

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Cultura da soja.....	14
2.2 Controle Biológico de doenças de plantas	16
2.3 Rizobactérias promotoras de crescimento	18
2.4 <i>Bacillus</i> spp. como promotor de crescimento de plantas e controle biológico de fitopatógenos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Teste de Lipase.....	23
3.2 Teste de Quitinase	24
3.3 Teste de Solubilização de Fosfato.....	25
3.4 Teste de Pareamento com fungos patogênicos	26
3.5 Testes em Casa de Vegetação.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Produção de lipase	30
4.2 Produção de quitinase.....	30
4.3 Solubilização de fosfato	31
4.4 Pareamento com fungos fitopatogênicos	32
4.5 Casa de vegetação.....	34
5. CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS	41
7. ANEXOS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Com a modernização constante do seguimento agrícola mundial, através da introdução de novas tecnologias, manejo e aplicabilidade da produção, os produtores rurais têm buscado a inserção de novas técnicas que permita a viabilização da sua produção, visando a redução dos custos, sustentabilidade ambiental e um aumento na produtividade.

O Brasil tem sua economia voltada basicamente para o agronegócio, se destacando principalmente na pecuária extensiva e intensiva, as culturas de soja, algodão, milho e cana-de-açúcar, favorecidos pelos fatores edafoclimáticos e pela vasta extensão territorial, permitindo a produção de tais produtos.

A cultura da soja é, desde anos de 1970, responsável por grandes e inúmeras mudanças no cenário do agronegócio brasileiro (SANTOS e SILVEIRA, 2012). Cultivada em todo o país, essa cultura é utilizada tanto como alimento, quanto para uso alternativos, como por exemplo, na fabricação de ração animal, óleo, combustível, etc.

A soja é uma das plantas mais cultivadas na atualidade, sendo o Brasil um dos maiores produtores, com cerca de 96,2 milhões de toneladas produzidas na safra de 2014/15 (CONAB, 2015).

O cultivo da soja tem avançado em expansão territorial pelo Norte e Nordeste, devido a novas tecnologias envolvidas em seu cultivo. Atualmente as regiões com maior produção no Brasil são as regiões Sul (37,2%) e Centro Oeste (30,6%). No Sul a liderança é do Paraná e no Centro Oeste, Mato Grosso, de acordo com os dados do MAPA, 2012.

O modelo de produção agrícola atualmente utilizado no Brasil privilegia o uso intensivo de insumos industrializados, como fertilizantes e agrotóxicos. Esses insumos utilizados de forma incorreta, podem acarretar em vários problemas à saúde e ao meio ambiente. A utilização desses insumos além de elevar o custo da produção, negligenciam o potencial e as oportunidades oferecidas pela exploração dos componentes biológicos do solo em prol da produção com bases sustentáveis.

Na atualidade tem-se buscado alternativas para a redução do uso de insumos e agrotóxicos, visando o aumento na produtividade e a diminuição dos custos para o produtor. Uma alternativa bastante promissora é o uso de inoculantes, de baixo custo, como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs)

(COELHO et al., 2007). Essas rizobactérias são bactérias que habitam o solo e com frequência são isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas, que agem na promoção de crescimento nas plantas associadas. Os principais gêneros mais estudados são: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Azotobacter* (ZAADY et al., 1993; RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; ARAÚJO, 2008). Existem diversos efeitos desses microrganismos sobre o desenvolvimento de plantas, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plantas e crescimento de plantas (LAZARETTI e BETTIOL, 1997).

Existem vários estudos que comprovam a promoção de crescimento de plantas por rizobactérias em várias culturas como: soja (ARAUJO e HUNGRIA, 1999), trigo (LUZ, 1996), feijão (SILVEIRA et al., 1995), eucalipto (CAMPELLO, 1992), tomate (FREITAS e PIZZINATTO, 1991) e alface (GOMES et al., 2003). Em todos os casos citados, a promoção de crescimento está ligada a fatores como maior produção de grãos, maior germinação em casa de vegetação e no campo, na melhor absorção de nutrientes, no aumento do peso seco e na altura dos cultivares entre outros.

Levando em consideração todos esses fatores, pode-se afirmar que produtos à base de bactérias do gênero *Bacillus* spp., podem ser utilizadas de forma a aumentar a produtividade da soja, melhorando as condições de desenvolvimento da cultura no campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da soja

A soja (*Glycine max*) é originária da costa leste asiática, na região da china, sendo uma das culturas mais antigas, plantadas a pelo menos a cinco mil anos. Se espalhou por todo o mundo através de viajantes ingleses e por imigrantes japoneses e chineses.

A soja é uma cultura de grande importância econômica em todo o mundo. Tem uma ampla utilização dos seus grãos usados na produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal, indústria química e de alimentos, bem como o uso como fonte de biocombustível (FREITAS, 2004). Também é uma excelente fonte de proteínas, com teores consideráveis de vitaminas e sais minerais. Pelo seu poder nutricional, esta cultura desempenha um papel importante na reciclagem de nutrientes presentes no solo, em especial o nitrogênio.

O maior produtor de soja em destaque é os Estados Unidos da América (EUA), seguidos de Brasil, Argentina, Chile, Índia e Paraguai, respectivamente. A produção mundial de soja na safra de 2014/2015 atingiu a marca de 317,253 milhões de toneladas, sendo os EUA responsável por uma produção de 108,014 milhões de toneladas com cerca de 33,614 milhões de hectares plantados, representando, aproximadamente, 35% de toda a produção mundial (USDA, 2015).

No Brasil, a entrada da soja ocorreu no início do século XX, mas só se tornou de grande importância econômica em meados dos anos 70, em razão a diminuição da safra na Rússia e a pequena produção dos Estados Unidos incapaz de se abastecer toda a demanda mundial pelo produto. A partir daí a soja passou a ter grande importância para o agronegócio, ocorrendo um aumento nas áreas cultivadas e, principalmente, pela utilização de novas tecnologias na produção da soja (EMBRAPA, 2005).

Com o crescimento da produção de soja de quase 260 vezes no decorrer de apenas quatro décadas no Brasil, ocorreu uma cadeia mudanças na história do país. Com esse crescimento ocorreu uma grande mudança na mecanização das lavouras brasileiras, modernizando o sistema de transporte, aumentando a expansão das fronteiras agrícolas, profissionalizando e incrementando o comércio internacional e tecnificando outras culturas (EMBRAPA 2013).

A exploração de cultura de grãos oleaginosos iniciou-se no sul do país e, em seguida, passando a ser encontrada nos mais diferentes ambientes pelo avanço do cultivo nas áreas de Cerrado, formando novas fronteiras agrícola chamada de Matopiba (fronteira formada por regiões produtoras dos Estados de Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia).

Conforme dados da EMBRAPA (2004), a soja pertence à classe das dicotiledôneas, família leguminosa e subfamília Papilionoides. O sistema radicular é pivotante, com raízes principal bem desenvolvida e raízes secundárias em grande número, ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Tem caule com porte ereto e altura variável de 0,60 m a 1,50 m, pubescentes de pelos. Caule bastante ramificado, com ramos inferiores mais alongados e todos os ramos formando ângulos variáveis com haste principal. Folhas alternadas, longas pecioladas, compostas de três folíolos ovalados ou lanceolados, de comprimento variável entre 0,5 a 12,5 cm.

A soja possui o seu ciclo de desenvolvimento dividido em duas fases, a vegetativa e a reprodutiva. A fase vegetativa é subdividida em vegetativa de emergência e fase vegetativa de cotilédone. Já a fase de reprodução é subdividida em oito fases, que se iniciam com o florescimento e vão até a maturação plena das vagens (RITCHIE, 1985).

Na maioria das variedades, à medida que a planta vai chegando no ponto de maturação fisiológica, as folhas amarelecem, os frutos amadurecem e caem quando as vagens estão maduras.

Nas últimas três décadas a soja foi cultura agrícola que mais cresceu, correspondendo a mais de 56% da área plantada em grãos no Brasil (CONAB, 2016). Na safra brasileira de grãos 2014/2015, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção alcançou 95,07 milhões de toneladas em uma área plantada de 31,573 milhões de hectares, com uma produtividade média de 3011 Kg por hectare.

Na safra de 2016/2017, a produção atingiu 105.558,2 mil toneladas, correspondendo a um aumento de 10,61% em relação à safra anterior (CONAB, 2017).

O Brasil ocupa hoje a segunda posição na produção mundial de soja, atrás apenas dos EUA (CONAB, 2016). A indústria nacional produz, por ano, 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico

(MAPA). Os grãos e o farelo de soja brasileiros possuem padrão de qualidade *Premium* e alto teor de proteína, o que permite sua entrada em mercados extremamente exigentes. O seu grão é de grande utilidade como matéria prima para a agroindústria, indústria química e de alimentos. Dentro da alimentação humana, a soja entra na composição de vários produtos como: embutidos, chocolate, temperos, óleos, entre outros. A soja tem outras utilizações, como por exemplo, na fabricação de biodiesel, combustível capaz de reduzir em 78% a emissão dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera (MAPA).

