

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**CAMPOS DE JABOTICABAL**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

***Azospirillum brasilense* E *Bacillus subtilis***  
**SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO EM MUDAS DE**  
**EUCALIPTO.**

**Joviany Talita da Silva**

Bióloga

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Azospirillum brasilense* E *Bacillus subtilis*  
SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO EM MUDAS DE  
EUCALIPTO.**

**Joviany Talita da Silva**

**Orientador: Dr. Everlon Cid Rigobelo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

**JABOTICABAL – SÃO PAULO**

**2017**

O48f Silva, Joviany Talita da  
*Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* solubilizadores de fósforo em mudas de eucalipto/ Joviany Talita da Silva. – Jaboticabal, 2017 x, 55p. : il.; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Everlon Cid Rigobelo

Banca examinadora: Rinaldo Cesar de Paula, Leonardo Lucas Madaleno.

Bibliografia

1. Microbiologia. 2. Micro-organismo. 3. Solubilização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.54

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

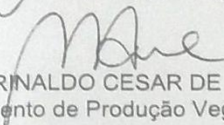
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Azospirillum brasilense* E *Bacillus subtilis* SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO EM MUDAS DE EUCALIPTO

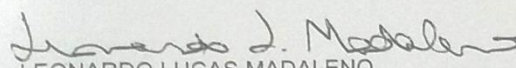
AUTORA: JOVIANY TALITA DA SILVA

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO  
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA  
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO  
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 20 de outubro de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JOVIANY TALITA DA SILVA** – nascida em 10 de junho de 1991, na cidade de Viradouro, estado de São Paulo, filha de Lourival Francisco da Silva e Solangela de Fátima Paiva da Silva, graduada com licenciatura plena em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – SP em 2012. Mestranda em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP. Atualmente exerce a função de professora eventual do ensino fundamental ministrando a disciplina de Ciências na escola municipal Dr. Clóvis Guimarães Spínola na cidade de Pitangueiras – SP.

*“A todos que sofrem e estão sós, dai sempre um sorriso de alegria. Não lhes proporcione apenas os vossos cuidados, mas também o vosso coração”.*

(Madre Tereza de Calcutá)

## **DEDICO**

A minha irmã Tânia (*in memorian*) que me ensinou a nunca perder a fé e nem desistir, sempre mostrou que na vida temos que persistir ser corajosos e fortes para levantar e continuar a caminhada, mesmo quando houver contratempos.



## AGRADECIMENTO

Á Deus, pela proteção que me foi prestada durante toda a minha vida; por ter me amparado nos momentos difíceis, não permitindo que me afastasse de meus ideais. E confiando Nele é possível realizar todos nossos sonhos, com fé e perseverança na sua infinita misericórdia.

Aos meus pais Lourival (*in memorian*) e Solange por estarem sempre comigo, apoiando e ensinando o melhor caminho a seguir na busca dos meus objetivos. Às minhas irmãs Tânia (*in memorian*), Sandra e Diana que sempre estiveram presentes nos diversos momentos da minha vida e compreenderam minha ausência em vários momentos.

Ao César, meu companheiro e verdadeiro amigo, pela paciência, apoio, atenção e carinho em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Everlon Cid Rgobelo, pela dedicação com que me acolheu e me orientou; minha sincera gratidão e amizade.

Ao Luiz Carlos Assis, pelos ensinamentos, por ser esse grande amigo que levarei pela vida, pelo apoio e confiança, por sua paciência, conselhos e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo pelo apoio, troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração, vocês foram essenciais nessa caminhada.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial á secretária Edna que sempre foi acolhedora e prestativa.

A Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Jaboticabal, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e a Capes pela concessão de bolsa durante o curso.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 <i>Eucalyptus spp.</i> .....	03
2.2 Funções do Fósforo.....	05
2.3 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP).....	07
2.4 Micro-organismos solubilizadores de Fósforo.....	10
2.4.1 <i>Azospirillum brasilense</i> .....	10
2.4.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	11
3 OBJETIVOS.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Tratamentos e Delineamento Experimental.....	14
4.2 Seleção de isolados bacterianos solubilizadores.....	15
4.3 Análise taxonômica do DNAr 16 S.....	16
4.4 Avaliação das características das plantas.....	17
4.5 Avaliação dos parâmetros do solo.....	18
4.5.1 Número Total de Bactérias.....	18
4.5.2 Determinação da umidade e matéria orgânica do solo.....	18
4.6.3 Determinação do fósforo no solo.....	19
4.6.4 Determinação do fósforo na planta.....	19
4.6 Análise dos Dados.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6 CONCLUSÃO.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## ***Azospirillum brasilense* E *Bacillus subtilis* SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO EM MUDAS DE EUCALIPTO.**

**RESUMO** - Para um bom desenvolvimento e produtividade a cultura de eucalipto exige, principalmente nos primeiros estágios do seu desenvolvimento, grande quantidades de fósforo (P), que é um nutriente essencial para o metabolismo do eucalipto, sua ausência afeta o desenvolvimento comprometendo sua produtividade. Devido à baixa disponibilidade desse nutriente nos solos brasileiros, altas doses de adubos fosfatados são utilizadas a fim de suprir a necessidade nutricional da planta, o que não obtém sucesso, devido à precipitação e combinação com as partículas do solo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* em solubilizar fósforo para mudas de eucalipto no período inicial do seu desenvolvimento. As mudas foram replantadas em vasos e receberam os inóculos em três doses, sendo 1ml, 10ml e 20ml na concentração  $1 \times 10^7$ . Após o plantio as mudas foram aspergidas diariamente com água e permaneceram em condições ambientais, sendo avaliadas nos períodos de 40 e 70 dias após o plantio. Comparando os parâmetros de crescimento das mudas de eucalipto e os períodos de avaliação, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. O número de bactérias totais variou entre tratamentos e períodos, mas não se verificou aumento significativo quando comparados ao controle. As concentrações de fósforo solúvel no solo, não apresentaram diferenças significativas entre si, os tratamentos que receberam os inóculos bacterianos apresentaram concentrações de fósforo no solo semelhantes quando comparados ao controle. As quantidades de fósforo nas folhas variaram entre os tratamentos e controle, e não verificou aumento nas concentrações entre os tratamentos. Os resultados sugerem que a inoculação do *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* solubilizadores de fósforo no período inicial de desenvolvimento da cultura de eucalipto não apresentaram diferenças entre os tratamentos e as doses, embora não apresentassem uma promoção no crescimento das plantas, as concentrações de fósforo mostraram-se semelhantes ao controle.

**Palavras- Chave:** Crescimento vegetal; rizobactérias; plantas perenes.

## **AZOSPIRILLUM BRASILENSE AND BACILLUS SUBTILIS PHOSPHORUS SOLUBILIZING IN EUCALYPTUS SEEDLINGS.**

**ABSTRACT** - For a good development and productivity the eucalyptus crop demands, mainly in the early stages of its development, great amounts of phosphorus (P), which is an essential nutrient for the metabolism of eucalyptus, its absence affects the development compromising its productivity. Due to the low availability of this nutrient in Brazilian soils, high doses of phosphate fertilizers are used in order to supply the nutritional need of the plant, which is not successful due to precipitation and combination with the soil particles. The objective of the present study was to evaluate the activity of the bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus subtilis* in solubilizing phosphorus for eucalyptus seedlings in the initial period of its development. The seedlings were replanted in pots and inoculated in three doses, being 1ml, 10ml and 20ml in the 1x10<sup>8</sup> concentration. After planting the seedlings were sprayed daily with water and remained in environmental conditions, being evaluated in the periods of 40 and 70 days after planting. Comparing the growth parameters of eucalyptus seedlings and the evaluation periods, there were no significant differences between treatments. The number of total bacteria varied between treatments and periods, but there was no significant increase when compared to the control. The concentrations of soluble phosphorus in the soil did not present significant differences among them, the treatments that received the bacterial inocula had similar concentrations of phosphorus in the soil when compared to the control. The amounts of phosphorus in the leaves varied between the treatments and control, and did not verify increase in the concentrations between the treatments. The results suggest that the inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus subtilis* phosphorus solubilizers in the initial period of development of the eucalyptus crop showed no differences between the treatments and the doses, although they did not present a promotion in the growth of the plants, if similar to the control.

**Keywords:** Plant growth; rhizobacteria; perennial plants.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do eucalipto é considerada de importância social, ambiental e econômica, sua produção abastece diversos segmentos industriais, tais como, papel e celulose, madeira, carvão vegetal, óleos essenciais entre outros. Sua fácil adaptação permitiu seu desenvolvimento por todo território brasileiro, onde são encontradas hoje aproximadamente mil espécies que ocupam cerca de sete milhões de hectares. (IBÁ, 2017).

O eucalipto exige grandes quantidades de fósforo (P), principalmente nos primeiros estágios do seu desenvolvimento. O P é um importante macronutrientes para o crescimento biológico, desenvolvimento e metabolismo vegetal, sua composição participa diretamente na respiração, fotossíntese, reprodução e energia, sua ausência se torna crucial, de modo que a planta não se recupera (SOUSA, 2010; FINGER, 2002). Podendo ser encontrado nas formas de fósforo orgânico (Po) e fósforo inorgânico (Pi), que se movimenta por difusão. Poucas quantidades são encontradas disponíveis nos solos brasileiros, por esse fator, altas doses de adubação mineral são utilizadas a fim de suprir as necessidades nutricionais das plantas, porém nem sempre essa alternativa é satisfatório, isso devido á presença de grande quantidade de óxido de alumínio (Al), ferro (Fe) e cálcio (Ca) que se combina com os ânions de fosfato, fazendo com que fique precipitado nas partículas do solo de modo que a planta não consegue assimilar o nutriente (MASSENSINI, 2007; BARROTI & NAHAS, 2000).

Uma maneira de se diminuir os impactos ambientais negativos decorrentes do uso contínuo de fertilizantes minerais e defensivos agrícolas é o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Elas constituem a microbiota do solo e estão localizados na rizosfera, vivem em simbiose direta com a planta, proporcionando nutrientes que a planta necessita quando não estão disponíveis no solo, facilitando a absorção dos nutrientes e promovendo o crescimento da planta (MASSENSINI, 2007; SOUCHIE & ABBOUT, 2007). Estes

efeitos benéficos sobre as plantas podem ser alcançados pela interação direta entre as RPCP e seus hospedeiros, e ocorrem também indiretamente devido as suas atividades antagônicas contra os patógenos de plantas. Os micro-organismos desempenham um papel central no ciclo natural do fósforo. Este ciclo ocorre por meios de oxidação cíclica e redução dos componentes do fósforo, onde reações de transferências de elétrons entre os estágios de oxidação iniciam-se em fosfina (-3) a fosfato (+5), (SWARNALAKSHMI et al., 2013).

As espécies de *Azospirillum* são consideradas fixadoras de nitrogênio (N) de vida livre que proporciona melhores condições de sobrevivência e desenvolvimento para os micro-organismos da microbiota do solo, essa espécie bacteriana a partir da fixação do nitrogênio, produzem substâncias capazes de promover o crescimento das plantas, elas modificam a morfologia do sistema radicular capacitando melhor absorção dos nutrientes pouco móveis no solo, como exemplo o fósforo. As espécies de *Bacillus* compõem a microbiota do solo e possuem capacidade de solubilização de fósforo, aumentam o sistema radicular das plantas e possuem características peculiares que as permite sua adaptação á ambientes adversos com desenvolvimento de endósporos. Essas espécies têm sido utilizadas em diversas culturas como alternativa de aumentar a produção com menores custos sem afetar o ambiente. (NOVAKOWISKI et al., 2001; VORPAGEL, 2010).

Os micro-organismos promotores de crescimento vegetal podem ser utilizados a fim de diminuir o uso de adubos minerais sem afetar a produtividade da cultura e a fertilidade do solo, reduzindo altos custos ao consumidor e realizando uma atividade ecologicamente correta ao ecossistema. Esse grande avanço biotecnológico é possível com o micro-organismo, planta e condições ambientais corretas.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade das bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* com capacidade de solubilização de fósforo em mudas de eucalipto nos primeiros estágios do seu desenvolvimento.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Eucalyptus* spp

O Eucalipto (*Eucalyptus* spp) é uma espécie arbórea pertencente à família das Mirtáceas. Sua origem é natural da Austrália, Tasmânia e ilhas da Oceania. Classificado como cultura perene, seu ciclo de produção é de aproximadamente oito anos, adaptável ao clima tropical seu desenvolvimento e adaptação se expandiu por toda América do Sul, desde então vêm se destacando por sua ampla diversidade de espécies e finalidades produtivas (MARRA et al., 2012; IBÁ, 2017).

Em 1903 o eucalipto foi introduzido no Brasil pelo Engenheiro Agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, com o projeto criação de Hortos Florestais, o objetivo era pesquisar qual espécie florestal melhor se adaptaria ao reflorestamento das áreas nativas, que foram derrubadas para construção da ferrovia e para produção de madeira e carvão para a construção da estrada (MARTINI, 2004). Hoje o Brasil ocupa a segunda posição mundial de área cultivada com eucalipto, destacando os estados de São Paulo e Minas Gerais, com uma produtividade média de 39 m<sup>3</sup>/ha/ano, sendo reconhecidas hoje aproximadamente mil espécies que ocupam cerca de 7,84 milhões de hectares em todo território brasileiro, sua produtividade possui diferentes finalidades, tendo como as principais, a produção de madeira, papel e celulose, carvão vegetal entre outras, tornando a cultura de grande importância econômica nacional (ABRAF, 2013; MOREIRA & ARAUJO, 2013; IBÁ, 2017).

O eucalipto tem sido uma cultura utilizada principalmente para produção de madeira. A utilização da madeira e a busca por sua qualidade têm ganhado destaque e importância econômica no setor florestal, com isso, o interesse se relaciona com a estrutura e o desenvolvimento das plantas, o que permite selecionar espécies melhores em relação à estrutura da madeira (TUNG et al., 2010).

Com as inovações na biotecnologia, o melhoramento genético vem ganhando destaque na utilização com espécies de eucalipto, o que contribui

significativamente para a silvicultura no país. A produção de madeira, papel e celulose, são as atividades que mais contribuem para obtenção de híbridos geneticamente modificados, essa técnica possibilita selecionar características desejáveis e obtenção de espécies resistentes a doenças e com capacidade de adaptação em diferentes habitats. Isso é possível com a utilização de híbridos, que se dá, através da variabilidade genética natural por meio da obtenção do material genético ideal para ser utilizado em melhorar a matéria-prima (CRISTINA, 2004; SANTOS et al., 2008; TUNG et al., 2010).

O híbrido de *Eucalyptus grandis* com *Eucalyptus urophylla* geneticamente modificado, denominado por Urograndis (H13), é hoje um dos clones mais utilizado no plantio de eucalipto, devido apresentar uma densidade da madeira melhor em relação às espécies que o originou, possibilitando maior produção para celulose. Esse clone apresenta um melhor rendimento e adaptação em condições ambientais diversas e maior resistência a patógenos (BRAGA, 2008; SOUZA, 2008).

Mesmo com as técnicas de melhoramento, os híbridos necessitam de atenção à sua nutrição e desenvolvimento. É nos primeiros estágios do ciclo inicial, que a planta necessita de grandes quantidades de nutrientes para realizar sua atividade metabólica e se desenvolver, essa função é dada as raízes finas e longas que compõem o sistema radicular do eucalipto, são elas que absorvem maiores quantidades de nutrientes, principalmente o fósforo, que após absorvido, auxilia na formação do sistema radicular tornando-o eficiente na assimilação dos nutrientes que a planta necessita, portanto, a ausência do P afeta todo o processo de desenvolvimento da planta, de modo que ela não se recupera (LARCHER, 2000; DIAS, 2016).

Para uma boa produtividade ser atingida, é necessário atenção aos nutrientes requeridos pela cultura, a fim de que a planta não demonstre sinais de deficiência, os principais macronutrientes responsáveis pelo desenvolvimento do vegetal são o nitrogênio (N), potássio (K) e o fósforo (P) (FINGER, 2002). O eucalipto necessita de uma boa profundidade e pouca umidade para que o desenvolvimento radicular não seja afetado, outro fator de relevância é o manejo do solo, que deve ser conduzido de maneira correta e eficaz, principalmente na



preparação para o plantio e após com correção dos nutrientes escassos, a fim de elevar sua produtividade (BRISOLA & DEMARCO, 2011).

