

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Bacillus cereus, Lactobacillus acidophilus E
Succinovibrio dextrinosolvens* NA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO E SOJA**

Ana Claudia dos Santos

Tecnóloga em Alimentos

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Bacillus cereus, Lactobacillus acidophilus E
Succinovibrio dextrinosolvens* NA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO E SOJA**

Ana Claudia dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

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

2019

S237b

Santos, Ana Claudia dos

Bacillus cereus, *Lactobacillus acidophilus* e *Succinovibrio dextrinosolvens* na promoção de crescimento de plantas de milho e soja / Ana Claudia dos Santos. -- Jaboticabal, 2019

59 p. : tabs., fotos

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

Orientador: Everlon Cid Rigobelo

1. Bactérias promotoras de crescimento. 2. Bactérias probióticas ruminais. 3. Fixação de nitrogênio. 4. Solubilização de Fósforo. 5. Inoculação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus* E *Succinovibrio dextrinosolvens* NA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO E SOJA


AUTORA: ANA CLAUDIA DOS SANTOS

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 (Fitotecnia) / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. FABIO CAMILOTTI
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP


Prof. Dr. RAPHAEL DE CAMPOS CASTILHO
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 11 de setembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Claudia dos Santos- nascida em 03 de novembro de 1995 na cidade de Catanduva – SP, Brasil. Filha de José Claudio dos Santos e Zilma Pereira dos Santos. Em maio de 2017 se graduou como tecnóloga em alimentos pela Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG- Frutal), durante a graduação foi bolsista de iniciação científica e estagiou no laboratório de microbiologia da UEMG- Frutal tendo ai sua primeira experiência na área, atuando em temas como isolamento, preparação de meios de cultura, fermentação alcoólica, controle biológico. Em agosto de 2017 ingressou no curso de mestrado da Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/ Unesp- Jaboticabal. Dando continuidade aos estudos na área de microbiologia, trabalhando atualmente com bactérias promotoras de crescimento de plantas.

EPÍGRAFE

Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível. (Charles Chaplin).

Dedico

A meus pais José Claudio e Zilma pela educação, ensinamentos e pelo apoio nos estudos, sem eles nada disso seria possível.

A minha Vó Maria Luisa (in memória) que sempre esteve ao meu lado e hoje é meu anjo protetor.

Minhas irmãs Maria Clara e Manuela, amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca me abandonar.

Ao meu Orientador Prof.Dr. Everlon Cid Rigobelo por me permitir trabalhar em seu grupo de pesquisa, oferecer todo o suporte necessário para o desenvolvimento do meu trabalho, mas principalmente pela compreensão em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora pelo seu tempo e contribuição.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos Professores do curso de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da UNESP-FCAV, pelas disciplinas ministradas e pelo aprimoramento acadêmico.

Aos companheiros de laboratório e amigos em especial Livia, Maura, Roberta, Noemi, Carlos, Paola, Lana e Fernanda pela ajuda e alegrias compartilhadas.

Aos meus pais Zilma e José Claudio pelo amor e por sempre acreditarem em mim.

Ao Lucas, meu companheiro, que esteve presente ao meu lado nos bons e maus momentos.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A cultura do milho	3
2.1.1 Produção de milho no Brasil	4
2.1.2 Importância dos nutrientes Nitrogênio e Fósforo para a cultura do milho	4
2.2 SOJA	5
2.2.1. Produção de soja no Brasil	6
2.2.2. Importância do Nitrogênio para a cultura da soja	6
2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO – BPCP	7
2.3.1. Mecanismos diretos de promoção de crescimento	8
2.3.1.1. Fixação de nitrogênio	8
2.3.1.2. Solubilização de Fósforo	8
2.3.1.3. Produção de AIA	9
2.3.2. Mecanismos indiretos	10
2.3.2.1. Biocontrole	10
2.4 GÊNERO <i>Bacillus</i>	10
2.4.1. <i>Bacillus cereus</i>	11
2.5. GÊNERO <i>Lactobacillus</i>	12
2.6. GÊNERO <i>Succinovibrio</i>	13

2.7. RÚMEN	13
2.7.1. Bactérias rúmen	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Fase 1	15
3.1.1 Isolados bacterianos	15
3.1.2. Produção de Sideróforos	15
3.1.2.1. Mistura das tubulações	16
3.1.3 Teste de atividade amilolítica	16
3.1.4. Atividade celulolítica	17
3.1.5. Determinação da produção de Ácido Indolacético ..	18
3.1.6 Quantificação de P em tubos de ensaio.....	18
3.1.7 Quantificação de Nitrogênio em tubos de ensaio.....	19
3.2. Fase 2.....	20
3.2.1 Projeto experimental e análise estatística.....	20
3.2.2 Plantio	21
3.2.3. Inoculações	21
3.2.4 Avaliações nas plantas de milho e soja.....	22
3.2.4.1 Massa seca	22
3.2.4.2. Concentração de Nitrogênio na parte aérea e raiz ...	22
3.2.4.3. Concentração de fósforo na parte aérea e raiz	23
3.2.5. Avaliações no solo	24
3.2.5.1. Fósforo solúvel	24
3.2.5.2. Nitrogênio total	24
3.2.5.3. Contagem de bactérias totais	25
3.2.5.4 Carbono da Biomassa	26
3.2.5.4.1. Preparo das amostras	26
3.2.5.4.2. Procedimento analítico	26

