

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA
CULTURA DO ALGODÃO**

Paola Andrea Escobar Diaz
Bacteriologista e Laboratorista Clínica

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA
CULTURA DO ALGODÃO**

Paola Andrea Escobar Diaz

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

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

2018

D542b Diaz, Paola Andrea Escobar
Bacillus spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão / Paola Andrea Escobar Diaz. -- Jaboticabal, 2018
vii, 46 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Everlon Cid Rigobelo
Banca examinadora: Mariana Carina Frigieri Salaro, Anderson
Lange
Bibliografia

1.BPCP. 2. Fixação de nitrogênio. 3. Solubilização de fósforo. 4.
Teor de clorofila. 3. Massa seca. 5. Altura. 6. Eficiência de adubação.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:633.51

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Bacillus spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA CULTURA DO ALGODÃO

AUTORA: PAOLA ANDREA ESCOBAR DIAZ

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



Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP



Prof. Dr. ANDERSON LANGE
SINOP / MT / Universidade Federal de Mato Grosso

Jaboticabal, 09 de março de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAOLA ANDREA ESCOBAR DIAZ – nascida em 10 de março de 1985, na cidade de Bogotá D.C., Colômbia, filha de Roberto Escobar Dueñas e Maria Margarita Diaz, Bacteriologista e Laboratorista Clínica, graduada pela Universidade Colégio Mayor De Cundinamarca (UCMC – Bogotá D.C.) em dezembro de 2009. No ano 2009 participou do projeto de pesquisa “ Evaluación genética y respuesta inmunológica em monos infectados por malaria” na Colômbia. No ano 2010 trabalhou no laboratório da Base Aérea “CACOM1”. Em março do 2016 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) / Unesp – Jaboticabal. Durante esse período participou de eventos apresentando trabalhos e experimentos junto ao Laboratório de Microbiologia do Solo – LSM sendo membro da equipe do Laboratório de Microbiologia do solo, sob a orientação do Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo.

EPÍGRAFE

“Pois eu bem sei os planos que estou projetando para vós, diz o Senhor; planos de paz, e não de mal, para vos dar um futuro e uma esperança. ”

— **Jeremias 29:11**

A Deus, o forjador de meu caminho, meu pai celestial, a essência da minha vida, que me acompanha e sempre me levanta, ao criador de minha família e das pessoas que mais amo, com meu mais sincero amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela sabedoria, força e saúde, por guiar meus passos em todos os momentos da minha vida, obrigada por pôr as pessoas certas nos momentos difíceis e lembrar sempre que nunca estive sozinha.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador professor Everlon Cid Rigobelo pela grande oportunidade e confiança, por acreditar ainda nas segundas oportunidades.

Ao nosso técnico do Laboratório de Microbiologia do Solo (LSM) Luiz Carlos de Assis pelo ensino, paciência, amizade; vamos sentir saudades.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Ao meu irmão Eduin, por todo o amor e apoio na distância, por escutar-me sempre e levantar meu animo quando as coisas pareciam não estar bem, não só durante esta etapa, em toda minha vida por apoiar sempre minhas escolhas, pelo amor que nos une.

À minha mãe Margarita e minha avó Maria pela base e cuidados com a minha formação, não estão presentes em corpo, mas sim em espírito, porque suas lições de vida me tornaram a mulher que sou agora.

Ao Oniel por me acompanhar neste caminhar diário, pela incrível paciência, tolerância, companheirismo, pelo apoio nas minhas decisões, por ouvir e suportar a distância, pela ajuda durante todo o projeto, por me incentivar e animar sempre com muito carinho, pelo seu amor e por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins.

À minha amiga Noemi pelas valiosas dicas ao escrever, por sua ternura e sincera amizade, pela colaboração e gentileza ao compartilhar o conhecimento, pela disposição que sempre tem para os outros, sempre falei para você que fui afortunada em te conhecer

sempre aprendo coisas em nossas conversas, por me fazer parte de seus sonhos, espero ter vocês nos meus.

Aos amigos: Fernanda Nascimento, Laiana Bentes, Roberta Mendes, Natália Sarmanho, Vanessa Moura, Luan Adames, pelo apoio e valiosa ajuda, pela amizade, críticas construtivas e pela alegre convivência, por suas doses de alegria diária. Por todos os momentos vividos por ser a família que eu consegui ter no Brasil para sempre.

Aos colegas de laboratório: Dinalva Mochi, Ana Carolina Machado, Marcelo Barbosa, por todos os momentos compartilhados.

A toda minha família, em especial aos meus tios Lili, Nidia, Maria e Gustavo, pela serenidade, força e apoio transmitidos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Algodão.....	3
2.2. Produtos da cotonicultura.....	4
2.3. Necessidades nutricionais do algodão	5
2.4. Bactérias promotoras do crescimento em plantas	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Localização do experimento.....	12
3.2. Preparação do solo	12
3.3. Semeadura.....	13
3.4. Microrganismos e preparo dos Inóculos.....	13
3.5. Inoculação do algodão	14
3.6. Delineamento experimental e análise estatística	15
3.7. Parâmetros avaliados.....	15
3.7.1. Altura	15
3.7.2. Determinação de massa seca	16
3.7.3. Teor de clorofila na folha e teor de nitrogênio na parte aérea e raiz.....	16
3.7.4. Teor de fósforo solúvel na parte aérea e raiz	17

3.8. Análise química do solo	18
3.8.1. Preparação das amostras do solo	18
3.8.2. Fosforo solúvel em bicarbonato	18
3.8.3. Isolamento e contagem de <i>Bacillus</i> em solo e raiz	19
3.8.4. Solubilização de fosfato insolúvel em meio de cultura líquido	19
3.8.5. Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e análise da região 16S do rDNA bacteriano	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Massa seca do algodão	21
4.2. Altura da planta	23
4.3. Teor de clorofila nas folhas e nitrogênio na planta	25
4.4. Solubilização de fosforo	28
4.5. Análise microbiológica do solo e raiz	32
4.6. Análise de componentes principais	34
4.7. Análise filogenética dos isolados	35
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS	38

***Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA CULTURA DO ALGODÃO**

RESUMO - O uso contínuo de fertilizantes minerais na agricultura promove o excesso de nutrientes como fósforo, nitrogênio e potássio o que ocasiona danos ao ecossistema e leva à alteração da microbiota do solo. Além disso, existe uma baixa eficiência das plantas em absorver e utilizar esses nutrientes o que gera perdas da adubação mineral. Neste sentido o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) é uma alternativa promissora para melhorar a eficiência das plantas na utilização dos fertilizantes minerais. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de dez isolados *Bacillus* (oito isolados de *Bacillus subtilis*, um isolado de *Bacillus velezensis* e um isolado de *Bacillus amyloliquefaciens*) quanto à sua capacidade de promoção de crescimento na cultura de algodão em condições de vaso em casa de vegetação. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos e cinco repetições. Os parâmetros avaliados foram altura da planta, massa seca da parte aérea e raiz, teores de clorofila nas folhas, nitrogênio e fósforo na planta e no solo. A massa seca total (parte aérea e raiz) foi maior nos isolados 248 e 290 (*B. subtilis*), e maiores valores de altura das plantas foram obtidos para o isolado 248. O teor de clorofila nas folhas foi superior nas plantas inoculadas com o isolado 290, indicando que o mesmo foi capaz de aumentar a atividade fotossintética das plantas de algodão. Os teores de nitrogênio na parte aérea e na raiz foram superiores nos tratamentos com os isolados 248 e 290, o que indica que houve estabelecimento dessas bactérias na rizosfera melhorando a disponibilidade e absorção de nitrogênio pela planta. O teor de fosforo na raiz foi maior em plantas que receberam o isolado 001 (*B. amyloliquefaciens*) o que indica que esse isolado favorece a absorção de fósforo pela planta. O isolado 248 apresentou maior quantidade de fósforo solúvel disponível no solo o que demonstra que *B. subtilis* atua positivamente na solubilização do fósforo. A análise molecular do DNA ribossomal 16S de isolados obtidos do reisolamento a partir do solo e raiz das plantas do algodão confirmam a identidade das linhagens utilizadas. Finalmente, os isolados 248 e 290 de *B. subtilis* têm a capacidade de aumentar os teores de clorofila e nitrogênio nas plantas, altura e matéria seca, e também solubilizam fósforo, o que os torna agentes potencias para uso como bioinoculantes nas plantas de algodão.

Palavras chaves: BPCP, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, teor de clorofila, massa seca, altura, eficiência de adubação

***Bacillus* spp. AS PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA IN COTTON CULTURE**

ABSTRACT - The continuous use of mineral fertilizers in agriculture promotes the excess of nutrients as phosphorus, nitrogen and potassium in the ecosystems which causes damages and leads to the instability of the soil microbiota. Moreover, a low efficiency of the plants to absorb and use these nutrients causes losses of the mineral fertilization, but the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) is a promising alternative to improve plant efficiency in the use of mineral fertilizers implying in the reduction of its application on the crops. This work aimed to evaluate the potential of ten *Bacillus* strains (eight of *B. subtilis*, one of *B. velezensis* and one of *B. amyloliquefaciens*) about their capacity to promote growth of cotton seedlings on greenhouse conditions. The experiment was carried out in a completely randomized design with 11 treatments and five replicates. The parameters evaluated were plant height, dry matter of aerial part and root, chlorophyll content in leaves, nitrogen and phosphorus in the plant and soil. The total dry matter (aerial part and root) was higher to the isolates 248 and 290 of *B. subtilis*, and higher values of plant height were obtained for the isolate 248. The chlorophyll content in leaves was higher in plants inoculated with the isolate 290 what indicates that this isolate was able to increase the photosynthetic activity of cotton seedlings. The nitrogen content in the aerial part and roots was higher at the treatments with the isolates 248 and 290 indicating that the bacteria were established in the rhizosphere improving the nitrogen availability and absorption by the plant. The phosphorus content in the roots was higher in seedlings treated with the isolate 001 of *B. amyloliquefaciens*, what demonstrates that this isolate favors its uptake by the plant. The isolate 248 provided the highest amount of soluble phosphorus available in the soil, which shows that *B. subtilis* acts positively on phosphorus solubilization. The molecular analysis of 16S Ribosomal DNA from isolates obtained from re-isolation from the soil and roots of cotton seedlings confirms the identity of the strains used at the experiment. Finally, isolates 248 and 290 of *B. subtilis* are able to increase nitrogen and chlorophyll contents in the plants, high and dry matter, and also solubilize phosphorus, which make them potential agents for use as bioinoculants in cotton plants.

Key words: BPCP, nitrogen fixation, phosphorus solubilization, chlorophyll content, shoot and root dry matter, height, fertilization efficiency.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Análise química do solo	13
Tabela 2. Descrição dos isolados usados no estudo	14
Tabela 3. Autovetores de análise de componentes principais para 10 tratamentos e seus respectivos autovalores e porcentagens de explicação	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Médias (\pm EP) da massa seca da parte aérea (A) , massa seca da raiz (B) , massa seca total (C) do algodão inoculado com 10 isolados de bactérias promotoras de crescimento.....	22
Figura 2 Média (\pm EP) da altura da planta de algodão inoculado com 10 isolados de bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> aos 60 dias após a emergência	24
Figura 3 Análise de regressão não linear da variável altura de planta no algodão inoculado com o isolado 248 de <i>Bacillus subtilis</i>	24
Figura 4 Médias (\pm EP) de clorofila inicial total nas folhas do algodão com 21 dias (A) e clorofila final total nas folhas do algodão com 60 dias (B) inoculados com 10 isolados de bactérias promotoras de crescimento..	26
Figura 5 Médias (\pm EP) do teor de nitrogênio na parte aérea (A) e na raiz (B) em plantas de algodão inoculadas com 10 isolados de <i>Bacillus</i>	27
Figura 6 Solubilização de fósforo <i>in vitro</i> dos dez isolados de <i>Bacillus</i> em tubos de ensaio na presença de fosfato de cálcio.....	29
Figura 7 Teor de fósforo na parte aérea (A) e raiz (B) em plantas de algodão inoculadas com 10 isolados de bactérias promotoras de crescimento.....	30
Figura 8 Média (\pm EP) do conteúdo de fósforo solúvel em bicarbonato no solo.....	32
Figura 9 Contagem de <i>Bacillus</i> presentes na raiz (A) e no solo (B) dos 11 tratamentos realizados no experimento com a cultura de algodão.	33
Figura 10 Projeção dos 'scores' dos tratamentos e 'loadings' das variáveis.....	35
Figure 11 Análise filogenética da região 16S de <i>Bacillus</i> spp. usados como tratamentos reisolados do solo e raiz em casa de vegetação.....	36

1. INTRODUÇÃO

O uso contínuo de fertilizantes minerais na agricultura tornou-se um problema alarmante no mundo, pois a maioria dos agroquímicos aplicados permanece persistente no solo durante muito tempo. Além disso, 75-90% dos fertilizantes fosfatados aplicados no solo no primeiro ano de cultivo (plantio) não e devidamente aproveitados pelas plantas. Essa situação leva ao uso e aplicação excessiva de fertilizantes minerais nos campos de cultivo, causando efeito deletério sobre o solo e sua microbiota, trazendo como consequência, solos improdutivos, além de problemas sociais e ambientais (TRIPTI et al., 2017).

A utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) é uma alternativa que se difunde cada vez mais. Essas bactérias, encontradas principalmente na região da rizosfera, podem atuar como agentes protetores contra patógenos, sintetizar fitormônios, atuar na melhoria do aporte de nutrientes pelas plantas e induzir mudanças na fisiologia, permitindo melhores processos de floração, germinação e estabelecimento das plantas (EGAMBERDIYEVA; HÖFLICH, 2004; KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004; COMPANT et al., 2005; HAYAT et al., 2010). O uso desses microrganismos como bioinoculantes aumenta a eficiência da obtenção de nutrientes pelas plantas, diminuindo assim os custos de produção e os impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado de fertilizantes no campo (PEDRAZA et al., 2010).

O gênero *Bacillus* inclui mais de 60 espécies e está conformado por microrganismos bacilares Gram positivos, formadores de endósporos resistentes a fatores físicos nocivos, como elevada temperatura, radiação e desidratação, além de diversos fatores químicos, o que favorece o uso como biofertilizantes agrícolas (BERGEY; JOHN G. HOLT, 2000; TEJERA-HERNÁNDEZ; ROJAS-BADÍA; HEYDRICH-PÉREZ, 2011).

A fibra do algodão é o têxtil natural mais utilizado no mundo sendo o Brasil o quinto maior produtor e quarto maior exportador de algodão (CARVALHO, 1996; CONAB, 2017).

A cultura é muito exigente com respeito a nutrientes e, além disso, é uma das que mais defensivos agrícolas utiliza, devido à sua suscetibilidade a variedades de pragas e doenças (ARAUJO, 2008). Entretanto, estudos desenvolvidos por Reva et al. (2004) e Borris (2011) demonstraram que o uso de *Bacillus subtilis* no algodoeiro promove o desenvolvimento da planta e reduz a incidência de doenças.

No presente trabalho, as bactérias *B. subtilis*, *B. velenzensis* e *B. amyloliquefaciens* foram testadas para determinar a capacidade desses microrganismos na promoção do crescimento e a possibilidade que tem esses isolados em aumentar a eficiência e assimilação de nutrientes. Assim como também selecionar por meio de análise de componentes principais, os isolados mais eficientes de acordo com as necessidades da cultura de algodão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Algodão

O algodão *Gossypium hirsutum* L., 1763 pertence à família das malváceas e é cultivado no Brasil, em três macrorregiões, a Norte–Nordeste (Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia), a Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) e a Sul–Sudeste (São Paulo, Paraná e Minas Gerais). Nas três macrorregiões, encontram-se diferentes sistemas de produção desde pequenas glebas, de agricultura familiar, até culturas empresariais, de alto nível tecnológico (CONAB, 2017).

As pesquisas indicam que a planta tem a origem na Índia. Na América pré-colombiana, o algodão já era conhecido pelos nativos que não somente plantavam algumas espécies de algodoeiro, mas sabiam extrair a fibra, fiar e tecer. Porém, foi no século XVIII, com a invenção da máquina de fiar e do tear mecânico por Sir Richard Arkwright e Edmond Cartwright, respectivamente, e do descascador mecânico, por Eli Whitney, que a utilização do algodão na indústria têxtil ganhou impulso (BUENO; COSTA; FERREIRA, 2004).

Os portugueses encontraram a planta sendo cultivada no Brasil na região do Nordeste, e depois foi disseminada para as demais regiões como Centro-Oeste e Sul. Com o algodão os índios fabricavam redes e algumas peças de roupa, empregando-o, também, em tochas incendiárias presas às flechas (SANTO; MORAES; RODRIGUES, 2001).

Carvalho (1996) indica que o algodoeiro é uma planta muito exigente quanto à qualidade do solo. As áreas acentuadamente ácidas ou pobres em nutrientes, as excessivamente úmidas ou sujeitas a encharcamento e os solos rasos ou compactados são desfavoráveis para o cultivo.

O algodão é uma das culturas mais importantes do Brasil sendo este um dos maiores produtores mundiais. A colheita é feita com 140 a 200 dias de idade, conforme a cultivar e as condições ambientais. Quando o capulho (ou maçã) do algodoeiro amadurece, conforme a variedade, mostra a matéria fibrosa que envolve as sementes. Depois de colhido, o algodão é levado às algodozeiras, onde se separa a fibra do caroço. A fibra é matéria-prima para a indústria têxtil e de fiação (NEVES; PINTO, 2012).

A cotonicultura vem crescendo no Brasil, O bom rendimento obtido da safra passada incentiva o produtor brasileiro a aumentar área de algodão. As estimativas iniciais apontam para um crescimento de 15% e para a safra 2017/18 a produção está estimada em quase 1,7 milhões de toneladas de pluma, quantidade que garante ao país lugar privilegiado no cenário internacional, como um dos cinco maiores produtores mundiais, ao lado de China, Índia, Estados Unidos e Paquistão (CONAB, 2017). Brasil e Estados Unidos disputam uma fatia do mercado de algodão desde o século XVIII quando a fibra adquiriu enorme importância econômica com o advento da revolução industrial e o notável desenvolvimento da manufatura têxtil inglesa (SANTO; MORAES; RODRIGUES, 2001).

A participação da cultura no consumo de fertilizantes e defensivos se justifica pelo fato da produção estar concentrada nas regiões do Cerrado, onde as condições do solo exigem adubação com a finalidade de fornecer à planta os elementos essenciais que o substrato não fornece, gerando maiores custos de produção (BUENO; COSTA; FERREIRA, 2004). No Brasil, existem 20 pragas de importância econômica e cinco pragas ocasionais, além de 15 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides que, aliadas a outros fatores socioeconômicos e ambientais, afetam as lavouras algodozeiras causando grande prejuízo econômico (NEVES; PINTO, 2012).

2.2. Produtos da cotonicultura

Em termos econômicos, a pluma é o principal produto primário do algodão. Trata-se das fibras mais longas do algodão em caroço. Atualmente, toda pluma produzida se

destina à fabricação de fios, os quais são usados quase que exclusivamente pela indústria têxtil. Outro tipo de fibra com grande aceitação no mercado é o línter, um conjunto de fibras curtas que envolvem o caroço. Após o processo de descaroçamento, o línter pode ter diversas destinações na indústria, como na fabricação do algodão de farmácia, também conhecido como algodão hidrófilo, tecidos rústicos, estofamentos, filtros e mesmo pavios de pólvora (BELTRÃO et al., 2011).

Além dos diferentes tipos de fibra, o caroço do algodoeiro fornece um produto cujo valor tem sido cada vez mais reconhecido pelo mercado e que também apresenta uma diversificada gama de aplicações. O caroço pode ser utilizado como suplemento na alimentação humana e animal ou mesmo para a fabricação de biodiesel (NEVES; PINTO, 2012). A parte que é destinada à indústria segue para as esmagadoras onde são obtidos o óleo, a torta e o farelo. Quando refinado, o óleo se torna comestível, podendo ser utilizado como óleo de cozinha ou aplicado na elaboração de outros produtos alimentares, como a margarina e a maionese, o que torna o óleo o segundo principal produto do algodoeiro, atrás somente da pluma (CARVALHO, 1996).

2.3. Necessidades nutricionais do algodoeiro

O algodoeiro é uma cultura exigente quanto à qualidade física do solo, a cultura tem preferência por solos com textura média a solos argilosos, favoráveis no conteúdo de nutrientes naturais, matéria orgânica. Enquanto a fatores químicos e biológicos e importante conhecer o grau de acidez, e cobertura vegetal para em caso de ser necessário fazer as correções prévias ao plantio favoráveis para à cultura. (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

O uso intensivo do solo e o aumento da produtividade agrícola esgotam os nutrientes do solo (GWATHMEY, 2005). Portanto, é necessário a reposição desses nutrientes. O nitrogênio (N), depois do carbono, oxigênio e hidrogênio é o quarto elemento mais abundante nas plantas e um dos nutrientes fundamentais na formação de proteínas, ácidos nucléicos, clorofila e hormônios exigidos pela cultura. Este nutriente influencia

diretamente no metabolismo, produtividade e qualidade da fibra do algodão (WILD; RUSSELL, 1992).

A absorção do N se intensifica a partir dos 20 dias de idade das plantas e continua assim até o pleno florescimento, regularizando o ciclo da planta, incentivando o florescimento, a frutificação e a produção, aumentando os níveis de clorofila a e b (que tem em seu núcleo quatro moléculas de nitrogênio), além de melhorar o comprimento e a resistência da fibra (VAN RAIJ; DA SILVA, 1997).

Outro macronutriente essencial para a planta de algodão é o fósforo (P), este faz parte de todo o metabolismo energético, e sua absorção também se intensifica a partir dos 20 dias de idade. Ele participa de importantes processos como a fotossíntese, a síntese de proteínas e as atividades enzimáticas sendo especialmente abundante no núcleo das células e o principal composto de reserva nas sementes, embora sua absorção seja baixa por se encontrar de forma insolúvel no solo. Portanto, é recomendável o uso de fontes solúveis de P e de formulações de N-P-K que além desses nutrientes também forneçam enxofre (AMES, 1966; KPOMBLEKOU-A; TABATABAI, 1994; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

O algodão também precisa de potássio (K), este nutriente age indiretamente na respiração, no metabolismo de carboidratos, na síntese de proteínas, no transporte, na fotossíntese e no balanço de água. Encontra-se nas sementes e na casca dos capulhos e ajuda na produtividade e qualidade de fibra (maturidade e micronaire) (EPSTEIN; BLOOM, 2006; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). O enxofre (S) também forma parte dos elementos necessários pela cultura do algodão, faz parte de proteínas e aminoácidos que interveem em processos fotossintéticos da planta (WILD; RUSSELL, 1992).

De acordo com Plazas e García (2011) dentre os nutrientes secundários, necessários para a cultura do algodão destacam-se o cálcio (Ca), magnésio (Mg), zinco (Zn) e boro (B); o Ca aparece como constituinte da parede celular, o Mg na clorofila e na translocação de açúcares dentro da planta, o B evita o nanismo fomentado pelo

desenvolvimento de meristemas de raízes e folhas, auxilia na formação do tubo polínico, além de participar na síntese de proteínas e formação da parede celular. O Zn evita o acúmulo de nitrato nas folhas. Estes não são problemas sérios para a adubação, uma vez que são fornecidos tanto na correção dos solos como em aplicações foliares (VAN RAIJ; DA SILVA, 1997).

2.4. Bactérias promotoras de crescimento em plantas

As bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) são aquelas capazes de colonizar as raízes das plantas e estimular o crescimento e rendimento dos cultivos (CHANWAY et al., 1989).

Os microrganismos presentes na rizosfera possuem uma diversidade genética que os permite se adaptarem nos diferentes habitats, cumprindo processos nos ecossistemas terrestres, agem como simbiontes com as plantas e contribuem no aporte de nutrientes limitantes, e na produtividade ao regular processos importantes de mineralização, no ciclo do nitrogênio, no ciclo do carbono e na solubilização de fosfatos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

O estudo de microrganismos promotores de crescimento de plantas tem como objetivo identificar inóculos microbianos que permitam melhorar o crescimento das plantas e reduzir a dependência dos fertilizantes e defensivos agrícolas (ADESEMOYE; TORBERT; KLOPPER, 2009).

O N é um dos principais nutrientes que as plantas precisam para seu desenvolvimento e é um fator limitante em seu crescimento. Segundo estudos realizados por Oberson et al. (2013), pode-se classificar as linhagens bacterianas em diazótrofos, que são bactérias simbióticas associadas as leguminosas que infectam a raiz produzindo nódulos e as bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre que inclui espécies dos gêneros *Azospirillum*, entre outras. Estas bactérias de vida livre não invadem a planta e fixam o nitrogênio atmosférico através das enzimas nitrogenase alterando o subministro

de nutrientes transformando o nitrogênio atmosférico em amônia-N (SPRENT; PARSONS, 2000; MERRICK, 2004; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

Depois do N, o P é o nutriente mais limitante nas plantas. No Brasil, os solos podem conter grandes reservas de fósforo total, mas a quantidade disponível para as plantas é muito pequena porque a maior porção deste elemento se encontra em formas insolúveis, as quais as plantas são incapazes de absorver. Os microrganismos utilizam os açúcares dos exsudados das raízes das plantas e o metabolizam liberando ácidos orgânicos como ácido butírico, málico, acético, láctico, cítrico entre outros, e estes agem como quelantes de cátions promovendo a liberação de fosfatos solúveis para a planta (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; FREITAS; BANERJEE; GERMIDA, 1997).

As plantas somente podem absorver o P em duas formas iônicas solúveis, a monobásica (H_2PO_4^-) e a dibásica (HPO_4^{2-}) (GLASS, 1989). Porém, as BPCP são capazes de solubilizar o fosfato, tornando-o disponível para a planta, seja mediante a secreção de ácidos ou mediante enzimas produzidas pelas bactérias conhecidas como fosfatases. Estas enzimas são capazes de solubilizar o P orgânico procedente da matéria orgânica mediante hidrólises (ALEXANDER, 1978; JHA; SARAF, 2015).

