

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DE SOLO SUBTROPICAL COM CAPACIDADE DE
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

JULIANA MARIA MATTER

CASCAVEL – PARANÁ – BRASIL

ABRIL 2015

JULIANA MARIA MATTER

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DE SOLO SUBTROPICAL COM CAPACIDADE DE
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Dra. Amarílis de Varennes

Co-orientador: Dr. Silvio César Sampaio

CASCADEL – PARANÁ – BRASIL

ABRIL 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M387i

Matter, Juliana Maria

Isolamento de bactérias de solo subtropical com capacidade de promoção de crescimento vegetal./Juliana Maria Matter. Cascavel, 2015.

42 p.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Amarilis de Varennes

Coorientador: Dr. Silvio César Sampaio

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola

1. Solubilizadores. 2. Fosfatos. 3. AIA. 4. Fosfatases. 5. Adubação. 6. Produção agrícola. I. Varennes, Amarilis de. II. Sampaio, Silvio César. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 21.ed. 631.8

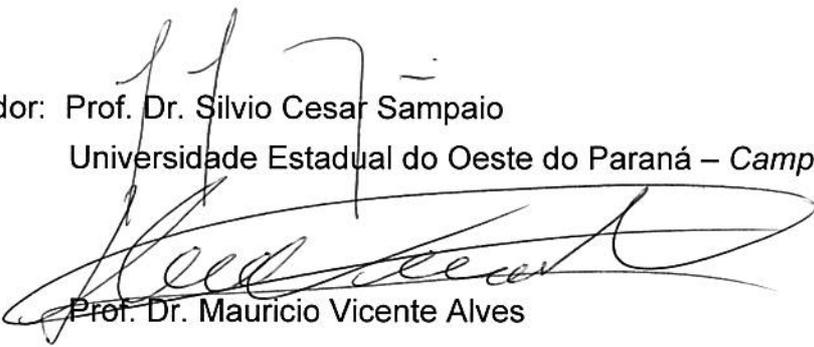
JULIANA MARIA MATTER

"Isolamento de bactérias de solo subtropical com capacidade de promoção de crescimento vegetal"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "*Stricto Sensu*" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:

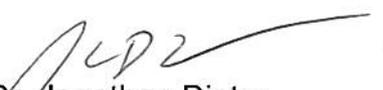
Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Cesar Sampaio

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Cascavel



Prof. Dr. Mauricio Vicente Alves

Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC



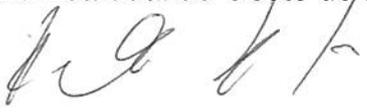
Prof. Dr. Jonathan Dieter

Universidade Federal do Paraná – UFPR/Palotina



Prof.ª Dra. Rita de Cássia Garcia Simão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Cascavel



Prof. Dr. Ralphy Rinaldo dos Reis

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Cascavel

Cascavel, 28 de abril de 2015.

BIOGRAFIA

Juliana Maria Matter, nascida em 16 de setembro de 1983, natural de Realeza, Paraná. Graduada em Ciências Biológicas com Ênfase em Biotecnologia (2005) pela UNIPAR. Especialista em Biotecnologia Aplicada à Qualidade Ambiental – UNIPAR (2007). Mestre em Engenharia Agrícola na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (2010). Ingressante no Doutorado em Engenharia Agrícola na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, UNIOESTE (2011), pela qual participou da Cooperação Internacional financiada pela CAPES para cursar Doutorado Sanduíche no Instituto Superior de Agronomia (ISA) em Lisboa, Portugal (2013).

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho inicial.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Co-Orientador Sílvio Cesar Sampaio por quem tenho grande admiração e respeito, por sua orientação, sua confiança e amizade, obrigada.

A Professora Orientadora Amarílis de Varennes por ter disponibilizando seu tempo e seu conhecimento, tanto em Portugal quanto no Brasil, para passar informações e ensinamentos indispensáveis para a realização do projeto. Muito obrigada.

Ao pesquisador Paulo Ivan Fernandes Junior por abrir as portas dos laboratórios da EMBRAPA Semiárido e investir em metodologias para o projeto.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola pela oportunidade concedida e pelo apoio durante estes seis anos de estudo.

A CAPES pela bolsa de Doutorado, sem a mesma não seria possível a execução do trabalho. Também pela bolsa de Doutorado Sanduiche que possibilitou a viagem e estadia em Portugal pela qual pude contemplar e admirar vários lugares e culturas do continente europeu.

Ao Edison do laboratório de Saneamento, por ser tão eficiente e prestativo, meu muito obrigada.

Aos demais Professores do PGEAGRI, que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado e minha formação, obrigada Doutores!

Aos meus familiares que sempre torceram por mim em especial meus pais, Neusa e Nelson, minha prima Bárbara, tia Vanda e tio Vilson.

Ao Nicholas Varner por toda compreensão e apoio.

Aos meus amigos que me apoiaram e que sempre estavam do meu lado passando energia positiva.

Ao Alexandre Moura, Marcelo Remor, Danielle Rosa, Mariana Sbizzaro, Pâmela Maldaner e Kathleen Jeniffer Modal pela ajuda no laboratório e convivência no grupo de pesquisa.

A Indra Elena Costa Escobar por sua dedicação em parte dos experimentos realizados na EMBRAPA.

A todos os colegas, docentes, funcionários do curso de Pós Graduação em Engenharia Agrícola pela agradável convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

RESUMO

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DE SOLO SUBTROPICAL COM CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

A utilização de fertilizantes químicos na agricultura constitui-se como a principal fonte de nutrientes para o desenvolvimento das culturas visando ao aumento da produtividade. O fósforo, dentre outros nutrientes, é o mais requerido pelas plantas e o que mais limita a produtividade nas culturas de interesse comercial em virtude da sua baixa disponibilidade e imobilização no solo, haja vista ficar indisponível para absorção pelo vegetal. Estudos comprovam que a solubilização de fosfatos a partir da inoculação de bactérias pode ajudar na melhoria da produção agrícola. Muitas bactérias realizam processos de dissolução a partir de diferentes mecanismos e promovem crescimento vegetal tanto pela dissolução de fosfatos como na fixação de nitrogênio (N) e produção de ácido indol acético (AIA). Com o isolamento desses microrganismos, é possível inoculá-los e disponibilizar o fósforo fixado, reduzir o uso de fertilizantes ou readequar as porcentagens excessivas desse elemento em suas fórmulas, visando ao desenvolvimento da produção agrícola sustentável. A partir desta temática, foi utilizada metodologia para isolamento de bactérias de solo subtropical sob cultivo de milho com diferentes históricos de adubação. Além do isolamento, os microrganismos foram submetidos a testes de resistência após repicagem, produção de fosfatases, produção de AIA com e sem L- triptofano e identificação por técnica de extração de rDNA. Uma maior diversidade de bactérias mineralizadores foi encontrada no solo Tratamento 1 (sem adubação). Os resultados relacionados à maior porcentagem de crescimento em fitato de cálcio podem ser justificados pelo fato de as comunidades bacterianas serem capazes de produzir enzimas. A estabilidade da função solubilizadora foi maior em fitato de cálcio do que nos outros meios usados. O estudo indicou que a microbiota do solo mantém similaridade onde prevalece o gênero *Ochrobactrum* e que, em diferentes situações de manejo, pouco varia sua diversidade, mas apresenta capacidade para produzir metabólitos promotores de crescimento de plantas. Os isolados do Tratamento 2 (adubação mineral) mantiveram a produção de fosfatase ácida mais acentuada. A produção de AIA sem a adição de L-triptofano no tratamento T1 sugere que a microbiota utiliza vias metabólicas distintas para tal, visto que o solo estudado é pobre em minerais. Isso afeta a produção de promotores de crescimento de plantas, contrapondo-se ao Tratamento 3, o qual recebeu adubação com água residuária de suinocultura e diversificou a produção de AIA por seus isolados com valores mais robustos. Finalmente, de acordo com os resultados do presente estudo, foi possível a identificação de gêneros de bactéria com elevada capacidade de solubilização de fitatos e produção de AIA, indicando capacidade de promoção de crescimento vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: solubilizadores, fosfatos, AIA, fosfatases, adubação, produção agrícola.

ABSTRACT

BACTERIA ISOLATION FROM SUBTROPICAL SOIL WITH VEGETAL GROWTH CAPACITY

Chemical fertilizers management in agriculture is the main source of nutrients for crops development aiming at increasing yield. Thus, phosphorus, among other nutrients, is required by plants since it is the most limiting mineral on yield crops of commercial interest, because of its low availability and immobility in soil, as it also gets unavailable to absorption by the plants. Studies have shown that phosphate solubilization up from bacteria inoculation can improve agricultural production. Many bacteria can take part on the dissolution process through different mechanisms and promote plant growth either by dissolving phosphates or determining nitrogen (N) and indole acetic acid production (IAA). Due to the isolation of these microorganisms, they can be inoculated and make the fixed phosphorus available, reducing the use of fertilizers or readjusting excessive percentages of this element in their formulas to improve a development of sustainable agricultural yield. According to this theme, it was possible to apply a methodology for the isolation of subtropical soil bacteria with maize cropping from different soil fertilization managements. After isolating the micro-organisms, they were submitted to endurance tests after pricking, phosphatase production ability, IAA production with and without L-tryptophan and identification method by rDNA extraction technique. A greater diversity of mineralizing bacteria was found in treatment 1 soil (no fertilization). The results related to the largest percentage increase in Calcium phytate can be justified by the fact that bacterial communities can produce enzymes. The stability of the solubilizing function was greater in calcium phytate when compared to the other culture media that have been used. The study has indicated that soil microbiota keeps a similarity in which *Ochrobactrum* gender has prevailed and under different management situations, its diversity slightly varies, but it is able to produce metabolites promoters of plant growth; while the isolates of Treatment 2 (mineral fertilization) have kept the best acid phosphatase production. The IAA production, without L-tryptophan addition in T1, suggests that the microbiota uses metabolic pathways for different purposes, since the studied soil is poor in minerals, thus it affects the production of plant growth promoters. It differs from Treatment 3 that received fertilization with swine wastewater, and diversified IAA production for its isolates with stronger values. With this study it was possible to identify genera of bacteria with high phytate mineralization capacity. At last, according to the study results, it was possible to identify the bacteria genera with high capacity to mineralize phytate and produce IAA, indicating the promotion of vegetal growth capacity.