Com o aumento expressivo das áreas cultivadas por soja, sendo na sua maioria monocultura sob semeadura direta, algumas doenças aumentaram também sua frequência e intensidade, doenças essas causadas por fungos, bactérias, nematoides, vírus, etc., somando no Brasil 33 doenças conhecidas e catalogadas (EMBRAPA, 2010).

A principal estratégia utilizada na redução da intensidade de doenças é o controle químico, contudo essa não deve ser a única, deve-se sempre conciliar o controle químico com outras táticas de manejo como cultivares resistentes, tratamentos culturais que visam reduzir a população do patógeno, barreiras fitossanitárias que impeçam a introdução de uma nova doença em áreas onde essas doenças não ocorrem.

O controle químico apesar de ainda ser muito eficaz vem ocasionando problemas relacionados ao surgimento de resistência de patógenos aos produtos químicos, além da contaminação do meio ambiente, assim sendo necessário a busca por outras alternativas que possam proporcionar, no campo, as condições favoráveis ao controle biológico como a utilização de fungos e bactérias no manejo de algumas doenças e que promovam boas condições de desenvolvimento da cultura no campo, expressando todo o potencial e vigor da cultura.

2.2 Controle Biológico de doenças de plantas

Seja pela racionalização no uso de defensivos químicos na agricultura convencional ou pelo aumento na produção orgânica, ocorreu um aumento na procura por produtos alternativos que mantenham níveis aceitáveis de manejo de doenças. Neste contexto, os produtos mais promissores para o manejo alternativo

de doenças de plantas são agentes microbianos de controle biológico e organismos promotores de crescimento.

Os primeiros relatos do controle biológico de doenças no Brasil são relativamente recentes. O primeiro artigo publicado sobre controle biológico de doenças foi em 1950, por Reinaldo Foster, pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas, com o tema Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp., (EMBRAPA, 2009).

Um sistema de controle biológico deve ser baseado na seleção de microrganismos antagonico, podendo ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. Os testes *in vitro* apresentam a vantagem de permitir o conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos (ex: antibiose e hiperparasitismo), facilitando a observação das interações entre o antagonista e o fitopatógeno (LIU et al., 2009; LOUZADA et al., 2009; CARVALHO et al. 2011).

Os organismos selecionados podem servir como fonte de genes para transformação de outros isolados de agentes de controle biológico, ou para desenvolvimento de formulações eficazes para o controle biológico em campo (YAQUB e SHAHZAD, 2011).

As formas de ação do controle biológico baseiam-se em relações antagonicas (competição, predação, amensalismo, parasitismo, resistência induzida ou pela produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento do outro). Dentro do antagonismo, o parasitismo é o mecanismo mais eficiente no controle biológico, pois os hiperparasitas dependem de seus hospedeiros para sobrevivência e estão sujeitas as mesmas transformações do meio ambiente (SILVA et al., 2011).

O controle biológico, considerado como natural, forma uma estratégia de grande interesse e importância para a redução ou até mesmo substituição de uso excessivo de defensivos químicos (VINALE et al., 2008; REZENDE, 2011). O uso de produtos biológicos na agricultura vem sendo reconhecido e tem se tornado cada vez mais importante, em alguns casos, substituindo ou complementando a utilização de defensivos químicos (BRAÚNA, 2011).

Em estudos feitos sobre produtos biológicos para controle de doenças de plantas, os fungos são os principais alvos do mercado de produtos biológicos (51%), os principais microrganismos que compõem esses produtos são bactérias (51%) e, dentre os gêneros de bactérias, *Bacillus* sp. é o principal agente de biocontrole (41%) (MONTESINOS, 2003). O principal motivo para a utilização de bactérias como

agente de biocontrole dá-se pelos seus diversos mecanismos de ação contra fitopatógenos, pela facilidade de formulação e produção de esporos aumentando a vida de prateleira dos produtos.

2.3 Rizobactérias promotoras de crescimento

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas é constituído de um grupo muito amplo de microrganismos, incluindo-se quaisquer bactérias que vivem na rizosfera de plantas e afetem benéficamente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais. Convencionalmente, entretanto, ainda não tem sido incluído rizóbios enquanto fixadores de nitrogênio, atividade benéfica ao desenvolvimento vegetal, resultante de uma interação simbiótica com leguminosas, interação que não é considerada para as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (BASHAN e HOLGUIN, 1998).

As primeiras pesquisas com rizobactérias começaram na Rússia e na Ucrânia, em 1885, usando *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* e outras espécies de *Bacillus* (ZAGO, 2003). De acordo com FREITAS (1994), as pesquisas com fertilizantes bacterianos se intensificaram após trabalhos feitos por BURR et al. (1978), demonstrando aumento significativo na produção de batatas que receberam inóculo de *Pseudomonas fluorescens* e de *P. putida*.

A expressão “rizobactérias promotoras de crescimento de plantas” (RPCPs), foi utilizada pela primeira vez em trabalho de KLOEPPER e SCHROTH (1981), para denominar as bactérias benéficas que vivem na rizosfera de plantas sem estabelecer relações simbióticas.

Dentre os microrganismos mais pesquisados, destacam-se bactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), com a possibilidade de utilização para tratamentos de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverização na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita.

Segundo MARIANO et al. (2004), as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endolíticas e não são fitopatogênicas.

As RPCPs podem exercer efeitos benéficos de forma direta ou indireta. Os efeitos de forma direta ocorrem quando uma rizobactéria produz metabólitos que promovem diretamente o crescimento das plantas sem interação com a microbiota do solo, como por exemplo, pela produção de reguladores de crescimento, tais como auxinas (ASGHAR et al., 2002), citocininas (ARKHIPOVA et al., 2005), giberelina (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 2001; JOO et al., 2004) e pela solubilização de fosfatos minerais (FREITAS et al., 1997). Os efeitos da promoção de crescimento de forma indireta ocorrem pela eliminação de patógenos, antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997), ácido cianídrico (OWEN e ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003). A produção de Ácido cianídrico (HCN), também pode ser um promotor direto de crescimento de plantas, aumentando o desenvolvimento dos pelos radiculares (LUZ, 1996). As RPCPs podem também, ativar o mecanismo de defesa das plantas e induzir resistência sistêmica a vários patógenos.

A utilização de rizobactérias nos solos traz benefícios diretos para a produção agrícola, sendo ao mesmo tempo uma alternativa de cultivo com menor utilização de insumos agrícolas (SCHROTH e HANCOCK, 1982; LAVIA e STOTZKY, 1986).

As rizobactérias promotoras de crescimento em plantas representam uma grande diversidade de bactérias de solo que, quando em contato com plantas, resultam em um aumento substancial da área da raiz. Com o aumento da superfície da área radicular ocorre uma maior eficiência na retirada de água do solo, macro e micronutrientes pelas plantas. Um outro aspecto importante é que as RPCPs apresentam um relativo efeito antagônico sobre muitos microrganismos patogênicos, promovendo, portanto, um eficiente controle biológico na natureza (PEDRINHO, 2009).

RODRIGUES e FRAGA (1999), citam que estirpes do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial de solubilização de fósforo. RICHARDSON (2000), relatou que a grande maioria dos solos tropicais são pobres em fósforo disponível às plantas e que o fertilizante fosfatado representa um alto custo para o produtor. Existem outros mecanismos de que estimulam o

crescimento das plantas além da solubilização de fósforo, estes estão ligados com o metabolismo microbiano no solo, tais como a produção de enzimas nitrogenase, quitinases e glucanases (CATTELAN et al., 1999).

Existem outros fatores relacionados ao crescimento de plantas proporcionados pelas rizobactérias, como a diminuição na incidência e inibição de crescimento de fitopatógenos ou outros microrganismos deletérios (SIMEONI et al., 1987 apud MELLO, 1998).

Além da utilização de rizobactérias na promoção de crescimento de plantas e no controle biológico de doenças e de plantas daninhas, outros diversos grupos de espécies podem ser utilizados na conservação do meio ambiente e na biorremediação de solos contaminados, pois possuem a habilidade de degradar compostos xenobióticos (BUNDY et al., 2004; NEUMANN et al., 2004).

Existem inúmeras outras formas pelas quais rizobactérias poderiam beneficiar o crescimento vegetal, algumas formas com mais visibilidade e mais trabalhos a elas dedicados, outras formas com menos pesquisadores a lhes investigar as possibilidades. Diante de tudo isso podemos perceber que ainda existe muito espaço para estudos voltados para essa área do comércio de inoculantes com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.

2.4 *Bacillus* spp. como promotor de crescimento de plantas e controle biológico de fitopatógenos

As bactérias pertencentes a esse gênero são caracterizadas devido a sua capacidade de produzir esporos com alta tolerância ao calor e ao frio, bem como as condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem (KLOEPPER, 19997). A grande maioria das espécies do gênero *Bacillus* é saprófito, estando amplamente distribuídas no ar, solo e água (BOER; DIDERICHSEN, 1991).