O ferro é um nutriente essencial no metabolismo das mitocôndrias, cloroplastos e é absorvido principalmente da rizosfera das plantas. No solo, o ferro se encontra distribuído em grandes quantidades no íon Fe^{3+} , forma que reage formando óxidos e hidróxidos que são insolúveis e, portanto, indisponíveis para as plantas e os microrganismos (ROUT; SAHOO, 2015). As BPCP geram maneiras para melhorar a absorção do ferro, mediante a liberação de compostos orgânicos capazes de reduzi-lo até ficar solúvel para que seja absorvido por enzimas presentes na membrana celular da planta. O ferro solúvel atua numa série de processos como a respiração, fixação de nitrogênio e a fotossíntese (MORRISSEY; GUERINOT, 2009).

O uso potencial que tem as BPCP como inoculantes em plantas, pelos seus diversos mecanismos responsáveis na resposta de crescimento e a competência pelos

nutrientes, tem uma enorme variação entre os microrganismos do solo, incluindo os patógenos microbianos que são os responsáveis pela dinâmica da comunidade vegetal e a diversidade das plantas, o que indica a importância dos microrganismos como reguladores da riqueza de espécies vegetais na terra (VAN DER HEIJDEN; BARDGETT; VAN STRAALLEN, 2008).

Para o processo de desenvolvimento de inoculantes, é necessário levar em consideração fatores como a seleção das BPCP adequadas baseando-se na planta hospedeira, alvo, tipo de solo, comunidades microbianas selvagens (autóctones) e condições ambientais, pois a maioria dos microrganismos estão influenciados pelas interações entre as raízes das plantas e o solo circundante (BIRCH; KAMOUN, 2000; BERG; SMALLA, 2009).

A capacidade de produção de hormônios vegetais (fitoestimulação) pelas BPCP é considerada um dos mecanismos mais importantes pelo qual muitas bactérias promovem o crescimento das plantas, a divisão celular e a extensão das raízes (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010). Os principais fitormônios são as auxinas, citocininas e giberelinas. As auxinas são produzidas como resultado do metabolismo das BPCP e que são responsáveis pela influência no crescimento vegetal, divisão, expansão e diferenciação de células e tecidos vegetais, além do alongamento da raiz (TSAVKELOVA et al., 2006; LAVENUS et al., 2013). As citocininas são derivados de purinas que promovem e participam na divisão celular das plantas e no crescimento primário da raiz sendo *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Azospirillum* os principais gêneros que as produzem. As giberelinas são um amplo grupo de hormônios sintetizados pelas bactérias que estimulam o sistema radicular melhorando a aquisição de nutrientes para facilitar o crescimento da parte aérea (GLICK, 2014; WONG et al., 2015).

Outro dos hormônios que participam no crescimento e desenvolvimento das plantas e fazem parte da coleção estrutural das BPCP é o etileno, implicado como mediador nas vias de sinalização hormonal. Estudos recentes confirmam que o etileno está envolvido em diversos processos dentro do desenvolvimento da planta, como a

germinação de sementes, crescimento de pelos radiculares, nodulação, maturação dos frutos e senescência (SANTNER; ESTELLE, 2009).

Outra forma de atuação das BPCP é a produção de antibióticos e enzimas que excretam como metabolitos secundários. Espécies do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* possuem esta característica que permite sua rápida colonização na rizosfera deslocando outras bactérias prejudiciais e auxiliando no biocontrole de patógenos (HILLEL; HATFIELD, 2005; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

Na atualidade, o uso de BPCP nos solos agrícolas é uma influência para as interações e processos microbianos no solo. As BPCP podem agir como biofertilizantes, biocontroladores e fitoestimulantes (BERG; SMALLA, 2009; BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012). Várias linhagens bacterianas estão disponíveis comercialmente em forma de produtos que são usados como biofertilizantes e agentes de controle biológico (JHA; SARAF, 2015). Nos sistemas de produção de algodão a necessidade de se conseguir um rendimento alto e uma produção favorável aponta para a necessidade de novos estudos que procurem novas linhagens que estabeleçam uma interação planta-microrganismo favorável, baseando-se em enfoques moleculares e biotecnológicos que permitam gerar novos conhecimentos da biologia da rizosfera para atingir o manejo integrado das populações microbianas do solo (NADEEM et al., 2013; PAJUELO et al., 2014).

Dentro dos gêneros de BPCP estudados por apresentarem potencial na agricultura estão *Pseudomonas*, *Bacillus* (KIM et al., 2003), *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Staphylococcus*, *Burkholderia* e *Flavobacterium*. As bactérias do gênero *Bacillus* pertencem à família *Bacillaceae*, atualmente inclui mais de 60 espécies, são Gram-positivas, formadores de endósporos, quimioheterótrofos, móveis, rodeados de flagelos, podem ser anaeróbias ou aeróbias facultativas. As células bacterianas deste gênero apresentam um tamanho que varia 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm , e podem ser isolados comumente de solos e plantas (BERGEY; JOHN G. HOLT, 2000; ANDERSON, 2003).

Bacillus subtilis se caracteriza por ser Gram-positivo, produtor de endósporos resistentes a fatores físicos e químicos prejudiciais como altas temperaturas, radiação, desinfetantes, entre outros. Produz enzimas hidrofílicas extracelulares que degradam polissacarídeos; produz antibióticos lipopeptídicos, da família surfactina, bacitracina e polimixina; sobrevive de 55-77 °C, e é considerado como um agente de controle biológico por promover o desenvolvimento de plantas e prevenir doenças no solo (RAGAZZO-SÁNCHEZ et al., 2011).

A promoção de crescimento ocasionada por *B. subtilis* é consequência do aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Estudos realizados em feijão inoculados com esta bactéria mostraram que a síntese de auxina, citocinina e giberelina levou a semente a uma rápida germinação, emergência e aumento (29 a 33%) do peso seco das plântulas (MANJULA; PODILE, 2005). Além disso, Araujo (2008) mostra que sementes de algodão, milho e soja expostas à inoculação com *B. subtilis* tiveram incremento na emergência das plântulas. Desta maneira, a rápida emergência das plantas diminui o tempo no campo e favorece um menor contato com patógenos presentes no solo e no ambiente externo nos primeiros estágios da planta (LANNA FILHO; FERRO; DE PINHO, 2010).

Outras espécies de *Bacillus* que estão sendo estudadas como possíveis bioinoculantes são *B. velezensis* e *B. amyloliquefaciens* gerando bons resultados na agricultura pela importância na promoção de crescimento (FERNÁNDEZ et al., 2004).

A espécie *B. velezensis* é comumente encontrada no solo, e por apresentar metabolismo aeróbio é capaz de produzir antibióticos com alta atividade antifúngica comprovada por bioensaios *in vitro*. Também, comprovou-se a capacidade de solubilizar fosfatos, produzir ácido-3-indol acético e sideróforos que promovem o crescimento da planta (FERNÁNDEZ et al., 2004). Outros estudos mostraram que *B. velezensis* poderia ajudar a restabelecer o funcionamento da microflora benéfica no solo (RUIZ-GARCIA, 2005).

A espécie *B. amyloliquefaciens* possui atividade fungicida que foi demonstrada a partir da produção de antifúngicos gerando um composto ativo que inibe o crescimento de hifas de *Rhizoctonia solani* (YU et al., 2002). Seu genoma está constituído por um grupo de genes implicados nas sínteses de lipopeptídeos e policétidos com atividade antifúngica, antibacteriana e nematicida. Esta bactéria tem a capacidade de se associar às raízes da planta estimulando seu crescimento e favorecendo a supressão de patógenos, melhorando os ciclos naturais dos materiais minerais e orgânicos, permitindo assim criar condições ideais para as plantas, capaz de produzir uma variedade de metabólitos secundários que evitam o crescimento de outras bactérias competitivas dentro da rizosfera da planta (CHEN et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização do experimento

O experimento foi desenvolvido de fevereiro a abril de 2017 (60 dias) em casa de vegetação no Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV/UNESP em Jaboticabal-SP (21° 14' 05" S, 48° 17' 09" W e 615,01 m de altitude). Todas as análises químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo.

3.2. Preparação do solo

O solo utilizado no experimento foi Latossolo vermelho eutrófico (EMBRAPA., 2006). Foi realizada análise química prévia à semeadura apresentando as características indicadas na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo.

pH	MO	P (resina)	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
CaCl ₂	g dm ³	mg dm ³mmolc dm ³						%
6,5	11	20	0,7	19	5	17	24,4	42,8	64

O solo foi peneirado e utilizado para preencher vasos com capacidade de 5 litros. A adubação foi realizada de acordo com a análise de solo e as recomendações nutricionais da cultura do algodão. Foram acrescentados nitrogênio (N: 3,34 g ureia), fósforo (P: 81,67 g Super Simples), potássio (K: 0,3379 g KCl), zinco (Zn: 1,94 g ZnSO₄7H₂O, e boro (B: 0.0070 g H₃BO₃) em cada vaso antes da semeadura para disponibilizar nutrientes para as plantas. A umidade foi mantida em torno de 70% da capacidade de campo com irrigações diárias. As temperaturas mínimas e máximas ficaram na média de 28,6 e 38,0 °C, respectivamente.

3.3. Semeadura

Quatro sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* - IMA15675 B₂RF) foram semeadas por vaso, e quinze dias após a emergência foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por vaso.

3.4. Microrganismos e preparo dos inóculos

Os microrganismos utilizados foram previamente isolados da cultura do milho (MILANI, 2017) e pertencem ao acervo de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal-SP. Foram utilizados 10 isolados bacterianos, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos isolados usados no estudo.

Espécie	Isolado bacteriano
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	001
<i>Bacillus velezensis</i>	188
<i>Bacillus subtilis</i>	248
<i>Bacillus subtilis</i>	263
<i>Bacillus subtilis</i>	274
<i>Bacillus subtilis</i>	287
<i>Bacillus subtilis</i>	290
<i>Bacillus subtilis</i>	291
<i>Bacillus subtilis</i>	309
<i>Bacillus subtilis</i>	320
Controle	-

Estas bactérias foram selecionadas por apresentarem características para a promoção do crescimento de plantas como a capacidade de solubilização de fosforo, fixação de nitrogênio e produção de AIA (Ácido Indol Acético) de acordo com Milani (2017).

Cada isolado bacteriano foi cultivado em frasco erlenmeyer com capacidade para 125 mL, contendo 60 mL de meio caldo nutriente estéril e incubado a 30 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após esse período, as amostras foram padronizadas e a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 630 nm para determinar a concentração do inóculo (KLOEPFER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989). As suspensões foram inoculadas em meio sólido e incubadas por 24 horas para realização de contagem e verificação da pureza dos isolados. Em seguida a concentração foi ajustada para 7×10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹).

3.5. Inoculação do algodão

As sementes de algodão IMA 15675 B₂RF foram inoculadas por meio de imersão nas suspensões bacterianas, que foram mantidas sob agitação em plataforma agitadora a 130 rpm por 30 minutos. Após esse período, as sementes foram retiradas das

suspensões e semeadas nos vasos mantidos em casa de vegetação.

Após a emergência, as plântulas foram inoculadas utilizando as mesmas concentrações e metodologia para inoculação das sementes. Foram realizadas oito inoculações sendo feitas a cada 7 dias, desde o dia 03 de março até 21 de abril com o auxílio de uma pipeta adicionando 10 mL da suspensão contendo 10^8 UFC.mL⁻¹ do inóculo. A inoculação foi realizada na base e na parte aérea da planta para avaliar a eficiência da colonização e a promoção do crescimento vegetal. Com o controle, foram utilizadas plantas sem nenhum tipo de inóculo.

3.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 11 tratamentos e cinco repetições, totalizando 55 vasos. Prévio à análise de variância, a normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variâncias (teste de Levene) foram realizadas para cada parâmetro avaliado. Os dados da altura foram submetidos a análise de regressão não linear para estimar o crescimento das plantas através do tempo usando o software livre R 3.4.1 para Windows. Os resultados calculados pelo programa foram o valor de cada uma das constantes com 95% de confiabilidade, o valor do coeficiente de correlação (r^2) e o erro padrão. As comparações das médias foram realizadas utilizando o teste de Duncan ($\alpha \leq 0.05$). A análise de componentes principais foi empregada para examinar as variações nos parâmetros avaliados e verificar quais parâmetros contribuíram na separação dos tratamentos. Finalmente, as análises univariada e multivariada foram executadas utilizando o software livre R 3.4.1 para Windows.

3.7. Parâmetros avaliados

3.7.1. Altura

A altura foi avaliada com o auxílio de uma régua graduada em centímetros à distância entre o colo e o ápice da planta. As medidas foram realizadas semanalmente, totalizando oito medições ao longo do experimento. A altura do caule principal é uma das

medições mais comuns feitas na planta do algodão e são úteis para a tomada de decisões de manejo (RAMÍREZ-LUNA et al., 2005).

3.7.2. Determinação de massa seca

No final do experimento, as plantas foram lavadas em água corrente, separadas em raiz e parte aérea, e colocadas em sacos de papel. A secagem foi realizada para obter a massa seca de raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST). Para o cálculo da MST foram somadas MSR e MSPA. As amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar a 65°C por 72 horas, até peso constante, sendo em seguida, determinada a massa utilizando-se balança analítica.