KEYWORDS: solubilizing, phosphates, IAA, phosphatases, fertilization, agricultural production.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
ARTIGO 1 - Aplicação de água residuária da suinocultura como fertilizante reduz comunidades bacterianas solubilizadoras de fosfatos em solos subtropicais. Revista Ciências Agrárias (SCAP) – Portugal	3
1 Introdução	3
2 Material e métodos	5
2.1 Isolamento de bactérias	5
2.2 Análises do solo	6
2.3 Tratamento estatístico	6
3 Resultados e discussão	7
4 Conclusão	12
5 Agradecimentos	13
6 Referências Bibliográficas	13
ARTIGO 2 - Isolamento e caracterização de rizobactérias solubilizadoras de fosfatos de solo subtropical com capacidade de promoção de crescimento vegetal. Microbiology Ecology (FEMS)	20
1 Introdução	20
2 Elaboração da Pesquisa	22
2.1 Solo	22
2.2 Isolamento de rizobactérias fosfolubilizadoras	22
2.3 Atividade Fosfatase	23
2.4 Produção de AIA (ácido indol acético)	23
2.5 Caracterização e Identificação dos microrganismos	23
2.6 Análise Estatística	24
3 Resultados e Discussão	25
4 Conclusão	34
5 Agradecimentos	35
6 Referências Bibliográficas	35

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 – Porcentagem da estabilidade da capacidade de solubilização após repicagem de cada meio de rasteio.....	10
Tabela 2 – Correlação de Pearson entre o número de unidades formadoras de colônias e as variáveis físico-químicas do solo.....	11
Tabela 3 – Média dos elementos P, K e Zn no solo de cada tratamento.....	12

Artigo 2

Tabela 1 Caracterização genética das bactérias solubilizadoras de fosfatos por nível de gênero.....	28
Tabela 2 Comparação de médias para atividade fosfatase ácida.....	30
Tabela 3 Produção de Ácido Indol Acético por bactérias selecionadas no Tratamento 1	31
Tabela 4 Produção de Ácido Indol Acético por bactérias selecionadas no Tratamento 2	32
Tabela 4 Produção de Ácido Indol Acético por bactérias selecionadas no Tratamento 3	33

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1 Efeito do histórico de adubação e do meio de cultura no número de unidades formadoras de colônias (UFC). As médias foram comparadas com o teste de Duncan (5% de significância), com letras maiúsculas para comparação entre meios de cultura dentro de cada nível de solo e letras minúsculas para comparação da fertilização dentro de cada meio de cultura. T1 – solo sem adubação; T2 – solo com adubação mineral; T3 – adubação com água residuária de suinocultura. Fi – fitato de cálcio; Ca – fosfato de cálcio; Al – fosfato de alumínio..... 8

Artigo 2

Figura 1 (A e B) UFC isolada com presença de halo indicando solubilização de fosfato..... 25

Figura 2 Árvore filogenética para análise de similaridade entre os 29 isolados, baseada na morfologia e no sequenciamento do gene 16S rRNA..... 26

Isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfatos em solos subtropicais com diferentes históricos de adubação

Revista Ciências Agrárias (SCAP) – Portugal

A presença de nutrientes é um dos aspectos fundamentais para a qualidade dos solos e consequentemente produtividade sustentável. Dentre os nutrientes requeridos pelas plantas, o fósforo apresenta um paradoxo, mesmo sendo um dos elementos químicos mais abundantes na crosta terrestre, todavia, é o nutriente com menor índice de biodisponibilidade (Lemos *et al*, 2009).

Apesar da proporção dos nutrientes ser inerente à cultura, o fósforo merece atenção especial, pois, quando em contato com o solo, reage rapidamente com o meio e converte-se em formas não absorvíveis pelas plantas. Em solos de regiões tropicais a indisponibilidade do fósforo acentua-se, pois grande quantidade do P aplicado no solo forma partículas a partir da reação de precipitação junto ao Al^{3+} e Fe^{3+} altamente reativos em solos ácidos (Hao *et al*, 2002) e Ca^{2+} em solos alcalinos ou calcários (Gyaneshwar *et al*, 2002), os quais permanecem imobilizados e fixados ao solo em forma de fosfatos de alumínio, fosfatos de ferro e fosfatos de cálcio (Tsai e Rossetto, 1992).

A fim de reverter este processo, a via biológica caracteriza-se inicialmente pelo isolamento, caracterização e quantificação da capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis por microrganismos e posterior formulação de inóculos viáveis, assim, torna eficiente a técnica de inoculação de microrganismos solubilizadores no uso agrícola. Portanto, a via biológica possui altíssimo potencial de solubilização de fosfatos

insolúveis, associada à sustentabilidade ambiental, semelhante à fixação de nitrogênio no solo por leguminosas e gramíneas. Neste sentido, pesquisas que visam obter isolados solubilizadores de fosfato vêm sendo desenvolvidas em diversos solos; no Brasil: região de Cerrado (Embrapa, 2003; Ceribeli *et al*, 2012), região Amazônica (Silva *et al*, 2011; Oliveira-Longatti *et al*, 2014), região do Semiárido (Souza *et al*, 2013; Lima *et al*, 2014); e no exterior: solos subtropicais chineses (Chen *et al*, 2006; Zhu *et al*, 2011), australianos (Park *et al*, 2011), solos vulcânicos do Chile (Milko *et al*, 2008), solos de pastagem no Uruguai (Azziza *et al*, 2012) e regiões de mangue da Índia (Behera *et al*, 2014).

Nestas regiões, encontraram-se alguns gêneros de bactérias biossolubilizadoras de fosfato, sendo: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Achromobacter* (Nisha *et al*, 2014) *Arthrobacter* e *Serratia* (Chen *et al*, 2006) *Pantoea* (Milko *et al*, 2008; Park *et al*, 2011), *Kushneria* e *Halomonas* (Zhu *et al*, 2011), *Azospirillum* e *Azotobacter* (Khan *et al*, 2009), *Burkholderia* (Embrapa, 2008), *Aeromonas*, *Alcaligenes* e *Pasteurella* (Corderó *et al*, 2014), *Acinetobacter* e *Bradyrhizobium* (Oliveira-Longatti *et al*, 2014). Vale destacar que os fosfatos que sofrem solubilização por bactérias podem ser na forma inorgânica (Silva Filho e Vidor, 2001; Duponnois *et al*, 2005; Chen *et al*, 2006; Barroso e Nahas, 2008; Park *et al*, 2011) ou orgânica, como os fitatos (Nahas, 2002; Costa e Lovato, 2004; Milko *et al*, 2008; Ribeiro *et al*, 2013; Nisha *et al*, 2014).

Diante do exposto, percebe-se que os gêneros encontrados estão intimamente correlacionados com as características edafoclimáticas e do uso do solo, específicos da localidade. Logo, considerando que inexistente informação sobre bactérias solubilizadoras de fosfatos na região Oeste do Estado do Paraná, caracterizada por um solo com elevada

capacidade de produção agrícola, criação de animais e ainda grandes reservas ambientais e hídricas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e classificar comunidades bacterianas solubilizadoras de fosfatos de cálcio, fosfato de alumínio e fitato de cálcio, extraídas de três parcelas agrícolas monitoradas por oito anos: natural, adubação química e adubação orgânica de um solo subtropical.

Material e métodos

As amostras de solo e rizosfera foram retiradas de uma área experimental implantada em 2006, com sucessão contínua anual com soja, milho e aveia, totalizando 18 ciclos de cultura até 2014. A partir dos tratamentos aplicados em cada ciclo de cultura (Kessler *et al*, 2014), foi possível a seleção de três extremos para coleta do material, sendo: T1 – Sem adubação mineral ou orgânica; T2 – Adubação mineral conforme as necessidades de cada cultura e; T3 – Adubação orgânica com 300 m³.ha⁻¹ de água residuária de suinocultura. A planta-isca utilizada foi o milho (variedade CD 316 - híbrido superprecoce - safrinha) e o solo da área é classificado como Latossolo Vermelho Distroférrico típico (Embrapa, 2006).

Isolamento de bactérias

Foi suspenso 1 g de fragmentos de raízes com solo agregado em 25 mL de solução salina estéril (8,5 g L⁻¹ NaCl) (Milko *et al*, 2008) e agitado durante 10 minutos. Após agitação, as amostras foram diluídas sucessivamente até 10⁻¹⁰. Usando triplicata para cada diluição, as mesmas foram transferidas em alíquotas de 100 µL para placas de Petri estéreis, com meio rico (PDA Acumedia®) e para meios mínimos de rasteiro

contendo como única fonte de fósforo as formas insolúveis: fosfato de cálcio, fosfato de alumínio e fitato de cálcio. As placas permaneceram em estufa durante 4 dias a 30°C.

Os meios de rasteio foram elaborados conforme as necessidades mínimas para o desenvolvimento microbiano adaptado de Milko *et al*, (2008).

Os isolados dos meios mínimos foram transferidos para os meios de rasteio novamente e depois se repetiu a repicagem por mais duas vezes, com o objetivo de confirmar o crescimento das colônias e a capacidade de solubilização. Esta técnica de repicagem (“replica-picking”) ocorre pela transferência de células a partir de uma matriz de colônias para uma série de placas de “réplicas”. Assim, cada uma das placas de réplica é inoculada por células na mesma disposição (Lederberg e Lederberg, 1951).

A contagem total de unidades formadoras de colônias foi utilizada para realizar a porcentagem de crescimento total. Após a resposta do crescimento, os dados foram relacionados ao crescimento nos meios de cultura com as distintas formas de fosfato insolúvel de cada solo para fins de comparação da quantidade de bactérias solubilizadoras e a capacidade de solubilização após repicagens.

