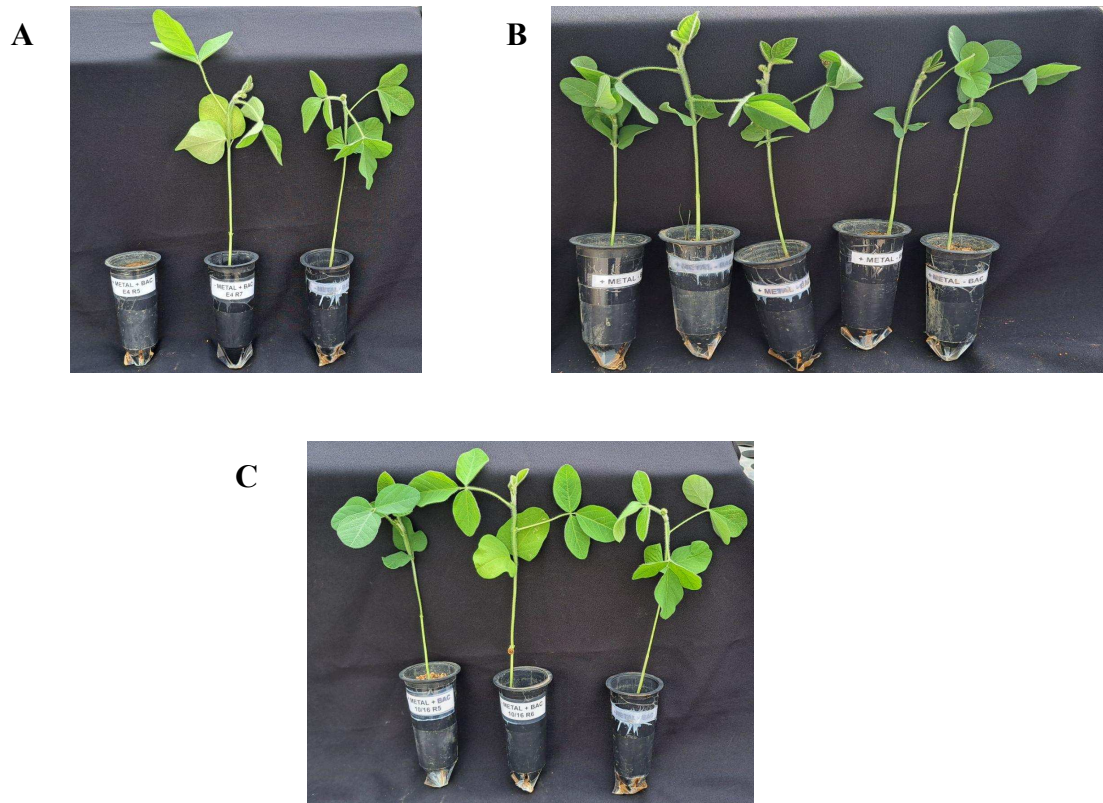


Figura 6: Análise comparativa entre a soja inoculada e o controle. (A): Da esquerda para a direita, semente inoculada com *Klebsiella michiganensis* e plantada em solo com alumínio; semente inoculada com *Klebsiella michiganensis* e plantada em solo sem alumínio; semente não inoculada, plantada em solo sem alumínio. (B): Semente não inoculada, plantada em solo com alumínio. (C): Da esquerda para a direita, semente inoculada com *Bacillus siamensis* e plantada em solo com alumínio; semente inoculada com *Bacillus siamensis* e plantada em solo sem alumínio; semente não inoculada, plantada em solo sem alumínio.

4.5 PCR em Tempo Real (qPCR)

A análise não identificou diferença estatisticamente significativa entre o controle e o tratamento da soja inoculada com *Bacillus siamensis* e *Leisonia* sp. para a expressão do gene SAM, que codifica a proteína S-adenosil-biossíntese de etileno (Figura 7A). Para o gene PAL, codificador da proteína phenylalanine ammonia-lyase, o tratamento da soja com o inóculo *Leisonia* sp. foi diferente do controle e do tratamento com *Bacillus siamensis*, mostrando uma maior expressão desse gene (Figura 7B).