3.7.3. Teor de clorofila na folha e teor de nitrogênio na parte aérea e raiz

A determinação do teor de clorofila foi realizada utilizando-se dimetilformamida e posterior leitura em espectrofotômetro a 480, 647 e 664 nm para determinação das clorofilas a, b e c, respectivamente, conforme método proposto por (Wellburn, 1994). Foram escolhidas aleatoriamente três plantas por tratamento para realizar a medição da clorofila. Foi amostrado 1 cm² de folha extraída a partir de dois terços de sua base e a 1 cm de sua margem, nas terceiras folhas das plantas escolhidas. O material vegetal foi retirado com auxílio de uma tesoura, cortado e transferido a tubos eppendorf âmbar de 5 mL com dimetilformamida. As amostras foram armazenadas durante 48 horas em geladeira. Após esse período, as leituras foram realizadas.

A determinação do N foi feita pelo método de Kjeldahl proposta por Bremner (1996) e Mulvaney (1996) modificado por Bezerra Neto e Barreto (2011). Foi realizada em três etapas: digestão, destilação e titulação. Foram pesados 100 mg das amostras vegetais moídas e transferidas para tubos digestores, adicionando nesses tubos 7 mL da mistura digestora. Os tubos foram adaptados em blocos digestores localizados em uma capela e colocados para aquecer em sequência de tempo e temperatura (1 h a 100°C, 1 h a 200°C e 1 h a 300°C).

Após resfriamento, o digerido foi dissolvido com 10 mL de água destilada acoplado o tubo digestor ao destilador de Kjeldahl. Posteriormente, foi destilado com 25 mL de NaOH (50%) e recolhido o destilado em um erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico com indicador misto. Após obter 20 mL de destilado, a amônia destilada foi titulada usando uma solução padrão de H_2SO_4 0,05 N. O ponto final da titulação corresponde à mudança de cor de verde para vermelho ou rosa claro. Os valores obtidos correspondem ao teor de nitrogênio total.

3.7.4. Teor de fósforo solúvel na parte aérea e raiz

As concentrações de P nas plantas e nas raízes foram determinadas segundo a metodologia proposta por Haag et al. (1975) com a digestão sulfúrica do material vegetal e seguida pela metodologia proposta por Bezerra Neto e Barreto (2011). Foi pesado 0,5 g do material vegetal moído e transferido para tubo digestor, foi adicionado 5 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de ácido perclórico concentrado e foi deixado em repouso de um dia para outro. Os tubos foram colocados para aquecer em bloco digestor localizado em uma capela, na sequência de tempo e temperatura (1h a 80°C, 1h a 120°C, 1h a 150°C e 1h a 180°C). Após esfriar, foi transferido quantitativamente o digerido para um balão volumétrico de 50 mL, com o auxílio de água deionizada e um bastão. O tubo digestor foi lavado pelo menos três vezes, transferindo o líquido de lavagem para o balão volumétrico e completando o volume; o extrato foi transferido para frascos. Para sua análise por método colorimétrico, foi adicionado reagente específico (molibdato de amônio mais vanadato de amônio), o qual reage com o fósforo formando um complexo de cor amarelada. Foi preciso fazer uma curva padrão com concentrações de fósforo conhecidas para correlacionar com as amostras.

3.8. Análise química do solo

3.8.1. Preparação das amostras do solo

As amostras do solo foram separadas em duas partes de aproximadamente 100 gramas cada uma. Uma parte foi peneirada e seca a temperatura ambiente para a realização das análises químicas e a outra foi conservada em geladeira para a realização das análises microbiológicas.

3.8.2. Fósforo solúvel em bicarbonato

Para a determinação do P solúvel foi utilizado o método proposto por Murphy e Riley (1962) modificado por Watanabe e Olsen (1965). As amostras de solo seco ao ar à temperatura ambiente foram peneiradas com malha de 2 mm. Foram pesadas 0,6 g de terra fina seca ao ar (TFSA) em erlenmeyers de 250 mL, contendo 12 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,5M pH 8,5. Posteriormente, as amostras foram levadas ao agitador horizontal onde permaneceram por 30 minutos e foram filtradas em papel Whatman nº 40. Em tubos de ensaio, foram adicionados 2 mL do filtrado, 0,2 mL de solução de ácido sulfúrico 2,5 N, 0,8 mL de “**Reagente B**” em tubos de ensaio 13x150 mm, foi agitado vigorosamente e incubado em banho-maria por 20 minutos a 45 °C e foi feita a leitura em absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda de 820 nm utilizando um branco, com 2 mL de bicarbonato de sódio 0,5 M, pH 8,5, no lugar do extrato de solo. Foi preparada uma curva padrão com solução KH_2PO_4 contendo $100 \mu\text{g P/mL}^{-1}$. Os cálculos foram feitos de acordo com a correlação dos valores da curva.

Reagente B: Preparado imediatamente antes de ser utilizado dissolvendo 1,056 g de ácido ascórbico em 200 mL do reagente A.

Reagente A: Dissolver 12 g de molibdato de amônio e 0,2908 g de tartarato de antimônio e potássio em 250 e 100 mL de água destilada, respectivamente. Juntou-se as duas soluções em 1000 mL de solução de ácido sulfúrico 2,5 M e completou-se volume com água destilada para 2000 mL.

3.8.3. Isolamento e contagem de *Bacillus* em solo e raiz

As amostras coletadas foram mantidas a 4 °C em geladeira até o processamento no laboratório para estimar o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Foi utilizada a metodologia de diluição em série de 10^{-1} a 10^{-3} segundo Wollum (1982). Os isolamentos de *Bacillus* foram obtidos conforme metodologia seletiva de choque térmico proposta por Rothfuss; Bender e Conrad (1997) e Vieira e Nahas (2000). Foram adicionados 10 g de solo de cada tratamento em um erlenmeyer contendo 95 mL de uma solução de pirofosfato de sódio 0,1% (p/v) e levadas a agitação horizontal por 30 minutos, em seguida, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de pirofosfato e agitadas em vórtex para homogeneização das amostras. Para reisolamento de *Bacillus*, os tubos com as diluições foram submetidos a um choque térmico a temperatura de 80°C por 10 minutos, resfriando-o em seguida por 5 minutos na água gelada (ROTHFUSS; BENDER; CONRAD, 1997). Em seguida, 0,1 mL de cada diluição foram transferidas a placa de Petri contendo meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas em BOD, com temperatura de 25°C a 30°C permitido o crescimento de colônias isoladas de *Bacillus* resistentes ao choque por possuírem endósporos resistentes, comprovando sua morfologia com coloração de Gram. As contagens foram feitas a cada 24 horas em um contador de colônias com 6x de aumento, até não se constatar nenhum aumento do número de colônias. Foram consideradas apenas as contagens que variaram de 30 a 300 colônias (BLACK, 1965; SCHORTEMAYER et al., 1996).

3.8.4. Solubilização de fosfato insolúvel em meio de cultura líquido

A determinação do P solúvel foi feita utilizando a metodologia descrita por Ames (1966) e Nahas (1996) onde a atividade de solubilização de fosfato de cálcio por microrganismos do gênero *Bacillus* foi determinada em frasco de erlenmeyer de 125 mL contendo 60 mL de meio líquido com pH 7,0 contendo por litro 0,1 g de NaCl, 1 g de NH₄Cl, 2 g de KCl, 1 g de CaCl₂.2H₂O, 1,2 g de MgSO₄.7 H₂O, 10g de glicose, 0,5 g de extrato de levedura, suplementado com 5 g.L⁻¹ de fosfato de cálcio (NAHAS, 1996). A

inoculação de cada isolado foi realizada pela transferência de 0,2 mL de uma suspensão obtida a partir de colônias crescidas por 24 horas em caldo nutriente na concentração de 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Após a inoculação, as culturas foram incubadas, sem agitação, a 28°C por 7 dias. Diariamente, foram retirados quatro frascos de cada cultura bacteriana. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 9000 rpm por 15 minutos e, no sobrenadante, foi determinado o teor de fosfato.

Seguindo a metodologia de descrita por Ames (1966), foram adicionados 0,1 mL do sobrenadante em tubos de ensaio, adicionando a estes 1,5 mL de água destilada e 1,4 mL da **solução R**. Todos os tubos foram agitados e incubados em banho-maria, a 45 °C, por 20 minutos. Após a incubação, foi feita uma curva padrão com solução de KH₂PO₄ 0,0002 mol.L⁻¹. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 820 nm correlacionando o valor das leituras para fazer os cálculos.

Solução A: Dissolver 10 g de ácido ascórbico em 100 mL de água deionizada.

Solução B: Dissolver 1,25 g de molibdato de amônio em 30 mL de água deionizada, acrescentar 7,3 mL de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume para 300 mL.

Solução R: Mistura da solução A e a solução B na proporção de uma parte de solução A para seis partes de solução B (preparar no momento da determinação).

3.8.5. Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e análise da região 16S do rDNA bacteriano

As 10 linhagens utilizadas nesse trabalho tiveram a caracterização molecular realizada previamente por Milani (2017). A fim de realizar a confirmação de que os resultados obtidos se deram em virtude da ação da linhagem inoculada, as culturas obtidas do isolamento realizado após o experimento foram novamente caracterizadas. O DNA genômico bacteriano foi extraído com o kit Quick-DNA Universal (Zymo Research) seguindo as orientações do fabricante.

Para a identificação, foi amplificada e sequenciada a região 16S do DNA ribossomal. A amplificação foi realizada utilizando-se os *primers* P027F e 1378R. As condições da reação seguiram segundo o programa de amplificação: 95 °C/2 min seguido de 25 ciclos de desnaturação a 95 °C/30s, anelamento a 63 °C/1 min e extensão da fita de DNA a 72 °C/1 min; seguido por uma extensão final a 72 °C/7min.

A reação de sequenciamento foi realizada com os mesmos *primers* em sequenciador automático. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas utilizando-se o software BioEdit, versão 7.0.5.3 (HALL, 1999) e comparadas às sequências depositadas Genbank, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A análise filogenética da região 16S do DNA ribossomal do isolado obtido do solo após novo isolamento ao final do teste foi utilizado para construção da árvore elaborada pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando-se o parâmetro Kimura-2 para o cálculo das distâncias evolutivas. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 repetições, sendo exibidos em forma de porcentagem (%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Massa seca do algodão

O tratamento contendo o isolado 248 de *B. subtilis* apresentou maior massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de algodão, diferenciando-se significativamente do controle (Figura 1A). O tratamento com o isolado 263 de *B. subtilis* foi superior na quantidade de massa seca da raiz (MSR) (Figura 1B) quando comparadas com o controle. No caso da massa seca total (MST) (Figura 1C), os tratamentos com os isolados 248 e 290 superaram significativamente o controle.

Segundo Saharan e Nehra (2011), a inoculação com bactérias promotoras de crescimento pode beneficiar as plantas no estágio vegetativo potencializando a emergência, vigor, altura, peso da planta, disponibilização de nutrientes e aumento na clorofila. Por outro lado, cada cultura dependendo das necessidades seleciona os microrganismos através da raiz (exsudatos) e, posteriormente, esses microrganismos

colonizam o solo e tecidos internos da planta (HALLMANN et al., 1997; HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008).

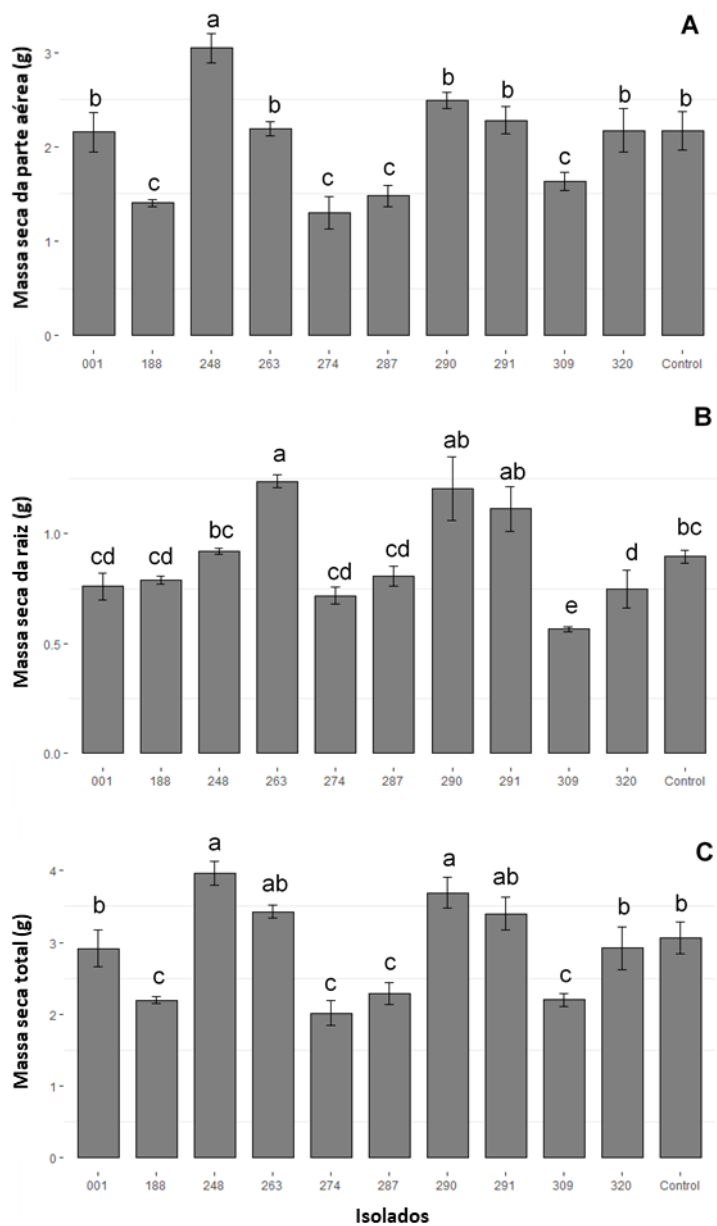


Figura 1 Médias (\pm EP) da massa seca da parte aérea (**A**), massa seca da raiz (**B**), massa seca total (**C**) do algodão inoculado com 10 isolados de bactérias promotoras de crescimento.