3.2.5.4.3. Cálculos.....	27
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS	38

***Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus* E *Succinovibrio dextrinosolvens* NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO E SOJA**

RESUMO - Bactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser uma alternativa para a produção vegetal em problemas como aumento dos índices de produtividade, e diminuição dos impactos ambientais. As bactérias probióticas possuem diversas habilidades, dentre elas facilitar a digestão e a absorção de nutrientes, e fortalecer o sistema imunológico de homens e animais. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar se os micro-organismos probióticos podem trazer benefícios também as plantas, como incremento de nutrientes. Para isso, utilizou-se as culturas de milho e soja, onde foi inoculado bactérias probióticas isoladas do rúmen: *Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Succinovibrio dextrinosolvens*. Os testes in vitro mostraram que as bactérias foram capazes de fixar nitrogênio, solubilizar o fósforo, sintetizar ácido indolacético e amilase. Depois dos testes in vitro, os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em blocos casualizados com cinco tratamentos e seis repetições, sendo eles T1= Controle; T2= *Bacillus cereus*, T3= *Lactobacillus acidophilus*, T4= *Succinovibrio dextrinosolvens*, T5= *Bacillus cereus* + *Lactobacillus acidophilus* + *Succinovibrio dextrinosolvens*. A inoculação com *S. dextrinosolvens* proporcionou o aumento da massa seca de raiz em milho, enquanto que a aplicação individual com *L. acidophilus* e em conjunto com as demais bactérias, proporcionaram o aumento do teor fósforo nas raízes de milho. Nas plantas de soja, a inoculação com *L. acidophilus* promoveu o aumento da massa seca da parte aérea e da concentração de fósforo e nitrogênio, em comparação ao tratamento não inoculado. Este é o primeiro relato mostrando que a bactéria *L. acidophilus* e *S. dextrinosolvens* possuem potencial para serem utilizadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas.

PALAVRAS – CHAVE: Ácido indolacético, Bactéria promotoras de crescimento, fixação de nitrogênio, *Glycine max*, inoculação, *Zea mays*.

***Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus* E *Succinovibrio dextrinosolvens* IN THE PROMOTION OF GROWTH IN CORN AND SOY PLANTS**

ABSTRACT- Plant growth-promoting bacteria may be an alternative to crop production in problems such as increased yields and reduced environmental impacts. Probiotic bacteria have many abilities, including facilitating digestion and absorption of nutrients, and strengthening the immune system of humans and animals. In this sense, the objective of this study was to evaluate if probiotic microorganisms can also bring benefits to plants, such as nutrient increment. For this, corn and soybean cultures were used, where probiotic bacteria isolated from the rumen were inoculated: *Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Succinovibrio dextrinosolvens*. In vitro tests showed that bacteria were able to fix nitrogen, solubilize phosphorus, synthesize indolacetic acid and amylase. After in vitro tests, the experiments were conducted in a greenhouse in randomized blocks with five treatments and six replications, T1 = Control; T2 = *Bacillus cereus*, T3 = *Lactobacillus acidophilus*, T4 = *Succinovibrio dextrinosolvens*, T5 = *Bacillus cereus* + *Lactobacillus acidophilus* + *Succinovibrio dextrinosolvens*. The inoculation with *S. dextrinosolvens* increased the root dry mass in maize, while the individual application with *L. acidophilus* and together with the other bacteria, increased the phosphorus content in the corn roots. In soybean plants, inoculation with *L. acidophilus* promoted the increase of shoot dry mass and phosphorus and nitrogen concentration, compared to uninoculated treatment. This is the first report showing that *L. acidophilus* and *S. dextrinosolvens* have the potential to be used as plant growth promoting bacteria.

Keywords: Indolacetic acid, Growth promoting bacteria, nitrogen fixation, *Glycine max*, inoculation, *Zea mays*.

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 1. Estádios vegetativos e reprodutivos do milho	03
TABELA 2. Estádio vegetativos e reprodutivos da soja	06
TABELA 3. Análise Química do solo anterior a montagem do experimento...	21
TABELA 4. Teste in vitro do isolados <i>B. cereus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>S. dextrinosolven</i>	27

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1. MSR (*CV=25,54) (A) e MSPA (*CV=47,85) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....28

FIGURA 2. Figura 2 : Raiz de milho do tratamento controle (T1) (A), raiz de milho inoculada com *Lactobacillus acidophilus* (T3) (B).....28

FIGURA 3. Concentração de Nitrogênio na Raiz (*CV=23,27) (A) e Concentração de Nitrogênio na Parte Aérea (*CV=25,57) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....29

FIGURA 4. Concentração de Fósforo na Raiz (*CV= 25,00) (A) e Concentração de Fósforo na Parte Aérea (*CV= 29,04) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....29