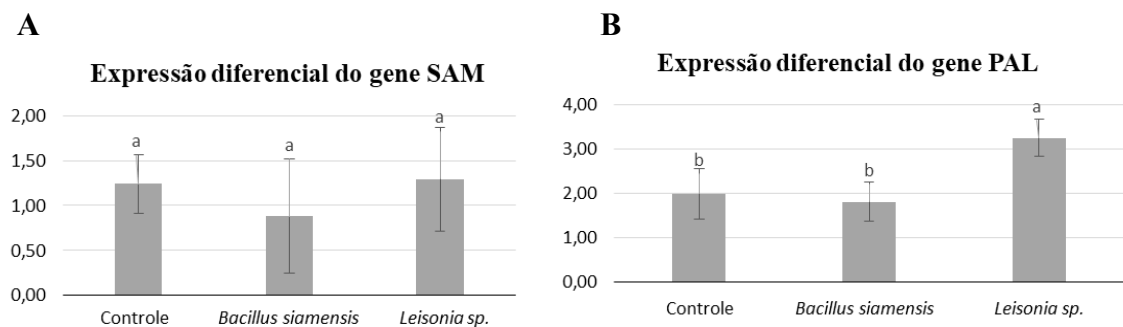


Figura 7: Gráfico representativo da expressão dos genes SAM e PAL em soja inoculada com *Bacillus siamensis* e *Leisonia* sp. e no controle. Em (A) é mostrada a expressão do gene SAM e em (B) é mostrada a expressão do gene PAL. Letras iguais em cada gráfico significam que não houve diferença estatisticamente significativa.

5. DISCUSSÃO

A presença de grandes quantidades de metais no solo afeta negativamente o desenvolvimento de plantas por reduzir a biomassa, o desenvolvimento das raízes e a germinação de sementes (Lee; Sreekanth, 2010; Sethy; Ghosh, 2013; Agajyoti, 2010). Nesse contexto, estudos têm destacado a existência de bactérias capazes de tolerar concentrações significativas de metais e desempenhar um papel relevante no aumento do crescimento vegetal (Belhassan *et al.*, 2024; Etesami, 2018). Ensaio de resistência a metais, como os realizados por Raja, Selvam e Omine (2009), indicaram que, embora algumas bactérias

apresentam resistência ao cádmio a 4 mM, elas demonstraram susceptibilidade a outros metais na mesma concentração, evidenciando que a toxicidade pode variar entre os diferentes metais. Um padrão semelhante foi observado neste estudo: dos 20 isolados testados, apenas 7 (*K. michiganensis*, *Paraburkholderia* sp., *Leifsonia* sp., *B. siamensis*, e *Acidobacteriota* spp. (AB20, AB23 e AB60) apresentaram tolerância aos 4 metais avaliados (Al, Fe, Li e Zn). Os outros 13 isolados, por sua vez, não conseguiram crescer em pelo menos um dos metais testados. Além disso, quando testados a concentrações maiores que 4mM, a tolerância dos 7 isolados selecionados variou consideravelmente entre os diferentes metais. Essa variação na capacidade de tolerância, sugere a existência de mecanismos distintos responsáveis pelo processamento desses compostos tóxicos nos isolados analisados.