Andreote et al. (2010) indicam que a microbiota é uma estrutura dinâmica influenciada pelos fatores bióticos e abióticos que permitem uma constante interação entre a planta e as bactérias inoculadas formando associações que proporcionam uma troca de benefícios no solo e dentre esses benefícios pode-se mencionar o aumento da massa seca da planta. Pesquisas relacionadas com bactérias do gênero *Azotobacter* e *Azospirillum* inoculadas no algodão e arroz indicam que o uso desses microrganismos favorece o crescimento e a formação de massa seca na planta (GUZMÁN et al., 2012; MANTILLA; ALVAREZ; OVIEDO, 2015)

Portanto, sugere-se que os isolados 248, 263 e 290 de *B. subtilis* inoculados nas sementes e, posteriormente no solo, colonizaram a rizosfera das plantas de algodão favorecendo a maior formação de massa seca interagindo positivamente com a microbiota própria do solo, uma vez que o solo utilizado não foi esterilizado.

4.2. Altura da planta

Os tratamentos apresentaram alturas similares entre as plantas quando comparadas com o controle (Figura 2). Entretanto, um dado interessante foi constatado no padrão de crescimento do isolado 248. Apesar de não ter sido encontrada uma diferença significativa entre a altura das plantas tratadas e o controle ao final do experimento (35,44 cm de altura, 21,36% a mais que o controle, enquanto o controle atingiu 29,20 cm aos 60 dias após a emergência das plantas), as medidas tomadas ao longo do teste demonstram que as plantas tratadas com o isolado 248 de *B. subtilis* atingiram a altura máxima em um período menor de tempo do que o controle, como pode ser observado na análise de regressão não linear apresentada na (Figura 3).

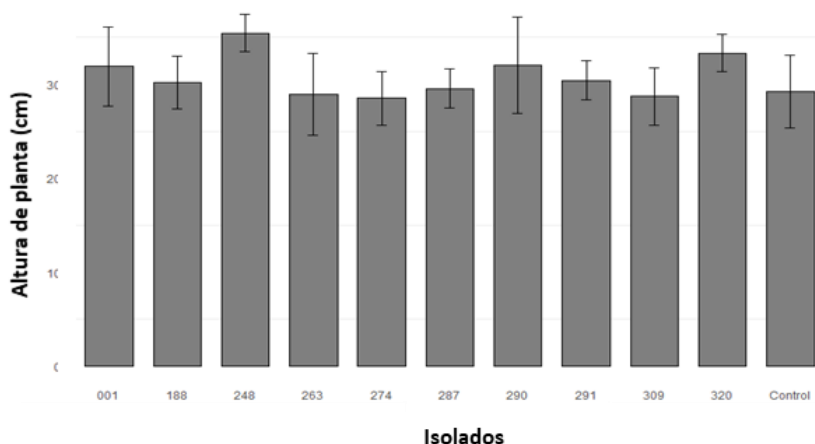


Figura 2 Média (\pm EP) da altura da planta de algodão inoculado com 10 isolados de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* aos 60 dias após a emergência.

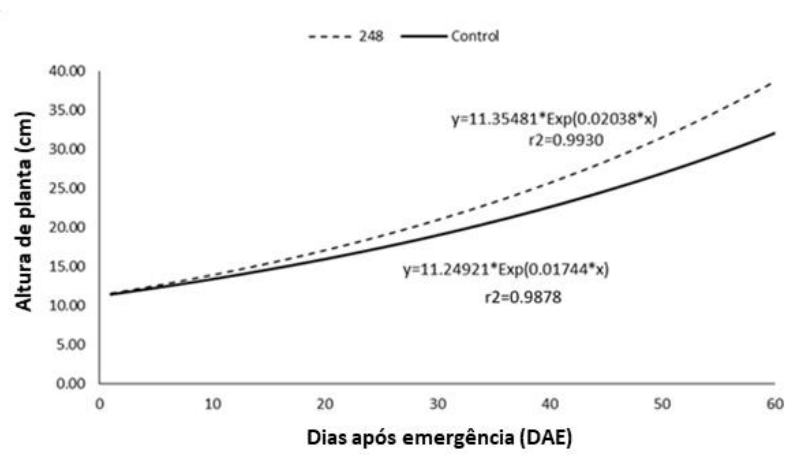


Figura 3 Análise de regressão não linear da variável altura de planta no algodão inoculado com o isolado 248 de *Bacillus subtilis*.

Em estudo de campo, Yao et al. (2006) constataram que a inoculação com *B. subtilis* promoveu um aumento no crescimento e na produtividade das plantas de algodão. Silva et al. (2008) demonstram que a altura de plantas de tomateiro foi influenciada pela inoculação de *B. amyloliquefaciens* e *Acinetobacter johnsonii* que promoveram o crescimento das plantas em 9,5% e 20,2% após 21 dias.

No caso do experimento, foi constatado que o isolado 248 promoveu um aumento de 21,36% a mais na altura das plantas do que o controle, entretanto esse valor não foi considerado significativo mediante as análises estatísticas. Provavelmente, isso seja devido ao período experimental de 60 dias, sugerindo que um tempo maior poderia evidenciar de maneira significativa a influência positiva no crescimento da planta que pode ser obtida com a aplicação do isolado bacteriano.

4.3. Teor de clorofila nas folhas e nitrogênio na planta

A clorofila inicial aos 21 dias após a emergência não apresentou diferenças significativas comparadas com o controle (Figura **4A**). Para a clorofila final aos 60 dias apresentou diferenças significativas no tratamento com o isolado 290 (Figura **4B**).

O teor de N da parte aérea nos tratamentos 248, 263, 274, 290 e 320 foi significativamente superior ao controle (Figura **5A**). No caso da raiz, o teor de nitrogênio foi significativamente superior ao controle nos tratamentos com os isolados 248, 263 e 290 (Figura **5B**).

Segundo López et al. (2014) o conteúdo de clorofila nas folhas está diretamente relacionado com a concentração de nitrogênio na planta. De acordo com Pindi, Sultana e Vootla (2014), as bactérias promotoras de crescimento podem potencializar o aumento da clorofila nas folhas. O resultado obtido no experimento sugere que as inoculações periódicas dos isolados 248 e 290 nas fases iniciais da planta de algodão contribuíram para o aumento da atividade fotossintética das plantas que se reflete no teor de clorofila. Além disso, os dados apresentados corroboram com a existência da relação direta entre o teor de clorofila e a concentração de N na planta, uma vez que a maior concentração de N na planta foi obtida para os mesmos isolados (Figura **5**).

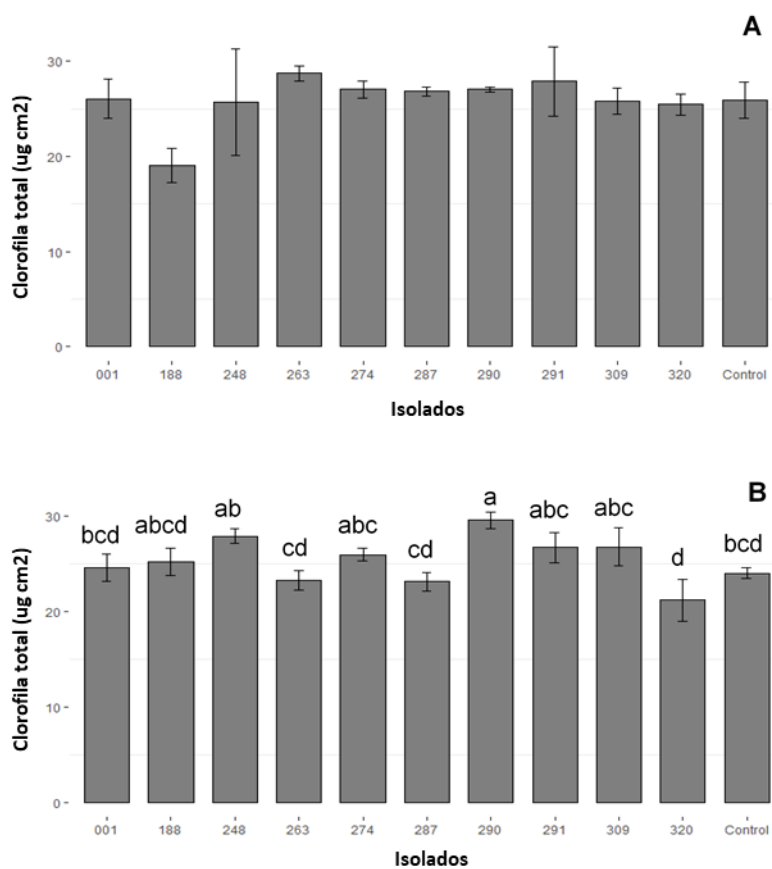


Figura 4 Médias (\pm EP) de clorofila inicial total nas folhas do algodão com 21 dias **(A)** e clorofila final total nas folhas do algodão com 60 dias **(B)** inoculados com 10 isolados de bactérias promotoras de crescimento.

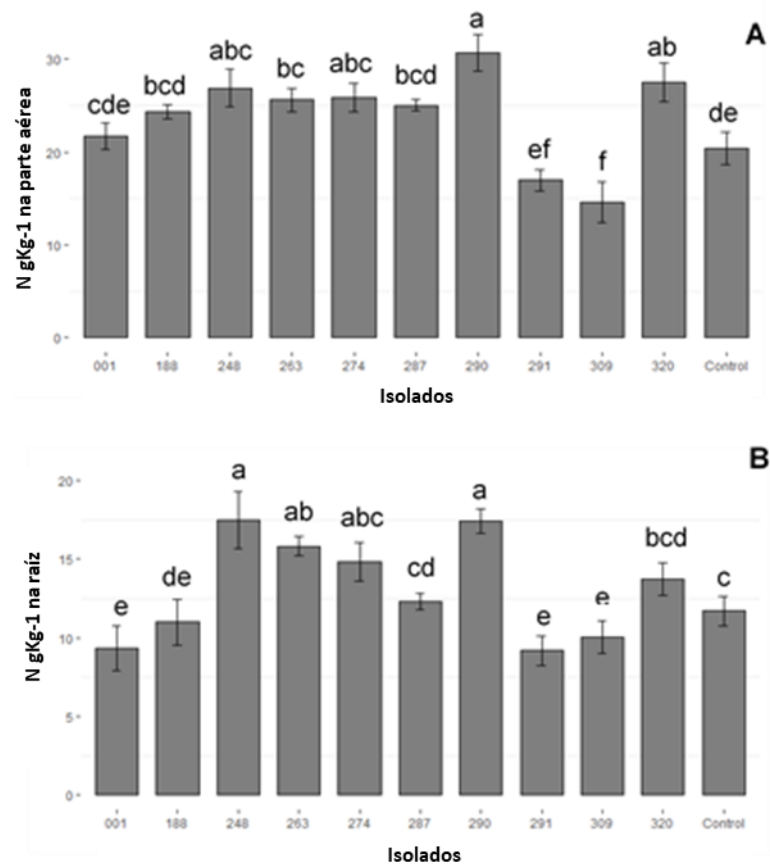


Figura 5 Médias (\pm EP) do teor de nitrogênio na parte aérea **(A)** e na raiz **(B)** em plantas de algodão inoculadas com 10 isolados de *Bacillus*.

Nesse sentido, sugere-se que o aumento no teor de clorofila indica maior absorção de nutrientes, principalmente o N pela planta de algodão o que também fica evidente pela maior massa ou comprimento radicular o que permitiu aumento na absorção de N, como foi evidenciado por Wood et al. (1992); Castillo e Ligarreto (2010) em estudo com milho e algodão.

Dobbelaere, Vanderleyden e Okon (2003) e Loon (2007) demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* foram capazes de melhorar a condição nutricional da planta, pois disponibilizaram o N no solo para a absorção pelas mesmas. Manjula e Podile (2005) determinaram que a inoculação com *B. subtilis* contribuiu na promoção de crescimento e

aumento da nodulação em plantas de gandu, e como consequência houve aumento da fixação de nitrogênio.

Os resultados obtidos indicam que os isolados 290, 320, 248, e 274 interagiram com a microbiota do solo e que, posteriormente, colonizaram a rizosfera disponibilizando metabolitos para a planta, o que foi evidenciado no maior teor de nitrogênio na parte aérea. Segundo Van Raij e Da Silva (1997) os intervalos de teores de N na cultura do algodão com 60 dias após a emergência (DAE), variam de 18,9 a 23,2 g/Kg. Os teores máximos encontrados para os isolados 290 e 248, no presente trabalho foram 30 g/Kg e 19,0 g/kg, respectivamente. Apesar da diversidade entre as bactérias diazotróficas e os hospedeiros, é necessária uma forte interação entre os microrganismos e a planta para se conseguir uma associação bem-sucedida (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). Outros estudos relacionados também constataram que a inoculação de *Bacillus* spp., *Azotobacter* e *Azospirillum* em algodão e dendezeiro contribuíram para o aumento significativo no teor de N (AMIR et al., 2003; GUZMÁN et al., 2012).