Análises do solo

As amostras de solo foram coletadas após o manejo da cultura de milho, na camada de 0,00-0,20 m de profundidade, abrangendo parte do perfil da parcela experimental, para determinação de pH, MO, P, S, H^+Al^{3+} (acidez trocável), Ca^{2+} , Mg^{2+} , K, Na^+ , Mn, Cu^{+2} , Fe, Zn^{+2} , N_{Total} , N_{inor} , N_{org} , $NO_3^- + NO_2^-$, NH_4^+ (nitrogênio amoniacal) segundo metodologias da EMBRAPA (2009).

Tratamento estatístico

A diferença entre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) em função do tipo de adubação aplicada ao solo e o meio de cultura utilizado para crescimento microbiano foi obtida por análise de variância e teste de média de Duncan (5% de significância). Para a realização da análise de variância e do teste de média, foi considerado um experimento fatorial casualizado (3^2) com dois fatores, três níveis e três repetições totalizando 27 unidades amostrais utilizando o programa Statistica®. Os fatores e os níveis de cada fator são: histórico de adubação do solo (T1, T2, T3) e meios de cultura (Fosfato de Cálcio insolúvel, Fosfato de Alumínio insolúvel e Fitato de Cálcio insolúvel).

Os dados referentes ao número de unidades formadoras de colônias foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de homogeneidade de variância de Bartlett, ambos com 5% de significância. Os testes mostraram que os dados possuem normalidade (p-Valor = 0,282) e homogeneidade de variância (p-Valor = 0,758).

A identificação das variáveis do solo que interferem no número de unidade formadora de colônias foi realizada por correlação linear de Pearson com 5% de significância.

Resultados e discussão

A diluição escolhida para comparações entre os solos foi 10^{-2} , a qual apresentou maior UFC para todos os solos. Na Figura 1 são apresentadas as comparações de médias entre os números de UFC em função da adubação do solo e dos meios de culturas.

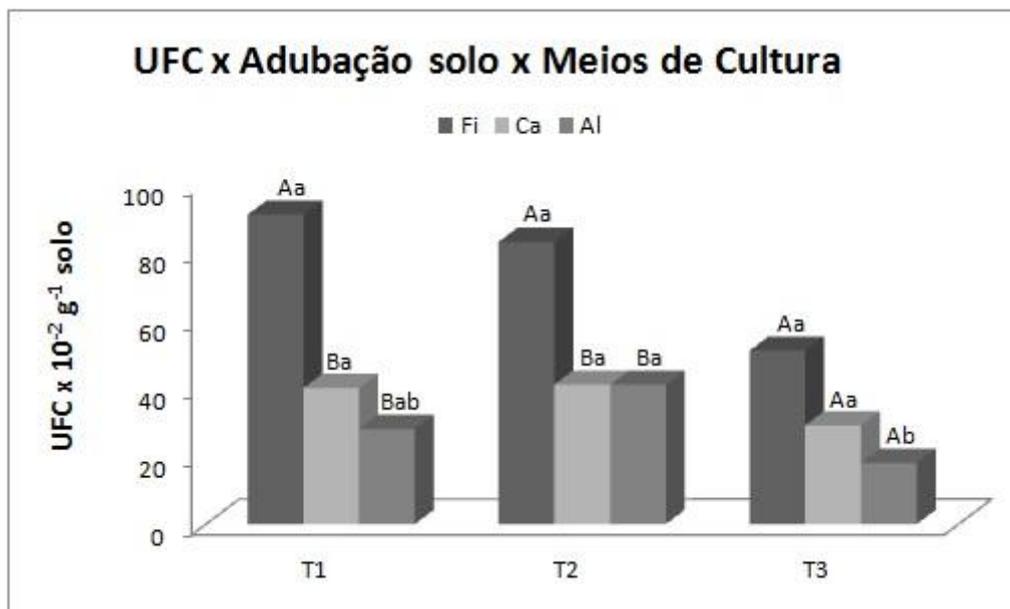


Figura 1 Efeito do histórico de adubação e do meio de cultura no número de unidades formadoras de colônias (UFC). As médias foram comparadas com o teste de Duncan (5% de significância), com letras maiúsculas para comparação entre meios de cultura dentro de cada nível de solo e letras minúsculas para comparação da fertilização dentro de cada meio de cultura. T1 – solo sem adubação; T2 – solo com adubação mineral; T3 – adubação com água residuária de suinocultura. Fi – fitato de cálcio; Ca – fosfato de cálcio; Al – fosfato de alumínio.

Houve diferença estatística entre o número de UFC nos meios de cultura. O meio com Fitato de Cálcio insolúvel apresentou valores maiores para todos os históricos de fertilização e atingiu valores de 50% de crescimento maior nos tratamentos T1 e T2. Geralmente, se aceita que o mecanismo de mineralização de fosfatos por cepas bactérias solubilizadoras de fosfato está associado com a liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Kim *et al*, 1997; Behera *et al*, 2014) enquanto a liberação de íon fosfato a partir dos fitatos depende de enzimas denominadas de fitases.

A produção de fitases por bactérias neste solo é mais do que a capacidade de solubilização dos fosfatos insolúveis, embora seja influenciada pelo histórico de fertilização. O solo T3, que recebeu água residuária de suinocultura, teve baixos valores de UFC, principalmente para o Fosfato de Alumínio, o que pode estar relacionado à disponibilidade de P já presente no solo, proveniente da fertilização, fazendo com que as bactérias não necessitem gastar energia para solubilizar tal fosfato.

Na Tabela 1 são apresentados os valores em porcentagem referentes ao crescimento de colônias após a repicagem de cada um dos meios de rasteio para todos. É possível observar que as bactérias isoladas apresentam maior estabilidade quando o meio contém fitato de cálcio e eram provenientes do mesmo meio, com valores entre 55 e 70% de estabilidade. Tais valores variaram entre 54 e 66% para o fosfato de cálcio e entre 48 e 63% para o fosfato de alumínio. Por outro lado, as bactérias provenientes de um meio e repicadas noutro meio de rasteio tinham por vezes a capacidade de solubilizar esta forma de fósforo insolúvel, com os números mais elevados em relação ao fitato de cálcio (60 a 88% das bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio também atuavam sobre o fitato de cálcio e este número variava de 59 a 92% para as bactérias provenientes de fosfato de alumínio).

Segundo Arcand e Schneider (2006), nas plantas e nos microrganismos, os mecanismos primários da solubilização de P são: excreção de H^+ , produção de ácidos orgânicos e biossíntese da fosfatase ácida. Portanto, as vias metabólicas que direcionam para a mineralização dos compostos orgânicos parecem ser mais prevalentes no solo analisado do que as necessárias para a solubilização de Fosfatos inorgânicos como o fosfato de Cálcio e Fosfato de Alumínio.

O solo T2 apresenta maior porcentagem de estabilidade após a repicagem de UFC dos meios contendo fosfato inorgânico. Pelo fato do solo receber adubação

mineral fosfatada, é possível que o mesmo apresente formas de fosfatos insolúveis em maior quantidade devido à reação química com íons do solo, assim, a presença de bactérias pode solubilizar ambos os fosfatos inorgânicos. Algumas espécies bacterianas têm potencial de mineralização e solubilização de fosfatos orgânicos e inorgânicos, respectivamente (Hilda e Fraga, 2000; Khiari e Parent, 2005; Behera *et al*, 2014).

Tabela 1 – Porcentagem de estabilidade da capacidade de solubilização após repicagem de cada meio de rasteio.

Estabilidade da capacidade solubilizadora						
	T1 - Sem adubação		T2 - Adubação mineral		T3 - Adubação 300m ³ h ⁻¹ ARS	
 Meio Repicado % de Crescimento	Fitato	%	Fitato	%	Fitato	%
	Fitato	70	Fitato	58	Fitato	55
	P-Ca	42	P-Ca	49	P-Ca	36
	P-Al	41	P-Al	41	P-Al	29
 Meio Repicado % de Crescimento	P-Ca	%	P-Ca	%	P-Ca	%
	Fitato	60	Fitato	88	Fitato	70
	P-Ca	54	P-Ca	66	P-Ca	58
	P-Al	48	P-Al	72	P-Al	70
 Meio Repicado % de Crescimento	P-Al	%	P-Al	%	P-Al	%
	Fitato	92	Fitato	74	Fitato	59
	P-Ca	50	P-Ca	64	P-Ca	57
	P-Al	56	P-Al	63	P-Al	48

Verificou-se que o único atributo do solo com influência positiva no total de UFC foi o pH, com base na análise de correlação linear de Pearson (Tabela 2), mas com coeficiente de correlação baixo (0,39). A baixa relação sugere que os microrganismos encontrados fazem parte de grupos insensitivos e indiferentes, que podem tolerar e adaptar-se em uma ampla faixa de pH, analisado em comparação ao pH dos meios de rasteio (Fitato: 6,13, P-Ca: 6,32 e P-Al: 4,4). Segundo a Embrapa (2007), o pH do solo representa importante determinante para a atividade e distribuição dos microrganismos,

pois o pH de um solo ou de um microssítio é dependente de um grande número de fatores e processos microbiológicos e bioquímicos. Apesar disso, há certa tendência para o pH mais elevado corresponder a uma população bacteriana maior, sendo bem conhecida a baixa tolerância da generalidade das bactérias a solos ácidos.

Espera-se a correlação negativa entre o fósforo e o número de UFC porquanto as bactérias terão menor tendência a investir em vias metabólicas para solubilizar esse elemento quanto mais o tenham à sua disposição. Mikanová e Nováková (2002) mostraram que o efeito do nível exógeno de P no microambiente bacteriano afeta a solubilização de fosfatos por bactérias solubilizadoras. Na presença de fósforo solúvel, a solubilização de fósforo insolúvel por algumas bactérias solubilizadoras de fosfatos foi reprimida e algumas não foram afetadas. No entanto, há grande demanda de estudos sobre o número total dessas bactérias bem como sobre a capacidade de solubilização de fósforo das mesmas, a qual também é afetada pela presença de fósforo disponível na concentração no solo.