FIGURA 5. Concentração de Nitrogênio no solo(*CV=40,96) (A) e Concentração de Fósforo no solo(*CV=40,25) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....30

FIGURA 6. Unidade Formadora de Colônia (UFC) (*CV= 11,24) do solo de plantas de. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....30

FIGURA 7. Carbono da biomassa do solo de plantas de milho (*CV= 15,3). Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....31

FIGURA 8. MSR (*CV=38,89) (A) e MSPA (*CV=35,24) (B) de plantas de soja Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....31

FIGURA 9. Raiz de soja do tratamento controle (T1) (A), raiz de soja inoculada com *Lactobacillus acidophilus* (T3) (B).....32

FIGURA 10. Parte aérea de soja do tratamento controle (T1) (A) e parte aérea de soja inoculada com *Lactobacillus acidophilus* (T3) (B).....32

FIGURA 11. Concentração de nitrogênio na raiz (*CV=9,56) (A) e concentração de nitrogênio na parte aérea (*CV=8,22) (B) de plantas de soja. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As médias

com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....33

FIGURA 12. Concentração de fósforo na raiz (*CV=76,73) (A) e Concentração de fósforo na parte aérea(*CV=13,74) (B) de plantas de soja. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....33

FIGURA 13. Concentração de nitrogênio no solo(*CV=11,24) (A) e Concentração de fósforo no solo(*CV=41,78) (B) de plantas de soja. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$).....34

FIGURA 14. Unidade Formadora de Colônia (UFC) (*CV= 11,24) do solo de plantas de. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....35

FIGURA 15. Carbono da biomassa do solo de plantas de milho (*CV= 15,3). Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.....35

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é uma cultura originária do México hoje cultivada em diversas partes do mundo, é de grande importância, afinal é utilizada como matéria-prima para diversos produtos alimentícios pós-colheita, tais como ração animal e ingredientes industriais para fazer bebidas alcoólicas, amido, óleo, proteína, cosméticos, adoçantes, etc (Andrade, 2006). Atualmente, o Brasil se classifica em terceiro lugar no ranking de produção, segundo em exportações e quarto em consumo de milho.

A soja *Glycine max*, teve sua provável origem na China, e logo disseminou-se pela Europa, Américas do Norte e Sul. Em 1882 foi trazida ao Brasil, mais especificamente no estado da Bahia, e logo foi levada para a região Sul do país, onde teve melhor adaptação (Verneti, 1983). Segundo a CONAB (2019), o Brasil e os Estados Unidos se classificam como os produtores mundiais de soja, seguidos da Argentina e China. Estima-se que no ano de 2020 o Brasil liderará esse ranking.

O uso de insumos químicos em associação com o melhoramento genético e o tipo de manejo, proporcionam um aumento na produtividade desses grãos (Galvão et al., 2014). Atualmente existe uma preocupação com o uso excessivo de fertilizantes minerais, uma vez que, estes causam poluição em lençóis freáticos, eutrofização de solos e emissão de gases do efeito estufa (Chien et al., 2011).

O grande desafio da agricultura hoje é aumentar ou manter a produtividade das culturas agrícolas com menores custos de produção e impactos ambientais. Como alternativa, surgem as bactérias promotoras de crescimento vegetal, que são um grupo de micro-organismos que habitam normalmente superfícies radiculares, tecidos internos dos vegetais e a rizosfera, e são capazes de estimular o desenvolvimento das plantas através de mecanismos diretos (produção de fitormônios, enzimas, ácido cianídrico, solubilização de fosfatos e fixação de nitrogênio), e/ou indiretos (controle biológico, competição por espaço e por nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada)(Hungria et al., 2010).

Muitos benefícios para a saúde do homem e dos animais têm sido relacionados ao consumo de organismos probióticos (Shah, 2000). De forma geral, dependendo da cepa empregada e do efeito benéfico que se deseja obter, é recomendado o uso diário em concentrações de 10^8 e 10^{11} UFC. Todavia, esses organismos ainda não foram aplicados em plantas, e existem inúmeras bactérias que poderiam ser testadas com o objetivo de trazer benefícios também a este tipo de ser vivo.

Dentre elas o *Bacillus cereus* é uma bactéria com formato cilíndrico, gram-positiva, formadora de esporos, anaeróbia facultativa e mesófila. Seus esporos facilitam sua adesão em superfícies e resistência a altas temperaturas e processos de sanitização, ou seja, a bactéria consegue permanecer em um estado de “dormência” até que o ambiente se torne novamente favorável. É produtor de fosfolipases e enzimas degradadoras de alimentos como as amilases, proteases e a lectinase (Koneman, 2001).

Lactobacillus acidophilus é um probiótico degradador de diversas enzimas, muito utilizado como suplemento nutricional, é produzido pela indústria alimentícia, com a função de manter o equilíbrio da microbiota intestinal (Fiesch e Poziomyck, 2014). Ele se adere a receptores específicos na membrana intestinal competindo com patógenos, além de produzir substâncias antimicrobianas, chamadas de bactericidas (Marco e Kleerebezem, 2004).