Os resultados obtidos permitem inferir que a planta de algodão foi capaz de hospedar as linhagens de *B. subtilis*, as quais obtiveram êxito na associação com a microbiota própria do solo e a raiz da planta o que permitiu que utilizassem no benefício os exsudatos da raiz e em troca disponibilizaram o N para ser absorvido. Nesse sentido, é importante mencionar que a seleção de rizobactérias promotoras de crescimento é bastante crítica, porque a resposta da planta é variável dependendo do isolado bacteriano, genótipo da planta e as condições do experimento (KHALID et al., 2009).

4.4. Solubilização de fósforo

O isolado 290 solubilizou a maior quantidade de P em meio de cultura líquido em relação aos demais isolados do gênero *Bacillus* (Figura 6).

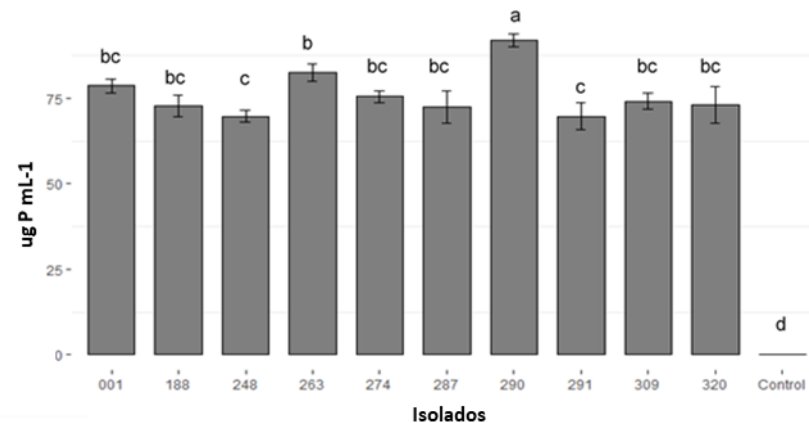


Figura 6 Solubilização de fósforo *in vitro* dos dez isolados de *Bacillus* em tubos de ensaio na presença de fosfato de cálcio.

Portanto, acredita-se que as linhagens em estudo têm comportamentos diferentes em condições de laboratório, visto que tem as condições adequadas de temperatura, nutrição e açúcares para a síntese de ácidos orgânicos, sendo que a quantidade de P liberado no meio de cultura depende da fonte de P segundo Nahas (1996).

Os teores de P na parte aérea (FPA) não apresentaram diferenças estatísticas significativas em comparação com o controle (Figura 7A). Por outro lado, houve diferença significativa no teor de P na raiz com o isolado 001 de *B. amyloliquefaciens* (Figura 7B). Provavelmente, os isolados promoveram uma solubilização de P maior do que as necessidades da planta. Segundo Van Raij e Da Silva (1997) os intervalos de teores de fósforo na cultura do algodão com 60 DAE variam de 1,3 a 2,0 g/Kg. Os teores encontrados para os isolados 290 e 001 no presente trabalho foram 1,1 g/Kg e 1,3 g/kg, respectivamente.

Estudos similares com inoculação de bactérias do gênero *Bacillus* demonstraram que estes microrganismos são solubilizadores de fosfato e aumentam a disponibilidade desse nutriente para serem absorvidos pelas plantas. Diversos genes envolvidos na solubilização de fosfatos foram descritos para espécies de *Bacillus* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

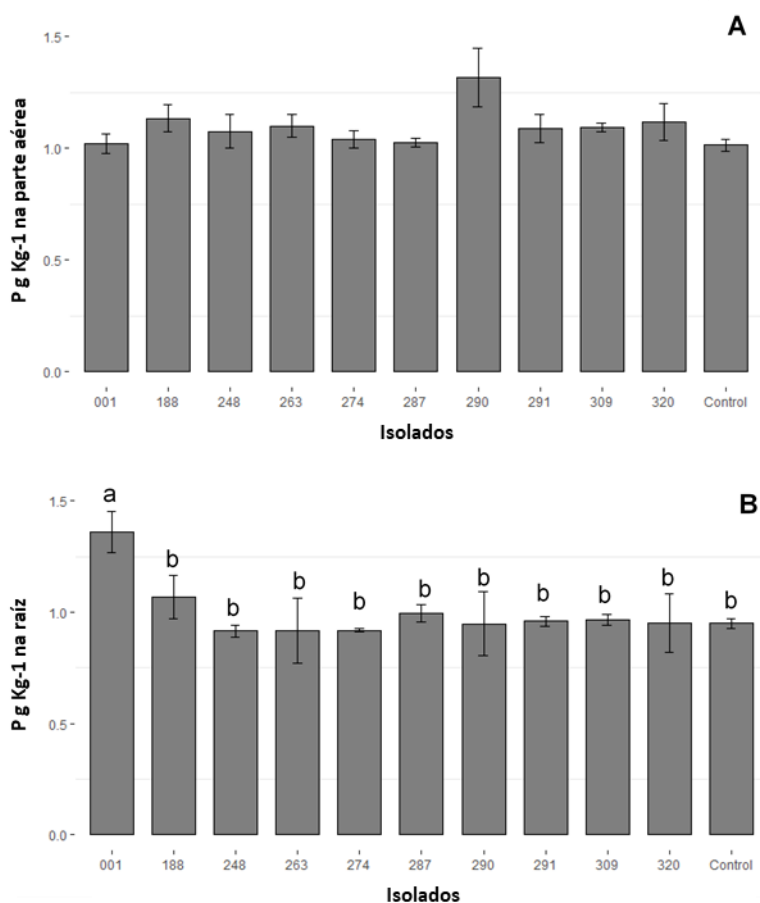


Figura 7 Teor de fósforo na parte aérea (**A**) e raiz (**B**) em plantas de algodão inoculadas com 10 isolados de bactérias promotoras de crescimento.

As bactérias do gênero *Bacillus* têm a capacidade de solubilizar o P através da produção e liberação de ácidos orgânicos e de enzimas fosfatases que são secretadas no solo (HARIPRASAD; NIRANJANA, 2009; PATIÑO-TORRES; SANCLEMENTE-REYES, 2014). Essas substâncias transformam formas orgânicas e inorgânicas de fosfato indisponíveis para a planta, em formas químicas assimiláveis que uma vez dentro da raiz podem ser armazenadas (KPOMBLEKOU-A e TABATABAI, 1994) e quando necessário o P pode ser transportado até a parte superior onde fica disponível para reações metabólicas da planta.

O resultado do experimento sugere que o isolado 001 de *B. amyloliquefaciens* interagiu com as bactérias da rizosfera, colonizando as raízes e disponibilizando fontes insolúveis de P (Figura **7B**). As plantas de algodão não apresentaram deficiência de P durante o experimento, o que sugere que as bactérias inoculadas têm a habilidade de solubilizar o P não disponível para a planta de forma suficiente para suprir a demanda desse nutriente na fase inicial de seu desenvolvimento vegetativo.

O teor de P solúvel no solo foi significativamente superior nos tratamentos inoculados com os isolados 188, 248, 263 e 274 quando comparado com o controle (Figura **8**). Interessantemente, esses mesmos isolados não foram os que apresentaram os maiores valores de solubilização de fósforo em condições de laboratório e, além disso, o isolado 290 que apresentou o maior valor de solubilização de P em condições de laboratório não promoveu a maior disponibilização de P no solo. Esses resultados sugerem que os dados preliminares de laboratório para os microrganismos solubilizadores de P são importantes, mas precisam ser confrontados com as condições de vasos. Isto porque, fatores como o tipo de solo, idade da planta e cultura vegetal e espécie microbiana afetam o processo de solubilização do P.

Considerando que o experimento foi realizado em vasos contendo latossolo vermelho, no qual a disponibilidade de P e o acesso do mesmo pela microbiota são favorecidos, pode-se inferir que as diferenças apresentadas são resultado de que as raízes não precisaram explorar um maior espaço no vaso, o que pode ser relacionado à massa seca da parte aérea e raiz durante o experimento.

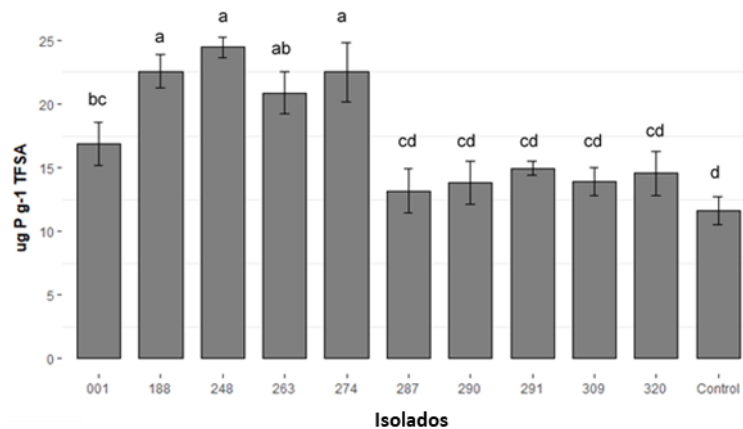


Figura 8 Média (\pm EP) do conteúdo de fósforo solúvel em bicarbonato no solo.

Os resultados de pesquisas da área são bastante diversos até o momento, variando de acordo com as espécies de microrganismos e as culturas. No trabalho realizado por Ramirez et al. (2014), *Bacillus* sp. é considerado como bom solubilizador de fosfato que contribui na disponibilidade de nutrientes no solo, sendo que o P é considerado um elemento limitado na agricultura, o que poderia ser explicado pela especificidade entre a bactéria e os exsudatos da planta (VIVAS et al., 2003).

A utilização de linhagens de *B. subtilis* como bioinoculantes não substituem a adubação, mas os resultados do experimento sugerem que o uso do isolado 248 aumenta a eficiência da absorção da adubação com o P que no futuro poderia contribuir para uma menor perda de fertilizantes na cultura de algodão.

4.5. Análise microbiológica do solo e raiz

Na raiz, os tratamentos inoculados com os isolados 290 e 291 apresentaram maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) (Figura 9A), enquanto no solo os vasos inoculados com os isolados 263 e 291 apresentaram maior número de UFC comparadas com o controle (Figura 9B).

Os resultados podem ser atribuídos ao sucesso dos isolados de *B. subtilis* (263, 290 e 291) em conseguir se associar com a microbiota própria do solo e da raiz, o que permitiu maior associação com a cultura do algodão. Estudos demonstraram que *B. subtilis* ajuda na promoção de crescimento da raiz e da planta, além de auxiliar no controle biológico por ser capaz de colonizar todos os órgãos vegetativos da planta, sendo encontrada como epifíticas, endofíticas e na rizosfera, confirmando o seu amplo espectro para o uso agrônômico (LANNA FILHO; FERRO; DE PINHO, 2010).

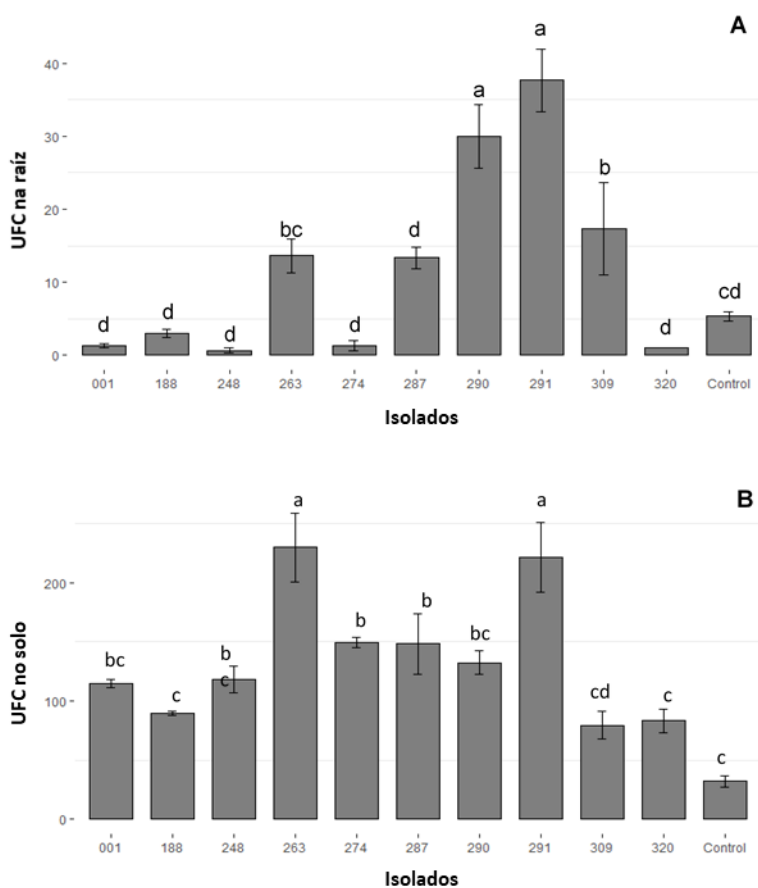


Figura 9 Contagem de *Bacillus* presentes na raiz (A) e no solo (B) dos 11 tratamentos realizados no experimento com a cultura de algodão.