O gênero *Bacillus* spp. possui organismos com uma grande capacidade de alterar a sua fisiologia ou morfologia de acordo com as condições do ambiente, garantida pelo crescimento desde 15 °C até 60 °C e formação de endósporos que lhe permitem sobreviver além destes limites de temperatura e na escassez de nutrientes ou água (LAMANNA, 1940). Tem crescimento rápido em condições

aeróbicas e sob condições anaeróbicas (SCHISLER et al., 2004). Dessa forma, isolados que apresentem uma grande eficiência de controle acabam se transformando mais facilmente em produtos formulados e disponíveis aos agricultores (EMMERT e HANDELSMAN, 1999). Além do mais, uma diversidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. tem sido estudada (KATZ e DEMAINE, 1997).

As principais características do gênero *Bacillus* são: bacilos gram-positivos, células com forma de bastonetes retos, com extremidades arredondadas ou em ângulo, em pares ou cadeias; são moveis por meio de flagelos peritríquios; seus endósporos são ovais ou algumas vezes, redondos ou cilíndricos, possuindo uma grande resistência às condições adversas, tais como calor e baixos níveis de umidade; são aeróbios ou aeróbios facultativos e na maioria das espécies encontradas em laboratório são saprófitos (MELO, 1998).

Existem mais de 191 espécies e 4 subespécies descritas no gênero *Bacillus* das quais muitas possuem características semelhantes ao *Bacillus anthracis*. A maioria dos bacilos são saprófitos e não patogênicos para animais (MELO, 1998). No contexto da agricultura já existem vários produtos tendo, como base de ingrediente ativo, espécies do gênero *Bacillus*, alguns exemplos são: *Bacillus thuringiensis* (DIPEL, Abbot Co., USA), *Bacillus sphaericus* (BIOBAC, ICI, Alemanha) e *Bacillus subtilis* (KODIAK, Gustafson Inc., USA). Estes produtos têm sido utilizados em vários países do mundo com fins de controle biológico. No controle biológico de doenças de plantas a espécie *Bacillus subtilis* como eficiente antagonista tem sido a mais utilizada no controle principalmente de fungos patogênicos de solo (MCKEEN et al., 1986; BETTIOL; KIMATI, 1990; 1993; ARAÚJO et al., 2005; DOMENECH et al., 2006).

A maioria dos trabalhos realizados com *Bacillus* spp. estão voltados para o controle biológico de fitopatógenos na rizosfera de forma frequente por conta da produção de antibióticos produzidos pelas bactérias desse gênero. Esse gênero bacteriano classificado como rizobactérias promotora de crescimento de plantas podem realizar a supressão da doença através de outros mecanismos e modo de ação como: competição por espaço, nutrientes e indução de resistência sistêmica em plantas (KLOEPPER, 1999). As bactérias do gênero *Bacillus*, também

apresentam potencial de controle biológico de nematoides fitopatogênicos (ARAÚJO et al., 2002).

Com a inoculação de *Bacillus* spp. pode ser observado um ganho na nutrição de plantas destacado como benefício advindo da presença deste grupo de microrganismos na rizosfera. Rodriguez e Fraga (1999) citam que estirpes do gênero de *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial de solubilização de fósforo. A solubilização de fosfatos insolúveis realizada por microrganismos está ligada ao despendimento de ácidos orgânicos que são frequentemente combinados com outros metabólitos, sendo constatado *in vitro* que o potencial de solubilização de fósforo por microrganismos está diretamente ligado à produção de sideróforos, fitohormônios e enzimas líticas (VASSILEV et al., 2006). Em relação ao aumento da disponibilidade de alguns nutrientes no solo pela ação de *Bacillus subtilis* foi comprovada maior absorção de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, em plantas inoculadas com rizobactérias nas sementes (ARAÚJO, 2008). Estirpes dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial de solubilização de fósforo no solo, citados por RODRIGUEZ e FRAGA (1999). RICHARDSON (2000) relatou que em sua maioria os solos brasileiros são deficientes em fósforo disponível para as plantas, sendo necessários altos custos para o agricultor com fertilizantes fosfatados. Desta forma a utilização de microrganismos do solo como inoculantes para mobilizar o fósforo em solos pobres se tornou uma alternativa muito importante. Outro mecanismo relacionado à promoção de crescimento de plantas, bem como à indução de resistência de plantas a patógenos e ao antagonismo microbiano, é a produção de enzimas como nitrogenase, quitinase, lipase e glucanases (CATTELAN, et al., 1999).

Bactérias do gênero *Bacillus* spp. possuem uma grande variedade de mecanismos que podem ser úteis no controle de doenças e na promoção de crescimento de plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de bacteriologia e o experimento com plantas foi conduzido em casa de vegetação na JCO – Indústria e Comércio de Fertilizantes LTDA – EPP, situado no município de Barreiras-BA, ROD. BR 242/020, Km 802.

O experimento foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado, contendo 12 tratamentos e 4 repetições, onde foi avaliado diferentes tipos de isolados de rizobactérias do gênero *Bacillus*.

Os 11 isolados de rizobactérias do gênero *Bacillus* spp. usados neste experimento foram, previamente isoladas no laboratório da JCO, de solos de diferentes estados do Brasil (Tabela 1). Os isolados foram cultivados em meio *agar nutrien*te, durante dois dias em temperatura ambiente. Em seguida os isolados foram submetidos aos testes de Lipase, Quitinase, Solubilização de fosfato e pareamento *in vitro* com fungos patogênicos na cultura da soja.

Tratamento	Isolados	Origem
T1	ENS1	BA
T2	MT389.1B	MT
T3	UKMA.4	PI
T4	ENC3	BA
T5	ID386.23	BA
T6	MT388.12B	MT
T7	UKS.10	PI
T8	UFVO58-B	MG
T9	UFV030	MG
T10	1322R	MG
T11	8412R	MG
T12	CONTROLE	-

Tabela 1: Descrição dos tratamentos utilizados.

3.1 Teste de Lipase

O teste de Lipase foi realizado através da repicagem dos isolados de bactérias em placas de Petri contendo meio a base de lipídeos (Anexo A). Nesse

meio, a atividade lipásica extracelular foi detectada pela formação de um halo opaco em torno das colônias bacterianas, por degradação dos sais de lipídio, conforme HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975).

No preparo, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri. Após a solidificação do meio, cada placa foi dividida em 4 partes, onde foram repicados 4 isolados diferentes de bactérias, sendo feito apenas um risco em cada divisão na placa e distanciados cerca de 2 cm do bordo da placa, cada um com 3 repetições. Decorrido o período de incubação de 7 dias à temperatura ambiente, foi feita a avaliação do crescimento e a ocorrência ou não da atividade lipásica, efetuada através da observação das colônias.

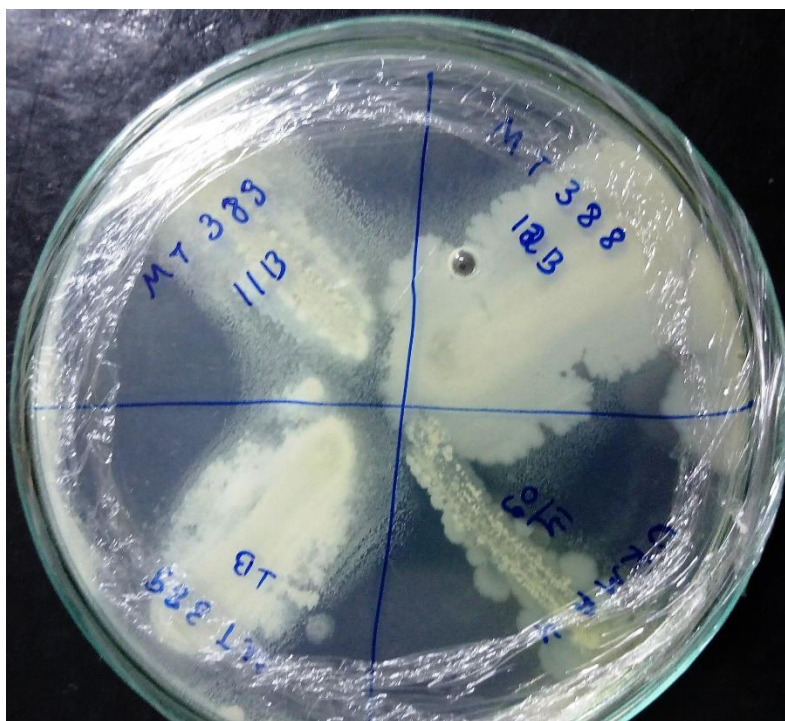


Figura 1: *Bacillus* cultivado em placas de Petri contendo meio a base de lipídeos.

3.2 Teste de Quitinase

No teste de Quitinase, assim como no teste de Lipase, foi realizado através da repicagem dos isolados de bactérias em placas de Petri contendo um meio a base de quitina (Anexo B). Nesse meio, a atividade de degradação da quitina foi detectada pela formação de um halo opaco em torno das colônias bacterianas e pelo seu crescimento.

O procedimento para realização desse teste ocorreu da mesma forma descrita no teste de Lipase, onde após 7 dias em temperatura ambiente foi feita a avaliação

do crescimento e a ocorrência ou não de atividades de degradação da quitina, efetuada através da observação das colônias.