Succinivibrio dextrinosolvens é uma bactéria amilolítica (degrada o amido) anaeróbia, Gram-negativa, têm pH ótimo em torno de 6,0 – 7,0. É encontrada geralmente no rúmen de bovinos, auxiliando juntamente com outros micro-organismos no melhor aproveitamento de nutrientes (Araújo, 2013).

Na agricultura existem muitos produtos que possuem como ingrediente ativo espécies do gênero *Bacillus* como *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, entre outros. Quando presentes na rizosfera, esses micro-organismos promovem muitos ganhos para a nutrição de plantas e solubilização de fósforo (Araújo e Guerreiro, 2010). Entretanto, não existe na literatura pesquisas relacionadas a aplicação de bactérias probióticas ruminais como promotoras de crescimento nas culturas de milho e soja.

Diante do exposto o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de promoção de crescimento de plantas das bactérias isoladas do rúmen *Bacillus*

cereus, *Lactobacillus acidophilus* e *Succinovibrio dextrinosolvens* nas culturas de milho e soja.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays L.*) é uma cultura originária do México; hoje cultivada em diversas partes do mundo é de grande importância, seja do ponto de vista econômico ou social. Pode ser utilizado na produção de matéria – prima industrial, alimentação humana e animal, sendo extremamente benéfico, por possuir elevadas taxas nutricionais (Andrade, 2006).

Pertencente à família das *Poaceas* e grupo C-4 das plantas, é uma espécie anual que floresce cerca de 65 dias após a emergência e atinge a sua maturidade fisiológica 125 dias depois, produz em média de 20-21 folhas. Todas as plantas de milho geralmente seguem um mesmo padrão de desenvolvimento (tabela 1); durante a fase vegetativa, cada estágio é definido de acordo com a formação visível do colar na inserção da bainha da folha com o colmo; desta forma quando vemos a primeira folha de cima para baixo com o calor visível consideramos completamente desenvolvida. (Magalhães, 2006).

Tabela 1. Estágios vegetativos e reprodutivos da planta de milho.

ESTÁDIOS VEGETATIVOS		ESTÁDIOS REPRODUTIVOS	
VE	Emergência	R1	Embonecamento
V1	Primeira folha	R2	Bolha d'água
V2	Segunda folha	R3	Leitoso
V3	Terceira folha	R4	Pastoso
V(n)	Enésima folha	R5	Dente
VT	Pendoamento	R6	Maturidade

Quando se fala em nutrição humana, o milho é consumido nas formas de fubá e farinha, já para a alimentação animal seu grão é o maior componente de rações para suínos e aves, é também muito utilizado na forma de silagem para bovinocultura. Ao longo dos anos a indústria vem inovando e criando novos produtos a partir do milho, como fabricação de lisina, itens biodegradáveis e etanol; tudo graças a expansão do consumo interno, e exportações. (Batista, 2012).

2.1.1 Produção de milho no Brasil

Sendo o cereal de maior cultivo no país, o milho apresenta duas safras que são divididas em duas épocas de plantio: primeira safra, realizada nos períodos de maior fluxo hídrico, entre os meses de agosto e dezembro; e a segunda safra normalmente feita após a colheita de soja precoce, no período de janeiro a março.

2.1.2 Importância dos nutrientes Nitrogênio e Fósforo para a cultura do milho

O Nitrogênio é o elemento absorvido em maior quantidade pela cultura do milho e o mais limitante; ele exerce função direta nos processos fisiológicos e bioquímicos da planta. Na fase inicial de desenvolvimento do milho, é exigido pela cultura no mínimo 25 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Já em momentos em que o sistema radicular começa a demonstrar quantidades consideráveis de pelos absorventes, o nitrogênio torna-se um estímulo a proliferação.

Além do nitrogênio (N) o fósforo (P) é um elemento essencial para a cultura do milho. Pois está envolvido em diversas funções metabólicas

importantes na planta, sua deficiência prejudica o crescimento vegetal. (Rajj e Cantarella, 1997). As doses recomendadas de P são altas, em função da sua baixa eficiência (20 a 30%) de aproveitamento desse nutriente pela cultura. Para essa cultura considera-se que, para cada tonelada de grãos produzida, são necessários 10 kg de P_2O_5 . (Cruz et al., 2008).

Com a necessidade da alta produção e desenvolvimento dessa cultura fez-se necessário a associação de níveis considerados ótimos de água e temperatura, além de técnicas de manejo adequadas. (Cruz et al., 2014).

O uso de insumos químicos em associação com o melhoramento e o tipo de manejo, proporcionam um aumento na produtividade do milho. (Galvão et al. 2014). Hoje existe uma preocupação referente ao uso excessivo de fertilizantes químicos, uma vez que estes causam poluição em lençóis freáticos, eutrofização de solos e emissão de gases do efeito estufa. (Chien et al. 2011)

As associações benéficas entre bactérias endofíticas e diazotróficas podem contribuir para promoção de crescimento, aumento da biomassa das raízes, e redução da perda de nitrogênio.