A existência de genes diretamente relacionados à resistência bacteriana a metais é um tema amplamente conhecido e foi discutido por Silver em 1996, com destaque para metais como mercúrio, cobre, zinco e outros. Diante disso, o presente estudo ressaltou a necessidade de explorar os mecanismos envolvidos na detoxificação de metais nos sete isolados selecionados. Para *B. siamensis*, *K. michiganensis*, *Leifsonia* sp., foi possível a investigação do genoma quanto a presença dos genes ALU1 e SmtA. Em *Leifsonia* sp. não foi encontrado nenhuma correspondência com esses dois genes. Contudo, isso não descarta a possibilidade de haver outros genes envolvidos na resistência ao alumínio. Isso se justifica pelo fato de que um único gene pode participar da detoxificação de diferentes metais. Um exemplo disso é o gene FieF, identificado no genoma desse isolado, que compõem um sistema de efluxo para o ferro, mas também para o zinco e possivelmente o cádmio (Chao; Fu, 2004; Grass *et al.* 2001; Grass, *et al.*, 2005). Em *B. siamensis* foi identificada a presença de ALU11, o que corrobora o fato dessa espécie ter conseguido sobreviver mesmo em altas concentrações de alumínio, metal que foi mais limitante entre os isolados no experimento *in vitro*. Já em *K. michiganensis*, foram encontradas correspondências entre os dois genes analisados. O SmtA já foi encontrado *in silico* no genoma de outra espécie do gênero, indicando papel relevante e conservação do gene. Já o ALU11 foi encontrado no genoma de *Arthrobacter viscosus* (Jo *et al.*, 1997), microrganismo também isolado de solo ácido, o que confirma a presença de mecanismos para lidar com a toxicidade de alumínio nesses ambientes. Além disso, genomas relacionados a todos os 7 isolados apresentaram genes relacionados a bomba de efluxo, captação e homeostase dos metais zinco e ferro.

Bactérias que possuem genes de resistência a metais, geralmente são associadas com a potencial capacidade de biorremediação de ambientes (Das; Dash; Chakraborty, 2016). Neste estudo, é interessante observar que 3 dos isolados (AB23, *Paraburkholderia* sp. e *K.*

michiganensis) resistentes ao alumínio *in vitro* impediram o crescimento da soja quando plantada em solo contendo alumínio. Esse resultado pode estar associado ao produto da detoxificação realizada pelas bactérias, o qual pode ter exercido efeitos negativos no desenvolvimento das sementes. Além disso, *Leifsonia* sp. e *B. siamensis* permitiriam o crescimento vegetal, mas não aumentaram esse crescimento em relação à soja não inoculada, plantada no mesmo solo. Em contrapartida, na soja inoculada com *Leifsonia* sp., a expressão do gene PAL foi maior do que na soja não inoculada. O gene PAL pode ser induzido em plantas sob diferentes tipos de estresse (Yin *et al.*, 2024). Nesse cenário, a soja inoculada apresentou maior resposta ao estresse que a soja não inoculada, o que levanta a hipótese de que a bactéria auxiliou na sobrevivência da planta, ainda que não tenham sido observadas diferenças nos parâmetros físicos avaliados. Portanto, nota-se que a maioria dos isolados não possui capacidade de promover o crescimento da soja em solos com alta concentração de alumínio. Pelo contrário, eles podem desenvolver um papel negativo no cultivo de plantas nessas condições. Contudo, *Leifsonia* sp. pode induzir respostas mais rápidas das plantas ao estresse por metais, favorecendo sua adaptação a essas condições adversas. A partir disso, outras análises podem ser feitas, pois apesar de não terem sido encontrados dados relacionados ao produto bacteriano da detoxificação de alumínio, e a inibição do crescimento de soja, essa possibilidade se mantém em aberto devido a interatividade que esse elemento pode ter com outras substâncias.

6. CONCLUSÃO

Das 20 bactérias isoladas do solo do Cerrado, 7 foram escolhidas de acordo com a sua capacidade de tolerar os metais alumínio, ferro, zinco e lítio. Em análise *in silico*, foram encontrados genes associados à tolerância ao ferro e zinco relacionados a todos os isolados selecionados. Além disso, em *K. michiganensis* e *B. siamensis* foi encontrado, *in silico*, o gene ALUI1 relacionado a tolerância ao alumínio. Os isolados AB23, *Paraburkholderia* sp. e *K. michiganensis* impediram o crescimento de soja em solo ácido contendo alumínio, desenvolvendo um papel negativo para o cultivo de plantas nessas condições. Além disso, os isolados *Leifsonia* sp. e *B. siamensis* permitiriam o crescimento vegetal, mas não aumentaram esse crescimento em relação à soja não inoculada plantada no mesmo solo. Entretanto, *Leifsonia* sp. pode induzir respostas mais rápidas das plantas ao estresse por metais, favorecendo sua adaptação a essas condições adversas. Esses resultados abrem margem para a realização de novos estudos que correlacionem o produto de detoxificação de metais de