A utilização de fosfatos naturais está sendo um recurso utilizado pelos produtores a fim de diminuir custos com adubação fosfatada. Porém, os fosfatos naturais reagem no solo lentamente, mostrando eficiência em longo prazo, quando não precipitado nas partículas do solo (DIAS, 2016). A utilização de micro-organismos promotores de crescimento vegetal, com capacidade de solubilizar os fosfatos naturais, pode ser um método utilizado para disponibilizar o fósforo que a planta necessita para seu desenvolvimento, sem elevar o custo ao produtor.

## **2.2. Funções do Fósforo**

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o crescimento biológico e desenvolvimento dos organismos, sendo de extrema importância para o metabolismo vegetal, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta. Sua composição participa diretamente nas estruturas de macromoléculas, como membranas celulares, carboidratos e ácidos nucleicos. Participa na ativação enzimática e na produção de energia (ATP), sendo responsável também pela síntese de celulose e sacarose nas plantas entre outras funções. Sua ausência se torna crucial, de modo que a planta não se desenvolve (FINGER, 2002; SOUSA, 2010; TAIZ & ZEIGER, 2013).

As plantas mostram sintomas visíveis quando estão com deficiência de fósforo, surgindo principalmente nas folhas, isso devido à mobilidade de P nos tecidos, no eucalipto, as folhas que apresentam deficiência, começa pelas mais velhas que se tornam verdes escuras para roxa e com pontos escuros ao longo do limbo foliar, e dependendo do nível de deficiência chegam à necrose (SILVEIRA et al., 2000).

O fósforo pode ser encontrado no solo de duas formas, na forma orgânica (Po) que são originados da atividade e decomposição de micro-organismos e resíduos vegetais, constituindo a maior parte do fósforo no solo, e na forma inorgânica (Pi) que é compreendida pelo íon de fosfato na solução do solo (P-solução) que se precipitam ao  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e se absorvem oxi-hidróxidos de Al e Fe, argilas e minerais fosfatados (MARTINAZZO et al., 2007; GATIBONI et al., 2013).

De modo geral, o fósforo presente nos solos apresentam aproximadamente níveis de 400 a 1200  $\text{mg.kg}^{-1}$  de solo, sendo apenas 1% disponível para planta. Isto é, a maior quantidade de fósforo encontrada nos solos brasileiros encontra-se em baixa disponibilidade. Devido a esse fator, altas doses de adubos minerais fosfatados são utilizadas para obtenção de maiores picos na produtividade (ALVES et al., 2002; SOUCHIE & ABBOUT, 2007; SOUSA, 2010). A consequência, é que grande parte dessa aplicação realizada em solos tropicais, fica retida no solo, tornando-se pouco disponível para a planta (NOVAIS & SMYTH, 1999; BARROTI & NAHAS, 2000; MASSENSINI, 2007).

As soluções de P no solo variam de acordo com o pH e podem ser encontradas em várias formas aniônicas, as formas  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  e  $\text{HPO}_4^{-2}$  apresentam melhor forma de absorção pelas células da planta. Após absorção, cerca de 90% de P é incorporado aos compostos orgânicos nas formas de uridina fosfato e hexose fosfato (Figura 1) (MARSCHNER, 1995).

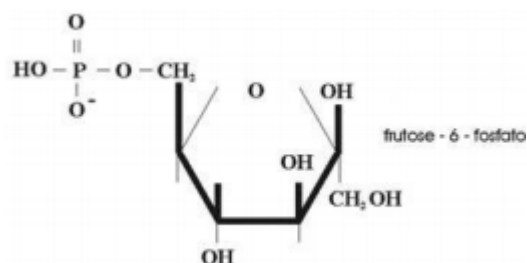


Figura 1 – Molécula da frutose-6-fosfato com presença de fósforo após ser incorporado. Fonte: Mengel & Kirkby (2001).

A maior reserva de fósforo são as rochas, esses fosfatos naturais são constituídos por grupos como apatita, hidroxiapatita e oxiapatita. Essas formas são encontradas como parte da estrutura da rocha e sua principal característica é sua insolubilidade. Apesar disso, eles constituem a maior reserva desse elemento no solo, porque, sobre apropriadas condições, elas podem ser solubilizadas e se tornam disponíveis para assimilação das plantas e aos micro-organismos para realização metabólica. (FERNÁNDEZ et al., 2011). Os fosfatos naturais são utilizados como matéria-prima para fabricação de fertilizantes fosfatos, que recebem tratamento industrial com ataque sulfúrico, originando o superfosfato simples, que apresenta alta solubilidade em água, tornando-se prontamente disponível para planta (DIAS, 2016).

A cultura de eucalipto apresenta ciclo reprodutivo de aproximadamente oito anos, a disponibilidade de fósforo liberada pelo fosfato natural supriria as necessidades da planta ao longo prazo, e que com o passar do tempo seria compatível ao exigido pela cultura. Portanto, a necessidade exigida de P nos períodos iniciais do eucalipto é alto, o que faz necessária aplicação de fosfatos solúveis ou a disponibilidade imediata dos fosfatos naturais (CHIEN et al., 2011; DIAS, 2016).

Os micro-organismos desempenham um papel central no ciclo natural do fósforo, possuem a capacidade de produzir ácidos orgânicos geradores de H<sup>+</sup> capazes de dissolver diretamente o fósforo inorgânico. Este ciclo ocorre por meios de oxidação cíclica e redução dos componentes do fósforo, onde reações de transferência de elétrons entre os estágios de oxidação iniciam-se em fosfina (-3) a fosfato (+5) (OHTAKE et al., 1996; SWARNALAKSHMI et al., 2013).

### **2.3. Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP)**

O termo rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) foi utilizado pela primeira vez por Kloepper & Schroth (1978) para descrever bactérias de solo que colonizavam a rizosfera das plantas, crescendo dentro ou ao redor dos

tecidos das plantas estimulando seu crescimento por diversos mecanismos. A rizosfera é uma fina área de solo circundando a área da raiz que é imensamente influenciada pelo sistema radicular (HARTMAN et al., 2008). Comparado com a massa vizinha de solo, esta área é rica em nutrientes, devido à acumulação de uma grande variedade de componentes orgânicos liberados pelas raízes através dos exsudatos, secreção e rizodeposição. Estes componentes orgânicos podem ser usados como fontes de carbono e energia pelos micro-organismos e a atividade microbiana é particularmente intensa na rizosfera. As rizobactérias benéficas, que influenciam positivamente o crescimento das plantas, são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (CHAUHAN et al., 2015).

Alguns estudos verificaram *in vitro* algumas características de rizobactérias tais como: síntese de fitormônios (RASHEDUL et al., 2009; ABBASI et al., 2011); como as auxinas (KHALID et al., 2004); síntese de sideróforos (FILIPPI et al., 2011); solubilização de fósforo (TAJINI et al., 2012; KREY et al., 2013); ou fixação de nitrogênio (RIGGS et al., 2001; FICSHER et al., 2007).

Estas características foram usadas para isolar as RPCP diretamente das rizosferas e para selecionar suas atividades de promoção de crescimento em plantas, sob condições axênicas. Uma vez que os micro-organismos candidatos a RPCP se mostraram promissores no crescimento de plantas em condições controladas, eles foram em seguida usados como inoculantes para plantas cultivadas em condições naturais em parcelas e/ou ensaios de campo (FICSHER et al., 2007).

Os benefícios para as plantas hospedeiras provenientes das interações com as RPCP têm sido mostrados incluindo a saúde e crescimento, supressão de doenças causadas por micro-organismos e aceleração da disponibilidade de nutrientes e assimilação (MANTELIN & TOURAINE, 2004; YANG et al., 2009). Estes efeitos benéficos sobre as plantas podem ser alcançados pela interação direta entre as RPCP e seus hospedeiros, e ocorrem também indiretamente devido as suas atividades antagônicas contra os patógenos de plantas.

A direta estimulação inclui diversos mecanismos tais como: a produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC - deaminase) para reduzir os níveis de etileno nas raízes das plantas em desenvolvimento; produção de reguladores de crescimento de plantas como auxinas, giberelinas e substâncias voláteis; fixação do nitrogênio simbiótico; solubilização de minerais como o fósforo e outros nutrientes. A estimulação indireta está relacionada ao biocontrole, por meio de atividades antagônicas contra micro-organismos fitopatogênicos, incluindo as respostas de resistência sistêmica da planta, interferindo no sistema de *Quorum Sensing* (QS) bacteriano. Alguns estudos mostram que as RPCP podem usar mais do que um desses mecanismos para a promoção do crescimento das plantas (BASHAN & HOLGUIN, 1997; AHMAD et al., 2008).

Os inoculantes microbianos incluem três grandes grupos: (1) fungos micorrízicos arbusculares (FMA), (2) rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e (3) *Rhizobium* fixador de nitrogênio simbiótico. Os benefícios de cada grupo têm sido estudados separadamente (VERNA et al., 2001; MURRAY, 2011). Além disso, vários estudos estão sendo feitos para avaliar os efeitos do crescimento nas plantas aplicando diferentes combinações microbianas ou consórcios, tais como FMA- RPCP, *Rhizobium* fixador de nitrogênio simbiótico- RPCP ou diferentes RPCP (SINGH & KAPOOR, 1999; SWARNALAKSHMI et al., 2013).

Na rizosfera a química e a biologia do solo são influenciadas pelas raízes (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009). Os exsudatos de raízes incluem aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, açúcares, mucilagem e proteínas. A habilidade das rizobactérias para usar os ácidos orgânicos como fontes de carbono está correlacionada com a competência da rizosfera. A estrutura das comunidades microbianas da rizosfera é determinada pelas diferenças de cada espécie de planta. A composição e a maioria dos exsudatos provavelmente afetam as populações microbianas. O entendimento de como as raízes das plantas selecionam os micro-organismos de solo para formar as comunidades da rizosfera é uma importante questão científica quando se considera o uso de rizobactérias como promotoras de crescimento de plantas (DROGUE et al., 2012).

## 2.4. Micro-organismos Solubilizadores de Fósforo

### 2.4.1. *Azospirillum brasilense*

O *Azospirillum* é um gênero de vida livre encontrado em quase todos os lugares da Terra (HUERGO et al., 2008). Muitos estudos têm mostrado que o *Azospirillum* pode promover o crescimento e o aumento da produtividade em diversas culturas, muitas das quais possuem grande importância agrônômica ou ecológica (BASHAN & HOLGUIN, 1997; BASHAN et al., 2004). Os benefícios promovidos por esse gênero provavelmente são devido a uma associação de fatores.

Os *Azospirillum* produzem fitormônios que promovem o desenvolvimento das raízes aumentando a absorção de água e capacitando uma melhor absorção dos nutrientes pouco móveis no solo, como exemplo o fósforo (VORPAGEL, 2010), tornando assim as plantas mais resistentes aos estresses ambientais, resultando em plantas mais vigorosa e produtiva (DOBBELAERE et al. 2001; BASHAN et al. 2004). Em adição, o *Azospirillum* promove a fixação do nitrogênio atmosférico se associando a diversas culturas de gramíneas ou plantas não leguminosas, o que auxilia indiretamente na disponibilidade do fósforo para planta, devido à capacidade de maior exploração do solo pelas raízes, e melhores condições para o desenvolvimento e atividade metabólica da população microbiana presente na rizosfera (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). Contudo, diversas espécies têm sido utilizadas em diversas culturas como alternativa aumentar a produção com menores custos, sem afetar o ambiente (REIS, 2007; NOVAKOWISKI et al., 2011).

Inoculantes contendo *Azospirillum* têm sido testados em condições de campo em importantes culturas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, com diversos graus de respostas (DOBBELAERE et al., 2001). Em alguns estudos foram realizadas associações entre o *Azospirillum* e outros micro-organismos (GONZALEZ & BASHAN, 2000). Entretanto, na grande maioria dos experimentos os inoculantes têm sido preparados somente com o *Azospirillum*. Em testes com

cereais, foi obtido como resultado um aumento significativo da produtividade, em relação à promoção e disponibilidade dos macronutrientes fósforo e nitrogênio (FERNANDEZ CANIGIA, 2008). Castellanos et al., (2000) em um estudo com bactérias promotoras de crescimento em eucalipto, comprovou a associação de *Azospirillum sp*, incluindo o *Azospirillum brasilense*, com a cultura, onde a espécie realizou a produção de ácido indolacético (AIA) e redução de acetileno (ARA).

O ponto chave do sucesso com a inoculação de *Azospirillum* é a escolha do isolado e sua interação com a cultura, diversas culturas tem mostrado uma interação com *Azospirillum*, incluindo a cultura de eucalipto.

#### **2.4.2. *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* é uma espécie pertencente à microbiota do solo possuindo capacidade de interagir com diferentes plantas, podendo multiplicar-se em diferentes rizosfera por estabelecimento do rizopiano, filopiano e tecidos internos (CAMPOS SILVA et al, 2008). Essa bactéria possui respostas adaptativas desenvolvendo capacidades como motilidade e formação de endósporos, transformação do DNA exógeno, produção de enzimas e antibióticos (HENRIQUES & MORAN, 2000). Como resposta simbiótica com a planta, o *Bacillus* melhora o sistema radicular da planta proporcionando maior sensibilidade à absorção dos nutrientes (MANJULA & PODILE, 2005).

O gênero *Bacillus* tem grande importância agrícola, sua interação simbiótica proporcionam ações benéficas às plantas como aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo (KLOEPPER, 1999), vários estudos relatam a utilização de *Bacillus*, como produtores de hormônios com capacidade de produzir efeitos deletérios nas plantas (KARADENIZ et al., 2006), capacidade de proporcionar ganhos na nutrição mineral (ARAUJO, 2008), ação de biocontrole e aumento na produtividade (YAO et al., 2006), produção de metabólicos tóxicos que afetam nematoides (ARAUJO et al., 2005), e ação de solubilização de fosfatos minerais (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999).

Assim como para espécies de *Azospirillum*, o sucesso para utilização de *Bacillus* é dependente da escolha do isolado com as características da rizosfera da

planta. Estudos realizados por Mafia et al., (2007) comprovam a interação de *Bacillus* com a cultura de eucalipto, onde a espécie produziu um melhor desenvolvimento do sistema radicular e biomassa, proporcionando melhor crescimento e disponibilidade de nutrientes quando testados em mudas de eucalipto.



### 3. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade das bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* com capacidade de solubilização de fósforo em mudas de eucalipto no primeiro estágio do seu desenvolvimento

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Microbiologia de Solo, pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/FCAV.

### 4.1 Tratamentos e Delineamento Experimental

Foram obtidas mudas de *Eucalyptus Urograndis* (H13), procedentes de Pomares de Sementes Clonais da Empresa Suzano Papel e Celulose S.A. As mudas, com aproximadamente 60 dias após a semeadura, foram retiradas dos tubetes e seu substrato foi extraído realizando a lavagem das raízes em água corrente. Após foram replantadas em vasos com 2,5 L em Neossolo Quartzarênico cuja caracterização química e granulométrica, realizadas no Departamento de Solos e Adubos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), campus de Jaboticabal, encontram-se na Tabela 1.

O solo foi seco à sombra e peneirado, vinte dias antes do plantio das mudas aplicou-se por vaso, 0,05g de carbonato de magnésio e 0,20g de carbonato de cálcio, na forma a elevar a saturação por bases a 60%, juntamente com a correção, aplicou-se e 0,07g de fosfato de rocha, com exceção dos controles que aplicou-se 0,10g de superfosfato simples. Dez dias após o plantio todos os vasos receberam adubação de N e K e micronutrientes, sendo, 30 mg dm<sup>-3</sup> de N, 16 mg dm<sup>-3</sup> de K, 4,98 mg dm<sup>-3</sup> Zn, 0,5 mg dm<sup>-3</sup> B, 0,7 mg dm<sup>-3</sup> de Cu, 1,15 mg dm<sup>-3</sup> Mn, 0,03 mg dm<sup>-3</sup> Mo.

O experimento teve duração de 70 dias, sendo avaliados com 40 dias e 70 dias após o plantio, imediatamente após o plantio, todos os vasos receberam uma muda de eucalipto e na sequência seu respectivo isolado e concentração. O inóculo foi aplicado na superfície próximo às raiz com auxílio de uma pipeta, os vasos foram

identificados e irrigados com água diariamente. O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial, 3x3+2 (três isolados bacterianos, três dose de inoculo, dois controles) com quatro repetições, sendo avaliados 11 tratamentos.