2.2 SOJA

A soja *Glycine max*, pertence à família *Fabaceae*, que compreende também grãos como o feijão, ervilhas e a lentilha. Teve sua provável origem na China, e logo disseminou-se pela Europa, Américas do Norte e Sul. Em 1882 foi trazida ao Brasil, mais especificamente no estado da Bahia, e logo foi levada para a região Sul do país, onde teve melhor adaptação. (Verneti, 1983)

O grande aumento da produtividade da soja está associado aos avanços tecnológicos, manejo e eficiência dos produtores. É um componente utilizado na fabricação de ração animal, e alimentação humana, produção óleos, produtos farmacêuticos e biocombustível (Marcon et al., 2017.)

Segundo a CONAB (2019), o Brasil e os Estados Unidos se classificam como os maiores produtores de soja do mundo, seguidos da Argentina e China. Estima-se que no ano de 2.020 o Brasil liderará esse ranking.

O crescimento, desenvolvimento e rendimento da soja são resultado de um determinado potencial genético interagindo com o ambiente. A planta de soja está em sintonia com o ambiente à medida que este auxilia também em realizar o desenvolvimento da planta (Dechen, 2007).

Tabela 2. Estágios vegetativos e reprodutivos da planta de soja.

ESTÁDIOS VEGETATIVOS		ESTÁDIO REPRODUTIVOS	
VE	Emergência	R1	Início do florescimento
VC	Cotilédone	R2	Pleno florescimento
V1	Primeiro nó	R3	Início da formação das vagens
V2	Segundo nó	R4	Plena formação das vagens
V3	Terceiro nó	R5	Início do enchimento das sementes
V4	Quarto nó	R6	Pleno enchimento das vagens
V5	Quinto nó	R7	Início da maturação
VN	Enésimo nó	R8	Maturação plena

2.2.1. Produção de soja no Brasil

Soja é o grão mais exportado do país, sua colheita pode iniciar em fevereiro/março e se estender até abril/maio, dependendo principalmente da cultivar de soja utilizada.

2.2.2. Importância do Nitrogênio para a cultura da soja

Durante todos os estádios é fundamental que a planta esteja bem nutrida para que tenha desenvolvimento adequado. É importante que haja

disponibilidade e absorção dos nutrientes em volumes ideais, através do solo ou por meio de suplementação, através das folhas (Dechen e Nachtigal, 2007). Cada nutriente tem papel específico no metabolismo das plantas. Qualquer desequilíbrio em suas proporções pode provocar limitações ao desenvolvimento e até mesmo sua morte.

O Nitrogênio (N) é o nutriente do qual a planta necessita em maior quantidade se comparado aos demais, isso porque ele constitui os ácidos nucléicos, as proteínas e moléculas. Na cultura da soja, devido ao alto teor de proteínas presente nos grãos, há uma elevada necessidade de N (Hungria et al., 2007); calcula-se em torno de 80 kg de N para cada 1.000 kg de grãos produzidos.

A principal forma de fornecimento do N na cultura da soja é através da fixação biológica de Nitrogênio (FBN), todavia, requer esforço energético da planta, através de seus nódulos, o que pode levar a um gasto energético maior do que para a absorção de fertilizantes nitrogenados (Hungria et al., 2007).

2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO – BPCP

O termo rizobactérias promotoras de crescimento foi definido por Kloepper e Schroth em 1978, todavia com o crescimento do número de pesquisas nessa área o termo pareceu não mais englobar da melhor forma esse novo grupo de bactérias, assim Bashan e Holguin (1998) propuseram dois novos termos visando abranger todos os benefícios que essas bactérias tem a oferecer : Biocontroladoras promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) e as Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs). Mais tarde Cessán e colaboradores definiram mais um termo: Bactérias reguladoras de estresse em plantas (PSHR). Juntas elas formam os três grupos funcionais das Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs)(Sgroy et al.,2009).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal são um grupo de micro-organismos capazes de estimular o desenvolvimento das plantas através de mecanismos diretos (produção de fitormônios, enzimas, ácido cianídrico,

solubilização de fosfatos e fixação de nitrogênio), e/ou indiretos (controle biológico, competição por espaço e por nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada. Essas bactérias habitam normalmente superfícies radiculares, tecidos internos dos vegetais e a rizosfera. Uma grande variedade de gêneros de bactérias promotoras de crescimento de plantas já foi descrito, entre eles podemos destacar: *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Azospirillum* (Hungria et al. 2010).

2.3.1. Mecanismos diretos de promoção de crescimento

2.3.1.1. Fixação de nitrogênio

As plantas podem assimilar N do solo como nitrito, nitrato ou amônia. Estas formas de nitrogênio não estão abundantes na maioria dos solos e a adubação nitrogenada é frequentemente perdida por lixiviação. Bactérias fixadoras de N₂, estabelecem simbioses formando nódulos nas raízes de plantas leguminosas, como soja, ervilha, amendoim e alfafa, nas quais convertem N₂ em amônia, tornando -se assim assimilável pelas plantas. (Murray, 2011).