4.6. Análise de componentes principais

As variáveis que mais contribuíram para a diferenciação dos tratamentos (Tabela 3) no primeiro componente principal (CP1) foram massa seca da parte aérea, raiz e total, e o nitrogênio da parte da raiz. No segundo componente principal (CP2), as variáveis foram altura, clorofila inicial, nitrogênio na parte aérea, fósforo solúvel em bicarbonato, unidades formadoras de colônias no solo e raiz.

Tabela 3 Autovetores de análise de componentes principais para 10 tratamentos e seus respectivos autovalores e porcentagens de explicação.

	CP1	CP2
Altura (H)	-0.23235761	-0.392630183
Clorofila final (FCI)	-0.22670329	0.063317793
Clorofila inicial (ICI)	-0.20219689	0.332379924
Massa seca parte aérea (DMa)	-0.34341870	-0.137772700
Massa seca parte raiz (DMr)	-0.37753094	0.181156029
Massa seca total (DM)	-0.39179947	-0.050373953
Nitrogênio parte aérea (Na)	-0.25080940	-0.353812973
Nitrogênio parte raiz (Nr)	-0.33705573	-0.266763170
Fósforo parte aérea (Pa)	-0.29882045	0.006167524
Fósforo parte raiz (Pr)	0.17893642	-0.072818333
Fósforo solúvel em bicarbonato (P bicarbonate)	-0.08228186	-0.322613524
Fósforo <i>in vitro</i> (P in vitro)	-0.19347397	0.088226013
Unidade formadoras de colônia na raiz (UFCr)	-0.20905964	0.508520674
Unidade formadoras de colônia no solo (UFCs)	-0.23243687	0.323846068
Autovalor	0.33208	0.18248
Porcentagem	33.21	18.25

No primeiro componente principal, a projeção dos 'scores' dos tratamentos e *loadings* das variáveis indicam que valores baixos de massa seca da parte aérea, raiz, total e nitrogênio na raiz estão associados a valores altos nos tratamentos 248, 290, 263 e 291. No segundo componente principal, valores baixos de altura, nitrogênio na parte aérea e fosforo solúvel em bicarbonato estão associados a valores nos tratamentos 248, 320, 188, 001 e 274, e valores altos de clorofila total inicial, unidades formadores de

colônia em raiz e solo estão associados a valores altos nos tratamentos 290, 263, 291, 287 e 309. Portanto, as variáveis massa seca na parte aérea, raiz, total, nitrogênio na raiz, altura, clorofila total inicial, nitrogênio na parte aera, fósforo solúvel em bicarbonato, unidades formadoras de colônia no solo e raiz são variáveis que permitem a diferenciação dos tratamentos em grupos distintos.

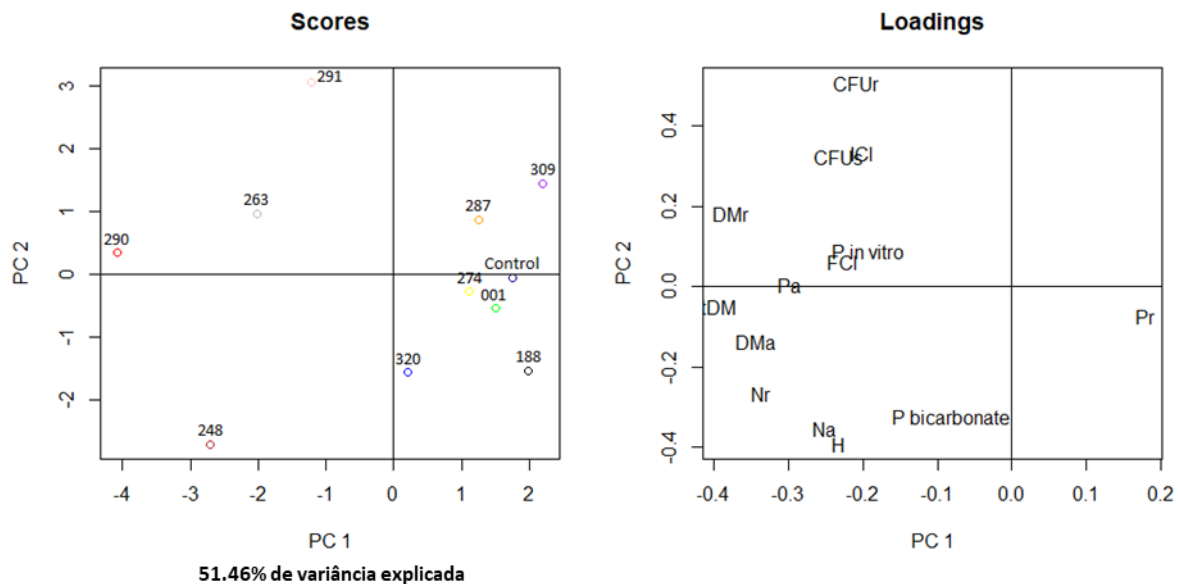


Figura 10 Projeção dos ‘scores’ dos tratamentos e *loadings* das variáveis.

4.7. Análise filogenética dos isolados

As sequências de DNA ribossomal 16S previamente obtidas dos isolados 001, 188, 248, 263, 274, 287, 290, 291, 309 e 320 por Milani (2017) foram alinhadas com as sequências de linhagens da espécie *Bacillus subtilis* e espécies relacionadas obtidas do banco de sequências (Genbank) do NCBI. Conjuntamente, foi inserida na análise a sequência de DNA da bactéria isolada do solo ao final do experimento a partir do tratamento que recebeu o isolado 290, aqui denominada como “REisol 290” (Figura 11).

A análise filogenética não apenas permitiu a confirmação da identificação dos isolados testados nesse estudo, como também forneceu a informação de que o isolado

290 de *B. subtilis*, que foi obtido a partir do reisolamento realizado ao fim do experimento, trata-se do mesmo que foi inoculado, provando que o efeito positivo obtido na promoção do crescimento das plantas de algodão é decorrente da presença das bactérias inoculadas.

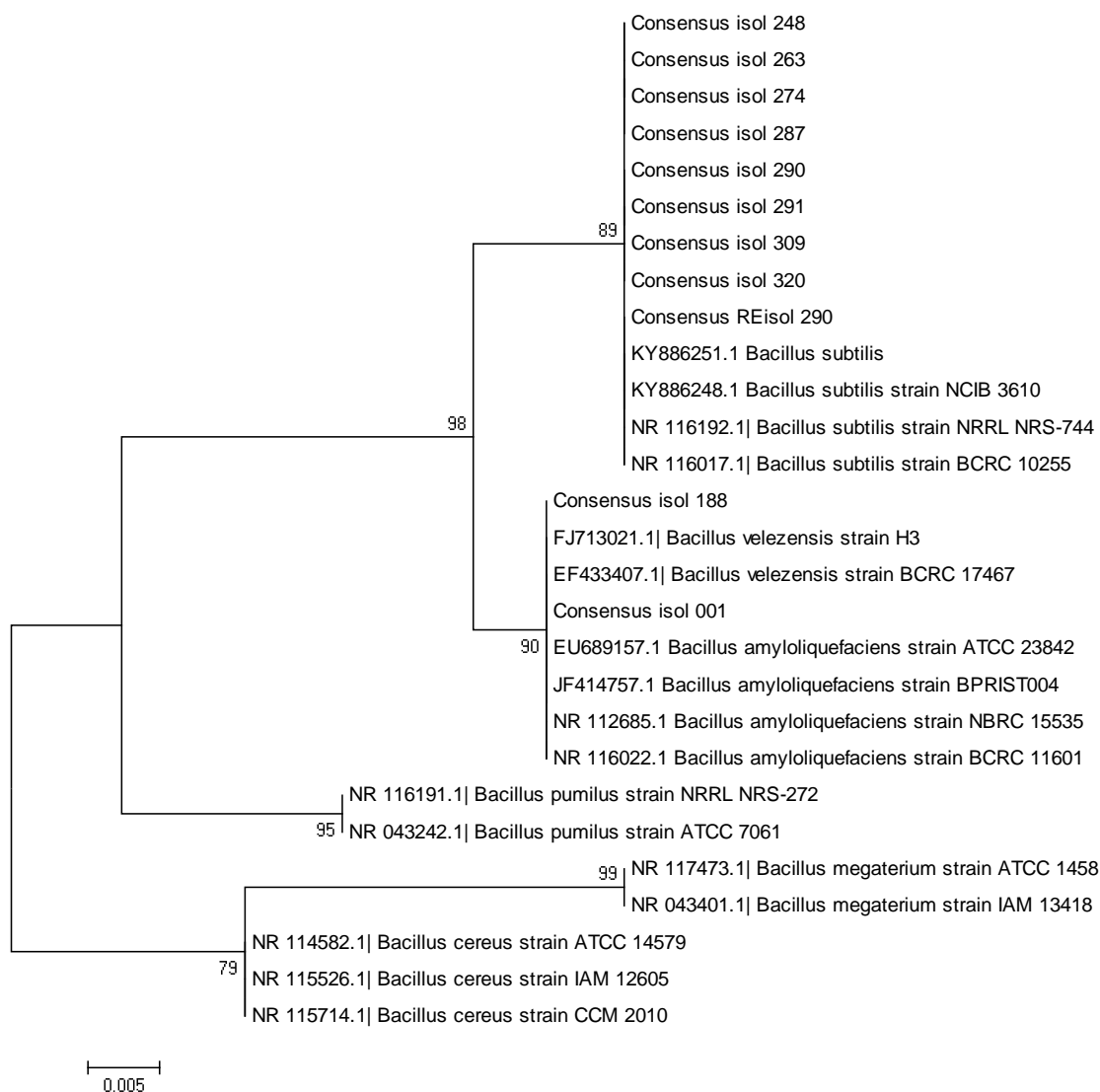


Figura 11 Análise filogenética da região 16S do DNA ribossomal dos isolados utilizados nos tratamentos com plantas de algodão em condição de vaso e com o isolado obtido do solo após novo isolamento ao final do teste em casa de vegetação. A árvore foi elaborada pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando-se o parâmetro Kimura-2 para o cálculo das distâncias evolutivas. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 repetições, sendo exibidos em forma de porcentagem (%).

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os isolados 248 e 290 de *B. subtilis* apresentam uma possível alternativa como bactérias endofíticas promotoras de crescimento para a cultura do algodão visto que destacaram-se nos parâmetros avaliados como massa seca da parte aérea, raiz e total, nitrogênio na raiz e parte aérea, e fósforo no solo.

Por outro lado, alguns isolados de *B. subtilis* não promoveram o crescimento da planta e se fossem tomados como bioinoculantes não funcionariam. Esse resultado ressalta a importância de se conhecer de uma forma mais próxima o isolado que será o futuro bioinoculante para se obter sucesso na promoção de crescimento de plantas.

A análise de PCA sugere que novos estudos devem ser realizados como um possível consórcio entre os isolados 290, 248 e 188 para a criação de um novo produto biológico para a promoção de crescimento da cultura do algodão.

6. REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 921–929, nov. 2009.
- ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. **Soil Science**, v. 125, n. 5, p. 331, maio 1978.
- AMES, B. N. Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 115–118, 1966.
- AMIR, H. G.; SHAMSUDDIN, Z. H.; HALIMI, M. S.; RAMLAN, M. F.; MARZIAH, M. N₂ Fixation, Nutrient Accumulation and Plant Growth Promotion by Rhizobacteria in Association with Oil Palm Seedlings. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 14, p. 1269–1272, 2003.
- ANDERSON, T.-H. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1, p. 285–293, 2003.
- ANDREOTE, F. D.; ROCHA, U. N. da; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; OVERBEEK, L. S. van. Effect of Bacterial Inoculation, Plant Genotype and Developmental Stage on Root-Associated and Endophytic Bacterial Communities in Potato (*Solanum Tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 4, p. 389–399, 1 maio 2010.
- ARAUJO, F. F. de. Seed inoculation with *Bacillus subtilis*, formulated with oyster meal and growth of corn, soybean and cotton. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456–462, 2008.
- ARAÚJO, E. de O.; CAMACHO, M. A.; DOS SANTOS, E. F.; CÂMARA, A. P. Teor, conteúdo, eficiência de absorção, transporte e utilização de nitrogênio e fósforo pelo algodoeiro cultivado sob diferentes concentrações de BORO e ZINCO. In: Embrapa Algodão-Artigo em anais de congresso (ALICE), **Anais...In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 8.; COTTON EXPO, 1., 2011, São Paulo. Evolução da cadeia para construção de um setor forte: Anais. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2011., [s.d.]**
- BELTRÃO, B.; OLIVEIRA, M. I.; P. SOUSA JÚNIOR, S.; BRITO, G.; DIONÍZIO, C. Ecofisiologia do Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch.). In: BELTRÃO, N.E. de M.; OLIVEIRA, M.I.P. Ecofisiologia das culturas de algodão, amendoim, gergelim, mamona, pinhão-manso e sisal. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica 1**, p. 65-124, 2011.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1044–1051, 2012.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant Species and Soil Type Cooperatively Shape the Structure and Function of Microbial Communities in the Rhizosphere: Plant Species, Soil Type and Rhizosphere Communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–13, abr. 2009.