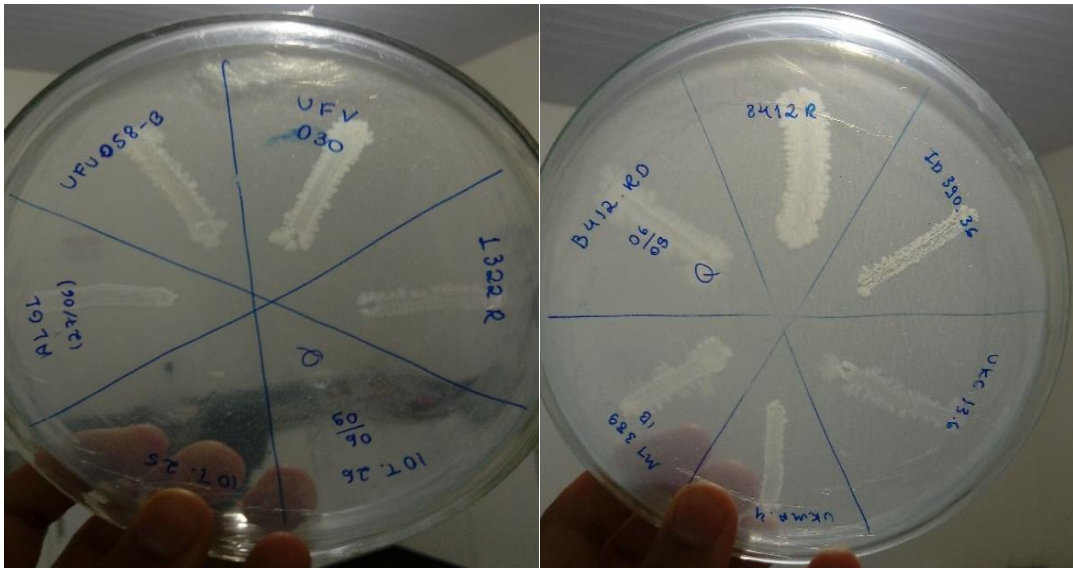


Figura 2: *Bacillus* cultivado em placas de Petri contendo meio a base de quitina.

3.3 Teste de Solubilização de Fosfato

Para o teste de Solubilização de Fosfato, foi realizado a repicagem dos isolados das bactérias em placas de Petri contendo meio e os fosfatos (Anexo C) onde cada placa foi dividida em 6 partes, onde foi repicado 6 isolados diferentes de bactérias, sendo feito apenas um risco em cada divisão na placa e distanciados cerca de 2 cm do bordo da placa, cada um com 3 repetições. A inoculação das bactérias foi feita, colocando-se esporos na superfície do meio já solubilizado, utilizando-se alça de Drisgalski. A avaliação foi feita após 3 a 8 dias de inoculado, sendo observado visualmente, a formação do halo transparente ao redor das colônias, contraste com o meio opaco, o que indica a solubilização do fosfato adicionado ao meio de cultura, de acordo com DI SIMINE et al. (1998).

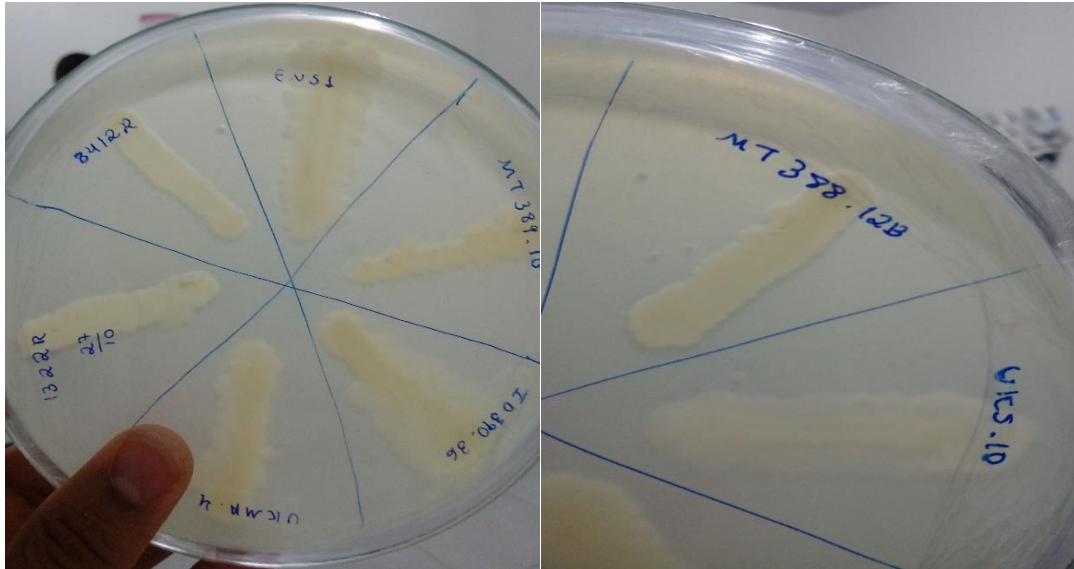


Figura 3: *Bacillus* cultivado em placas de Petri contendo meio a base de fosfatos.

3.4 Teste de Pareamento com fungos patogênicos

No teste de pareamento com fungos patogênicos na cultura da soja, os isolados de bactérias foram plaqueados em placas de Petri com os fungos. Os fungos utilizados foram: *Sclerotinia sclerotiorum* que causa a doença conhecida como mofo branco, *Macrophomina phaseolina* que causa a doença conhecida como tombamento ou podridão de raízes e *Rhizoctonia solani* que causa a doença conhecida como mela da soja. Em cada placa de Petri foi colocado um esporo do fungo no centro da placa e dois isolados diferentes de bactérias um em cada extremidade da placa, cada um com 3 repetições. Após 7 dias foi observado se ocorreu por parte da bactéria a inibição e o avanço do fungo em direção a bactéria, sendo assim feito a medição da distância do halo formado pela inibição do crescimento do fungo (distância entre a bactéria e o fungo).

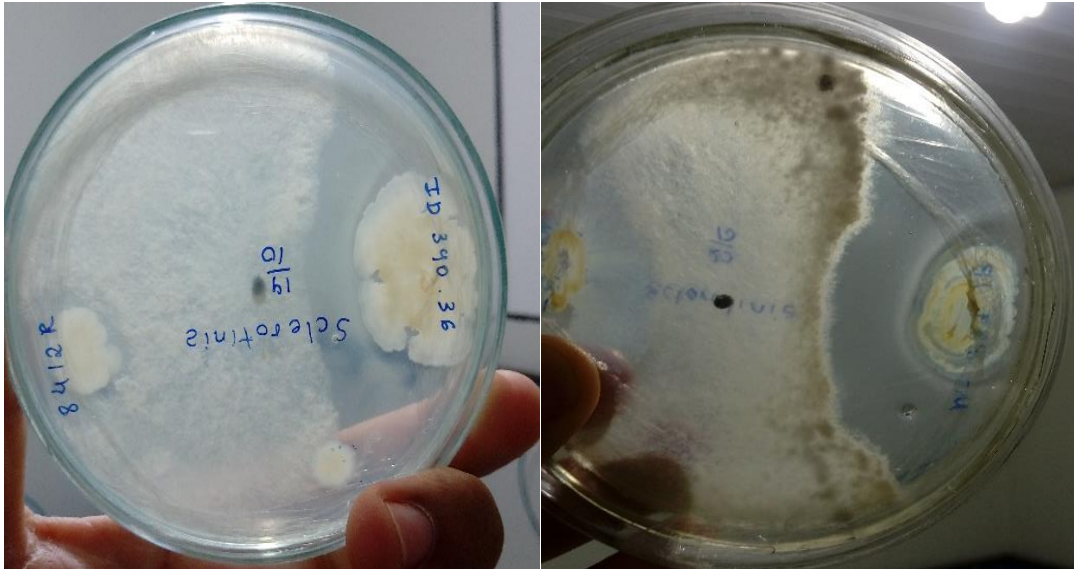


Figura 4: Pareamento de esporos de *Bacillus* spp. com esporos do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

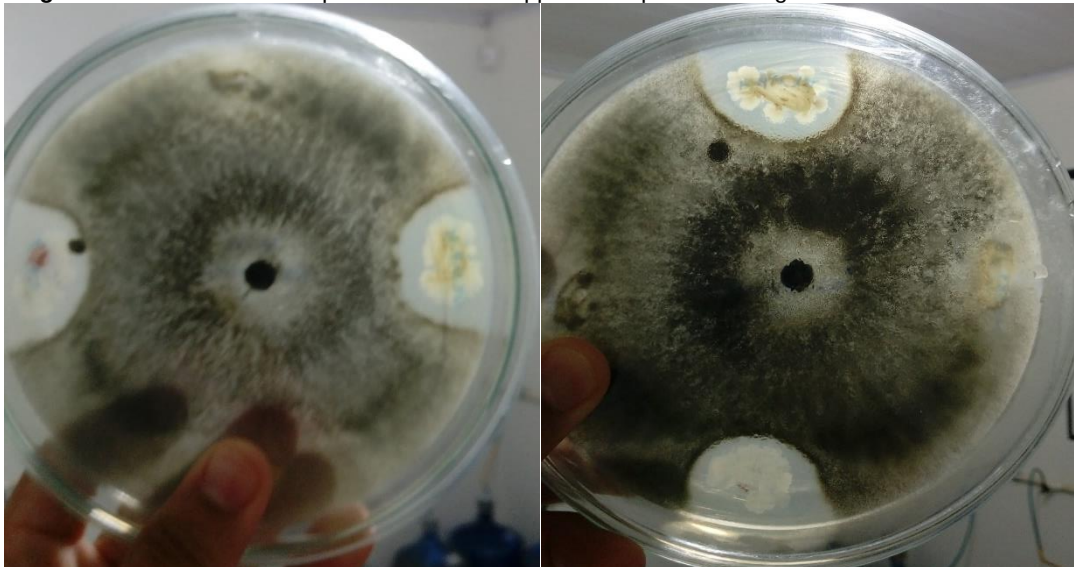


Figura 5: Pareamento de esporos de *Bacillus* spp. com esporos do fungo *Macrophomina phaseolina*.