bactérias à redução do desenvolvimento de soja. Além disso, pode ser investigada a atuação *Leifsonia* sp. na tolerância da soja à condição de estresse por metais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SA'ADY, A. T.; NAHAR, H. S.; SAFFAH, F. F.. Antibacterial activities of chlorine gas and chlorine dioxide gas against some pathogenic bacteria. **EurAsian Journal of Biosciences**, v. 14, n. 2, 2020.

ANDREAZZ, R.; DE OLIVEIRA CAMARGO, F. A.; ANTONIOLLIA, Z. I.; QUADRO, M. S.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.

ARSENAULT, J. L.; POULCUR, S.; MESSIER, C.; GUAY, R. WinRHIZO™: a root-measuring system with a unique overlap correction method. **HortScience**, v. 30, n. 4, p. 906, 1995.

BELHASSAN, M., FARHAT, A., ABED, H. E., CHAABEEN, Z., BOUZID, F., ELLEUCH, A.; KHEMAKHEM, B. Isolation and identification of a new *Bacillus glycinifermentans* strain from date palm rhizosphere and its effect on barley seeds under heavy metal stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 843-854, 2024.

Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Parkinson, J. A., Robinson, A. K., Cavet, J. S., Robinson, N. J., & Sadler, P. J. A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 17, p. 9593-9598, 2001.

CHAO, Y; FU, D. Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the Escherichia coli zinc transporter YjiP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17173-17180, 2004.

COUTINHO, L. M. Biomas brasileiros. São Paulo: Oficina de Textos, 2016.

DAS, S.; DASH, H. R.; CHAKRABORTY, J.. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 2967-2984, 2016

DE FARIAS, G. M.; ZAMBERLAN, C. O.. Expansão da fronteira agrícola: impacto das políticas de desenvolvimento regional no centro-oeste brasileiro. **Revista Brasileira de Planejamento e Desenvolvimento**, v. 2, n. 2, p. 58-68, 2014

DURAN-FIGUERO, N.; RIVERA-GUTIERREZ, S.; CAMARERO-ARELLANO, Y.; DEL CARMEM OLIVER-SALVADOR, M.; BADILLO-CORONA, J. A. Rapid and massive protocol to disinfection of Arabidopsis seeds using gaseous chlorine. **Bio-protocol Preprint**, 1 jan. 2022.

ETESAMI, H. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 175-191, 2018.

FRANZARING, J.; DAMSOHN, W.; FANGMEIER, A.; SCHLOSSER, S.; KURZ, H; BUTTNER, P. Phytotoxicity of tin mine waste and accumulation of involved heavy metals in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **International journal of phytoremediation**, v. 20, n. 5, p. 462-470, 2018.

GRABSKI, S.; SCHINDLER, M. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiology**, v. 108, n. 3, p. 897-901, 1995.

GRASS, G.; FAN, B.; ROSEN, B. P.; FRANKE, S.; NIES, D. H.; RENSING, C. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 15, p. 4664-4667, 2001

GRASS, G.; OTTO, M.; FRICKE, B.; HANEY, C. J.; RENSING, C.; NIES, D. H.; MUNKELT, D. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. **Archives of microbiology**, v. 183, p. 9-18, 2005.

GUPTA, N.; GAURAV, S. S; KUMAR, A.. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2013, 2013.

HAYNES, William M. **CRC handbook of chemistry and physics**. CRC press, 2016.

HIDALGO, K. J.; GIACHINI, A. J.; SCHNEIDER, M. R.; SORIANO, A. U.; BAESSA, M. P.; MARTINS, L. F., OLIVEIRA, V. M. Recent advances in bioremediation of biofuel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 188, p. 105750, 2024.

JABBAR, N. M., ALARDHI S. M., MOHAMMED, A. K., SALIH, I. K., ALBAYATI, T. M. Challenges in the implementation of bioremediation processes in petroleum-contaminated soils: A review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 18, p. 100694, 2022.