BERGEY, D. H.; JOHN G. HOLT. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. **Análises Químicas e Bioquímicas em Plantas**. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2011.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, abr. 2012.

BIRCH, P. R.; KAMOUN, S. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. **A Trends Guide**, v. 12, n. 2000, p. 77–82, 2000.

BLACK, C. A. **Methods Of Soil Analysis Part1And2**. [s.l.] American Society Of Agronomy, Inc.; USA, 1965.

BORRIS, R. Use of Plant-Associated Bacillus Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 41–76.

BREMNER, J. M. Nitrogen-total. In: **Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods**. [s.l: s.n.]p. 1085–1121.

BUENO, M.; COSTA, S.; FERREIRA, J. L. (ed.). **A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC**. Brazil: ABRAPA, Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2004.

CARVALHO, P. P. **Manual do algodoeiro**. Lisboa: Ministério da Ciência e da Tecnologia, Instituto de Investigação Científica Tropical, 1996.

CASTILLO, Á. R.; LIGARRETO, G. A. Relación entre nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos en el Piedemonte Llanero colombiano. **Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 11, n. 2, p. 122–128, 2010.

CHANWAY, C. P.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Plant growth-promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta moench*) and pea (*Pisum sativum L.*). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 511–517, 1 jan. 1989.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; PIEL, J.; BORRISS, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of biotechnology**, v. 140, n. 1, p. 27–37, 2009.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 1 set. 2005.

CONAB. **Acompanhamento da safra Brasileira de grãos.**: Safra 2016/17. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, jun. 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_06_08_09_02_48_boletim_graos_junho_2017.pdf#page=1&zoom=auto,-39,842>. Acesso em: 29 out. 2017.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107–149, mar. 2003.

EGAMBERDIYEVA, D.; HÖFLICH, G. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. **Journal of Arid Environments**, v. 56, n. 2, p. 293–301, 1 jan. 2004.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos.** Brasília, DF: Embrapa Solos, 2006.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas.** Londrina: PLANTA, 2006.

FERNÁNDEZ, A.; VILLAVERDE, M.; CASANOVA, J.; MALO, J.; NICOLAS, J. A.; BLANCA, I. Nuevo aislado de *Bacillus* y su utilización para el control de hongos fitopatógenos. **Agroecologia. net**, v. 6, p. 50–57, 2004.

FREITAS, J. R. de; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria Enhance the Growth and Yield but Not Phosphorus Uptake of Canola (*Brassica Napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, n. 4, p. 358–364, 1 maio 1997.

GLASS, A. D. **Plant nutrition: an introduction to current concepts.** Boston: Jones and Bartlett, 1989.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GUZMÁN, A.; OBANDO, M.; RIVERA, D.; BONILLA, R. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón

(*Gossypium hirsutum*). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, n. 1, p. 182–190, 1 jan. 2012.

GWATHMEY, C. O. Do Contemporary Cotton Cultivars Respond Differently to Potassium Fertilization? **Better Crops**, v. 89, p. 8–10, 2005.

HAAG, H. P.; SARRUGE, J. R.; DE OLIVEIRA, G. D.; DECHEN, A. R. Nutrição mineral do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.): I-deficiência dos macronutrientes-nota prévia. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 32, p. 185–190, 1975.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and 1282 analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial Endophytes in Agricultural Crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, out. 1997.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. van. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 1 out. 2008.

HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. R. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria to Improve Plant Health of Tomato. **Plant and Soil**, v. 316, n. 1–2, p. 13–24, 1 mar. 2009.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: A Review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 1 dez. 2010.

HILLEL, D.; HATFIELD, J. L. **Encyclopedia of Soils in the Environment**. [s.l.] Elsevier Amsterdam, 2005. v. 3

JHA, D. C.; SARAF, M. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, 2015.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Nitrogen Fixation in Australian Agricultural Systems: 13th Australian Nitrogen Fixation Conference. v. 36, n. 8, p. 1229–1244, 1 ago. 2004.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; SHAHAROONA, B.; MAHMOOD, T. Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Sustainable Agriculture. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbial Strategies for Crop Improvement**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 133–160.

- KIM, H. S.; PARK, J. Y.; CHOI, S. W.; CHOI, K. H.; LEE, G. P.; BAN, S. J.; LEE, C. H.; KIM, C. S. Isolation and Characterization of Bacillus Strains for Biological control. **Journal of Microbiology**, 2003.
- KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39–44, 1989.
- KPOMBLEKOU-A, K.; TABATABAI, M. Effect of Organic Acids on Release of Phosphorus From Phosphate Rocks. **Soil Science**, v. 158, p. 442–453, 1 dez. 1994.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por Bacillus subtilis. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12–20, 2010.
- LAVENUS, J.; GOH, T.; ROBERTS, I.; GUYOMARC'H, S.; LUCAS, M.; DE SMET, I.; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M.; LAPLAZE, L. Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. **Trends in plant science**, v. 18, n. 8, p. 450–458, 2013.
- LOON, L. C. van. Plant Responses to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243–254, 1 nov. 2007.
- LÓPEZ, D. B. S.; HOYOS, A. M. G.; PERDOMO, F. A. R.; BUITRAGO, R. R. B. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en Lactuca sativa cultivar White Boston. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 16, n. 2, p. 122–128, 1 jul. 2014.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 541–556, 2009.
- 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 and Biotechnology**, v. 21, n. 6–7, p. 1057–1062, out. 2005.
- MANTILLA, C. L.; ALVAREZ, A.; OVIEDO, L. E. Impacto de inoculación con la bacteria nativa Azospirillum sobre Oryza sativa L. en Córdoba–Colombia. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 11, n. 2, p. 37–45, 16 maio 2015.
- MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293–319, 2010.
- MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Diazotrophs. In: **Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria**. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress. [s.l.] Springer, Dordrecht, 2004. p. 197–223.

- MILANI, R. de M. **Diversidade de bactérias epífitas e endofíticas da cultura do milho**. 2017. Universidad Estadual Paulista “Julho Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/151225>>. Acesso em: 29 out. 2017.
- MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4553–4567, 14 out. 2009.
- MULVANEY, R. L. Nitrogen—inorganic forms. In: **Methods of soil analysis part 3—Chemical methods**. [s.l.: s.n.]p. 1123–1184.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31–36, 1962.
- NADEEM, S. M.; NAVEED, M.; ZAHIR, Z. A.; ASGHAR, H. N. Plant–microbe interactions for sustainable agriculture: fundamentals and recent advances. In: **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. [s.l.] Springer, 2013. p. 51–103.
- NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 567–572, 1996.
- NEVES, F. N.; PINTO, M. J. A. **A CADEIA DO ALGODÃO BRASILEIRO: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS** ABRAPA, , 2012. .
- OBERSON, A.; FROSSARD, E.; BÜHLMANN, C.; MAYER, J.; MÄDER, P.; LÜSCHER, A. Nitrogen Fixation and Transfer in Grass-Clover Leys under Organic and Conventional Cropping Systems. **Plant and Soil**, v. 371, n. 1–2, p. 237–255, 1 out. 2013.
- PAJUELO, E.; RODRÍGUEZ-LLORENTE, I. D.; LAFUENTE, A.; PÉREZ-PALACIOS, P.; DOUKKALI, B.; CAVIEDES, M. A. Engineering the rhizosphere for the purpose of bioremediation: an overview. **CAB Rev**, v. 9, n. 001, 2014.
- PATIÑO-TORRES, C. O.; SANCLEMENTE-REYES, O. E. Phosphate-solubilizing microorganisms (PSM): a biotechnological alternative solution for a sustainable agriculture. **Entramado**, v. 10, n. 2, p. 288–297, 2014.
- PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R.; FERNÁNDEZ SCAVINO, A.; GARCÍA DE SALAMONE, I.; BACA, B. E.; AZCÓN, R.; BALDANI, V. L.; BONILLA, R. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. **Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 11, n. 2, 2010.
- PINDI, P. K.; SULTANA, T.; VOOTLA, P. K. Plant Growth Regulation of Bt-Cotton through Bacillus Species. **3 Biotech**, v. 4, n. 3, p. 305–315, 1 jun. 2014.
- PLAZAS, N. Z.; GARCÍA, J. F. La Nutrición de la Planta y su Problemática en la Agricultura. **Cultura Científica**, v. 9, n. 9, p. 101, 2011.

RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A.; ROBLES-CABRERA, A.; LOMELÍ-GONZÁLEZ, L.; LUNA-SOLANO, G.; CALDERÓN-SANTOYO, M. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. **Revista Chapingo. Serie horticultura**, v. 17, n. SPE1, p. 5–11, 2011.

RAMÍREZ, L. C. C.; LEAL, L. C. S.; GALVEZ, Z. Y. A.; BURBANO, V. E. M. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. **Nova**, v. 12, n. 22, p. 165–178, 2014.

RAMÍREZ-LUNA, E.; CASTILLO-AGUILAR, C. de la C.; ACEVES-NAVARRO, E.; CARRILLO-ÁVILA, E. EFECTO DE PRODUCTOS CON REGULADORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA FLORACIÓN Y AMARRE DE FRUTO EN CHILE'HABANERO'. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 11, n. 1, p. 93–98, 2005.

REVA, O. N.; DIXELIUS, C.; MEIJER, J.; PRIEST, F. G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 2, p. 249–259, 1 maio 2004.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4–5, p. 319–339, out. 1999.

ROTHFUSS, F.; BENDER, M.; CONRAD, R. Survival and Activity of Bacteria in a Deep, Aged Lake Sediment (Lake Constance). **Microbial Ecology**, v. 33, n. 1, p. 69–77, 1 jan. 1997.

ROUT, G. R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**, v. 3, p. 1–24, 2015.

RUIZ-GARCIA, C. *Bacillus Velezensis* Sp. Nov., a Surfactant-Producing Bacterium Isolated from the River Velez in Malaga, Southern Spain. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 55, n. 1, p. 191–195, 1 jan. 2005.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sci Med Res**, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2011.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological Nitrogen Fixation in Non-Legume Plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, maio 2013.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent Advances and Emerging Trends in Plant Hormone Signalling. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1071–1078, jun. 2009.

SANTO, B. R. do E.; MORAES, M. V. P. de; RODRIGUES, R. **Os caminhos da agricultura brasileira**. São Paulo: Evoluir, 2001.

SCHORTEMAYER, M.; HARTWIG, U. A.; HENDREY, G. R.; SADOWSKY, M. J. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (FACE). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 1717–1724, 1996.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M. de; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P. da; CASTRO, A. M. dos S. Control with endophytic bacteria and in vitro inhibition of *Pseudomonas syringae* pv tomato, agent of bacterial speck of tomato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1062–1072, ago. 2008.

SPRENT, J. I.; PARSONS, R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2, p. 183–196, 2000.

TEJERA-HERNÁNDEZ, B.; ROJAS-BADÍA, M. M.; HEYDRICH-PÉREZ, M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 42, n. 3, p. 131–138, 2011.

TRIPTI; KUMAR, A.; USMANI, Z.; KUMAR, V.; ANSHUMALI. Biochar and Flyash Inoculated with Plant Growth Promoting Rhizobacteria Act as Potential Biofertilizer for Luxuriant Growth and Yield of Tomato Plant. **Journal of Environmental Management**, v. 190, p. 20–27, abr. 2017.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. The Unseen Majority: Soil Microbes as Drivers of Plant Diversity and Productivity in Terrestrial Ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, n. 3, p. 296–310, mar. 2008.

VAN RAIJ, B.; DA SILVA, N. M. Fibrósas. In: **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. (IAC. Boletim Técnico, 100). 2. ed ed. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), 1997. 100p. 105–110.

VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. Quantification of total and sporulating bacteria in soils. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 539–545, set. 2000.

VIVAS, A.; MARULANDA, A.; RUIZ-LOZANO, J. M.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R. Influence of a *Bacillus* Sp. on Physiological Activities of Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi and on Plant Responses to PEG-Induced Drought Stress. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 5, p. 249–256, out. 2003.

WATANABE, F. S.; OLSEN, S. R. Test of an Ascorbic Acid Method for Determining Phosphorus in Water and NaHCO₃ Extracts from Soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 29, n. 6, p. 677–678, 12/01 1965.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1 set. 1994.

WILD, A.; RUSSELL, E. J. **Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas de Russell**. Madrid: Mundi-Prensa, 1992.

WOLLUM, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: **Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties**. [s.l.: s.n.]p. 781–802.

WONG, W. S.; TAN, S. N.; GE, L.; CHEN, X.; YONG, J. W. H. The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers. In: **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**. Sustainable Development and Biodiversity. [s.l.] Springer, Cham, 2015. p. 105–158.

WOOD, C. W.; TRACY, P. W.; REEVES, D. W.; EDMISTEN, K. L. Determination of Cotton Nitrogen Status with a Handheld Chlorophyll Meter. **Journal of Plant Nutrition**, v. 15, n. 9, p. 1435–1448, set. 1992.

YAO, A. V.; BOCHOW, D. H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. K. Effect of FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 39, n. 4, p. 323–328, 1 ago. 2006.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 7, p. 955–963, 2002.