De acordo com Moreira (2010) existem oito gêneros de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio, sendo eles: *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Cupriavidus*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Burkholderia*.

2.3.1.2. Solubilização de Fósforo

O fósforo é um nutriente de extrema importância para as plantas, ele tem ligação direta no desenvolvimento da raiz, confere maior resistência de talo e caule, formação melhorada de flores e produção de semente, maturidade de planta mais uniforme e adiantada, confere a planta maior resistência a doenças.

É encontrado na natureza na forma de orgânica: resíduos de plantas, esterco e tecido microbiano; e na forma inorgânica: Apatita, complexos de ferro, fosfatos de alumínio e fósforo absorvido nas partículas de argila. Todavia, a maioria do P no solo encontra-se em formas insolúveis, enquanto as plantas conseguem absorver apenas sob a forma de ânions H_2PO_4 e HPO_4^{2-} (Bhattacharyya e Jha, 2012).

Algumas bactérias tem a capacidade de solubilizar fosfatos do solo através da produção de ácidos orgânicos e fosfatases. Assim, organismos acoplados com atividade de solubilização de fosfato, podem fornecer as formas disponíveis de P para as plantas se tornando uma opção ecologicamente segura e economicamente razoável para melhorar a produção agrícola (Angulo et al., 2014).

2.3.1.3. Produção de AIA

As auxinas são os fitormônios, ou hormônios vegetais, mais importantes das plantas. Esses hormônios podem ser encontrados em fungos, bactérias e algas. Dentre as atividades fisiológicas das auxinas, destaca -se a regulação do crescimento dos vegetais. Elas são produzidas nas células meristemáticas, folhas jovens, flores, frutos, nas pontas dos caules e das raízes, podendo ser transportadas à outras regiões das plantas quando necessário.

Dependendo de sua concentração, as auxinas podem ter diversos efeitos sobre a planta como: crescimento do caule, das folhas, das flores, das raízes e

dos frutos, como também a abscisão foliar, a dominância apical, a formação de flores femininas, a partenocarpia, entre outras atividades. (Droque et al., 2012).

2.3.2. Mecanismos indiretos

2.3.2.1. Biocontrole

Visando o controle de pragas, agrotóxicos são pulverizados inúmeras vezes nas culturas o que acarreta um aumento nos custos de produção, além dos riscos para a saúde humana, e desequilíbrios ao meio ambiente.

A atuação do biocontrole contra agentes patogênicos é o principal mecanismo indireto de promoção do crescimento de plantas. Ele se dá pela utilização de micro-organismos que trabalharão em prol da planta trazendo benefícios a mesma como: a competição por nutrientes, a indução da resistência sistêmica e a produção de metabólitos antifúngicos. (Glick, 2012).

2.4 GÊNERO *Bacillus*

O gênero *bacillus* é composto de forma geral por bactérias que tem o solo como habitat natural, são gram-positivas, possuem importância ambiental e em

sua maioria não são patogênicas. Devido sua forte característica de esporulação, é conferido a esse grupo a propriedade de permanecer coletivamente subsistindo nos solos, assim elas são disseminadas em larga escala pelo vento o que faz com que sejam encontradas com frequência em diferentes tipos de alimentos. Além disso, a resistência de seus esporos e diversidade fisiológica das células fazem com que o isolamento dessas bactérias possa ser feito de outros locais além dos solos, como: água e alguns gêneros alimentícios (Rabinovitch, 2016).

2.4.1. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria com formato cilíndrico, gram-positiva, formadora de esporos, anaeróbia facultativa e mesófila. É considerada um agente etiológico causador de intoxicações alimentares. (Mendes et al., 2004). Seus esporos facilitam sua adesão em superfícies e resistência a altas temperaturas e processos de sanitização, ou seja, a bactéria consegue permanecer em um estado de “dormência” até que o ambiente se torne novamente favorável. É um micro-organismo produtor de fosfolipases e enzimas degradadoras de alimentos como as amilases, proteases e a lectinase. (Koneman et al., 2001).

Hoje no âmbito da agricultura existem muitos produtos que possuem como ingrediente ativo espécies do gênero *Bacillus*: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, entre outros. Muitos ganhos na nutrição de plantas e solubilização de fósforo são advindos da presença deste grupo de micro-organismo na rizosfera

Em relação ao uso de *Bacillus subtilis* como promotor de crescimento de plantas, trabalhos como o de Araújo (2008), apontam uma maior absorção de nutrientes como nitrogênio e fósforo em plantas inoculadas com essa bactéria.

Muito se ouve falar do *Bacillus cereus* como causador de intoxicações alimentares, apesar de diversos estudos de outros gêneros de *Bacillus*, ainda

não se estudou a viabilidade do *Cereus* enquanto promotor de crescimento de plantas.

2.5. GÊNERO *Lactobacillus*

Lactobacillus são micro-organismos gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios - facultativos e degradadoras de frutose, galactose, glicose, maltose, esculina e sucrose; geralmente são encontrados no intestino, boca ou genitais femininos. Entre suas espécies pode-se citar os *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, esta última foi isolada pela primeira vez por Moro (1900) a partir das fezes de neonatos, ele deu a elas o nome de *Bacillus acidophilus*.