Tabela 2 – Correlação de Pearson entre o número de unidades formadoras de colônias e as variáveis físico-químicas do solo.

Variáveis do Solo	UFC total Pearson
pH	0,39*
MO	-0,26
P	-0,51*
S	-0,37
H+Al	-0,31
Ca	0,24
Mg	0,35
K	-0,46*
Na	-0,23
Mn	-0,24
Cu	-0,37
Fe	0,12
Zn	-0,42*

NH ₄	-0,10
NO ₃ +NO ₂	-0,36
N _{inorg}	-0,35
N _{org}	-0,25

*Significância 5%.

A maior parte dos elementos não apresentou correlação com o número de UFC. Fazem exceção o K e o Zn com valores negativos. A correlação entre os elementos e a UFC pode ser fruto do acaso, pois os mesmos apresentam maior quantidade no solo com adubação com água residuária seguindo do solo com adubação mineral (Tabela 4). Segundo Silva Filho e Vidor (2001), a capacidade e o potencial de solubilização dos microrganismos variam com os fatores nutricionais do meio. Elevados teores de K, por exemplo, aumentam o tamanho das colônias dos isolados, porém, alguns desses tendem a diminuir a capacidade de solubilização.

Tabela 4 – Média dos elementos P, K e Zn no solo de cada tratamento.

Tratamentos	Média dos elementos no solo		
	P (mg/dm ³)	K(mmol/dm ³)	Zn(mg/dm ³)
T1	3,33	1,10	4,50
T2	9,67	1,63	3,10
T3	20,00	3,30	43,47

O zinco é um metal utilizado em larga escala nas rações para suinocultura com objetivo de prevenir doenças, melhorar a digestão e promover o crescimento animal (Marcato e Lima, 2005), portanto caracteriza maior quantidade do elemento no tratamento T3. Logo, a correlação negativa do mesmo em relação ao número de UFC pode estar relacionada à maior ocorrência do elemento corroborando que, quando presente em altas concentrações, o zinco apresenta propriedades antibacterianas (Rutz e Lima, 2001).

Conclusão

A maior diversidade microbiológica de mineralizadores de fosfatos insolúveis no solo T1 (sem adubação) está relacionada com a adaptação dos microrganismos ao meio que apresenta baixa disponibilidade de fósforo. Isso faz com que os mesmos encontrem vias de mineralização para utilizar o fósforo presente, sobretudo na forma orgânica insolúvel.

Os resultados relacionados à maior porcentagem de crescimento em Fitato de Cálcio podem ser justificados pelo fato de as comunidades bacterianas apresentarem a capacidade de produzir fitases responsáveis pela mineralização do Fitato de Cálcio utilizado no experimento.

A estabilidade da função solubilizadora precisa ser testada para que as bactérias selecionadas mantenham tal capacidade após vários ciclos de repicagem, a qual seja maior em fitato de cálcio do que nos outros meios usados. Portanto, quanto mais fósforo existir no meio, menor será o número de bactérias com potencial de solubilização, como ocorreu no Tratamento 3, adubado com água residuária de suínocultura.

Agradecimentos

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Cascavel, em especial ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, pelo apoio e pela oportunidade de realização do curso. Ao Instituto Superior de Agronomia, à Universidade de Lisboa pelo suporte à pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado. Ao Doutor Silvio Cesar Sampaio, Bolsista Produtividade financiado pelo CNPq.

Referências Bibliográficas

Arcand, M. M.; Schneider, K. D. (2006) – Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Vol. 78. N. 4, p. 791–807.

Azziza, G.; Bajsaa, N.; Haghjoua, T.; Tauléa, C.; Valverdec, Á. (2012) - Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Applied Soil Ecology*. Vol. 61, p. 320– 326.

Barroso, C.B.; Nahas, E. (2005) - The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology*. Vol. 29, p. 73-83.

Behera, B.C.; Singdevsachan, S. K.; Mishra, R. R.; Dutta S. K.; Thatoi, H.N. (2014) - Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove – A Review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Vol. 3, p. 97–110.

Ceribeli, M. G. A.; Cabral, J. S. R.; Ceribeli, A. R. A.; José Neto, C. A. Souchie, E. L.; Silva, F. G. (2012) - Solubilização de fosfatos de alumínio e ferro por microrganismos rizosféricos de caju-de-árvore-do-cerrado. In: *I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Campus Rio Verde do IF Goiano*. Rio Verde – Goiás.

Chen, Y. P.; Rekha, A. B.; Arun, F. T.; Shen, W. A.; Young, C. C. (2006) - Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Taiwan. *Applied Soil Ecology*. Vol 34, p. 33-41.

Corderó, A. P.; Sierra, A. T.; Jiménez, D. A. (2014) – Actividad in vitro de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agronomía mesoamericana*. Vol. 25, p. 213-223.

Costa, M. D.; Lovato, P. E. (2004) - Fosfatases na dinâmica do fósforo do solo sob culturas de cobertura com espécies micorrízicas e não micorrízicas. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília. Vol. 39, n.6, p.603-605.

Duponnois, R.; Colombet, A.; Hienb, V.; Thioulouse, J. (2005) - The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 37, p. 1469-1468.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2003). *Microorganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica*. Documento 85. Embrapa Cerrados. Planaltina – DF. 1 ed. 26 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2006) - *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 2.ed. Rio de Janeiro. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Embrapa. 374 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2007) - *Ecologia microbiana do solo*. Leite, L. F. C.; Araújo, A. S. F. Teresina. PI. Embrapa Meio-Norte. 24 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2008) - *Microorganismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera de genótipos de milho em plantio direto e convencional*. Documento 04. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas - MG. 1 ed. 29 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. (2009) - *Manual de Análises químicas de solo, plantas e fertilizantes*. 2º ed. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológica, 627p.

Gyaneshwar, P.; Kumar, G. N.; Parekh, L. J.; Poole, P. S. (2002) - Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. Vol. 245. p 83-93.

Hilda, R.; Fraga, R. (2000) – Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. Vol. 17, p. 319–359.

Hao, X.; Cho, C. M.; Racz, G. J.; Chang, C. (2002) - Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. Vol. 64. P. 213-224.

Kessler, N. C. H., Sampaio, S. C., Sorace, M., Lucas, S. D., & Palma, D. (2014). Swine wastewater associated with mineral fertilization on corn crop (*Zea mays*). *Engenharia Agrícola*, Vol. 34 (3), p. 554-566.

Khan, A. A.; Jilani, G.; Akhtar, M. S.; Naqvi, S. M. S.; Rasheed, M. (2009) - Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of agricultural and biological sciences*. Vol. 1, p. 48-58.

Khiari, L.; Parent, L. E. (2005) – Phosphorus transformations in acid light-textured soils treated with dry wine manure. *Canadian Journal of Soil Science*. Vol. 85, p. 75–87.

Kim, K. Y.; Jordan, D.; McDonald, G. A. (1997) - Solubilization of hydroxyl apatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 24, p. 347–352.

Lederberg, J.; Lederberg, E. M. (1952) – Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*. Vol. 63, p. 399–406.

Lima, J. V. L.; Pinheiro, M. de S.; Fiúza, L. M. C. G.; Martins, S. C. S.; Martins, C. M. (2014) - Populações microbianas cultiváveis do solo e de serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. *Enciclopédia Biosfera*. Centro Científico Conhecer – Goiânia. GO. v. 10, n.18; p. 2300 – 2316.

Lemos, S. G.; Menezes, E. A.; Chaves, F. S.; Nogueira, A. R. A.; Torre-Neto, A.; Parra, A.; Alonso, J. (2009) - In Situ Soil Phosphorus Monitoring Probe Compared with Conventional Extraction Procedures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. v. 40, p. 1282-1294.

Marcato, S. M.; Lima, G. J. M. M. (2005) - Efeito da restrição alimentar como redutor do poder poluente dos dejetos suínos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.34, n.3, p.855-63.

Mikanová, O.; Nováková, J. (2002) - Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná Výroba*. Vol. 48, p. 397–400.

Milko, A. J.; Hernández, M. T.; Rengel, Z.; Marschner, P.; Moura, M. de La L. (2008) - Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 44, p. 1025–1034.

Nahas, E. (2002) - Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*. Campinas. Vol. 61, n. 3, p. 267-275.

Nisha, K.; Padma Devi, S. N.; Vasandha, S.; Sunitha Kumari, K. (2014) – Role of phosphorous solubilizing microorganisms to eradicate P – deficiency in plants: A review. *International Journal of scientific and Research Publications*. Vol. 4, Issue 7. P. 3.

Oliveira-Longatti, S. M. de; Marra, L. M.; Soares, B. L.; Bomfeti, C. A.; Silva, K. da; Ferreira, P. A. A.; Moreira, F. M. de S. (2014) - Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World Journal Microbiology Biotechnology*. Vol. 30, p. 1239–1250.

Park, J. H.; Bolan, N.; Mallavarapu, M.; Ravi, N. (2011) - Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of Hazardous Materials*. Vol 185, p. 829-836.

Ribeiro, V. P.; Abreu, C. S. de.; Takahashi, J. A.; Teixeira, J. A.; Oliveria, C. A.; Marriel, I. E. (2013) - Isolamento e seleção de bactérias mineralizadoras de fósforo em região de mineração no município de Vertentes – MG. *In: XXXIV Congresso brasileiro de ciência do solo*. Florianópolis – SC.

Rocha, D. J.A.; Cardoso, G.; Meneses, P.; Wille, C. N.; Coila, V. H.C.; Moura, A. B. (2011) - Caracterização bioquímica de bactérias isoladas de vermicomposto de esterco bovino: produção de fosfatases amilases e lipases. *In: XIII ENPOS – Encontro de Pós Graduação Universidade Federal de Pelotas*. Pelotas, RG.