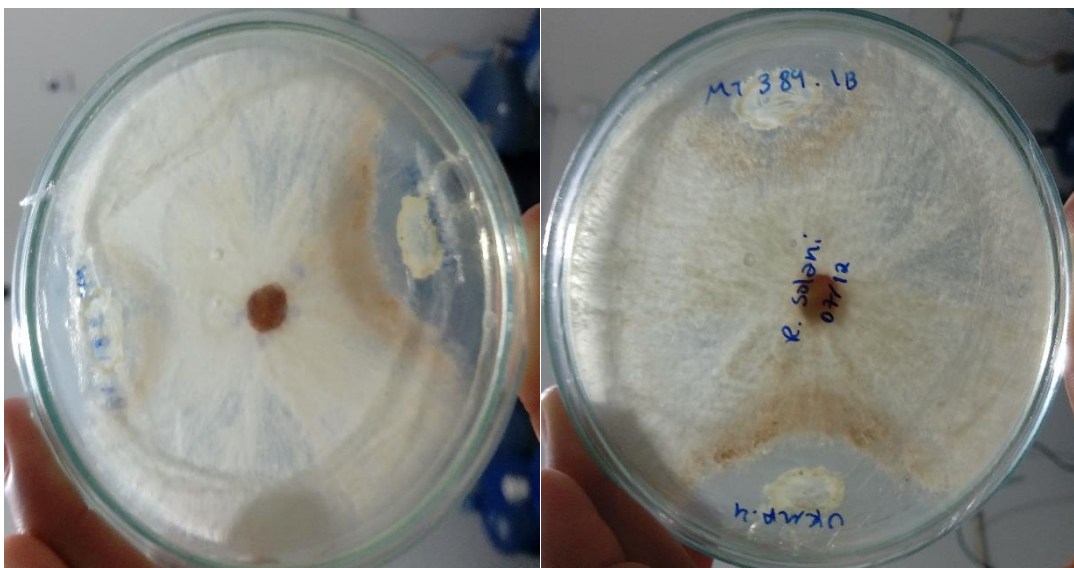


Figura 6: Pareamento de esporos de *Bacillus* spp. com esporos do fungo *Rhizoctonia solani*.

3.5 Testes em Casa de Vegetação

No teste de germinação foram plantadas 5 sementes (variedade M 8349 IPRO), em cada vaso, observando o número de plântulas emergidas por vaso com 8 dias (das). Logo após foi realizado o desbaste com 10 dias após a semeadura (das), permanecendo apenas duas plantas por vaso.



Figura 7: Plantio das sementes após a microbiolização em solução contendo a bactéria.

O experimento tem 4 repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso de 0,5 kg de solo com duas plantas. O solo foi autoclavado duas vezes por duas horas cada. As avaliações foram realizadas com 20 dias após a semeadura (das).

Os tratamentos foram nomeados da seguinte forma: Tratamento (T1) foi preenchido com solo + isolado 1; Tratamento (T2) foi preenchido com solo + isolado 2; Tratamento (T3) foi preenchido com solo + isolado 3; Tratamento (T4) foi preenchido com solo + isolado 4; Tratamento (T5) foi preenchido com solo + isolado 5; Tratamento (T6) foi preenchido com solo + isolado 6; Tratamento (T7) foi preenchido com solo + isolado 7; Tratamento (T8) foi preenchido com solo + isolado 8; Tratamento (T9) foi preenchido com solo + isolado 9; Tratamento (T10) foi preenchido com solo + isolado 10; Tratamento (T11) foi preenchido com solo + isolado 11; Tratamento (T12) foi a testemunha apenas com solo e sem nenhuma inoculação de isolado;

O procedimento para o preparo da suspensão para inoculação foi da seguinte forma: a bactéria foi cultivada por 24 h no meio *agar nutriente* em placa de Petri (KADO e HESKET, 1970). Uma alíquota de 10 ml de água destilada e esterilizada foi

adicionada à placa e foi feita a raspagem da cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski previamente desinfestada. Os 10 ml de suspensão obtidos foram transferidos para um frasco de plástico contendo 90 ml de água destilada e autoclavada, esse frasco foi agitado por 15 minutos em mesa agitadora a 150 rpm. As sementes foram tratadas na dose de 100 ml da suspensão para 24 sementes.

Para a medição da altura de planta e do sistema radicular foi utilizado uma régua milimétrica. Já para as variáveis de matéria seca da parte aérea, matéria seca do sistema radicular e matéria seca total foi obtida através da secagem do material em estufa com circulação de ar forçada, a 65 °C durante 72 horas, procedendo à pesagem em balança analítica eletrônica.

Para analisar os dados que foram obtidos, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de comparações de médias, teste Tukey, com 95% de confiança, sendo significativo um p-valor < 0,05, para verificar o inoculo mais eficaz nos parâmetros de germinação, tamanho de planta (cm), tamanho da parte aérea (cm), tamanho do sistema radicular (cm), peso úmido da parte aérea (gramas), peso úmido do sistema radicular (gramas), matéria seca da parte aérea (gramas), matéria seca do sistema radicular (gramas), matéria verde total (gramas), matéria seca total (gramas), utilizando o programa estatístico Minitab 16.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de lipase

Nessa etapa, foi observada a formação de halo opaco para avaliar a atividade lipásica extracelular de 11 isolados de *Bacillus* spp.

Tratamento	Isolados	Lipase
T1	ENS1	+
T2	MT389.1B	+
T3	UKMA.4	+
T4	ENC3	+
T5	ID386.23	+
T6	MT388.12B	+
T7	UKS.10	+
T8	UFV058-B	+
T9	UFV030	+
T10	1322R	+
T11	8412R	+
T12	CONTROLE	*

Tabela 2: Características dos tratamentos e dos isolados, quanto à formação de halo opaco.

Os 11 isolados de *Bacillus* spp. utilizados obtiveram resultado positivo quanto à atividade lipásica extracelular, degradando os sais de lipídios e proporcionando a formação de halo opaco, sendo assim considerados bons produtores de lipases em meio sólido.

4.2 Produção de quitinase

Para esta etapa, também foi utilizada a formação de halo opaco para a avaliação da atividade da quitinase extracelular de 11 isolados de *Bacillus* spp.

Os 11 isolados de *Bacillus* spp. utilizados obtiveram resultado positivo quanto a atividade da quitinase extracelular, degradando a quitina e proporcionando a formação de halo opaco, sendo assim considerados bons produtores de quitinase em meio sólido.

Tratamento	Isolados	Quitinase
T1	ENS1	+
T2	MT389.1B	+
T3	UKMA.4	+
T4	ENC3	+
T5	ID386.23	+
T6	MT388.12B	+
T7	UKS.10	+
T8	UFV058-B	+
T9	UFV030	+
T10	1322R	+
T11	8412R	+
T12	CONTROLE	*

Tabela 3: Características dos tratamentos e dos isolados, quanto à formação de halo opaco.

4.3 Solubilização de fosfato

A eficiência de solubilização de fosfato de alumínio em meio sólido foi avaliada pela formação de halo opaco, onde foram testados 11 isolados. Os isolados acrescentados ao meio rico em fosfatos (Anexo C), tendo resultados, após uma semana de inoculação.

Dos 11 isolados avaliados apenas 8 apresentaram capacidade de solubilizar o fosfato de alumínio (AlPO_4) em meio sólido, apresentando formação de halo de solubilização em meio de cultura rico em fosfato.

Os resultados desse trabalho confirmam que os isolados de bactérias do gênero *Bacillus* spp dos tratamentos T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10 e T11, são capazes de crescer no meio rico em fosfato de alumínio produzindo substâncias que degradam as moléculas de fosfato. SILVA FILHO (1998) sugere que a solubilização de fosfato ocorre pela acidificação do meio e que ela está relacionada ao crescimento do organismo. Isto está de acordo com a proposta de que a solubilização de fosfatos ocorre, basicamente, pela produção de ácidos orgânicos e liberação de prótons (SPERBER, 1958; SILVA FILHO; VIDOR, 2000; WHITELAW, 2000).