JO, J.; JANG, Y. S.; KIM, K. Y.; Kim, M. H.; Kim, I. J.; Chung, W. I. Isolation of ALU1-PGene Encoding a Protein with Aluminum Tolerance Activity from *Arthrobacter viscosus*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 239, n. 3, p. 835-839, 1997.

KHAN, M., IJAZ, M., CHOTANA, G. A., MURTAZA, G., MALIK, A., SHAMIM, S. *Bacillus altitudinis* MT422188: A potential agent for zinc bioremediation. **Bioremediation Journal**, v. 26, n. 3, p. 228-248, 2022.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 459–493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PINEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1-2, p. 175-195, 2005.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHÃES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 571–598, 2015.

KURNIAWAN, S. B.; PURWANTI, I. F.; TITAH, H. S.. The effect of pH and aluminium to bacteria isolated from aluminium recycling industry. **Journal of Ecological Engineering**, v. 19, n. 3, p. 154-161, 2018.

LI, J.; TIAN, J.; ZHOU, M.; TIAN, J.; LIANG, C. (2024). Research progress on the physiological and molecular mechanisms underlying soybean aluminum resistance. **New Crops**, p. 100034, 2024.

LI, S.; WU, J.; HUO, Y.; ZHAO, X.; XUE, L. Profiling multiple heavy metal contamination and bacterial communities surrounding an iron tailing pond in Northwest China. **Science of the Total Environment**, v. 752, p. 141827, 2021

LI, W.; ACHAL, V. Environmental and health impacts due to e-waste disposal in China—A review. **Science of the Total Environment**, v. 737, p. 139745, 2020.

LIRA-MARTINS, D.; CASTRO, L. C. de; LEITÃO, R. de A.; SILVA, R. C. da; SILVEIRA, S. C. da. Soil properties and geomorphic processes influence vegetation composition, structure, and function in the Cerrado Domain. **Plant and Soil**, v. 476, n. 1, p. 549-588, 2022.

NAGAJYOTI, P. C; LEE, K. Dtf; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental chemistry letters**, v. 8, p. 199-216, 2010.

NETO, R. G. M; RAMALHO, J. S.. A evolução do impacto ambiental acarretado pela extração de calcário, tendo como exemplo a mineração Paternal-Partezani, no estado de São Paulo. **CES Revista**, v. 24, n. 1, p. 31-42, 2010.

PREZOTTI, L. C.; MARTINS, A. G. Guia de interpretação de análise de solo e foliar.(p. 1-104). **Vitória: Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural**, 2013.

RAFFA, C. M.; CHIAMPO, F.. Bioremediation of agricultural soils polluted with pesticides: A review. **Bioengineering**, v. 8, n. 7, p. 92, 2021.

RAHMAN, R.; UPADHYAYA, H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: A review. **Journal of Plant Biology**, v. 64, n. 2, p. 101-121, 2021.

RAJA, C. E.; SELVAM, G. S.; OMINE, KIYOSHI. Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. In: **Int Joint Symp on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia**. 2009. p. 205-211.

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1289-1303, 2000.

REASONER, Donald J.; GELDREICH, EE238333. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and environmental microbiology**, v. 49, n. 1, p. 1-7, 1985.

SAWYER, D., MESQUITA, B., COUTINHO, B., DE ALMEIDA, F. V., FIGUEIREDO, I., ELOY, L. Perfil do Ecossistema: Hotspot de biodiversidade do cerrado. 2018

SETHY, S. K.; GHOSH, S. Effect of heavy metals on germination of seeds. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v. 4, n. 2, p. 272, 2013.

SHEKHAR, S. K.; GODHEJA, J.; MODI, D. R. Molecular technologies for assessment of bioremediation and characterization of microbial communities at pollutant-contaminated sites.

Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume II: Biological Agents and Methods for Industrial Waste Management, p. 437-474, 2020.