É um organismo probiótico muito utilizado como suplemento nutricional, produzidos pela indústria alimentícia, com a função de manter o equilíbrio da flora intestinal; em indivíduos que possuem sua microbiota já estabelecida, a influência de probióticos limita-se ao período em que são empregados, assim para que ocorram mudanças, faz-se necessário o uso do mesmo por longos períodos. Ele se adere a receptores específicos na membrana intestinal competindo com patógenos, além de produzir substâncias antimicrobianas, chamadas de bacteriocinas. (Marco, 2004).

Flech (2014) cita entre os muitos benefícios do *Lactobacillus acidophilus*, a prevenção de diarreia por *C. difficile* em adultos, tratamento da diarreia aguda infecciosa em crianças, aumento da imunidade, produção da enzima lactase.

Muitos trabalhos de revisão bibliográfica e estudo de caso já foram feitos sobre a importância e melhoras que o *Lactobacillus acidophilus* pode trazer ao ser humano e animais (Nunes, 2018). Todavia nada foi testado em específico dessa bactéria atuando na promoção de crescimento de plantas. Bertolin (2016)

utilizou *Lactobacillus plantarum* na viabilização do tomateiro, mas não teve resultados satisfatórios.

2.6. GÊNERO *Succinovibrio*

Succinovibrio dextrinosolvens é uma bactéria amilolítica (degrada o amido) anaeróbia, Gram-negativa, têm pH ótimo em torno de 6,0 – 7,0. É encontrada geralmente no rúmen de bovinos, auxiliando juntamente com outros micro-organismos no melhor aproveitamento de nutrientes (Araújo, 2013).

A literatura é carente de estudos mais aprofundados desse organismo, principalmente em relação a sua aplicação como bactéria promotora de crescimento de plantas.

2.7. RÚMEN

O Rúmen funciona como uma câmara de fermentação (Soest, 1982), a ação da população microbiana ruminal sobre o substrato (alimento do hospedeiro) tem especial importância, pois constitui a base da fisiologia digestiva dos ruminantes.

Celulose e hemicelulose representam a maior fonte potencial de energia para os animais herbívoros (Arcuri, 1992), após a degradação pelos complexos enzimáticos de micro-organismos animais. Além dessa fundamental capacidade hidrolítica, estes organismos reduzem acentuadamente o volume de matéria seca que passa à porção pós-ruminal do trato digestivo (Dehority, 1987).

2.7.1. Bactérias rúmen

A enorme diversidade de organismos ruminais pode ser devida à complexidade do substrato. Sobrevivem e predominam as espécies que possuam em seu material genético as informações para a síntese de enzimas que compõe as vias metabólicas mais eficientes no aproveitamento da energia contida no substrato (Hungate, 1966).

Bactérias celulolíticas têm a habilidade bioquímica de produzir a enzima extracelular celulase, através da hidrólise da celulose. Segundo Dehority (1987) as principais espécies celulolíticas são: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes* e *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Bactérias amilolíticas são as responsáveis pela degradação do amido (que se dá pela enzima amilase), que é fermentado por espécies do gênero *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Selenomonas* (Russell, 1988).

Existem também bactérias essencialmente proteolíticas, que utilizam aminoácidos como fonte de energia primária (*Bacteroides amylophilus* e *Bacteroides ruminicola*). A proteína contida no alimento do animal pode ser degradada pelos micro-organismos de rúmen (Teixeira, 1991).

Bactérias Metanogênicas (anaeróbias estritas) são organismos capazes de produzir metano. Estas bactérias são especialmente importantes para o ecossistema ruminal, pois tem um papel importante na regulação de fermentação pela remoção das moléculas de H₂ (Teixeira, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi dividida em duas fases: primeiro realizou-se os testes in vitro, com o objetivo de verificar se os isolados utilizados no estudos possuíam a capacidade de produzir sideróforos, amilase, celulase, ácido indolacético, fixar nitrogênio e solubilizar fósforo; todas características que são atribuídas a bactérias promotoras de crescimento de plantas. Com os resultados dos testes in vitro, foram selecionados os micro-organismos de melhor desempenho, e estes foram testados em casa de vegetação nas culturas de milho e soja.

3.1. Fase 1

3.1.1 Isolados bacterianos

Os micro-organismos utilizados (*Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Succinovibrio dextrinosolvens*) foram isolados do Rúmen de bovinos na Universidade Federal de Viçosa – UFV, identificados e trazidos ao Laboratório de Microbiologia da Unesp – FCAV.

3.1.2. Produção de Sideróforos

O ferro é um nutriente de extrema importância para as plantas e crescimento dos micro-organismos, todavia, no solo o Fe^{3+} é totalmente insolúvel, e o Fe^{2+} é pouco solúvel. Existe uma parcela da comunidade microbiana que produz uma molécula denominada sideróforo, que quando excretada no meio produz compostos solúveis com o ferro, tornando – o assimilável para as plantas.