Os tratamentos foram: T1= *Azospirillum brasilense*, dose 1ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T2= *Azospirillum brasilense*, dose 10ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T3= *Azospirillum brasilense*, dose 20ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T4= *Bacillus subtilis* (J310), dose 1ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T5= *Bacillus subtilis* (J310), dose 10ml ( $1 \times 10^7$  UFC) ; T6= *Bacillus subtilis* (J310), dose 20ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T7= *Bacillus subtilis* (E310), dose 1ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T8= *Bacillus subtilis* (E310), dose 10ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T9= *Bacillus subtilis* (E310), dose 20ml ( $1 \times 10^7$  UFC); T10= controle com fosfato de rocha; T11= controle com superfosfato simples.

pH	M.O.	P- resina	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>						
4,7	9	6	0,6	7	3	16	10,6	26,6	40
B	Cu	Fe	Mn	Zn	Argila	Limo	Areia Fina	Areia Grossa	Classe
mg dm <sup>-3</sup>							g kg <sup>-1</sup>		Textural
0,33	0,20	14	0,7	0,2	39	9	605	347	Arenosa

Tabela 1 - Característica química e granulométrica do solo.

#### 4.2. Seleção de isolados bacterianos solubilizadores

Os micro-organismos utilizados no presente estudo foram isolados bacterianos da microbiota do solo de plantio com milho, pertencentes à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Agrícola da FCAV/UNESP campus de Jaboticabal.

Foram repicados aproximadamente 300 isolados, que foram selecionados a partir dos critérios fenótipos de cada colônia como, agrupamento, dimensão da colônia, forma da colônia, elevação, margem ou borda, diferenciação por zona, cromogenese, transparência e odor. Em seguida, foram submetidos ao teste de solubilização de fósforo (P) pelo meio sólido de fosfato de cálcio (NAHAS et al., 1994), as placas foram incubadas à temperatura de 30°C por 120 horas para verificação do surgimento de uma zona clara em volta da colônia, caracterizando os isolados como micro- organismos solubilizadores de P. Após o crescimento dos micro-organismos, foram medidos o tamanho do halo e o tamanho da colônia, o critério utilizado para obtenção do diâmetro do halo foi, diâmetro do halo total (colônia + halo) / diâmetro da colônia. Sendo selecionados os isolados que apresentaram maior formação de halo apresentando diâmetro de halo superior á 1,5mm. Foram selecionadas três cepas bacterianas, identificadas por J310; E310 e a bactéria *Azospirillum brasilense*.

Após a seleção dos isolados, os mesmos foram submetidos à curva de quantificação de fósforo, para avaliar as concentrações de fósforo solubilizadas por cada isolado. Para tal procedimento, foi utilizado o meio de solubilização apresentado por Nahas et al. (1994), suplementado com 5g/L<sup>-1</sup> de Apatita de Araxá. A inoculação das bactérias foi realizada pela transferência de 0,2 mL de suspensão na concentração 1x10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, preparada a partir de culturas de *Azospirillum brasilense* e J310 e E310 crescidas em caldo nutriente (BURNETT et al., 1957), por 24 horas. Após a inoculação, as culturas foram incubadas em estufa BOD à temperatura 30°C por sete dias. Diariamente foram retirados 10 mL de cada suspensão, centrifugando-os a 9000g por 10 minutos e no sobrenadante foi determinado o fósforo solúvel pelo método de Ames (1996).

#### **4.3. Análise taxonômica do DNAr 16 S**

Para identificação dos isolados J310 e E310, os mesmo foram sequencias para análise taxonômica. O DNA bacteriano foi extraído segundo o protocolo do kit

de extração Quick-DNA Universal Kit (Zymo Research). A partir do DNA genômica extraído, para caracterização taxonômica dos isolados a região 16S do DNA ribossomal (rDNA) foi amplificada e sequenciada. A amplificação do rDNA 16S foi realizada em microtubos contendo volume final de reação de 25 µL. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada seguindo o protocolo: 95°C durante 2 minutos, seguidos por 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A verificação da amplificação foi realizada mediante aplicação de alíquotas dos produtos de PCR em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System e sequenciadas em sequenciador automático ABI 3700. As sequências foram editadas utilizando o programa Biological Sequence Alignment Editor – Bio Edit (Hall, 1999) e comparadas com as sequências do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI – Genbank) mediante o uso da ferramenta BLAST® (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências mais similares obtidas no processo de comparação foram utilizadas para a elaboração de árvores filogenéticas com auxílio do software MEGA7® (KUMAR et al., 2016).

#### **4.4. Avaliação das características das plantas**

Nos períodos de 40 e 70 após o plantio, as plantas de eucalipto foram submetidas aos parâmetros de avaliação, altura das plantas, realizadas com auxílio de uma régua; diâmetro do caule, realizada com auxílio de paquímetro. A área foliar por folha, realizada com medidor de área foliar LI-3100, colhendo-se 10 folhas de cada planta de eucalipto.

Para determinação da massa seca das folhas e massa seca das raízes, as plantas foram removidas dos vasos e tiveram suas superfícies totalmente lavadas com água deionizada, após secas naturalmente, foram postas em sacos de papel e armazenadas em estufa de secagem á 70°C por 72 horas, as quantidades de massa seca das plantas foram determinadas.

## **4.5. Avaliação dos parâmetros do solo**

Após os períodos de 40 e 70 dias, após o plantio do eucalipto, alguns parâmetros do solo foram analisados.

### **4.5.1. Número total de bactérias**

Para contagem de bactérias coletou-se 10g do solo fresco de cada vaso e este foi adicionado em um Erleymeyer contendo 90 ml de solução de pirofosfato 1%. Os Erleymeyers foram agitados em a 450 rpm em movimentos circular por 30 minutos. Após a agitação as amostras foram diluídas em séries até  $10^{-8}$  em tubos de ensaio e uma alíquota de 100 $\mu$ l da suspensão foi inoculada para a placa de Petri contendo o meio de cultura Bunt & Rovira (1955). A contagem foi feita em triplicata por amostra. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa B.O.D a 32°C por 72 horas. Após esse período de incubação foi realizada a contagem das colônias bacterianas e o número total de bactérias foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC).

### **4.5.2. Determinação umidade e matéria orgânica do solo**

A umidade do solo foi determinada pela fórmula (peso úmido do solo – peso seco do solo) / pelo peso úmido do solo. Em cadinho de cerâmica pesou-se aproximadamente 10 g de solo fresco, e sequencialmente colocou-os em estufa em 105°C por 24 horas, após os cadinhos foram retirados e depositados em dessecador com sílica, para não reter umidade do ar, e imediatamente realizou-se a pesagem do mesmo para obtenção da umidade do solo. Após a pesagem, os cadinhos contendo

o solo seco, foram levados e colocados em mufla em 550°C por 24 horas, após realizou a pesagem dos cadinhos para determinação da material orgânico (VAN RAIJ et al., 1997).

#### **4.5.3. Determinação do fósforo total do solo.**

As concentrações de fósforo no solo foram determinadas seguindo o procedimento de digestão úmida. O fósforo foi determinado colorimetricamente seguindo a extração por bicarbonato de sódio em pH 8,5 (OLSEN & SOMMER 1982). A quantificação foi realizada utilizando um espectrofotômetro pelo método do ácido ascórbico (WATANABE & OLSEN, 1965).

#### **4.5.4. Determinação do fósforo na planta**

Para efetuar a análise química das folhas, foram coletadas de todas as plantas de eucalipto 10 folhas novas nos períodos de 40 e 70 dias após o plantio. As amostras de folhas foram lavadas em uma solução detergente (0,1 % v/v), enxaguadas em água destilada até à remoção do detergente e enxaguadas em água deionizada. Após a lavagem, as amostras foram colocadas em sacos de papel e secas a 65°C em estufa de ventilação forçada, até a massa constante. Depois de seco, o material foi moído em moinho tipo Wiley, com câmara de aço inoxidável, com peneira de 1 mm de abertura (BATAGLIA et al., 1983). A concentração de fósforo na planta foi mensurada segundo Sarruge & Haag (1974).

#### **4.6. Análise dos Dados**

A análise de variância foi realizada usando o Programa Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos- AgroEstat (2015). O teste de Tukey

( $p \leq 0,05$ ) foi utilizado para comparação entre médias. Também foi realizada a correlação linear simples entre as variáveis ( $r$ ), aplicando-se o teste T nos níveis de 5 e 1% de probabilidade.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como critério de escolha, foi selecionado três isolados que apresentaram maior formação de halo, onde o diâmetro do halo foi superior a 1,5 mm, sendo os isolados J310, E310 e *Azospirillum brasilense*. Devido ao potencial de solubilização de fosfato ser proporcional ao tamanho do halo e relação com o tamanho da colônia (SOUCHIE et al., 2005). De acordo com análises taxonômicas dos isolados J310 e E310, as árvores filogenéticas demonstrando as características similares pertencentes à família *Bacillus subtilis*, de acordo como se agrupam com os filós e classes aos quais pertencem (Figura 2 e 3).

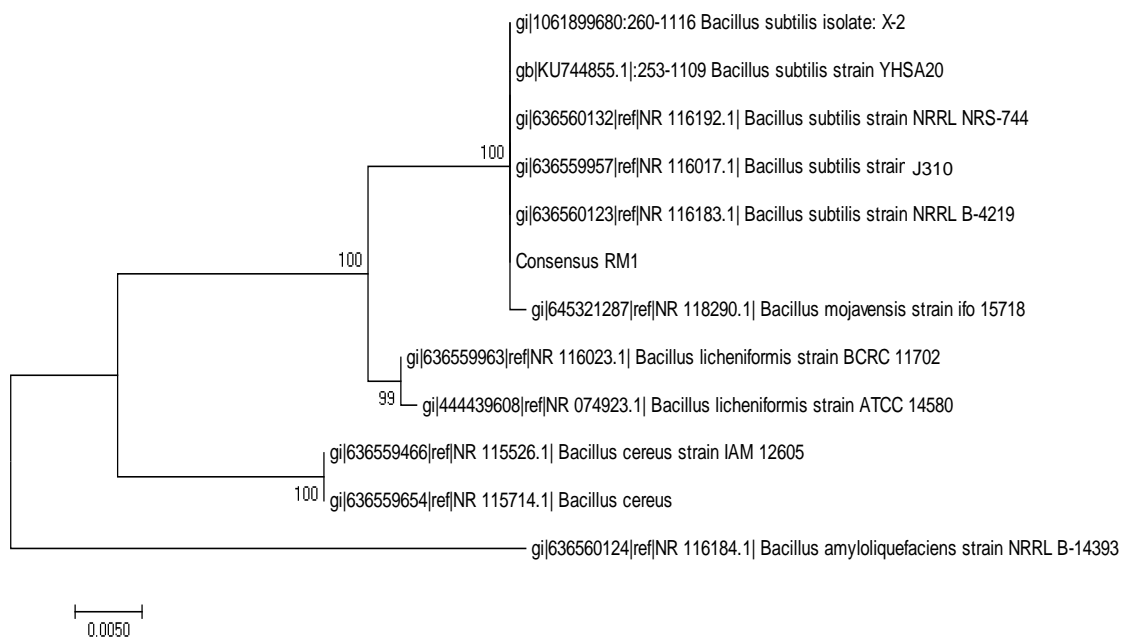


Figura 2 - Árvore filogenética do isolado J310, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria.

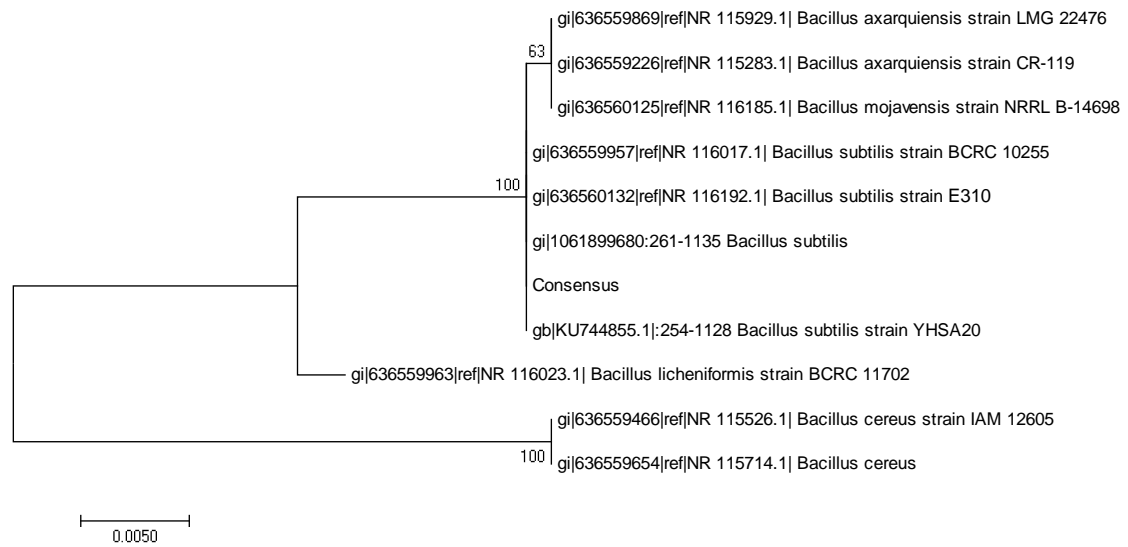


Figura 3 - Árvore filogenética do isolado E310, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria.

Embora os isolados J310 e E310 serem da mesma espécie *Bacillus subtilis*, eles são diferentes e possuem capacidade de solubilização de P diferentes (Figura 4). A quantidade de fósforo solubilizado pela bactéria *A. brasilense* foi menor comparado com as outras duas bactérias testadas. (Figura 5).

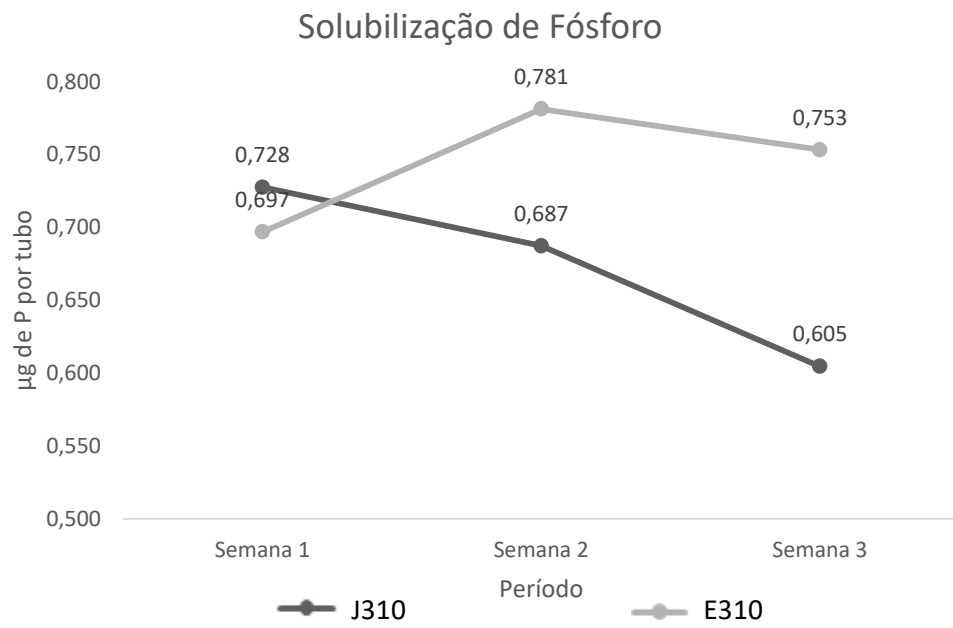


Figura 4 - Solubilização de fósforo em fosfato de rocha em condições de tubo de ensaio dois isolados de *Bacillus subtilis* em três períodos

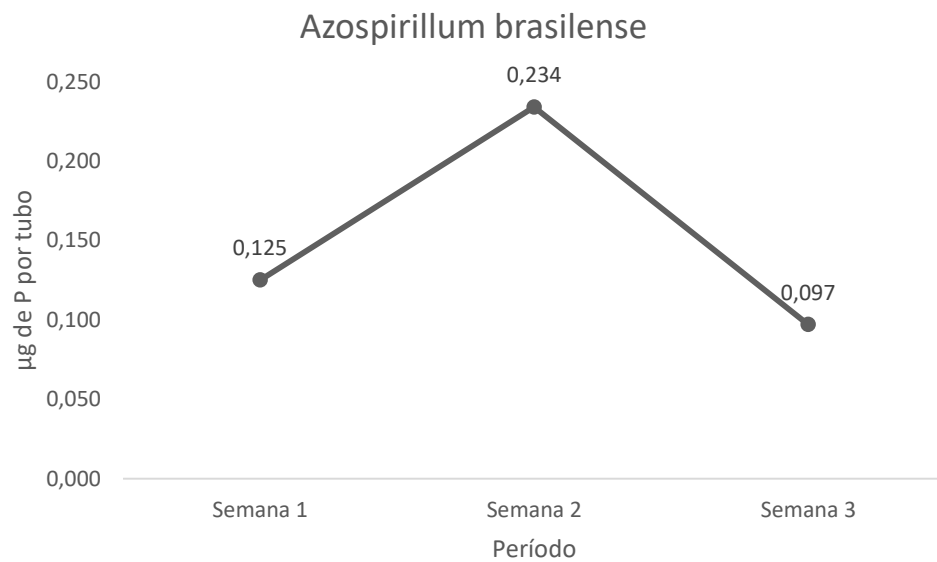


Figura 5. Solubilização de fósforo em fosfato de rocha realizada pela bactéria *Azospirillum brasilense* em relação ao tempo de incubação em condições de tubo.