Tratamento	Isolados	S.F. Alumínio
T1	ENS1	-
T2	MT389.1B	-
T3	UKMA.4	-
T4	ENC3	+
T5	ID386.23	+
T6	MT388.12B	+
T7	UKS.10	+
T8	UFV058-B	+
T9	UFV030	+
T10	1322R	+
T11	8412R	+
T12	CONTROLE	*

Tabela 4: Presença de atividade de solubilização de fosfato de alumínio.

4.4 Pareamento com fungos fitopatogênicos

Alguns isolados de bactérias do gênero *Bacillus* spp. mostraram-se eficientes como agentes antagonistas de alguns fungos fitopatogênicos, apresentando inibição do crescimento dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*.

Tratamento	Isolados	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
T1	ENS1	17,7	3,3	-
T2	MT389.1B	11,3	-	-
T3	UKMA.4	-	6,0	5,7
T4	ENC3	-	-	-
T5	ID386.23	-	-	-
T6	MT388.12B	-	-	-
T7	UKS.10	-	-	-
T8	UFV058-B	-	-	-
T9	UFV030	-	-	-
T10	1322R	-	-	4,0
T11	8412R	-	-	-
T12	CONTROLE	*	*	*

Tabela 5: Média (mm) do halo de inibição do crescimento por meio do pareamento do fungo contra isolados de *Bacillus* spp.

Comparando os 11 isolados de *Bacillus* spp., os tratamentos T1 e T2 além de inibir o crescimento da *Sclerotinia sclerotiorum* de forma eficiente, não permitiu que o fungo produzisse escleródios, que são estruturas de resistência que garantem a sobrevivência do mesmo no solo por até oito anos. Os tratamentos T1 e T3, foram capazes de inibir o crescimento do fungo *Macrophomina phaseolina*. Já os tratamentos T3 e T10, foram capazes de inibir o crescimento do fungo *Rhizoctonia solani*.

A inibição dos fitopatógenos pelo antagonismo é observada pela formação do halo de inibição, que se manifesta como uma limitação do crescimento do fungo pela bactéria.

Segundo STAVELY et al. (1981) e BAKER et al. (1985), citados por BETTIOL e GHINI (1995), a ação de *B. subtilis* ocorre na germinação dos esporos e no crescimento micelial. Observou-se que os isolados de *Bacillus* spp. atuam no crescimento micelial de alguns fitopatógenos, impedindo inclusive a formação de escleródios por *S. sclerotiorum*.

Foi observado por BETTIOL e KIMATI (1989, 1990) o potencial inibidor de *B. subtilis* sobre diversos fitopatógenos, entre eles *R. solani* e *Fusarium moniliforme*.

Observou-se a eficiência no controle micelial por isolados de *Bacillus* spp. sobre patógenos *M. phaseolina* e *R. solani*.

Alguns autores como Wilson e Pusey (1984), constataram que isolados de diversas espécies de *Bacillus* são capazes de inibir o crescimento fúngico em várias culturas. Foi constatado neste experimento que os isolados de *Bacillus* spp. inibiu o crescimento micelial de diversos fungos em condições de laboratório.

4.5 Casa de vegetação

Alguns isolados proporcionaram uma maior porcentagem de germinação (Tabela 6). As sementes passaram por microbiolização com os isolados de *Bacillus* spp., sendo plantadas 5 sementes por vaso de 0,5 kg de solo autoclavado.

Tratamento	Isolados	(%) Germinação
T1	ENS1	55
T2	MT389.1B	70
T3	UKMA.4	80
T4	ENC3	85
T5	ID386.23	80
T6	MT388.12B	75
T7	UKS.10	85
T8	UFV058-B	85
T9	UFV030	90
T10	1322R	100
T11	8412R	95
T12	CONTROLE	70

Tabela 6: Porcentagem de germinação avaliados com 8 dias.

Dos 12 tratamentos avaliados, os tratamentos T10 (1322R), T11 (8412R) e T9 (UFV030) tiveram a maior porcentagem de germinação respectivamente, com valores acima de 90% de porcentagem de germinação, sendo assim, proporcionando um maior número de plântulas.

SCORTICHINI *et al.* (1989) relata que o tratamento com as bactérias *Bacillus subtilis* afetam negativamente a emergência das plântulas de soja, já TURNER e

BACKMAN (1991) relata em seus estudos que as bactérias afetam positivamente a emergência das plântulas de amendoim. Esses estudos mostram a divergência de resultados encontrados para a aplicação de *Bacillus subtilis*. O que fica evidente neste experimento, embora os resultados encontrados para plantas que receberam algum tipo de inoculação sejam melhores, as diferenças não são expressivas quando comparadas às testemunhas.

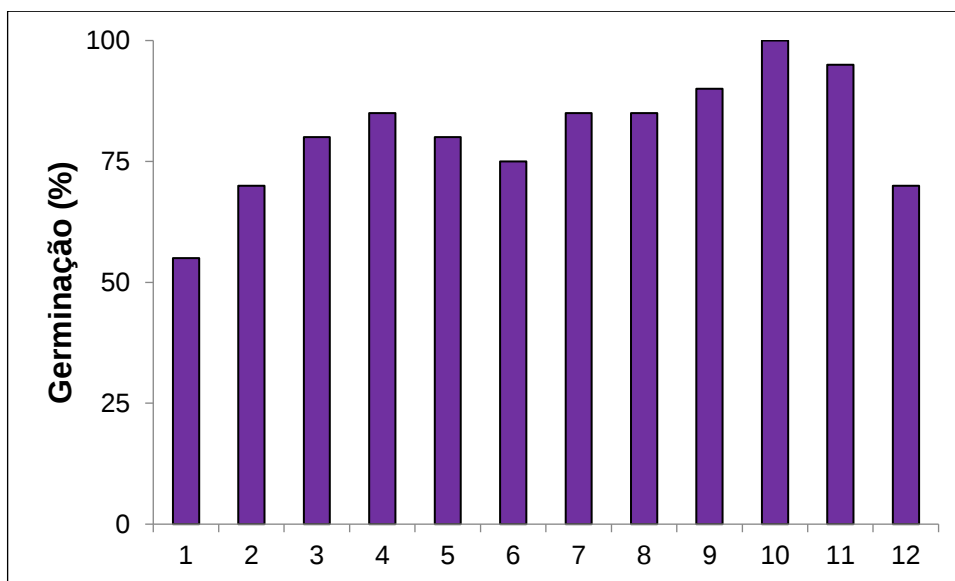


Gráfico 1: Porcentagem de germinação avaliados com 8 dias.

Tratamento	AP (cm)	CR (cm)	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
T1	22,75 ABC	16,25 F	2,72 G	0,64 F	0,47 G	0,08 CD
T2	23,50 AB	16,75 F	2,87 E	0,68 EF	0,51 DEF	0,09 BCD
T3	23,25 ABC	12,75 G	2,62 H	0,46 G	0,47 G	0,07 D
T4	22,63 BC	18,75 E	3,08 ABC	0,77 D	0,52 DE	0,10 ABC
T5	22,25 C	27,63 A	3,05 C	0,98 A	0,52 CD	0,10 ABC
T6	22,63 BC	20,00 DE	3,13 A	0,98 A	0,49 EFG	0,08 CD
T7	23,50 AB	18,50 E	2,89 E	0,70 DE	0,55 BC	0,08 CD
T8	23,38 ABC	23,50 BC	3,00 D	0,87 C	0,59 A	0,11 AB
T9	23,38 ABC	18,50 E	3,12 AB	0,88 C	0,56 BC	0,09 ABC
T10	22,50 BC	24,75 B	2,79 F	0,99 A	0,53 CD	0,11 AB
T11	23,88 A	21,00 D	3,05 BC	0,96 AB	0,59 AB	0,11 A
T12	20,38 D	22,75 C	2,79 F	0,95 B	0,49 FG	0,09 ABC

Tabela 7: AP (Altura de Planta), CR (Comprimento de Raiz), MFPA (Massa Fresca da Parte Aérea), MFR (Massa Fresca da Raiz), MSPA (Massa Seca da Parte Aérea) e MSR (Massa Seca da Raiz).

Dos 11 isolados de *Bacillus* ssp. inoculados, todos proporcionaram aumento na altura de plantas em relação à testemunha (Tabela 7). Não se observou relação

quanto à origem do isolado e sua capacidade de afetar o crescimento vegetal. Os isolados tiveram comportamentos bem diferentes quanto ao seu efeito sobre as plantas em que foram inoculadas.

Para a variável altura de planta todos os tratamentos obtiveram melhor rendimento que a testemunha T12. O tratamento que obteve o melhor rendimento foi o T11, inoculado com o isolado 8412R.