SILVA, L. D.; BASTOS, F. G.; LEITE, H. P. P.; FREIRE, L. V.; HIGA, A. R.; VICTORIA, D. de C. O clima no bioma Cerrado. In: SILVA, L. D. et al. **Sistema de Informações para Planejamento Florestal no Cerrado Brasileiro – Volume II**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2021. Cap. 2, p. 12-28.

SILVER, S. Genes for all metals—a bacterial view of the periodic table: The 1996 Thom Award Lecture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 1998.

SONUNE, N.. Microbes: a potential tool for bioremediation. **Rhizobiont in bioremediation of hazardous waste**, p. 391-407, 2021.

SPEHAR, C. R. Seed quality of soya bean based on mineral composition of seeds of 45 varieties grown in a Brazilian Savanna acid soil. **Euphytica**, v. 76, n. 1, p. 127-132, 1994.

VERMA, S.; KUILA, A. Bioremediation of heavy metals by microbial process. **Environmental Technology & Innovation**, v. 14, p. 100369, 2019.

WEST, T. O.; MCBRIDE, A. C. The contribution of agricultural lime to carbon dioxide emissions in the United States: dissolution, transport, and net emissions. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 108, n. 2, p. 145-154, 2005

YIN, T.; XU, R.; ZHU, L.; YANG, X.; ZHANG, M.; LI, X., ZHANG, H. Comparative analysis of the PAL gene family in nine citrus species provides new insights into the stress resistance mechanism of Citrus species. **BMC genomics**, v. 25, n. 1, p. 1020, 2024.

8. MATERIAIS SUPLEMENTARES

Tabela 1: Lista dos isolados utilizados para a realização dos experimentos.

Código dos isolados	Classificação
Parna 22/3R	<i>Bacillus velezensis</i>
E4	<i>Klebsiella michiganensis</i>
PARNA 5/10	<i>Paraburkholderia</i> sp.
PARNA 23/34	<i>Bacillus velezensis</i>
PARNA 12/2	<i>Dyella</i> sp.
PARNA 23/22	<i>Caulobacter</i> sp.
PARNA 22/21	<i>Leifsonia</i> sp.
S1/10	<i>Bacillus bombysepticus</i>
PARNA 5/6	<i>Bacillus bombysepticus</i>

PARNA 5/22	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
PARNA 10/4	<i>Paenibacillus elgi</i>
PARNA 10/16	<i>Bacillus siamensis</i>
E1/6	<i>Cohnella</i> sp.
Soy 15	<i>Monashia</i> sp.
21M	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
23/8	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
22/4R	<i>Spingobium</i> sp.
AB23	<i>acidobacteriota</i> sp.
AB20	<i>acidobacteriota</i> sp.
AB60	<i>acidobacteriota</i> sp.

Tabela 2. Análise físico-química de amostra do solo coletado na Floresta Nacional de Paraopeba, Minas Gerais, Brasil, utilizado para o plantio de sementes de soja inoculadas com bactérias.

H2O	ph	4,84	V	%	10
P	mg/dm ³	2,6	m	%	71,8
K	mg/dm ³	92	MO	dag/kg	3,97
Ca+	cmol _c /dm ³	0,41	P-Rem	mg/L	19,2
Mg2+	cmol _c /dm ³	0,29	S	mg/dm ³	12,1
Al3+	cmol _c /dm ³	2,39	Cu	mg/dm ³	0,87
H+AL	cmol _c /dm ³	8,5	Mn	mg/dm ³	15,2
SB	cmol _c /dm ³	0,94	Fe	mg/dm ³	86,4
t	cmol _c /dm ³	3,33	Zn	mg/dm ³	1,45
T	cmol _c /dm ³	9,44			

pH em água, KCl e CaCl - Relação 1:2,5; P - K - Extrator Mehlich 1; Ca - Mg - Al - Extrator: KCl - 1 mol/L; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0; B - Extrator água quente; S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético; SB = Soma de Bases Trocáveis; CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V = Índice de Saturação de Bases; m = Índice de Saturação de Alumínio; Matéria orgânica (MO) = C.Org x 1,724 - Walkley-Black.