A bactéria *Azospirillum brasilense* solubilizou uma quantidade inferior de fósforo comparada com *Bacillus subtilis* (J310 e E310). A bactéria *Azospirillum brasilense* possui capacidade de promover o crescimento vegetal não apenas com a solubilização de fósforo, mas com mecanismos como o de fixação biológica do nitrogênio, enquanto a bactéria *Bacillus subtilis* é considerada com grande potencial de solubilização de fósforo. Yang et al. (2009) em estudos realizados com *Azospirillum* comprovaram que ao fixar o nitrogênio biológico para a planta, houve um aumento significativo do sistema radicular, melhorando a absorção de nutrientes pouco moveis, como o fósforo. Já estudos realizados pelas SILVA (2014) relata que a maior capacidade de solubilização de fósforo foi observada em meio de fosfato de cálcio por isolado de *Bacillus*, solubilizando cerca de 67% de P, o que possibilitou assimilação do nutriente pela planta, através da disponibilidade pelo micro-organismo.

Em relação aos parâmetros das plantas, quando comparadas à altura (cm) das plantas de eucalipto no período 40 dias após o plantio, os resultados apresentaram pequena variação entre os tratamentos (Figura 6). A altura entre os tratamentos variaram entre 19,82cm a 13,45cm. O tratamento 11 apresentou melhor altura (19,82 cm), seguindo dos tratamentos 1 (19,12 cm), tratamento 5 (18cm), tratamento 6 (17,50 cm), tratamentos 10 e 7 (16,62 cm), tratamentos 4 e 3 (16,57 cm), tratamento 2 (15,12 cm), tratamento 9 (14,87 cm) e tratamento 8 (13,45 cm).

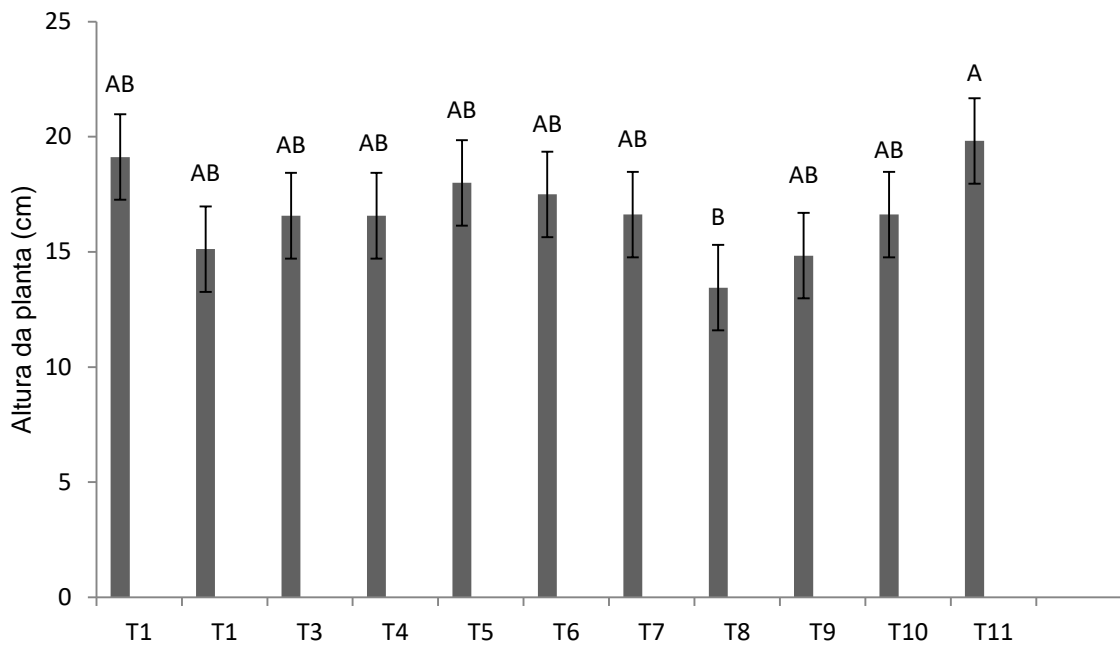


Figura 6 – Altura das plantas (cm) avaliadas no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para a altura das plantas no período de 40 dias após o plantio o tratamento 11 controle, que recebeu o superfosfato simples, apresentou melhor crescimento quando comparado aos demais tratamentos, enquanto o tratamento 8 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 10ml, apresentou menor crescimento. Os demais tratamentos não mostraram diferenças com os controles, sugerindo assim que as bactérias atuaram de forma semelhante aos controles em relação ao crescimento das plantas de eucalipto.

No período de 70 dias após o plantio, as diferenças variaram entre 25,37cm a 19,50cm (Figura 7). Seguindo o tratamento 8 (25,37 cm), tratamento 11 (25cm), tratamento 1 (24,75 cm), tratamento 2 (24,12cm), tratamento 9 (23,62 cm), tratamentos 6 e 3 (23,12 cm), tratamento 4 (22,87 cm), tratamento 7 (22,85 cm), tratamento 5 (22,85 cm) e tratamento 10 (19,50 cm).

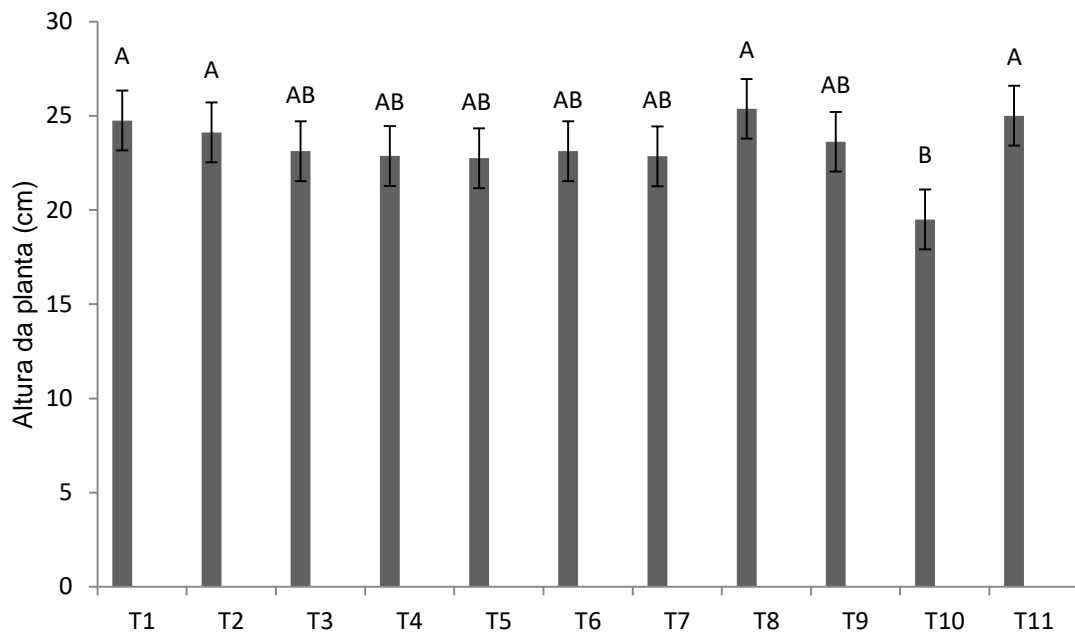


Figura 7 – Altura das plantas (cm) avaliadas no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

Após 70 dias do plantio, os tratamentos que apresentaram melhor crescimento foram os tratamentos 8 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 10ml, tratamento 11 controle, que recebeu o superfosfato simples, tratamento 1 que recebeu *Azospirillum brasilense* na concentração  $1 \times 10^7$  com 1ml, e tratamento 2 que recebeu *Azospirillum brasilense* na concentração  $1 \times 10^7$  com, 10 ml. Enquanto o tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inoculo, apresentou um crescimento inferior aos demais tratamentos. Os tratamentos 3, 4, 5, 6, 7 e 9 apresentaram um crescimento semelhante ao controle, o que sugere fortemente que as bactérias após 70 dias do plantio apresentaram atividade de solubilização de fósforo semelhante ao controle, promovendo crescimento nas mudas de eucalipto.

Comparando os períodos de 40 e 70 dias após o plantio de eucalipto, com relação a crescimento das mudas no parâmetro de altura (cm), as atividades dos tratamentos que receberam o inoculo foram semelhantes aos controles. Medeiros et al. (2016) ao avaliar a altura de dois clones de eucalipto com aplicação de 80g do

adubo superfosfato simples em vasos de 8L, avaliados em 60 dias após o plantio, observaram um crescimento de 21,33 cm para clone CNB001 e 26,67cm para o clone CBN016. Esses dados são semelhantes aos obtidos nesses estudos, comprovando a ação dos micro-organismos.

O parâmetro do diâmetro do caule (cm) no período de 40 dias após o plantio, a variação em cada tratamento foi pequena, as médias variaram de 2,70 cm a 1,84 cm (Figura 8). Seguindo o tratamento 11 (2,70 cm), tratamento 7 (2,52 cm), tratamentos 5 e 1 (2,38 cm), tratamento 6 (2,30 cm), tratamento 9 (2,20 cm), tratamentos 4 e 3 (2,18 cm), tratamento 2 (2,14 cm), tratamento 10 (1,99 cm) e tratamento 8 (1,84 cm).

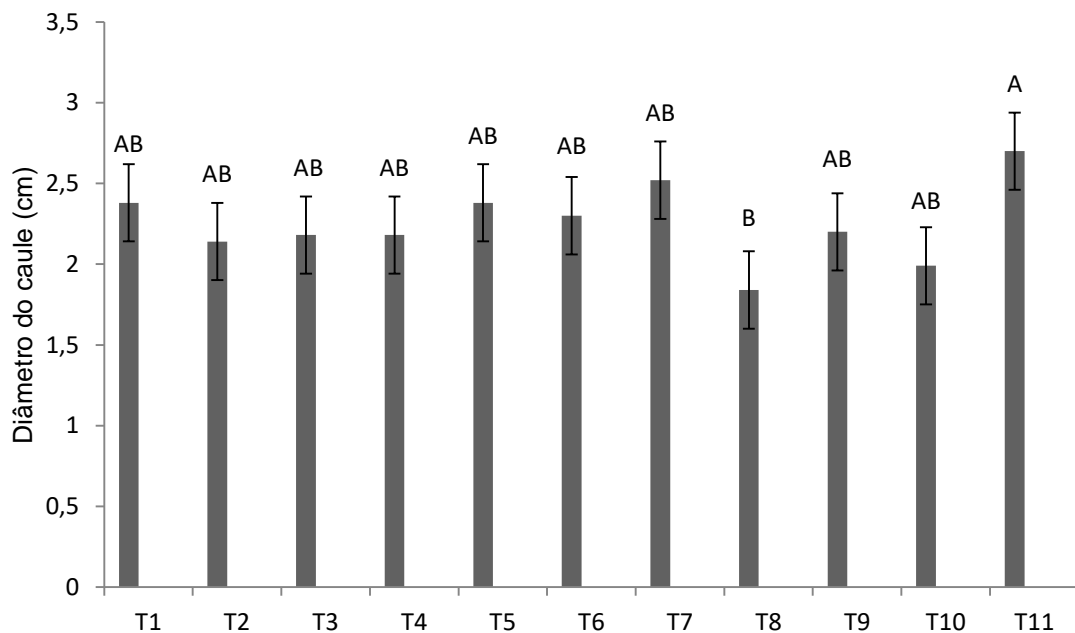


Figura 8 – Diâmetro do caule (cm) avaliado no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

No período de 40 dias após o plantio, o tratamento 11 controle, que recebeu o superfosfato simples, apresentou-se com melhor diâmetro do caule, enquanto o tratamento 8 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 10ml apresentou-se com um diâmetro do caule inferior aos demais tratamentos.

Com 70 dias após o plantio, a média do diâmetro do caule (cm) apresentou pequenas variações de 4,08cm a 2,92cm, entre os tratamentos (Figura 9). Seguindo o tratamento 11 (4,08 cm), tratamento 8 (3,60 cm), tratamento 6 (3,57 cm), tratamento 1 (3,56 cm), tratamento 4 (3,46 cm), tratamento 9 (3,40 cm), tratamento 5 (3,35 cm), tratamento 10 (3,27 cm), tratamento 3 (3,24 cm), tratamento 2 (3,21 cm) e tratamento 7 (2,92 cm).

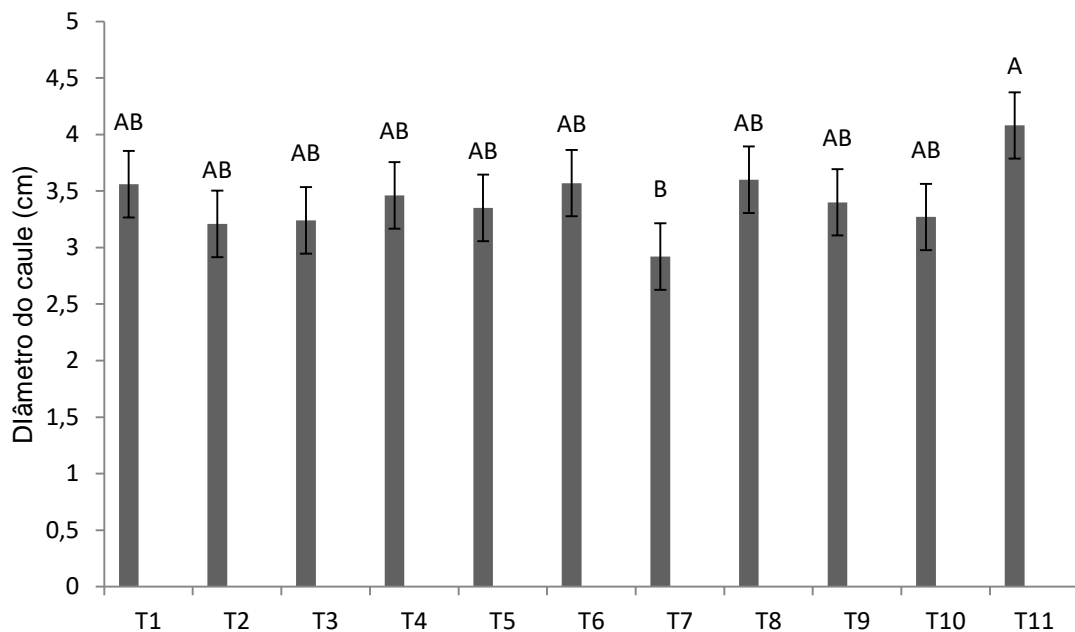


Figura 9 – Diâmetro do caule (cm) avaliado no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

O tratamento 11 controle, que recebeu o superfosfato simples, continuou apresentando melhor diâmetro do caule com 70 dias após o plantio, enquanto o tratamento 7 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 1ml apresentou-se com um diâmetro do caule inferior aos demais tratamentos, que apresentaram um diâmetro semelhante aos controles.