Rutz, F.; Lima, G. J. M. M. (2001) - O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. *In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*. Concórdia – Santa Catarina. Vol. 10.

Silva, A. C. S. da; Chagas Junior, A. F.; Oliveira, L. A.; Chagas, L. F. B. (2011) - Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 2, N. 1, pp. 37-42.

Silva Filho, G. N., Vidor, C. (2001) - Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Vol. 36, n 12, p. 1495-1508.

Souza, J. B. de.; Pinheiro, M. S. de.; Silva, L. L. da.; Martins, S. C. S.; Martins, C. M. (2013) – Capacidade de solubilização de fosfatos por isolados de rizóbio provenientes do Ceará e do Rio Grande do Norte. *In: III CONAC Congresso Nacional de Feijão Caupi*. Recife – PE.

Tsai, S. M.; Rossetto, R. (1992) - *Transformações microbianas do fósforo*. In: Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Campinas. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, p. 231-142.

Zhu, F.; Qu, L.; Hong, X.; Sun, X. (2011) - Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the Coast of Yellow Sea oh China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol 2011, 6 p.

Isolamento e caracterização de rizobactérias solubilizadoras de fosfatos de solo subtropical com capacidade de promoção de crescimento vegetal

Microbiology Ecology (FEMS)

1 Introdução

Há décadas a utilização de fertilizantes químicos na agricultura constitui-se como a principal fonte de nutrientes essenciais para o desenvolvimento das culturas visando ao aumento da produtividade, cujos elementos principais são nitrogênio (N), fósforo (P) e o potássio (K).

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para plantas, e é aplicado ao solo sob a forma de mineral fosfatado (Zhu *et al*, 2011). As concentrações e dinâmica de P são caracterizadas por processos físicos de sorção-dessorção e biológicos pela imobilização-mineralização (Khan *et al*, 2009).

O fósforo é 'sequestrado' por adsorção nas camadas superficiais dos colóides do solo e precipita a partir da reação com cátions do solo, particularmente de ferro, alumínio e cálcio (Harris *et al*, 2006). Por conseguinte, uma grande quantidade de fertilizante P é usada na produção agrícola para aumentar o crescimento das plantas, portanto, o qual pode causar impacto negativo em relação tanto ao ambiente como para economia agrícola (Park *et al*, 2011).

O solo é um ecossistema complexo e dinâmico, com a presença de diferentes populações de microrganismos responsáveis por uma gama de transformações bioquímicas, que podem sofrer alterações quando o ecossistema sofre algum tipo de interferência (Rodrigues e Fraga, 1999; Castro *et al*, 1993).

A atividade dos microrganismos afeta diretamente os atributos químicos e físicos do solo, bem como a meso e macrofauna, além de contribuir ativamente para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Pereira *et al*, 2007).

O fósforo é sujeito a inúmeros processos que alteram a própria disponibilidade. Dentre esses processos, destaca-se a dissolução de fosfatos por microrganismos que o torna disponível para as plantas (Rocha *et al*, 2011). Porém, tem sido frequentemente notado que a distribuição e a atividade de bactérias solubilizadoras de fosfatos estão diretamente ligadas ao efeito de solubilização de fósforo, as quais são reguladas pelos níveis exógenos desse elemento (Rodrigues e Fraga, 1999).

Tanto fungos como bactérias possuem a capacidade de realizar processos de dissolução a partir de diferentes mecanismos, principalmente pela produção de ácidos orgânicos e podem ser usados como agentes inoculantes. Além dos mecanismos para a solubilização de fosfatos, algumas bactérias ainda contribuem para promoção de crescimento das plantas pela fixação de nitrogênio, capacidade de produzir ácido indol acético (AIA), manter o pH do microambiente (rizosfera) e controle de patógenos.

A capacidade de solubilização do fósforo pelos microrganismos é considerada uma das mais importantes características associadas à nutrição da planta. Dado os impactos ambientais negativos da fertilização e custos crescentes, o uso de BPCV (bactérias promotoras do crescimento vegetal) torna-se uma prática agrícola sustentável e vantajosa (Chen *et al*, 2006).

Deste modo, a atividade de microrganismos rizosféricos tem efeito positivo e traz vantagens tanto para o crescimento vegetal como para a microbiota (Silva *et al*, 2011) com a produção de ácidos orgânicos, vitaminas e hormônios (Souchie *et al*, 2007) bem como a dissolução de fosfatos de alumínio e ferro, onde são predominantes em solos ácidos, como Latossolo Eutroférico.

Considerando as poucas informações sobre a microbiota solubilizadora na região Oeste do Paraná, o presente estudo teve como objetivos o isolamento e a triagem de bactérias com o potencial de solubilização de Latossolo Vermelho Eutroférico com características distintas de fertilização, para fins agrícolas. O estudo

visou estabelecer uma relação genética entre a capacidade solubilizadora, atividade fosfatase e a produção de ácido indol acético.

2 Elaboração da Pesquisa

2.1 Solo

Utilizaram-se amostras de solo e rizosfera de um solo caracterizado inicialmente como Latossolo Vermelho Distroférico típico (Embrapa, 2006) de uma área experimental que possui histórico de aplicação de água residuária da suinocultura, com experimentos conduzidos desde 2006, seguindo sequência dos ciclos do milho, soja, aveia e minimilho. As parcelas utilizadas foram denominadas: T1 – Sem fertilização; T2 – Adubação mineral, conforme as necessidades da cultura; T3 – Fertilização com 300 m³/ha de água residuária de suinocultura. A planta-isca utilizada foi o milho (variedade CD 316 - híbrido superprecoce - safrinha).

2.2 Isolamento de rizobactérias fosfolubilizadoras

Foi suspenso 1 g de fragmentos de raízes com solo agregado em 25 mL de solução salina estéril (8,5 g L⁻¹ NaCl) (Milko *et al*, 2008) e agitado durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram diluídas sucessivamente até 10⁻¹⁰. Usou-se triplicata para cada diluição e as mesmas foram transferidas em alíquotas de 100 µL para placas de Petri estéreis, com meio rico (PDA Acumedia®) e para meios de rasteiro contendo como única fonte de fósforo as formas insolúveis: fosfato de cálcio, fosfato de alumínio, fosfato de ferro e fitato de cálcio. As placas permaneceram em estufa durante quatro dias a 30 °C.

Os meios de rasteio foram elaborados conforme as necessidades mínimas para o desenvolvimento microbiano adaptado de Milko *et al* (2008). Os isolados dos meios mínimos foram transferidos para os meios de rasteio novamente e depois se repetiu a repicagem por mais duas vezes, com o objetivo de confirmar o crescimento das colônias e a capacidade de solubilização.

2.3 Atividade Fosfatase Ácida

A metodologia descrita por Romeiro (2007) utilizou como substrato *p*NPP (paranitrofenilfosfato), o qual, na presença de fosfatase, sofre hidrólise e libera fosfato e parnitrofenol. O parnitrofenol é um composto incolor que se torna amarelo em meio básico. A atividade fosfatase foi quantificada por espectrofotometria (410 nm) utilizando sistema de leitura ELISA.

2.4 Produção de AIA (ácido indol acético)

A produção de AIA foi testada por meio do método colorimétrico proposto por Sarwar e Kremer (1995). Para tal, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura DYG's (Rodrigues Neto *et al*, 1986) com adição de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano. Em seguida, os tubos foram incubados por 72 horas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 150 rpm. A densidade óptica foi ajustada e as leituras feitas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 590 nm. O passo seguinte foi submeter 1mL de amostra à centrifugação por 5 min a 10^4 rpm. Sobre as amostras foram adicionados 100 μL do reagente de Salkowski para observar a reação por colorimetria e absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

2.5 Caracterização e Identificação dos microrganismos

A identificação de bactérias selecionadas foi realizada por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA das bactérias foi extraído com kit comercial e de acordo com protocolo para PCR e amplificação de 16S gene rDNA foram utilizados os iniciadores universais: FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e rp2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') (Weisburg *et al*, 1991). Para o sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial e enviados para a empresa "Macrogen" em Seul, Coréia do Sul, onde foram realizados os sequenciamentos com a plataforma 3730xl (*Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no GenBank®, banco de dados de sequências de DNA do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

2.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Anderson-Darling (AD) e de homogeneidade de variância de Levene (L). As variáveis, respostas à atividade de fosfatase, e a produção de AIA apresentaram normalidade e homogeneidade de variância com p-Valores AD= 0,165, L= 0,161; AD= 0,253, L=0,436, respectivamente.

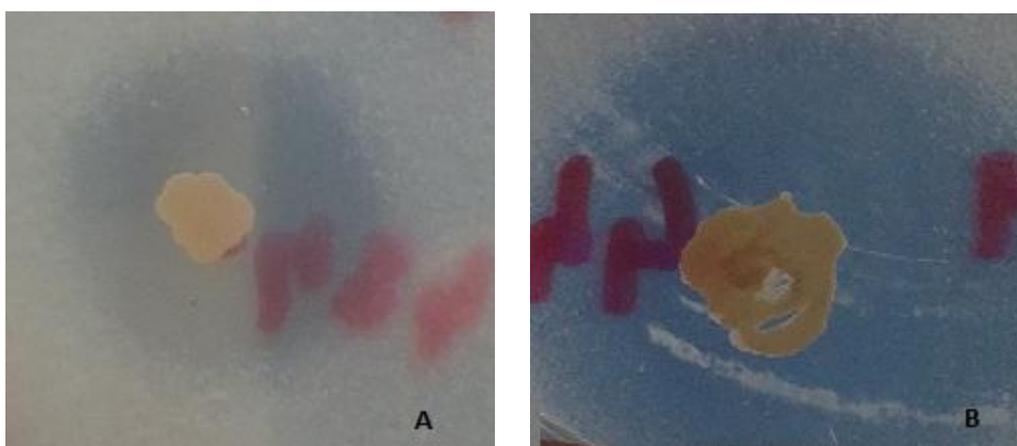
A atividade de fosfatase em função das bactérias foi analisada com delineamento inteiramente casualizado para cada tipo de Tratamento, separadamente, (T1, T2 e T3) com três repetições em cada. Em seguida, as médias da atividade da fosfatase foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância. A diferença na atividade de fosfatase em função do tipo de Tratamento foi analisada com delineamento inteiramente casualizado não balanceado e três repetições. As médias

da atividade da fosfatase também foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

A produção de AIA foi analisada por meio do delineamento fatorial, com dois fatores (bactéria e presença ou ausência de Triptofano) em cada tipo de solo separadamente (T1: 8¹x2¹; T2: 9¹x2¹ e T3: 12¹x2¹), todos com três repetições. Em seguida, as médias da produção de AIA foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

3 Resultados e Discussão

Foi isolado um total de 938 UFC provenientes das diluições feitas em todos os meios de cultura dos três tratamentos. Dessas, foram selecionadas aquelas que apresentaram crescimento maior que 4 mm ou presença de halo, e submetidas a nova repicagem. Foram selecionadas apenas aquelas que apresentaram crescimento significativo ou halo solubilizador, e foram novamente repicadas para confirmação de estabilidade da capacidade solubilizadora para posteriormente serem identificadas (Figuras 1 A e 1 B).