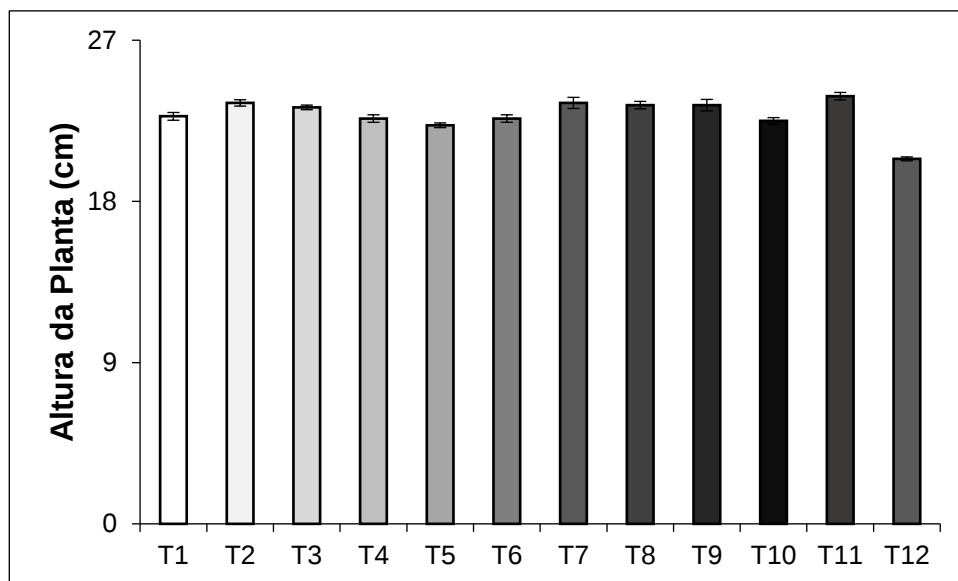


Gráfico 2: Altura média de plantas.

Dos 11 isolados de *Bacillus* ssp. inoculados, apenas dois proporcionaram um aumento no comprimento de raiz em relação à testemunha (Tabela 7). Os dois tratamentos com maior incremento no comprimento de raiz foram os T5 (ID386.23) e T10 (1322R) respectivamente.

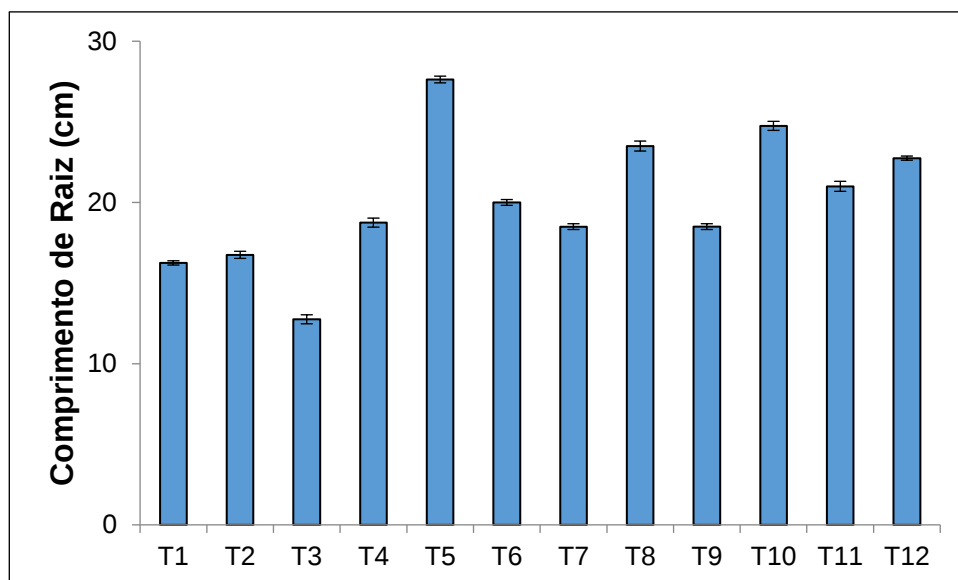


Gráfico 3: Comprimento médio de raiz.

Segundo WEAVER (1972) os órgãos vegetais de uma planta são alterados morfológicamente pela aplicação de fitoreguladores de modo que o crescimento das plantas possa ser promovido ou não.

Dos 11 isolados de *Bacillus* ssp. inoculados, oito isolados proporcionaram um aumento na quantidade de massa fresca da parte aérea em relação à testemunha. Os tratamentos que obtiveram os maiores valores foram os tratamentos T6 (MT388.12B, T9 (UFV030), T4 (ENC3), T11 (8412R), T5 (ID386.23), T8 (UFV058-B), T7 (UKS.10) e T2 (MT.389.1B), respectivamente.

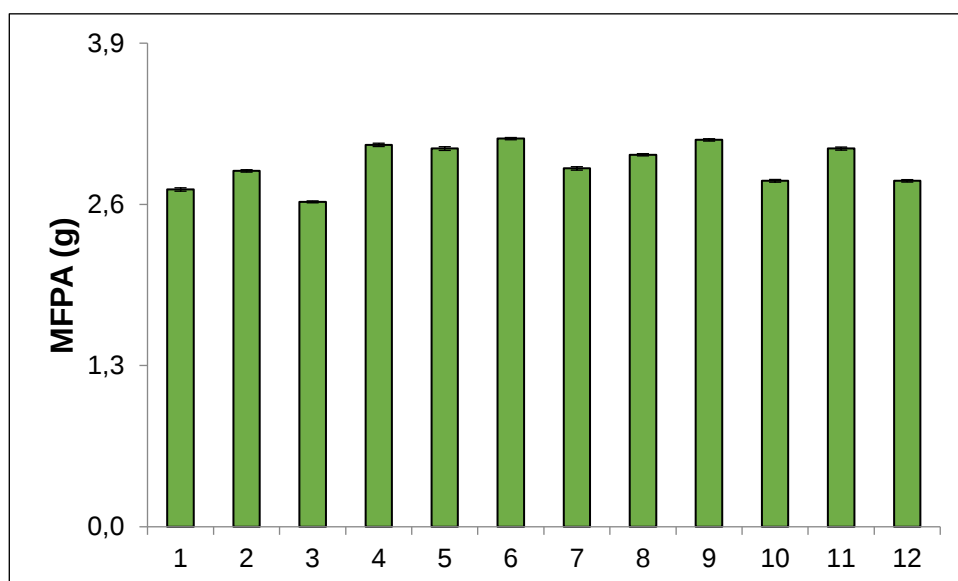


Gráfico 4: Valor médio de massa fresca da parte aérea.

Dentre os 11 isolados de *Bacillus* ssp. inoculados, apenas três isolados proporcionaram um aumento na quantidade de massa fresca da raiz em relação à testemunha. Os tratamentos que apresentaram os maiores valores foram os tratamentos T5 (ID386.23), T6 (MT388.12B) e T10 (1322R) respectivamente.

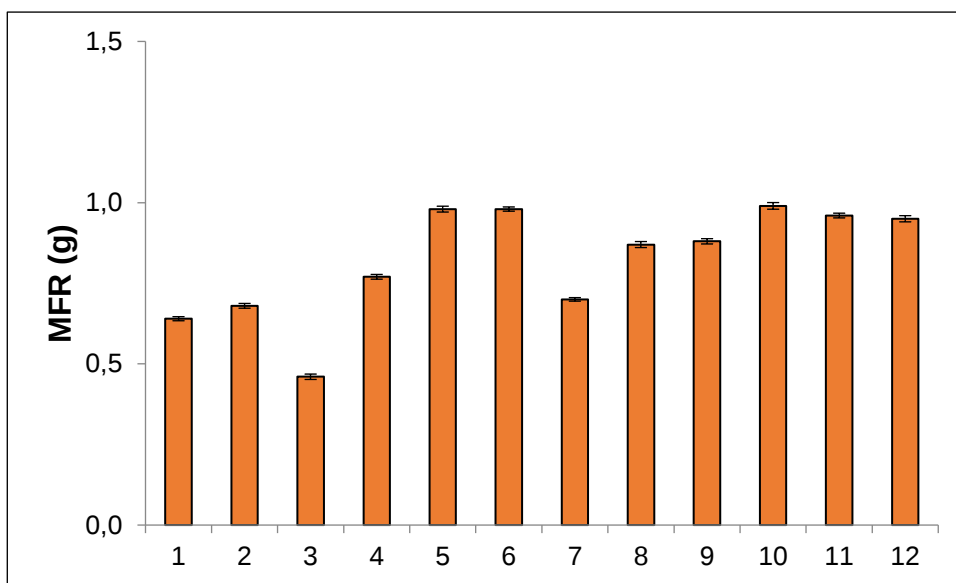


Gráfico 5: Valor médio de massa fresca da raiz.

Dos 11 isolados de *Bacillus* ssp. inoculados, sete isolados proporcionaram um aumento na quantidade de massa seca da parte aérea em relação à testemunha. Os tratamentos que obtiveram os maiores valores foram os tratamentos T8 (UFV058-B), T11 (8412R), T9 (UFV030), T7 (UKS.10), T10 (1322R), T5 (ID386.23) e T4 (ENC3) respectivamente.