Comparando o diâmetro de caule (cm) nos períodos de 40 e 70 dias após o plantio os tratamentos de 1 a 3 que receberam *Azospirillum brasilense* em diferentes doses, o tratamento de 4 a 6 que receberam *Bacillus subtilis* (J310) em diferentes



doses, os tratamentos de 7 a 9 que receberam *Bacillus subtilis* (E310) em diferentes doses, apresentaram atividade de promoção de crescimento para as mudas de eucalipto semelhante aos controles, tratamento 10 com fosfato de rocha sem inoculo e o tratamento 11 com o adubo superfosfato simples.

Após 40 dias do plantio, comparando o parâmetro das plantas em relação à área foliar ( $\text{cm}^2$ ) por folhas, houve pequenas variações nas médias entre os tratamentos sendo  $8,94 \text{ cm}^2$  a  $4,27 \text{ cm}^2$  (Figura 10). Seguindo o tratamento 11 ( $8,94 \text{ cm}^2$ ), tratamentos 4 e 3 ( $7,90 \text{ cm}^2$ ), tratamento 7 ( $7,32 \text{ cm}^2$ ), tratamento 1 ( $7,14 \text{ cm}^2$ ), tratamento 9 ( $6,58 \text{ cm}^2$ ), tratamento 5 ( $6,52 \text{ cm}^2$ ), tratamento 6 ( $6,28 \text{ cm}^2$ ), tratamento 10 ( $6,05 \text{ cm}^2$ ), tratamento 2 ( $5,35 \text{ cm}^2$ ) e tratamento 8 ( $4,27 \text{ cm}^2$ ).

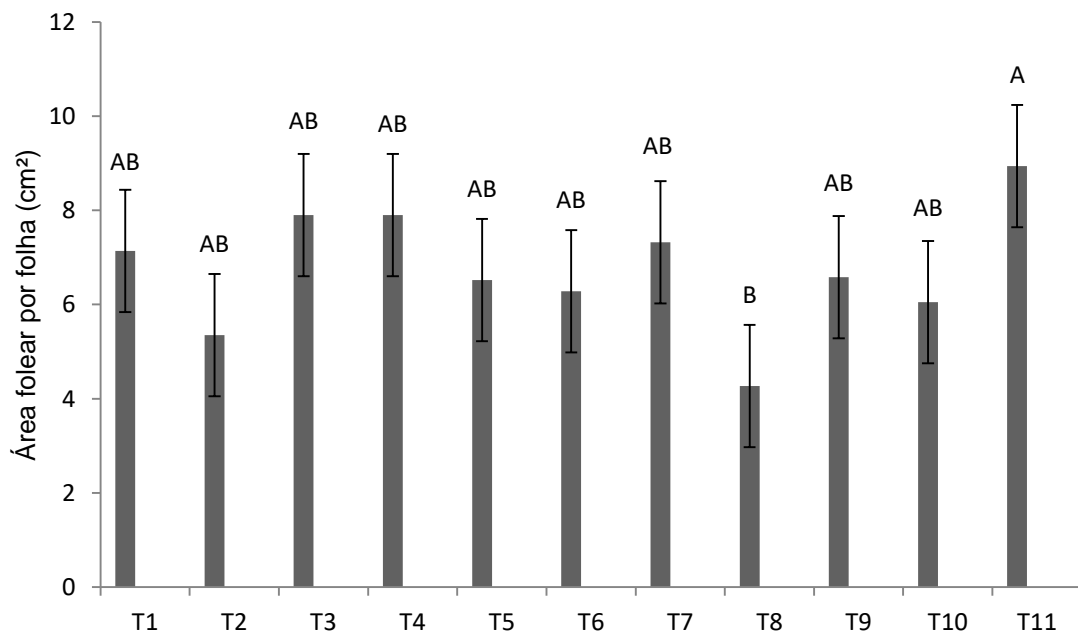


Figura 10 – Área foliar por folha ( $\text{cm}^2$ ) avaliada no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

O tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, apresentou melhor área foliar quando comparado aos demais tratamentos, enquanto o tratamento 8 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$

com 10ml, apresentou-se com menor área foliar, no período de 40 dias após o plantio das mudas de eucalipto.

No período de 70 dias após o plantio, não houve variações entre os tratamentos no parâmetro de área foliar  $\text{cm}^2$  por folha, a média entre os tratamentos foi de  $9,45 \text{ cm}^2$  a  $7,80 \text{ cm}^2$  (Figura 11). Os tratamentos seguiram, tratamento 8 ( $9,45 \text{ cm}^2$ ), tratamento 11 ( $9,22 \text{ cm}^2$ ), tratamento 6 ( $9,11 \text{ cm}^2$ ), tratamento 3 ( $8,70 \text{ cm}^2$ ), tratamento 9 ( $8,56 \text{ cm}^2$ ), tratamento 4 ( $8,33 \text{ cm}^2$ ), tratamento 10 ( $8,23 \text{ cm}^2$ ), tratamento 1 ( $8,20 \text{ cm}^2$ ), tratamento 7 ( $8,11 \text{ cm}^2$ ), tratamentos 2 e 5 ( $7,80 \text{ cm}^2$ ).

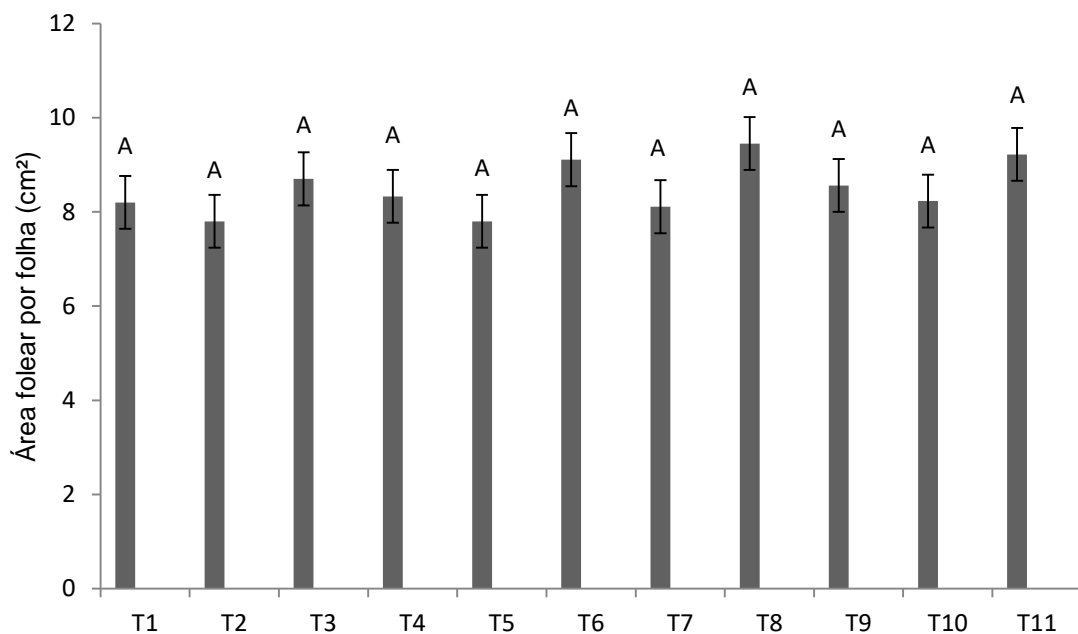


Figura 11 – Área foliar por folha ( $\text{cm}^2$ ) avaliada no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

Nos períodos de 40 e 70 dias o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, obteve uma área foliar ( $\text{cm}^2$ ) por folhas melhor quando comparados aos demais tratamentos, enquanto com 40 dias após o plantio, apenas o tratamento 8 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 10ml, apresentou-se com área foliar inferior aos demais tratamentos. No período de 70 dias, todos os tratamentos apresentaram área foliar ( $\text{cm}^2$ ) por folha

semelhante aos controles. Medeiros et al. (2016) ao comparar área foliar, obteve uma média de 17,03 cm<sup>2</sup> na área foliar em mudas de eucalipto, após 60 dias do plantio. Esses resultados sugerem que as quantidades dos nutrientes foram poucas para observar uma área foliar significativas entre as folhas de eucalipto nos períodos avaliados. O índice de área foliar das folhas de eucalipto é um parâmetro importante de avaliação, devido a sua ligação direta com a produtividade agrícola e florestal (ALMEIDA et al., 2015).

Ao comparar a massa seca das folhas no período de 40 dias após o plantio, as médias tiveram uma variação entre 105,72g a 28,82g (Figura 12). Seguindo o tratamento 10 (105,72 g), tratamento 1 (63,29 g), tratamentos 4 e 3 (59,08 g), tratamento 7 (52,89 g), tratamento 9 (49,09 g), tratamento 5 (48,10 g), tratamento 8 (36,28 g), tratamento 2 (35,29 g), e tratamento 11 (28,82 g).

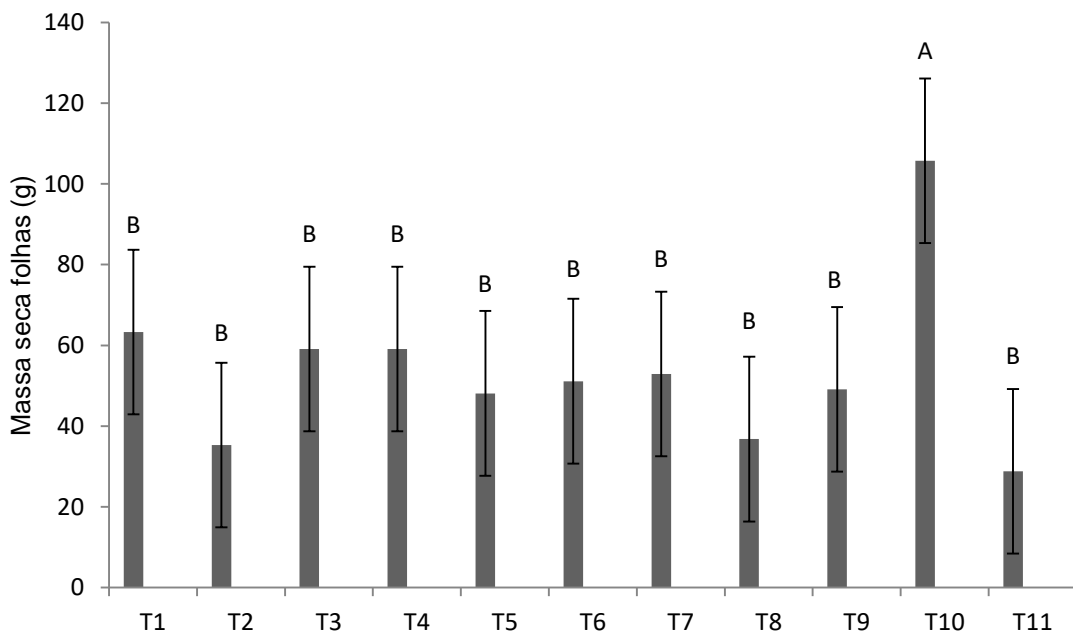


Figura 12 – Massa seca folhas (g) avaliada no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

Após 40 dias do plantio, o tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inoculo, apresentou melhor massa seca das folhas, enquanto os outros

tratamentos, incluindo o tratamento 11, apresentaram valores referentes à massa seca das folhas semelhantes.

No período de 70 após o plantio, a média da massa seca das folhas não apresentaram diferenças entre si (Figura 13). O tratamento 11 (87,93 g), tratamento 8 (87,90 g), tratamento 6 (85,96 g), tratamento 9 (85,71 g), tratamento 3 (85,36 g), tratamento 5 (79,40 g), tratamento 2 (77,3 g), tratamento 1 (73,34 g), tratamento 10 (73,22 g), tratamento 4 (69,39 g), e tratamento 7 (69,37 g).

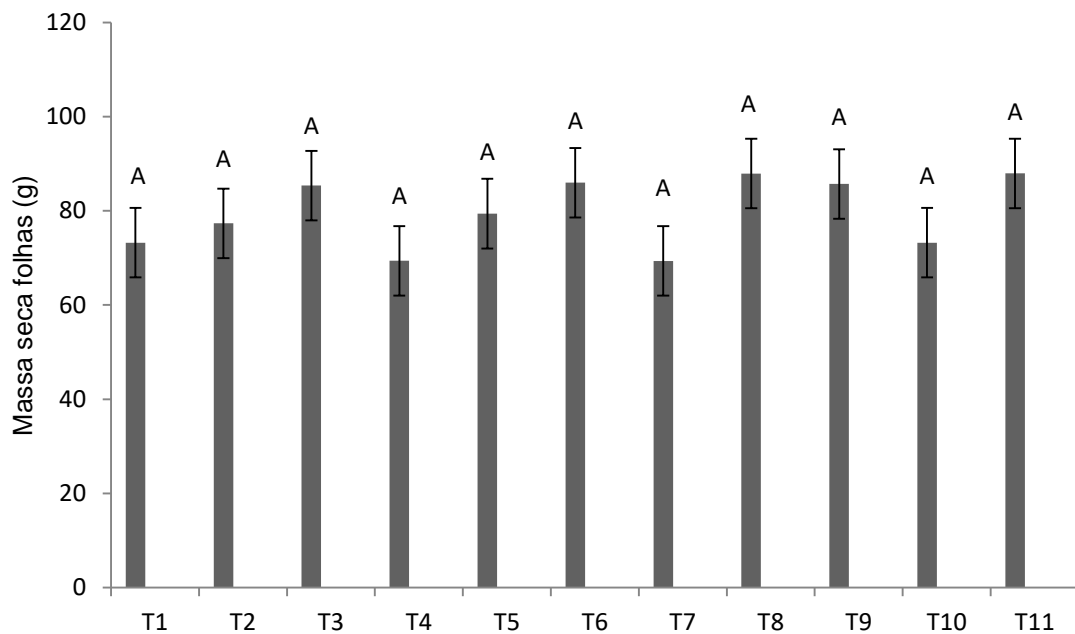


Figura 13 – Massa seca folhas (g) avaliada no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferenças significativas após 70 dias do plantio. Todos os tratamentos apresentaram atividades semelhantes, no parâmetro da massa seca das folhas nas mudas de eucalipto.

Comparando os dois períodos de avaliação da massa seca das folhas, os valores requeridos não demonstraram diferenças dos tratamentos que receberam inoculo aos controles. Medeiros et al (2016) obteve valores de 51,37 g de massa seca das folhas para o clone CBN001, e 24,95 g de massa de seca das folhas para

o clone CBN016, após 60 dias do plantio, avaliando adubação do superfosfato simples. Enquanto Benatti (2013) observou um valor de 4,39 t.ha<sup>1</sup> de massa seca em folhas de eucalipto avaliadas em latossolo e cambissolo. Santana et al. (2008) ao avaliar a massa seca das folhas de eucalipto em diversas regiões com aproximadamente um ano, obteve uma média de 22,0g de massa seca das folhas. A massa seca das folhas refere-se ao bom desenvolvimento do eucalipto, atribuídos às características de absorção de água, ao desenvolvimento radicular e assimilação dos nutrientes (MENEZES et al., 2009).

Para a massa seca (g) da raiz de eucalipto, após 40 dias do plantio, as médias apresentaram pouca variação entre os tratamentos, sendo de 1,24g a 0,57g (Figura 14). Na seguinte sequencia, tratamento 10 (1,24 g), tratamento 1 (0,88 g), tratamentos 5 e 9 (0,78 g), tratamentos 8 e 2 (0,64 g), tratamento 6 (0,61 g), tratamento 7 (0,60 g), tratamentos 3 e 4 (0,59 g) e tratamento 11 (0,57 g).