Figuras 1 (A e B) UFC isolada com presença de halo indicando solubilização de fosfato.

A similaridade entre os 29 isolados foi analisada em dendrograma conforme as características morfológicas: tamanho da colônia, cor, forma da borda, formato da colônia, transparência, muco e heterogeneidade (Figura 2). A análise elucida o polimorfismo entre os isolados em relação às atividades solubilizadoras.

O coeficiente de similaridade calculado pelo software PAST demonstra que há um grande grupo com 23 isolados que apresenta 40% de semelhança em suas características. Dentro do mesmo grupo é possível observar que a bactéria identificada como do gênero *Herbaspirillum* mantém características morfológicas distintas. O segundo grupo apresenta similaridade de aproximadamente 70% e divide-se em dois sub-grupos com isolados provenientes de tratamentos diferentes. Muitos dos isolados apresentaram características visuais semelhantes à sideróforos.

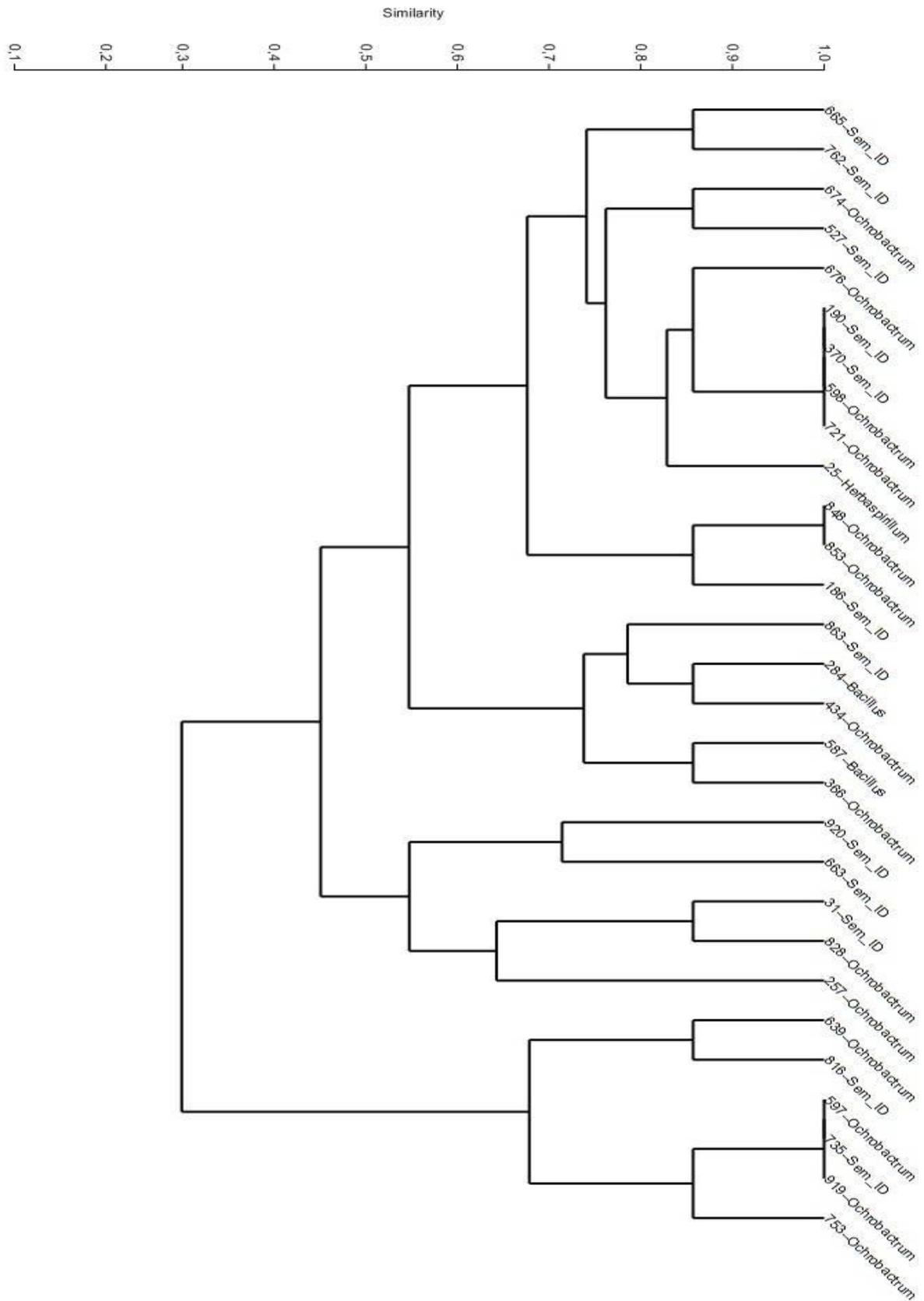


Figura 2 Árvore filogenética para análise de similaridade entre os 29 isolados, baseada na morfologia e no sequenciamento do gene 16S rRNA.

As análises genéticas pelo sequenciamento do 16S rRNA dos 29 isolados (Tabela 1) revelaram elevada similaridade de bactérias pertencentes ao gênero *Ochrobactrum*. Outras duas estirpes foram classificadas no gênero *Bacillus* e uma como *Herbaspirillum*.

Bactérias do gênero *Ochrobactrum* são genética e fenotipicamente diversificadas, membros de vários habitat, incluindo solo, plantas e rizosferas, animais e humanos (Bathe *et al*, 2005). São classificadas como parentes próximos das bactérias do gênero *Brucellae* e pertencem à família das *Brucellaceae* (Velasco *et al*, 1998). Chakraborty *et al*, (2009) realizaram testes associados à promoção do crescimento de plantas com cepas de *Ochrobactrum anthropi* que mostraram bom desempenho na atividade de solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de ácido indol acético. Podem ser endofíticas ou de vida livre (Meng *et al*, 2014) e colaborar com a absorção de nutrientes do solo para a prevenção de doenças nas plantas (Chakraborty *et al*, 2009).

O gênero *Bacillus* faz parte da família *Bacillaceae*, um grupo heterogêneo altamente diversificado, de vida livre ou endofíticos, capazes de produzir diversos ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fosfatos (Illmer *et al*, 1992; Chen *et al*, 2006). Pesquisas realizadas por Ögüt *et al* (2011) demonstram que a liberação de ácidos orgânicos extras produzidos por bactérias do gênero *Bacillus sp.* foi acompanhada pela alta produção de prótons pelas raízes das plantas, que contribuíram para a maior mobilização e absorção de P por plantas de trigo e que beneficiaram a nutrição a partir de modificações na captação e equilíbrio de nutrientes.

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são diazotróficas, endofíticas com capacidade de fixação de nitrogênio (Baldani *et al*, 1986) e, em geral, estão associadas às raízes de milho, sorgo e arroz (Rodriguez *et al*, 2006). Um estudo realizado por Estrada *et al* (2013) comprovou que além de apresentarem capacidade de fixar nitrogênio, estirpes de *Herbaspirillum* solubilizam fósforo inorgânico *in vitro* e quando

utilizadas como inóculo em biofertilizantes promovem aumento na produção de plantas de arroz cultivadas em presença de fosfato de cálcio.

A amplificação do gene para identificação dos demais selecionados não foi suficiente, sendo determinados apenas os gêneros de 17 dos isolados. Mesmo sem a identificação de todos os selecionados, é possível observar maior biodiversidade no tratamento T1. Os diferentes manejos do solo e das culturas afetam o equilíbrio existente entre o solo e os organismos que nele habitam, supondo-se que, em solos com maior biodiversidade, há possibilidade de que se encontrem classes de microrganismos distintos que atuem em processos importantes para manutenção da microbiota sob condições de estresse ambiental (Pereira *et al*, 2007).

Tabela 1 Caracterização genética das bactérias solubiladoras de fosfatos por nível de gênero.