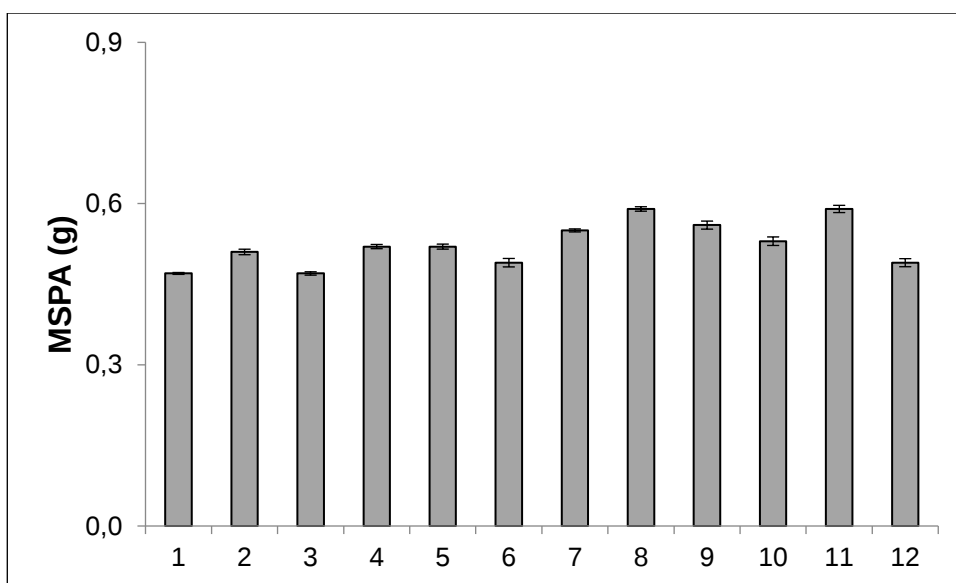


Gráfico 6: Valor médio de massa seca da parte aérea.

Dentre os 11 isolados de *Bacillus* spp. inoculados, apenas um isolado proporciona um aumento na quantidade de massa seca da raiz em relação à testemunha. O tratamento que apresenta o maior valor foi o tratamento T11(8412R)

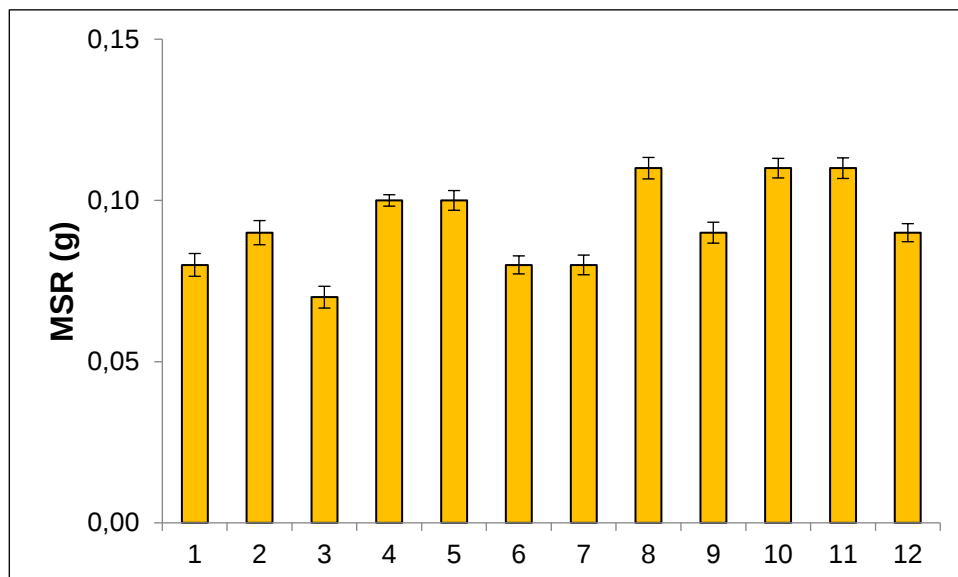


Gráfico 7: Valor médio de massa seca da raiz.

No estudo de Gomes et al. (2003) houve aumento de massa úmida em mudas de alface induzidas por C116 (*Bacillus pumilus*) em 50,21% e C25 (*Bacillus thuringiensis subvar. kenya*) 42,70%. Silveira et al. (2001) obtiveram resultados onde mudas de pepino bacterizadas com os isolados PEP81 (*B. amyloliquefaciens*) e PEP91 (*Enterobacter cloacae*) apresentaram aumentos de 33,3 e 27,5%, respectivamente, para massa seca total. Esses resultados mostram que bactérias do gênero *Bacillus* podem ser favoráveis ao aumento da massa úmida e seca das plantas.

Os resultados encontrados no experimento não divergem dos apresentados na literatura, pois os maiores valores para MFPA, MFR, MSPA e MSR foram obtidos pelos tratamentos inoculados com bactérias do gênero *Bacillus* spp.

5. CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Bacillus* spp. obtiveram resultados positivos na produção de lipase e quitinase.

A maioria dos isolados usados nesse trabalho foi capaz de solubilizar o fosfato de alumínio (AlPO_4) *in vitro*.

Alguns isolados do gênero *Bacillus* spp. se mostraram eficientes no controle dos fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum* (ENS1 e MT389.1B), *M. phaseolina* (ENS1 e UKMA.4) e *R. solani* (UKMA.4 e 1322R).

Todos proporcionaram um incremento de pelo menos um dos parâmetros de promoção de crescimento em casa de vegetação.

O isolado ID386.23 foi o que melhor promoveu o crescimento de plantas de soja.

6. REFERÊNCIAS

- DA SILVEIRA, Adriana Parada Dias; DOS SANTOS FREITAS, Sueli. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agronômico, 2007.
- DE OLIVEIRA, Ariádila Gonçalves et al. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.
- DE OLIVEIRA, Luiz Antonio; DOS SANTOS HARA, Francisco Adilson. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo. Amazonas. 2004.
- GONÇALVES, André Henrique. Eficiência da inoculação de *Trichoderma* e *Purpureocillium* na cultura da soja em Tocantins. 2016.
- GUERREIRO, Renato Tadeu et al. Seleção de *Bacillus* spp. promotores de crescimento de milho. 2008.
- HORSTMANN, Juliana Lopes. **Caracterização de isolados de *Streptomyces* spp. provenientes de raízes de *Fabaceae* como rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de respostas de defesa em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. 2017. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- LANNA FILHO, Roberto; FERRO, Henrique Monteiro; DE PINHO, Renata Silva Canuto. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.
- MARCUZZO, Leandro Luiz. Efeito de Rizobactérias sobre o Biocontrole e Promoção de Crescimento de Plantas. **Ágora: revista de divulgação científica**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2011.
- MISSÃO, Maurício Roberto. SOJA, ORIGEM, CLASSIFICAÇÃO, UTILIZAÇÃO E UMA VISÃO ABRANGENTE DO MERCADO. **Maringá Management**, v. 3, n. 1, 2008.
- MORANDI, Marcelo Augusto Boechat; BETTIOL, Wagner. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, p. 7-14, 2009.
- MOREIRA, Ana Ligia de Lima et al. Bioprospecção de *Bacillus* spp. promotores de crescimento de eucalipto. 2012.
- MURTHY, N.; BLEAKLEY, B. Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. **Internet J Microbiol**, v. 10, n. 2, p. e2bc3, 2012.

PEDRINHO, Eliamar Aparecida Nascimbém et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, 2010.

RABINOVITCH, Leon; DE OLIVEIRA, Edmar Justo. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. **CEP**, v. 21040, p. 900, 2015.

RATZ, Raquel Jackeline et al. Uso de bactérias do gênero *Bacillus* como promotoras de crescimento para a cultura do milho e da soja. 2014.

REMUSKA, Angie Carneiro; DALLA PRIA, Maristella. EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* E *Trichoderma* sp. NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 03, 2007.

RIBEIRO, Carlos Marcelo. **Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia***. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RODRIGUES, Celson et al. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Eng. sanit. ambient**, v. 21, n. 3, p. 507-518, 2016.

SILVEIRA, Anelise Beneduzi da. Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. 2008.

SOUCHIE, Edson Luiz et al. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

7. ANEXOS

- **Anexo A – Meio Lipase (RODRIGUES et al., 2016)**

Reagente	Quantidade
Peptona.....	10 g
NaCl.....	5,0 g
CaCl ₂	0,1 g
Ágar.....	15,0 g
Tween 80.....	10 ml
Água Destilada.....	1000 ml

- **Anexo B – Meio Quitinase (MURTHY e BLEAKLEY, 2012)**

Reagente	Quantidade
Quitina.....	2,0 g (20 g)
K ₂ HPO ₄	7,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
MgSO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,001 g
MnCL ₂	0,001 g
Ágar.....	20 g
Água Destilada.....	1000 ml

- **Anexo C - Meios para detecção de solubilização de fosfatos (HARA e OLIVEIRA, 2004)**

Meio para Solubilização de Fosfato de Alumínio.

Reagente	Quantidade
Manitol.....	10 g
Extrato de Levedura.....	2 g
K ₂ HPO ₄	6 g
Água Destilada.....	700 ml
Ágar.....	18 g
Ajustar o pH para 4,5.	

Solução A (autoclavar separadamente e misturar antes de verter)

AlCl_35,34 g

Água Destilada.....300 ml

- Após a autoclavagem, adicionar a Solução A ao meio fundente, agitar e verter as placas.