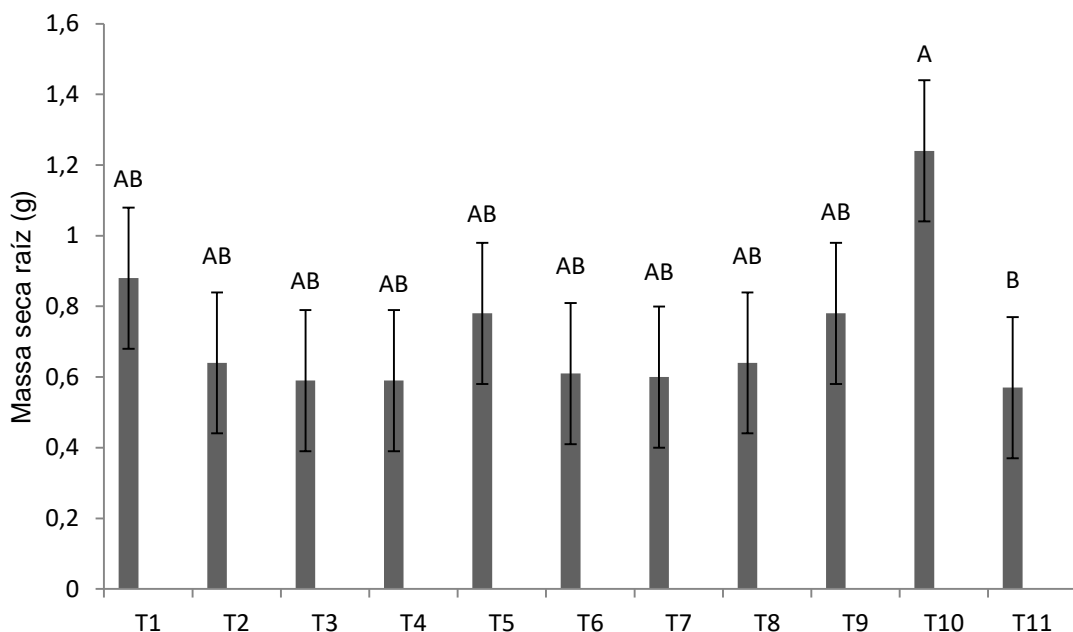


Figura 14 – Massa seca raiz (g) avaliada no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

No período de 40 dias após o planto o tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inoculo, apresentou melhor massa seca da raiz, enquanto o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, teve uma menor massa seca da raiz quando comparado aos demais tratamentos, que não mostraram diferenças entre si e controles.

Com 70 dias após o plantio, as médias na massa seca da raiz, apresentaram variações de 1,67g a 0,91g (Figura 15). Seguindo o tratamento 3 (1,67 g), tratamento 8 (1,65 g), tratamento 11 (1,62 g), tratamento 6 (1,51 g), tratamento 9 (1,49 g), tratamento 4 (1,45 g), tratamento 1 (1,41 g), tratamento 10 (1,25 g), tratamento 2 (1,18 g), tratamento 5 (1,09 g) e tratamento 7 (0,91).

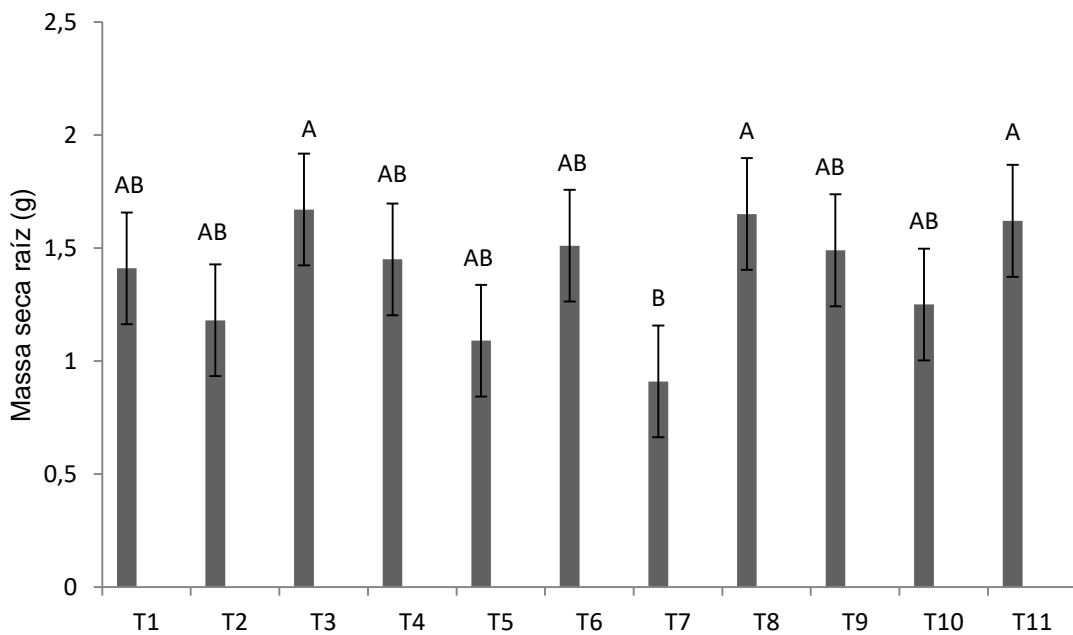


Figura 15 – Massa seca raiz (g) avaliada no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ( $p < 0,05$ ).

Com 70 dias após o plantio os tratamentos que melhor apresentaram massa seca da raiz foram, tratamento 3 que recebeu *Azospirillum brasilense* na concentração  $1 \times 10^7$  com 20ml, tratamento 8 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis*

(E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 10ml, e tratamento 11 controle, superfosfato simples, e o tratamento que obteve menor massa seca da raiz foi o tratamento 7 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 1ml. Os demais tratamentos tiveram a massa seca semelhante aos controles e entre os tratamentos. Em estudo realizado por Eloy et al. (2013) a média da massa seca da raiz foi de 3,32g avaliadas em *Eucalyptus grandis* após 140 dias de plantio. Para Santos (2000), quanto maior obtenção da massa seca das raízes de eucaliptos, maior deve ser a dimensão dos recipientes, assim haverá maior crescimento do sistema radicular e melhor crescimento das mudas. Binotto (2007) avaliou a massa seca de raiz em *Eucalyptus grandis* obtendo 0,96g após 120 dias de semeadura em tubetes. Para o autor, avaliar a massa seca de raiz, possibilita uma melhor compreensão da absorção dos nutrientes em relação ao desenvolvimento do sistema radicular, que é essencial para aumentos no pico da produtividade.

Em relação aos parâmetros das plantas. No período de 40 dias após o plantio, o tratamento 11, controle, que recebeu superfosfato simples, apresentou melhores condições de avaliação nos parâmetros altura da planta, diâmetro do caule e área foliar, enquanto, o tratamento 8 que recebeu o inoculo *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 10ml, apresentou valores inferiores aos demais tratamentos, nos parâmetros altura da planta, diâmetro do caule e área foliar. Enquanto nos parâmetros de massa seca das folhas e massa seca da raiz, o tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inoculo, apresentou melhores condições de avaliação nesse período, enquanto, o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, apresentou valores inferiores aos demais tratamentos, nos parâmetros massa seca das folhas e raiz.

Com 70 dias após o plantio, as relações entre os parâmetros da planta e os tratamentos variaram, o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, apresentou melhores condições nesse período nas características, altura da planta, diâmetro do caule, massa seca das folhas e massa seca da raiz. O parâmetro de área foliar não apresentou diferença sobre nenhum tratamento nesse período. O tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inoculo, apresentou valor inferior dos demais tratamentos nesse período apenas na altura das plantas. Nos

demais parâmetros, diâmetro do caule, massa seca das folhas e massa seca da raiz, o tratamento que apresentou valores inferiores aos demais, foi o tratamento 7 que recebeu *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 1ml. Conclui que em todos os parâmetros todos os tratamentos apresentaram atividade semelhante ao tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, onde os nutrientes estava prontamente disponível para a planta, sugerindo assim, que os inoculos bacterianos promoveram crescimento para a planta. Todos os parâmetros morfológicos são utilizados para determinar a qualidade de mudas nos eucaliptos, esses parâmetros servem para avaliar a qualidade, desenvolvimento e produtividade das plantas (GOMES et al., 2003; BINOTTO, 2007). A relação dos parâmetros, altura da planta, diâmetro, área foliar, fitomassa seca da parte aérea e das raízes, deixam a planta mais lignificada e com melhores capacidades de sobrevivência (GOMES & PAIVA, 2004).

Para o número total de bactérias, no período de 40 dias após o plantio, houve uma pequena variação entre os tratamentos. O tratamento 11 apresentou o maior número de bactérias totais (6,9 UFC) seguido pelo tratamento 9 (6,8 UFC) e os tratamentos que apresentaram os menores valores para o número de bactérias totais foram o tratamento 5 (6,6 UFC) seguido pelo tratamento 7 (6,5 UFC). (Figura 16).



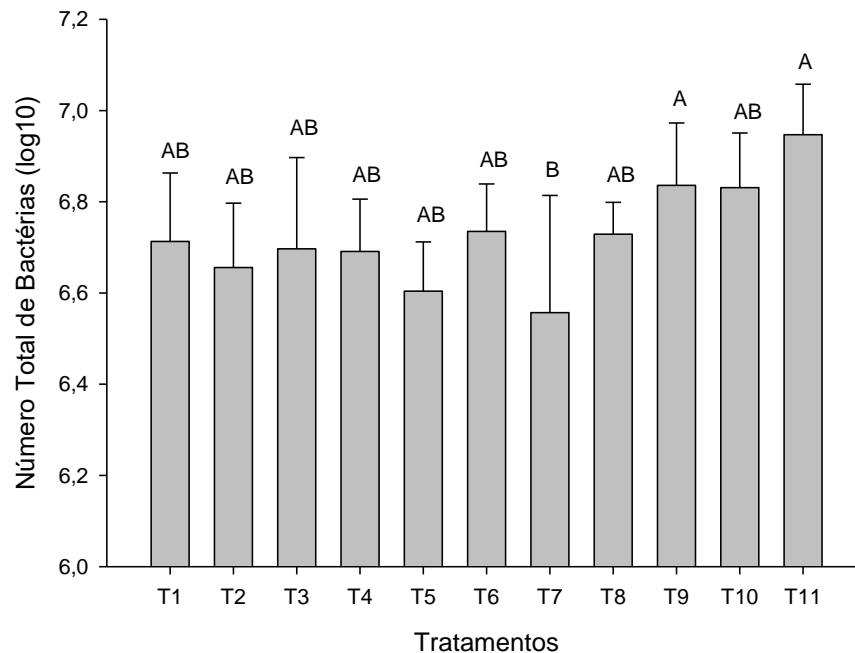


Figura 16 - Número (médias e desvio padrão) de totais bactérias (log<sub>10</sub>) UFC/por grama de solo isoladas dos solos de todos os tratamentos com a planta do eucalipto no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey (P<0,05).

Os tratamentos de 1 a 9 receberam inoculo bacterianos e os tratamentos 10 e 11 não receberam. No período de 40 dias após o plantio do eucalipto o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato de rocha, apresentou maior UFC de bactérias totais comparado com os outros tratamentos que receberam inoculo. Enquanto o tratamento 7 que recebeu *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 1ml, apresentou um UFC inferior aos demais tratamentos. Porém todos os tratamentos apresentaram UFC semelhante aos controles. Isto pode ter acontecido porque o solo apresentava uma microbiota inicial e quando este solo recebeu micro-organismos exógenos, houve competição pelos mesmos nutrientes com os micro-organismos endógenos, essa nova microbiota pode ter promovido um rearranjo nas populações microbianas iniciais e como resultado, a população bacteriana final total (após a inoculação) foi menor do que a população inicial. Alguns estudos demonstram que as propriedades do solo e o manejo podem afetar a densidade e a diversidade bacteriana. O solo utilizado nesse estudo apresentou inicialmente pH 4,7, a população bacteriana exigem condições em pH próximo 7,0 para melhor atividade

metabólica. Outro fator que pode ter influenciado a baixa quantidade na população bacteriana são as características do solo, que apresentou 347 g Kg<sup>-1</sup> de areia grossa, 600 g Kg<sup>-1</sup> e 39 g Kg<sup>-1</sup> de argila, caracterizando o solo arenoso. Beneduze et al. (2013) encontraram que o pH e a porcentagem elevada de argila foram os fatores que mais afetaram seis diferentes populações de bactérias solubilizadoras de fósforo, enquanto que a matéria orgânica foi o parâmetro menos relacionado com a diversidade microbiana. Esses autores também demonstraram que o pH poderia limitar a presença de micro-organismos no solo, colocando uma barreira para a diversidade. Parâmetros como a quantidade de argila e textura do solo influenciam a sobrevivência e a proliferação da bactéria no solo e na rizosfera.

Para o período de 70 dias após o plantio do eucalipto o maior número de bactérias totais na base log<sub>10</sub> em UFC/ g de solo seco foi encontrado no tratamento 6 (6,9 UFC) seguido pelo tratamento 5 (6,8 UFC), tratamento 10 (6,8 UFC), tratamento 9 (6,7 UFC), tratamento 1 (6,7 UFC), tratamento 4, (6,7 UFC) e tratamento 3 (6,7 UFC). O menor número de bactérias totais foi encontrado no tratamento 11 (6,5 UFC), seguido pelo tratamento 8 (6,6 UFC), tratamento 2, (6,7 UFC) e tratamento 7 (6,7 UFC). As diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos 11 e 8 comparado com todos os outros tratamentos (Figura 17).

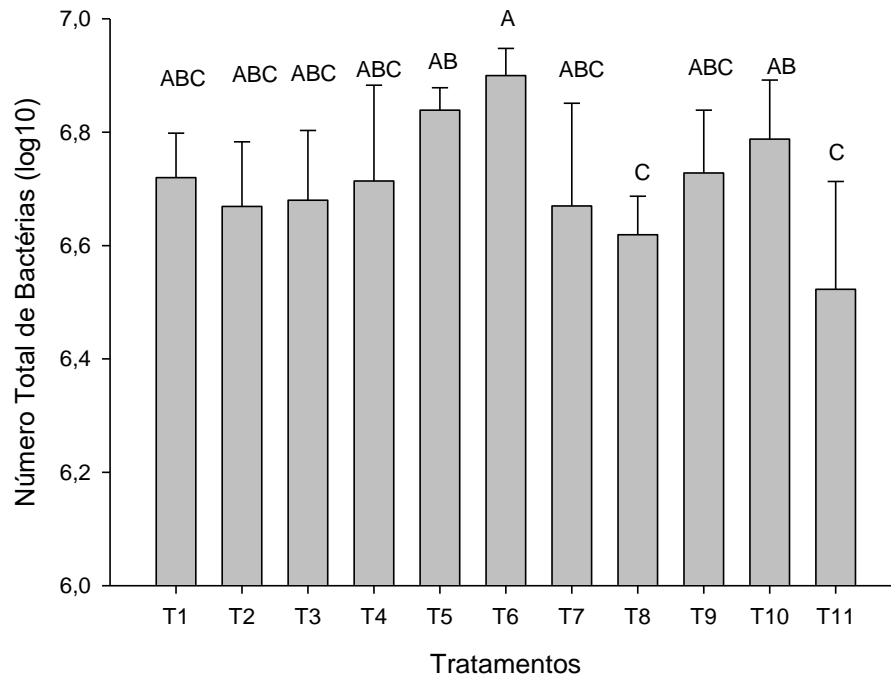


Figura 17 - Número total de bactérias (médias e desvio padrão) (log<sub>10</sub>) em UFC/ g de solo seco de todos os tratamentos com eucalipto no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey (P<0,05).

No período de 70 dias após o plantio, a população bacteriana apresentaram melhor UFC aos tratamentos que recebera os inoculos bacterianos ( Tratamento 1 á 9). O tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, que com 40 dias após o plantio apresentou maior UFC, com 70 dias apresentou uma queda na sua população microbiana. Enquanto o tratamento 8 que recebeu *Bacillus subtilis* (E310) na concentração  $1 \times 10^7$  com 10ml que com 40 dias apresentou uma UFC semelhante aos demais tratamentos, com 70 dias ocorreu um queda na sua população. Os demais tratamentos, apresentaram UFC semelhantes entre si, não os diferenciando aos dos controles T10 e T11.

Esses resultados sugerem que a inoculação de bactérias solubilizadoras de fósforo não promoveu um aumento no número de bactérias totais, mas que os micro-organismos adicionados ao solo após o plantio do eucalipto apresentaram uma interação com o sistema radicular da cultura, o que pode ter sustentado sua sobrevivência e atividade metabólica para promoção do crescimento da planta. O

aumento da população microbiana do solo é resultado de uma interação entre as raízes das plantas, o solo e as condições ambiental (COTTA et al., 2014). Acosta-Mártinez et al. (2008) verificaram diferenças na diversidade bacteriana no solo estudada sob diferentes manejos e usos do solo, não apenas na presença ou ausência de bactérias, mas também na distribuição bacteriana. Assim, levando-se em conta os dados obtidos no presente estudo, pesquisas futuras podem ser realizadas no intuito de verificarem-se os efeitos da adição de bactérias solubilizadoras de fósforo em diferentes tipos de solo e manejo, mantendo-se as condições de vaso e as plantas de eucalipto, na busca de resultados mais esclarecedores sobre o potencial desses micro-organismos.