Isolado T1	Fragmento (pb)	Similaridade (%)	Número de acesso	Gênero^a
25	631	99	KF555240.1	<i>Herbaspirillum</i>
31	***	***	***	<i>Sem ID*</i>
257	571	100	KM396913.1	<i>Ochrobactrum</i>
284	694	99	CP009941.1	<i>Bacillus</i>
639	593	99	KF987808.1	<i>Ochrobactrum</i>
663	***	***	***	<i>Sem ID</i>
665	***	***	***	<i>Sem ID</i>
762	***	***	***	<i>Sem ID</i>
Isolado T2	Fragmento (pb)	Similaridade (%)	Número de acesso	Gênero^a
366	610	99	AY623625.1	<i>Ochrobactrum</i>
527	***	***	***	<i>Sem ID</i>
674	607	94	AY972228.1	<i>Ochrobactrum</i>
676	600	100	LN615116.1	<i>Ochrobactrum</i>
816	***	***	***	<i>Sem ID</i>
828	590	99	KF987808.1	<i>Ochrobactrum</i>
848	617	99	LN615099.1	<i>Ochrobactrum</i>
853	725	99	JX855310.1	<i>Ochrobactrum</i>
863	***	***	***	<i>Sem ID</i>
Isolado T3	Fragmento (pb)	Similaridade (%)	Número de acesso	Gênero^a
186	***	***	***	<i>Sem ID</i>
190	***	***	***	<i>Sem ID</i>
370	***	***	***	<i>Sem ID</i>

434	537	100	CP008820.1	<i>Ochrobactrum</i>
587	581	98	JF772059.1	<i>Bacillus</i>
598	625	100	KJ754138.1	<i>Ochrobactrum</i>
597	619	100	AY972224.1	<i>Ochrobactrum</i>
721	538	99	KF987808.1	<i>Ochrobactrum</i>
735	***	***	***	Sem ID
753	502	100	KF987808.1	<i>Ochrobactrum</i>
919	614	99	KM396913.1	<i>Ochrobactrum</i>
920	***	***	***	Sem ID

^aBaseado no sequenciamento parcial do 16S rDNA gene e comparado ao *National Center for Biotechnology Information Database*. *Sem ID – Não identificada.

A atividade da fosfatase ácida que foi sintetizada pelos isolados varia de 0,0342 mM até 0,2627 mM, medida pela produção de p-nitrofenol (Tabela 2). Pela comparação de médias, é possível afirmar que as estirpes selecionadas do tratamento T1 não apresentaram diferença significativa na produção de fosfatase, porém, a cepa identificada como gênero *Herbaspirillum* se destaca com a produção de 0,0631 mM. Já no tratamento T2 ocorreu grande produção (0,2627 mM) pelo isolado 816 (não identificado), seguido do isolado 674 (0,1237 mM) pertencente ao gênero *Ochrobactrum*. No tratamento T3, apenas um dos isolados, o número 735 (não identificado), apresentou diferença estatística significativa dos demais (2,033 mM). Ao serem comparados os dados de todos os tratamentos, já que pertencem ao mesmo tipo de solo, foi possível afirmar que o tratamento T2 mantém dois isolados com maior produção de atividade fosfatase. Mesmo não apresentando valores significativos, os demais isolados produziram quantidades maiores quando comparados aos descritos por Park *et al* (2011), cujas bactérias isoladas de diferentes solos, incluindo um contaminado por chumbo (Pb), produziram entre 0,0034 mM e 0,1420 mM medido pela produção de p-nitrofenol.

Os resultados acima sugerem que os isolados de todos os tratamentos podem mineralizar não apenas o fitato de cálcio, mas também uma série de outros fosfatos orgânicos pela quantidade de fosfatase ácida produzida. Segundo Silva Filho e Vidor

(2001), diferenças na capacidade e no potencial de solubilização indicam alterações quantitativas ou qualitativas nos metabólitos produzidos, as quais sugerem a ocorrência de diferentes mecanismos de solubilização ou de processos com eficiência variável.

Tabela 2 Comparação de médias para atividade fosfatase ácida.

Tratamentos	Cepas Bactérias	Atividade Fosfatase (p-nitrophenol (mM))
T1	25– <i>Herbaspirillum</i>	0,0631 Ad*
	31–Sem Identificação	0,0595 Ad
	257– <i>Ochrobactrum</i>	0,0409 Ad
	284– <i>Bacillus</i>	0,0393 Ad
	639– <i>Ochrobactrum</i>	0,0410 Ad
	663–Sem Identificação	0,0414 Ad
	665–Sem Identificação	0,0595 Ad
	762–Sem Identificação	0,0450 Ad
T2	366– <i>Ochrobactrum</i>	0,0472 Cd
	527–Sem Identificação	0,0631 Cd
	674– <i>Ochrobactrum</i>	0,1237 Bc*
	676– <i>Ochrobactrum</i>	0,0515 Cd
	816–Sem Identificação	0,2627 Aa*
	828– <i>Ochrobactrum</i>	0,0428 Cd
	848– <i>Ochrobactrum</i>	0,0463 Cd
	853– <i>Ochrobactrum</i>	0,0469 Cd
863–Sem Identificação	0,0444 Cd	
T3	186–Sem Identificação	0,0344 Bd
	190–Sem Identificação	0,0471 Bd
	370–Sem Identificação	0,0429 Bd
	434– <i>Ochrobactrum</i>	0,0429 Bd
	587– <i>Bacillus</i>	0,0458 Bd
	597– <i>Ochrobactrum</i>	0,0426 Bd
	598– <i>Ochrobactrum</i>	0,0412 Bd
	721– <i>Ochrobactrum</i>	0,0399 Bd
	735–Sem Identificação	0,2033 Ab*
	753– <i>Ochrobactrum</i>	0,0385 Bd
	919– <i>Ochrobactrum</i>	0,0409 Bd
	920–Sem Identificação	0,0342 Bd

A produção de fosfatase pelo Teste Tukey (5% de significância). Letras Maiúsculas comparação no Tratamento. Letras minúsculas comparação entre todos os Tratamentos.

Os compostos que permitem a promoção de crescimento vegetal podem ser sintetizados por bactérias promotoras de crescimento (BPC) que fornecem compostos que afetam o metabolismo da planta ou facilitam a aquisição de nutrientes não disponíveis a partir do solo. As BPC possuem um dos mais importantes mecanismos de promoção de crescimento vegetal, pois promovem a síntese de compostos reguladores (auxinas) como o ácido indol acético (Boiero *et al*, 2007).

A produção de AIA entre os isolados no tratamento T1 variou de 7,35 µg/L a 110,69 µg/L na ausência de L-triptofano e 16,54 µg/L a 60,51 na presença do precursor. O isolado 639 identificado como gênero *Ochrobactrum* obteve produção de AIA maior em meio não suplementado com L-triptofano, cujo resultado foi a produção 40% maior, o qual confrontou o meio com L-triptofano. A comparação de médias ainda apresenta diferença estatística na produção de AIA para o isolado 762 (não identificado) em que foi maior na presença de L-triptofano (93,90 µg/L). O gênero *Bacillus* obteve produção muito baixa comparada aos demais isolados.

Tabela 3 Produção de Ácido Indol Acético por bactérias selecionadas no Tratamento 1

Isolados Tratamento 1	Produção AIA (µg/L) ^a	
	Ausência	L-triptofano
25– <i>Herbaspirillum</i>	16,54 Abc	43,94 Aab
31–Sem Identificação	15,34 Abc	43,81 Aab
257– <i>Ochrobactrum</i>	34,13 Abc	58,53 Aab
284– <i>Bacillus</i>	7,35 Ac	16,54 Ab
639– <i>Ochrobactrum</i>	110,69 Aa*	60,51 Bab*
663–Sem Identificação	33,21 Abc	68,28 Aab
665–Sem Identificação	69,08 Aab	58,59 Aab
762–Sem Identificação	43,25 Bbc*	93,90 Aa*

Letras maiúsculas diferença na linha (diferença da produção de IAA de cada bactéria em relação à presença e ausência de triptofano). Letra minúscula indica diferença na coluna (diferença da produção de IAA entre as bactérias que foram submetidas ao mesmo tratamento, ausência ou presença de triptofano) e Teste de média Tukey a 5%.

Pode se observar que no tratamento T2 ocorreu produção significativa de AIA pelo isolado 527 (não identificado) de 158,04 µg/L na ausência de L-triptofano, o qual se diferenciou significativamente de sua produção na presença do aminoácido (81,25 µg/L). A biossíntese de AIA em bactérias pode ser independente do L-triptofano e pode ser sintetizada a partir de precursores de vias metabólicas secundárias que, por sua vez, permite a produção do mesmo (Yamada e Castro, 2007). A fim de contrapor esse resultado, o isolado não identificado 816 produziu 113,69 µg/L na presença de L-triptofano e 35,85 µg/L na ausência do precursor. Outros isolados identificados no gênero *Ochrobactrum* apresentaram resultados distintos mesmo pertencendo ao mesmo gênero e isso pode justificar o fato de serem cepas de diferentes espécies.

Tabela 4 Produção de Ácido Indol Acético por bactérias selecionadas no Tratamento 2

Isolados Tratamento 2	Produção AIA (µg/L) ^a	
	Ausência	L-triptofano
366– <i>Ochrobactrum</i>	29,04 Ab	29,44 Ab
527–Sem Identificação	158,04 Aa*	81,25 Bab*
674– <i>Ochrobactrum</i>	83,17 Aab	44,94 Aab
676– <i>Ochrobactrum</i>	6,88 Ab	22,86 Ab
816–Sem Identificação	35,85 Bb*	113,69 Aa*
828– <i>Ochrobactrum</i>	18,98 Ab	19,23 Ab
848– <i>Ochrobactrum</i>	31,63 Ab	21,52 Ab
853– <i>Ochrobactrum</i>	39,40 Ab	43,15 Aab
863–Sem Identificação	39,27 Ab	66,96 Aab

Letras maiúsculas diferença na linha (diferença da produção de IAA de cada bactéria em relação à presença e ausência de L-triptofano). Letra minúscula indica diferença na coluna (diferença da produção de IAA entre as bactérias que foram submetidas ao mesmo tratamento, ausência ou presença de L-triptofano). Teste de média Tukey a 5%.

No tratamento T3, houve expressiva produção de AIA na presença de L-triptofano pelos isolados 735 (não identificado) e 920 (não identificado) de 234,18 µg/L

e 261,30 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Nesse tratamento, o isolado classificado no gênero *Bacillus* (587) produziu quantidade significativa de AIA tanto na ausência (117,49 $\mu\text{g/L}$) quanto na presença de L-triptofano (95,47 $\mu\text{g/L}$), diferente do isolado do mesmo gênero do tratamento T1. Os outros dois isolados que apresentaram diferença estatística são do gênero *Ochrobactrum* com valores de produção de AIA na presença de L- triptofano de 183,35 $\mu\text{g/L}$ para o isolado 597 e 199,98 $\mu\text{g/L}$ para o isolado 753. Meng *et al* (2014) desenvolveram experimento para produção de AIA com cepa da espécie *Ochrobactrum anthropi* Mn1, isolada a partir de raízes de alcachofra, a qual produziu 55,49 $\mu\text{g/L}$ da auxina, valor baixo quando comparado aos resultados obtidos pelas cepas do mesmo gênero no presente experimento. Chakraborty *et al* (2009) avaliaram a cepa de *Ochrobactrum anthropi* TRS- 2, isolada a partir da rizosfera de chá e confirmaram a produção de AIA, porém não quantificaram-na.

Tabela 4 Produção de Ácido Indol Acético por bactérias selecionadas no Tratamento 3

Isolados Tratamento 3	Produção AIA ($\mu\text{g/L}$) ^a	
	Ausência	L-triptofano
186–Sem Identificação	41,75 Bbcd	80,63 Acde
190–Sem Identificação	39,37 Bbcd	100,12 Ac
370–Sem Identificação	31,84 Acd	42,98 Ade
434– <i>Ochrobactrum</i>	21,29 Acd	29,86 Ae
587– <i>Bacillus</i>	117,49 Aa*	95,47 Acd
597– <i>Ochrobactrum</i>	93,81 Bab	183,35 Ab*
598– <i>Ochrobactrum</i>	20,63 Adc	25,24 Ae
721– <i>Ochrobactrum</i>	74,65 Aabc	42,69 Ade
735–Sem Identificação	2,82 Bd	234,18 Aab*
753– <i>Ochrobactrum</i>	103,21 Ba	199,98 Ab*
919– <i>Ochrobactrum</i>	43,70 Abcd	61,59 Acde
920–Sem Identificação	89,91 Bab	261,30 Aa*

Letras maiúsculas diferença na linha (diferença da produção de IAA de cada bactéria em relação à presença e ausência de L-triptofano). Letra minúscula indica diferença na

coluna (diferença da produção de IAA entre as bactérias que foram submetidas ao mesmo tratamento, ausência ou presença de L-triptofano). Teste de média Tukey 5%.

De acordo com a conjugação dos resultados dos diferentes tratamentos, o tratamento T3 apresentou uma variabilidade de isolados com capacidade de produção maior de AIA do que os demais. O desempenho dos processos biológicos que contribuem para o crescimento de plantas pode estar ligado à adaptação de comunidades bacterianas diazotróficas e vários fatores abióticos em conjunto com as condições de manejo e a dinâmica do solo (Oliveira-Longatti *et al*, 2014).

As vias metabólicas utilizadas pelos microrganismos são extremamente complexas e funcionais. Diversas espécies bacterianas vêm sendo estudadas e analisadas relacionando o papel dessas na produção de auxinas e a interação direta com plantas. Resultados segundo Spaepen *et al* (2007) demonstram uma gama muito diversificada de microrganismos que utilizam caminhos bioquímicos de síntese de AIA distintas e sugere que tais interações estão diretamente ligadas entre plantas e bactérias produtoras de AIA. Vale ressaltar que a variação da produção daquelas afeta as plantas de diferentes formas, incluindo: patogênese, inibição do crescimento, ou fitoestimulação.

4 Conclusão

Os estudos desenvolvidos neste projeto indicam que a microbiota do solo mantém uma similaridade onde prevalece o gênero *Ochrobactrum* e que, em diferentes situações de manejo, pouco varia sua diversidade, mas apresenta capacidade de produzir metabólitos promotores de crescimento de plantas.

O tratamento T1 apresentou uma variabilidade de gênero maior que os demais tratamentos. Porém, os isolados do tratamento T2 mantiveram uma produção de fosfatase ácida mais acentuada. A produção de AIA sem a adição de L-triptofano no

tratamento T1 sugere que a microbiota utiliza vias metabólicas distintas para tal, visto que o solo é pobre em minerais. Isso afeta a produção de promotores de crescimento de plantas, contrapõe-se ao tratamento T3 que recebeu adubação com água residuária de suinocultura e diversificou na produção de AIA por seus isolados com valores mais robustos.

5 Agradecimentos

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Cascavel, em especial ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, pelo apoio e pela oportunidade de realização do curso. Ao Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa pelo suporte à pesquisa. À EMBRAPA Semiárido pela disponibilização de laboratórios e realização de metodologias. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado. Ao Doutor Silvio Cesar Sampaio, Bolsista Produtividade financiado pelo CNPq.

6 Referências Bibliográficas

Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D.; Seldin, L.; Dobereiner, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol **36**, p. 86-93, 1986.

Bathe, S.; Achouak, W.; Hartmann, A.; Heulin, T.; Schloters, M. Lebuhn, M. Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum spp.* *FEMS - Microbiology Ecology*. Vol **56**, p. 272–280, 2006.

Boeiro, L.; Perrig, D.; Masciarelli, O.; Penna, C.; Cassán, F.; Luna, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol. **74**, p. 874–880, 2007.

Castro, O. M.; Prado, H.; Severo, A. C. R.; Cardoso, E. J. B. N. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Scientia Agricola*, Vol. **50**, p.212-219, 1993.

Chakraborty, U.; Chakraborty, B. N.; Basnet, M.; Chakraborty, A. P. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. **107**, p. 625–634, 2009.

Chen, Y.P.; Renkha, P.D.; Arun, A.B.; Shen, F.T.; Lai, W.-A.; Young, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, Vol. **34**, Issue 1, p. 33-41, 2006.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 2 ed. Rio de Janeiro. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Embrapa. 374 p. 2006.

Estrada, G. A.; Baldani, V. L. D.; Oliveira, D. M. de; Urquiaga, S.; Baldani, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*. Vol. **369**, p. 115–129, 2013.

Harris, J. N.; New, P. B.; Martin, P. M. Laboratory tests can predict benefic effects of phosphate-solubilizing bacteria on plants. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. **38**, p.1521 – 1526. 2006.

Illmer, P.; Schiner, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. **24**, N. 4, pp. 389-395, 1992.

Khan, A. A; Jilian, G; Akhtar, M. S; Naqvi, S. M, S; Rasheed, M. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of agricultural and biological sciences*. Vol. **1**, p. 48-58. 2009.

Meng, X.; Yan, D.; Long, X.; Wang, C.; Liu, Z.; Rengel, Z. Colonization by endophytic *Ochrobactrum anthropi* Mn1 promotes growth of Jerusalem artichoke. *Microbial Biotechnology*. Vol **7**, p. 601–610, 2014.

Milko, A. J.; Hernández, M. T.; Rengel, Z.; Marschner, P.; Moura, M. de La L. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. **44**, p. 1025–1034. 2008.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/.

Öğüt, M.; Er, F.; Neumann, G. Increased proton extrusion of wheat roots by inoculation with phosphorus solubilising microorganism. *Plant Soil*. Vol. **339**, p. 285–297. 2011.

Oliveira-Longatti, S. M. de; Marra, L. M.; Soares, B. L.; Bomfeti, C. A.; Silva, K. da; Ferreira, P. A. A.; Moreira, F. M. de S. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World Journal Microbiology Biotechnology*. Vol. **30**, p. 1239–1250. 2014.

Park, J. H.; Bolan, N.; Mallavarapu, M.; Ravi, N. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. **185**, p.829-833, 2011.

Pereira, A. A.; Hungria, M.; Franchini, J. C.; Kaschuk, G.; Chueire, L. M. de O.; Campo, R. J.; Torres, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. *Revista Brasileira Ciência do Solo*. Vol.**31**, n.6, pp. 1397-1412. 2007.

Rocha, D. J. A.; Cardoso, G.; Meneses, P.; Wille, C. N.; Coila, V. H.C.; Moura, A. B. Caracterização bioquímica de bactérias isoladas de vermicomposto de esterco bovino: produção de fosfatases amilases e lípases. *Anais... XIII ENPOS – Encontro de Pós Graduação Universidade Federal de Pelotas*. Pelotas, RG. 2011.

Rodríguez, H. and Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, Vol. **17**, no. 4–5, pp. 319–359, 1999.

Rodrigues, L. da S.; Baldani, V. L. D.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. Diversity of endophytic diazotrophic bacteria of the genus *Herbaspirillum* and *Burkholderia* in wetland rice. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília. Vol. **41**, n2, p. 275-284, 2006.

Rodrigues Neto, J.; Malavolta J. R., V. A.; Victor, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytologica*, Vol. **12**, p.16, 1986.

Romeiro, R. S. Controle biológico de doenças de planta: Procedimentos. Viçosa. Ed. UFV, 2007.

Sarwar, M.; Kremer, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplatemethod. *Letters in Applied Microbiology*, Vol.**20**, p.282-285, 1995.

Silva, A. C. S. da.; Chagas Junior, A. F.; Oliveria, L. A de.; Chagas, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfatos nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. **2**, N. 1, p. 37-42. 2011.

Silva Filho, G. N.; Vidor, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Vol. **36**, nº. 12. 2001.

Souchie, E. L.; Abboud, A. C. de S. Phosphate solubilization by microorganisms from the rhizosphere of Pigeonpea genotypes grown in different soil classes. *Semina: Ciências Agrárias*. Vol **28**, p. 11-18. 2007.

Spaepen, S.; Vanderleyden, J.; Remans, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. **31**, p. 425–448. 2007.

Velasco, J.; Romero, C.; López-Goni, I.; Jose, L.; Díaz, R. Moriyón. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* ssp. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. **48**, p. 759-768, 1998.

Yamada, T.; Castro, P. R. de C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *Informações Agronômicas*, Vol. **119**, p.1-32, 2007.

Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. 16S ribosomal amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, Vol. **173**, p. 697-703, 1991.

Zhu, F.; Qu, L.; Hong, X., Sun, X. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the Coast of Yellow Sea of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol **2011**, p. 1-6, 2011.