Na concentração de fósforo no solo, no período de 40 dias após o plantio, houve variações nas médias entre 303,09mg a 73,33mg nos tratamentos (Figura 18). Seguindo o tratamento 11 (303,09 mg), tratamento 2 (226,02 mg), tratamento 1 (204,16 mg), tratamento 8 (203,93 mg), tratamento 6 (201,66 mg), tratamento 7 (201,33 mg), tratamentos 3 e 4 (198,45 mg), tratamento 5 (179,88 mg), tratamento 9 (162,50 mg) e tratamento 10 (73,33 mg).

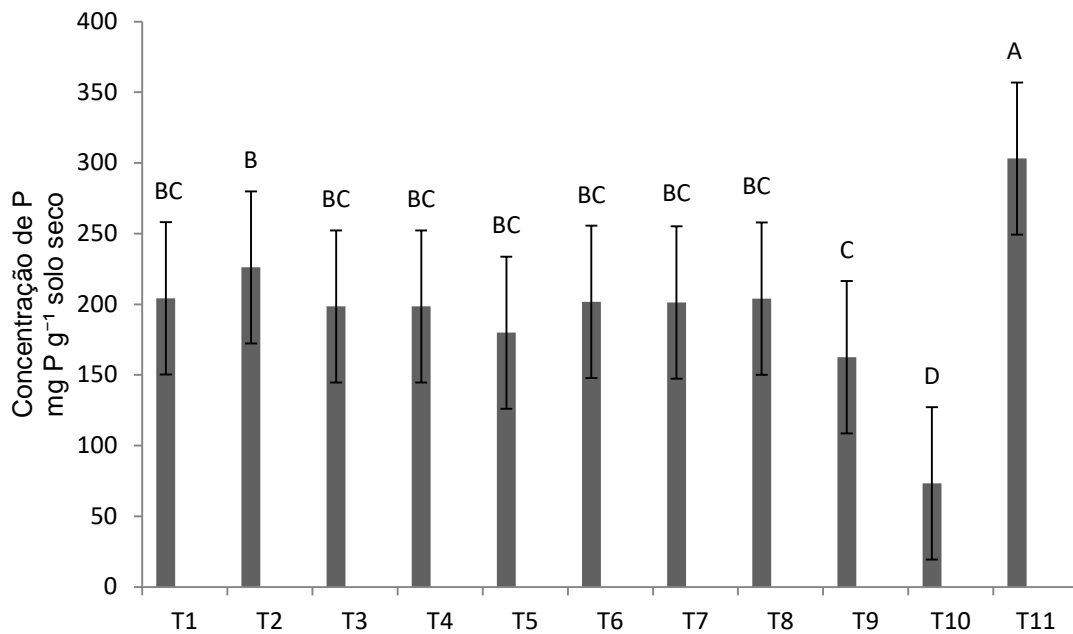


Figura 18 - Concentração de fósforo em mg de P.g<sup>-1</sup> de solo seco (médias e desvio padrão) de todos os tratamentos com eucalipto no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey (P<0,05).

Para a concentração de fósforo no solo no período de 40 dias após o plantio todos os tratamentos que receberam o inóculo com as bactérias solubilizadoras de fósforo tiveram uma concentração de fósforo no solo maior do que o tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inóculo. Enquanto o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, apresentou maiores concentrações de fósforo no solo. O tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, possui fósforo prontamente disponível para planta, por essa ocasião as concentrações de fósforo encontrados no solo são maiores, o tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inoculo, apresentou baixa concentração de fósforo, pois o nutriente não está prontamente disponível para a planta, por estar na forma insolúvel exige uma demanda de tempo para encontrar-se disponível para assimilação da planta, os tratamentos de 1 a 9 receberam o fosfato de rocha e as bactérias solubilizadoras de fósforo em diferentes doses na concentração  $1 \times 10^7$ , e sua concentração de fósforo no solo foi maior quando comparada ao tratamento 10 controle, o que evidencia a atividade metabólica realizada pelas bactérias na disponibilidade de fósforo para a planta.

Para o período de 70 dias após o plantio do eucalipto médias na concentração de fósforo no solo tiveram pouca variação, entre 279,52mg a 44,88mg (Figura 19). Seguindo os tratamento 11 (279,52 mg), tratamento 10 (98,09 mg), tratamento 8 (66,90 mg), tratamento 7 (65,69 mg), tratamento 5 (64,05 mg), tratamento 4 (61,31 mg), tratamento 6 (60,83 mg), tratamento 9 (56,66 mg), tratamento 2 (47,74 mg), tratamento 1 (47,26 mg), tratamento 3 (44,88 mg).

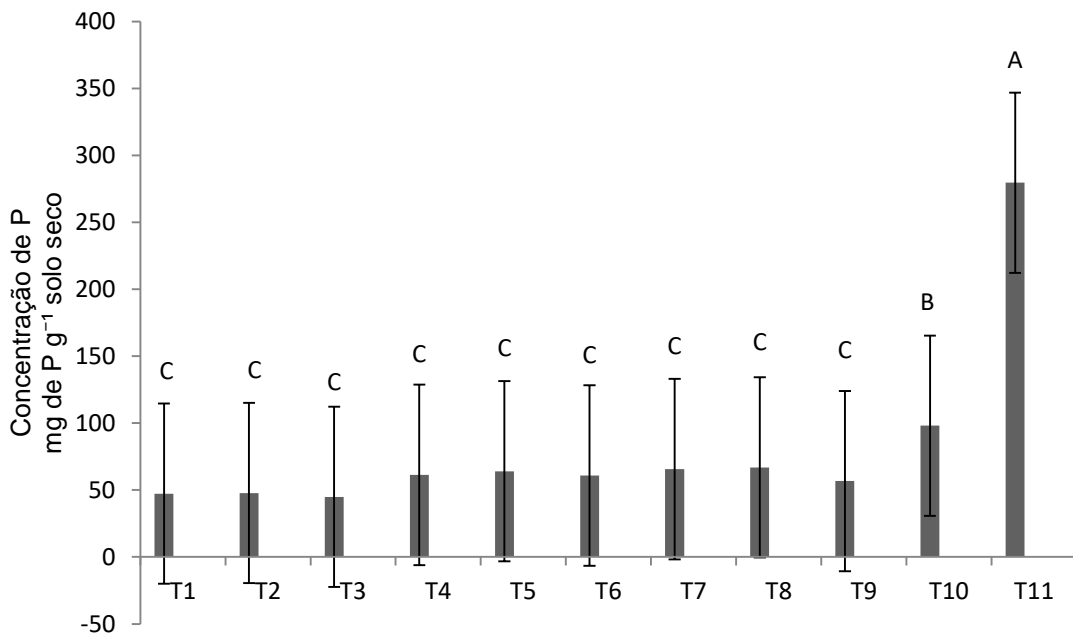


Figura 19 - Concentração de fósforo em mg de P.g<sup>-1</sup> de solo seco (médias e desvio padrão) de todos os tratamentos com eucalipto no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey (P<0,05).

Para o período de 70 dias após o plantio, o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, continuou apresentando maior concentração de fósforo no solo, isso devido a sua disponibilidade imediata para a planta. O tratamento 10 controle, que recebeu fosfato de rocha sem inoculo, apresentou melhor concentração no solo quando comparado aos tratamentos 1 a 9 que receberam os inoculos bacterianos. Enquanto os tratamentos que receberam inoculos bacterianos tiveram suas concentrações inferiores quando comparados aos 40 dias após o plantio. Acredita-se que após 70 dias do plantio, o fósforo

disponibilizado pelas bactérias (tratamento de 1 a 9) no solo, tenha sido assimilado pela planta pelo seu sistema radicular. No o tratamento 11 as concentrações encontradas no solo são maiores nos dois períodos, acredita-se que a planta assimilou o necessário para sua atividade metabólica e como o fósforo está prontamente disponível as concentrações encontradas no solo são maiores. Para o tratamento 10, pode ser que após 70 dias do plantio, quando comparados no período de 40 dias, pouca quantidade de fósforo se tornou disponível no solo para a planta.

As concentrações de fósforo nas folhas da planta do eucalipto no período de 40 dias após o plantio variaram de 3,77g a 1,80g (Figura 20). Seguindo o tratamento 9 (3,77 g), tratamento 8 (3,61 g), tratamento 11 (3,41 g), tratamentos 4 e 3 (3,01 g), tratamento 10 (2,98 g), tratamento 1 (2,74 g), tratamento 7 (2,72 g), tratamento 2 (2,60 g), tratamento 5 (2,45 g) e tratamento 6 (1,80 g).

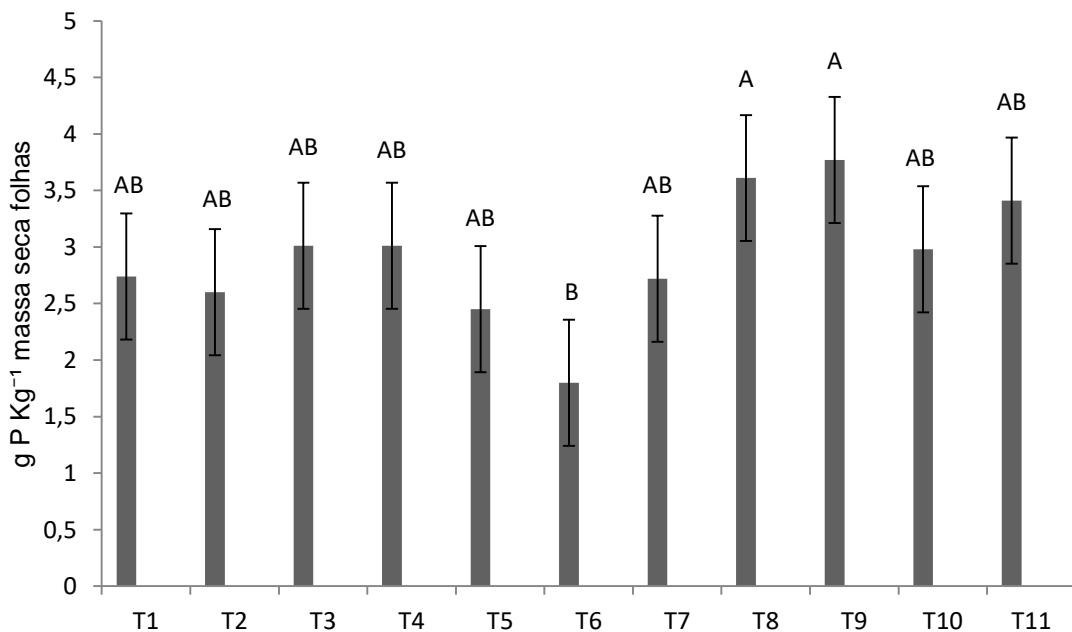


Figura 20 - Concentração de fósforo em g de P kg<sup>-1</sup> massa seca folhas eucalipto (médias) de todos os tratamentos no período de 40 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey (P<0,05).

Não houve diferenças significativas comparadas entre os tratamentos e os controles em relação as quantidades de fósforo encontradas na massa seca das

folhas de eucalipto no período de 40 dias após o plantio. Entretanto, os tratamentos que receberam os inoculos bacterianos, apresentaram concentrações de fósforo na massa seca das folhas semelhantes ao controle do tratamento 11 que recebeu o fósforo prontamente disponível para as plantas. Esses resultados sugerem que nesse período, as quantidades de fósforo encontradas no solo foram maiores, por esse motivo, a planta estava no processo de absorção do fósforo pelo sistema radicular, todo fósforo absorvida encontrava-se ainda em suas raízes.

As concentrações de fósforo nas folhas da planta do eucalipto no período de 70 dias após o plantio variaram entre 4,78g a 2,06g (Figura 21). Seguindo o tratamento 11 (4,78 g), tratamento 7 (4,18 g), tratamento 10 (3,76 g), tratamento 9 (3,65 g), tratamento 8 (3,63 g), tratamento 3 (3,36 g), tratamento 6 (3,31 g), tratamento 5 (3,21 g), tratamento 4 (2,95 g), tratamento 1 (2,40 g) e tratamento 2 (2,06 g).

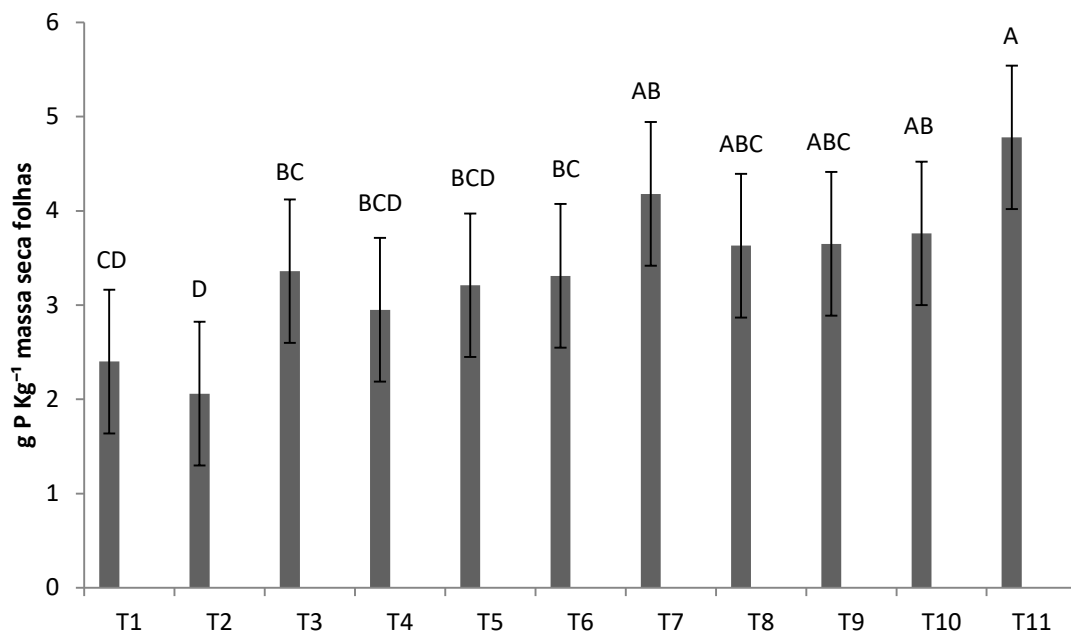


Figura 21 - Concentração de fósforo em g de P kg<sup>-1</sup> massa seca folhas eucalipto (médias) de todos os tratamentos no período de 70 dias após o plantio. As letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey (P<0,05).



Após 70 dias do plantio o tratamento 11 controle, que recebeu superfosfato simples, apresentou melhor concentração de fósforo nas folhas, enquanto aos demais tratamentos as concentrações variaram constantemente, os tratamentos T7, T8 e T9 que receberam *Bacillus subtilis* (E310), apresentaram uma concentração de fósforos semelhantes aos controles. A média de solubilização em tubo por *Bacillus subtilis* (E310), foi bem melhor quando comparados aos isolados *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* (J310). Os tratamentos de T1 á T6 apresentaram uma concentração de fósforo inferior quando comparados aos tratamentos de T7 a T9, porém não houve diferenças significativas.

No presente estudo não se pôde verificar o efeito das doses dos inoculos bacterianos. Quando um micro-organismo exógeno é inoculado no solo, inicialmente ocorre uma diminuição do número de indivíduos, depois se as condições ambientais forem apropriadas, geralmente o número de indivíduos cresce. Usualmente quem garante as condições apropriadas para os micro-organismos são as plantas, liberando os nutrientes necessários através dos seus exsudatos de raízes. Por isso, faz-se necessário a associação entre a planta correta para o micro-organismo adequado. Neste estudo, os resultados sugerem que não houve uma forte associação entre a planta do eucalipto com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis*, porém suas atividades foram semelhantes ao controle que recebeu o fósforo prontamente disponível para a planta. Provavelmente o tempo de avaliação pode ter sido curto para identificarmos diferenças entre o desenvolvimento das plantas em função dos tratamentos. O sucesso no estabelecimento de uma espécie bacteriana introduzida como inoculante no solo depende da sua sobrevivência no solo e da sua compatibilidade com a cultura vegetal na qual ela foi inoculada. Além disso, depende de suas interações com a microbiota inicial do solo e outros fatores ambientais que desempenham papel importante na determinação final do resultado da inoculação (MARTINS et al., 2013).

## 6. CONCLUSÃO

A inoculação no solo em condições de vaso com o *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* não promoveu maior crescimento das plantas de eucaliptos comparados com os tratamentos controle. Embora os isolados não tenham apresentado diferenças significativas os tratamentos e as doses aplicadas, os mesmos se mostraram mais eficiente em relação à fonte de P insolúvel e apresentaram resultados semelhantes à fonte de P prontamente disponível. Provavelmente as condições do solo não favoreceram o desenvolvimento e atividade dos isolados após o plantio e o período avaliado tenha sido curto para notar diferenças.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M. K.; SHARIF, S.; KAZMI, M.; SULTAN, T.; ASLAM, M. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. **Plant Biosystems**; p. 145:159–68, 2011.

ABRAF. **Anuário Estatístico da Associação Brasileira de Florestas Plantadas** 2013. Ano Base 2012. Brasília, 2013, 142 p. Disponível em: <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-abraf13-br.pdf>.

ACOSTA-MÁRTINEZ, V., DOUED, S., ALLEN, S., SUN, Y. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. **Soil Biol Biochem**, n. 40, p. 2762-2770, 2008.

AHMAD, F., AHMAD, I., KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol Res**, n. 163, p.173–81, 2008.

ALMEIDA, A. Q., RIBEIRO, A., DELGADO, R. C., RODY, Y. P., et al. Índice de Área Foliar de Eucalyptus Estimado por Índices de Vegetação Utilizando Imagens TM - Landsat 5. **Floresta e Ambiente**; 22(3): 368-376, 2015.

ALTSCHUL, S. F., et al. "Basic local alignment search tool." **Journal of molecular biology** 215.3. 403-410. 1990.

ALVES, B. J. R., SANTOS, J. C. F., VIRGEM FILHO, A. C., et al., Avaliação Da Disponibilidade De Macro E Micronutrientes Para Arroz De Sequeiro Cultivado Em Um Solo Calcário Da Região De Irecê, Bahia. **Revista. Universidade. Rural**, Série. Ciências da Vida Vol. 22, n.1, p.15-24, 2002.

AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**. v. 8, p. 115-116, 1996.

ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639-1645, 2005.

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, 2008.

BARROTI, G. & NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., Brasília, v.35, n.10, p. 2043-2050, 2000.

BASHAN, Y.; MORENO, M., TROYO, E. Growth promotion of the seawater-irrigated oil seed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere

bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. **Biol. Fertil. Soils**, v. 32, p. 265-272, 2004.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*–plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). **Canadian Journal of Microbiology** v. 43, p. 103–21, 1997.

BATAGLIA, O. C. et. al. Métodos de Análise Química de Plantas. **Instituto Agrônômico**, p.48, 1983.

BENATTI, B. P. Compartimentação de Biomassa e Nutrientes em Estruturas de Plantas de Eucalipto cultivados em Solos diferentes. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2013.

BENEDUZE, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1044-1051, 2013.

BINOTTO, A. F. Relação entre as variáveis de crescimento e o índice de qualidade de Dickson em mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maid e *Pinus elliottii* var. *elliottii* - Engelm. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2007.

BRAGA, J. L. P. **Estabilidade fenotípica de clone de Eucalyptus urograndis, na fazenda Bom Jardim - APARECIDA - SP.** 2008. 27. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Florestal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, São Paulo, 2008.

BRISOLA, S. U. & DEMARCO, D. Análise anatômica do caule de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis* x *urophylla*: desenvolvimento da madeira e sua importância para a indústria. **Scientia Forestalis**, v. 39, n. 91, p. 317-330, 2011.

BUNT J. S. & ROVIRA A. D. Microbiological studies of some subantarctic soils. **Journal of Soil Science**, v.6, p. 119–128, 1955.

BURNETT, G.W.; PELCZAR Jr., M.J. & CONN, H.J. Preparation of media. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. **Manual of microbiological methods**. McGraw-Hill Book Company, p. 315, 1957.

CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CHAUHAN, H.; BAGYANAY, D. J.; SILVAKUMAR, G.; SUNDARAM, S. P. Novel plant growth promoting rhizobacteria prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, n. 95, p. 38-53, 2015.

CASTELLANOS, T., ASCENCIO, F., BASHAN, Y. Starvation induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. **FEMS Microbiol Ecol** 33:1–9, 2000.

CHIEN, S.H.; PROCHNOW, L.I.; TU, S. & SNYDER, C.S. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutr. Cycl. Agroecosyst.**, 2011.

COTTA, S. R.; FRANCO DIAS, A. C.; MARRIEL, I. E.; ANDREOTE, F. D.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Different Effects of Transgenic Maize and Nontransgenic Maize on Nitrogen-Transforming Archaea and Bacteria in Tropical Soils. **Appl Environ Microbiol.** 2014.

CRISTINA, K. Melhoramento de essências florestais. **Revista da madeira**, v.14, n.83, p.60-62, 2004.

DIAS, L. P.R. Fósforo E Boro Na Adubação De *Eucalyptus Dunnii* E *Eucalyptus Benthamii* Em Solos Do Planalto Sul Catarinense. Tese Doutorado, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages - Santa Catarina, 2016.

DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in on-leguminous crop plants. **Science Tech**, Madison, USA, 155p, 1987.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGHS, A., THYS, A., PTACEK, D., VANDERLEYDEN, J., DUTTO, P., et al. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Aust J Plant Physiol**, n. 28, p. 871–9, 2001.

DROGUE, B., DORÉ, H., BORLAND, S., WISNIEWSKI-DYÉ, F., PRIGENT-COMBARET, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Res Microbiol**, n. 163, p. 500–10, 2012.

ELOY, E. CARON, B. O., SCHMIDT, D., et al. Avaliação Da Qualidade De Mudas De *Eucalyptus Grandis* Utilizando Parâmetros Morfológicos. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 43, n. 3, p. 373 - 384, jul. / set. 2013.

FERNÁNDEZ, B. L., SILVANI, V., COLOMBO, R., PÉRGOLA, M., BOMPADRE, J., GODEAS, A. Pre-symbiotic and symbiotic interactions between *Glomus intraradices* and two *Paenobacillus* species isolated from AM propagules. In vitro and in vivo assays with soybean (AG043RG) as plant host. **Soil Biol Biochem**, n. 43, p. 1866–72, 2011.

FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: **Asociación Argentina de Microbiología**, p.155-166, 2008.

FILIPPI, M. C. C.; DA SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; MORAES, A. J. G.; PRABHU, A. S. Leafblast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biology Control**, n. 58, p. 160–6, 2011.

FINGER, G. P. Efeito do fósforo sobre a interação das bactérias isoladas da rizosfera de guandu "*Cajanus cajan*". Tese (Doutorado em Microbiologia

Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2002.

FISCHER, S. E., FISCHER, S. I., MAGRIS, S., MORI, G. B. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. **World J Microbiol Biotechnol**, n. 23, p. 895-903, 2007.

GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J. Fracionamento químico das formas de fósforo do solo: usos e limitações. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v.8, p.141-187, 2013.

GONZALEZ, Luz E. & BASHAN, Y. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, April, vol. 66, no. 4, p. 1527-153, 2000.

GOMES, J. M., et al., Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Ecalyptus grandis*. *Revista Arvore*, Viçosa – MG, 27: 113 – 127. 2003.

GOMES, J. M. & PAIVA, H. N., **Viveiros Florestais** – propagação sexuada. 3 ed. Viçosa – MG: UFV, 116p. 2004.

Hall T.A. BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Series**;41:95–98, 1999.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; VAN TUINEN, D. & BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**, n. 321, p. 235-257, 2008.

HENRIQUES, A.O.; MORAN JUNIOR, C.P. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. **Methods**, v.20, p.95-110, 2000.

HUERGO, L. F., MONTEIRO, R. A., BONATTO, A. C., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R., CRUZ, L. M., CHUBATSU, L. S., SOUZA, E. M & PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: Cassán FD & Salamone IG de (Eds.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Córdoba, **Asociación Argentina de Microbiología**. p.17-28, 2008.

IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Ibá 2017**. 100 p. Disponível em: <[http://www.iba.org/shared/iba\\_2017\\_pt.pdf](http://www.iba.org/shared/iba_2017_pt.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2017

KARADENIZ, A.; TOPCUOGLU, S. F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 1061-1064, 2006.

KHALID, A.; TAHIR, S.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. **Australian Journal of Soil Research**; n. 42, p. 921–6, 2004.

KLOEPPER, J. W. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999.

KLOEPPER J. W. & SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In : Proceedings of the IV<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol. 2. **Station de Pathologie Vegetale et Phyto-Bacteriologie**; p. 879–82, 1978.

KREY, T., VASSILEV, N., BAUM, C., EICHLER-LÖBERMANN, B. Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. **Eur J Soil Biol** , n. 55, p. 124–30, 2013.

KUMAR, SUDHIR, GLEN STECHER, AND KOICHIRO TAMURA. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets." **Molecular biology and evolution**: msw054. 2016.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.

LUCY, M., REED, E., GLICK, B. R. Application of free - living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004;86:1–25. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu Rev Microbiol**, n. 63, p. 541–56, 2009.

LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiol*, Netherlands, v.63, n. 1, p.541–56. 2009.

MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, v.31, n.4, p.589-597, 2007.

MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MANTELIN, S. & TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability : impacts on root development and nitrate uptake. **Journal Exp Bot**, n. 55, p. 27–34, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego, Academic Press, 2a ed., 1995. 888p.

MARTINAZZO, R.; RHEINHEIMER, D. S.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J. Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, p. 563-570, 2007.

MARRA, L. M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MARTINI, A.J. **O plantador de eucaliptos: A questão da preservação florestal no Brasil e o resgate documental do legado de Edmundo Navarro de Andrade**. 2004. 320 f. Dissertação (Mestrado em História Social) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MARTINS, S. J.; VASCONCELOS DE MEDEIROS, F. H.; MAGELA DE SOUZA, R.; VILELA DE RESENDE, M. L.; MARTINS RIBEIRO JUNIOR, P.; Biological control of bacterial wilt of common bean byplant growth-promoting Rhizobacteria. **Biol Control**, v. 7, p. 66:65, 2013.

MASSESSINI, A. M. **Solubilização de fosfatos mediada por microrganismos do Solo de plantio de eucalipto**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MEDEIROS, W. N., MELO, C. A. D., TIBURCIO, R. A. S. et al. Initial Growth And Nutrient Concentration In *Eucalyptus Urophylla* X *Eucalyptus Grandis* Clones Under Weed Interference. **Ciênc. Florest.** vol.26 no.1 Santa Maria Jan./Mar. 2016.

MENEZES, M. D. D. de, et al. Levantamento pedológico e sistema de informação na avaliação de uso de terras em sub-bacias hidrográficas de Minas Gerais. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.6, p. 1544-1553, 2009.

MENGEL, K.; KIRBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 2001.

MOREIRA, A.L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de bacillus spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, v.37, n.5, p.933-943, 2013.

MURRAY, J. D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. **Mol Plant Microbe Interact**, n. 24, p. 631–9, 2011.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Phosphate-solubilizing and phosphate –producing microorganisms from various soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 43-48, 1994.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. **Universidade Federa de Viçosa**, Viçosa, MG. 399p, 1999.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias** v. 32, 2011

OLSEN, S. R. & SOMMERS, L. E. Phosphorus. In: A.L. Page (Editor), *Methods of Soil*. **American SocietyAgronomy**, v.2, p. 403-430, 1982.

OHTAKE, N.; NISHIWAKI, T.; MIZUKOSHI, K. Amino acid composition in xylem sap of soybean related to the evaluation of N<sub>2</sub> fixation by the relative ureide method. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tóquio, v.41, n.1, p.95-102, 1996.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. & FURLANI, A.M.G., eds. *Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo*. Campinas, **Instituto Agrônomo & Fundação IAC**, 1997. 285p. (Boletim 100)



RASHEDUL, I. M.; MADHAIYAN, M.; DEKA BORUAH, H. P.; YIM, W.; LEE, G.; SARAVANAN, V. S.; et al.,. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Microbiology Biotechnology**; n. 19, p.1213–22, 2009.

REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 22, 2007.

RIGGS, P. J., CHELIUS, M. K., INIGUEZ, A. L., KAEPLER, S. M., Triplett EW. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Aus J Plant Physiol**, n. 28, p. 829–36, 2001.

RODRIGUES, P. C. M. **Obtenção de microrganismos solubilizadores com potencial valor ecológico para uma agricultura sustentável**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto Superior de Agronomia Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

RODRIGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, Ontario, v. 17, p. 319-339, 1999.

SANTOS, J. Z. L.; FURTINI NETO, A. E.; RESENDE, Á.V.; CURI, N.; CARNEIRO, L. F.; COSTA, S. E. V. G. A. Frações de fósforo em solo adubado com fosfatos em diferentes modos de aplicação e cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p.705-714, 2008.

SANTANA, R. C., BARROS, N. F., NOVAIS, R. F., et al. Alocação De Nutrientes Em Plantios De Eucalipto No Brasil. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:2723-2733, 2008.

SANTOS, C. B. Efeito do volume de tubetes e tipos de substratos na qualidade de mudas de *Cryptomeria japonica*. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 1 - 15, 2000.

SARRUGE, J. R. & HAAG, H. P. **Análises Químicas em plantas**, 1974.

SILVEIRA, R. L. V. A. & GAVA, J. L. Nutrição e adubação fosfatada em *Eucalyptus* . **Relatório de pesquisa da Bahia Sul Celulose**, 82p, 2000.

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; MOREIRA, A. Avaliação do estado nutricional do *Eucalyptus*: Diagnose visual, foliar e suas interpretações. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Eds). **Nutrição e Fertilização Florestal Piracicaba**. IPEF, p.79-104. 2000.

SINGH, S. & KAPOOR, K. K. Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biol Fertil Soils**, n. 28, p.139–44, 1999.

SMITH, G. M.; FITZHUGH JUNIOR, H.A.; CUNDIFF, L.V.; CARTWRIGHT, T.C.; GREGORY, K.E. A genetic analysis of maturing patterns in straightbred and crossbred Hereford, Angus and Shorthorn cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.43, n.2, p.389-396, .1968.

SILVA, I. H. S. da. Utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato para aumento da disponibilidade de fósforo no solo. 2014. Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Ecossistemas) - Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas.

SOUCHIE, E. L. & ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007.

SOUCHIE, E. L. 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.

SOUSA, C. A. **Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2010.

SOUZA, R. F.; FAQUIN, V.; ANDRADE, A. T.; TORRES, P. R. F. Formas de fósforo em solos sob influência da calagem e adubação orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, p.1535-1544, 2007.

SWARNALAKSHMI, K., PRASANNA, R., KUMAR, A., PATTNAIK, S., CHAKRAVARTY, K., SHIVAY, Y. S., et al. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. **Eur J Soil Biol**, n. 55, p. 107–16, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2013.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol* 2006;2:194–208. Upadhyay SK, Singh JS, Saxena AK, Singh DP. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. **Plant Biol**, n. 14, p. 605–11, 2012.

TAJINI, F., TRABELSI, M., DREVON, J. J. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Saudi J Biol Sci**, n. 19, p. 157–63, 2012.

TUNG, E. S. C.; FREITAS, M. L. M.; FLORSHEIM, S. M. B.; LIMA, I. L.; LONGUI, E. L.; SANTOS, F. W.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Variação genética para caracteres silviculturais e anatômicos da madeira em progênies de *Myracrodruon urundeuva* (Engler) Fr. Allem. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 87, p. 499-508, set. 2010.

VAN RAIJ, B. CANTARELA, H., QUAGGIO, J. A., FURLANI, A. M. C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2.ed. Campinas: IAC,. 285p. **Boletim Técnico**, 100, 1997.

VERNA, S. C.; LADHA, J. K. & TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water Rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VORPAGEL, A. G. **Inoculação de Azospirillum, isolado e associado a bioestimulante, em milho, no noroeste do RS.** Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, defendido perante a banca abaixo subscrita. Ijuí, 2010.

WATANABE, F. S. & OLSEN, S. R. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, v. 29, p. 677–678, 1965.

YAO, A.; BOCHOW, H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. EFFECT OF FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.39, p.323-328, 2006.

YANG, J., KLOEPPER, J. W., RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends Plant Sci**, n14, p.1–4, 2009