Foi utilizada a metodologia descrita por Louden (2011):

- A. Corante azul: 0,06g de CAS (Fluka Chemicals) em 50mL de H₂O; 0,0027g de FeCl₃-6H₂O dissolvido em 10 ml HCl; 0,073 g de HDTMA em 40 ml de H₂O.
- B. Solução de mistura: Solução de Mínimo Mídia (MM9) Salt Solution Stock; 15 g/l KH₂PO₄; 25 g/l NaCl; 50g/l NH₄Cl; 500 ml de H₂O; Glicose a 20% 25 g/l de NaOH; 3 g/l de ácido casamino. O pH da solução foi ajustado para 12.
- C. Preparação de ágar CAS – Procedimentos: Adicionou-se 100 ml de solução salina MM9 em 750 ml de H₂O; Dissolveu-se 32,24 g de piperazina-N, N-bis (2- ácido etanossulfônico) PIPES; A Solução de PIPES não se dissolveu abaixo do pH 5; então lentamente o PIPES foi adicionado enquanto a solução era misturada. O pH então caiu depois da dissolução do PIPES e ficou em seu estado ideal com pH 6,8. Adicionou-se 15 g de Ágar Bacto. A solução foi autoclavada e resfriada a 50°C.

3.1.2.1. Mistura das tubulações

Adicionou-se 30 ml de solução estéril de ácido casamino e 10 ml de solução de glicose estéril a 20% para MM9; lentamente adicionou-se 100 ml de solução de corante azul ao longo a parede de vidro com agitação suficiente para misturar completamente. Assepticamente foi vertido nas placas.

3.1.3 Teste de atividade amilolítica

Amilases são enzimas que são catalisadoras da hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogênio em maltose e dextrinas.

Os seguintes reagentes foram utilizados para preparar o meio onde as bactérias foram inoculadas: 0,3 g/l K_2HPO_4 ; 1,0 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g/l NaCl; 1,0 g/l $NaNO_3$; 10 g/l amido; 1000 ml H_2O deionizada. O pH do meio foi ajustado em 6,9.

Procedimentos: Com auxílio de agulha, os isolados foram inoculados em picada e as placas incubadas a 30 °C por 72 horas. Após o crescimento as placas foram coradas com solução de lugol (2 g iodo; 4 g iodeto de potássio; 300 ml H_2O deionizada) de 5 a 10 min, o que possibilitou a visualização dos halos.

3.1.4. Atividade celulolítica

Celulase refere-se a uma classe de enzimas produzidas essencialmente por fungos, bactérias e protozoários que são encontrados no rúmen de ruminantes e no trato digestivo de termitas ou cupins, que catalisam a hidrólise da celulose.

Foi utilizado a metodologia com o meio descrito por (Ramachandra et al.,1987).

Os seguintes reagentes foram utilizados para preparo do meio: 6 g extrato de levedo; 0,10 g/l NH_3SO_4 0,3 g/l NaCl; 0,1 g/l $MgSO_4$; 0,02 g $CaCO_3$; 1 ml solução traço (0,1% $FeSO_4$, 0,09% $ZnSO_4$, 0,02% $MnSO_4$); suplementado com carboximetilcelulose 0,5%; 15 g/l ágar 1000 ml H_2O deionizada.

Procedimentos: Com auxílio de agulha, os isolados foram inoculados em picada e as placas incubadas a 30 °C por 72 horas. Após o crescimento as placas foram coradas com solução de vermelho congo, o que possibilitou a visualização dos halos de hidrólise da carboximetilcelulose.

3.1.5. Determinação da produção de Ácido Indolacético

Ácido indolacético é uma auxina, um hormônio de crescimento que promove o alongamento celular diferencial e funciona como regulador do crescimento dos vegetais

Utilizou-se o meio de cultura DYGS (Rodriguez et al., 1986). Os seguintes reagentes foram utilizados para o preparo do meio: 2g/l Glicose; 1,5g/l Peptona; 2g/l Extrato de levedura; 0,5g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; L- triptofano 5mM-0,5106; 1000mL H_2O . O pH do meio foi ajustado para 6,8.

Procedimentos: 20 ml de meio foram colocados em Erlenmeyer de 125ml, em seguida os isolados foram inoculados utilizando alça e incubados por 48h a 120 rpm a 28°C; após esse período 5 ml da cultura incubada foi colocada em centrífuga por 10.000 rpm durante 10 minutos; pegou-se 2 ml do sobrenadante + 2mL do reagente salkovisk e incubou por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Por fim foi feita a Leitura em espectrofotômetro a 530nm.

3.1.6 Quantificação de P em tubos de ensaio

O fósforo é um nutriente essencial para todos os organismos vivos, nas plantas ele está diretamente ligado ao desenvolvimento da raiz, maior resistência de talo e caule, confere resistência a doenças, maturidade de plantação mais uniforme e adiantada.

Utilizou-se a metodologia modificada de Malavolta et al., (1989) COM meio descrito por Nahas (1994): 0.1 g/l NaCl; 1 g/l NH₄Cl; 0.2 g/l KCl; 0,2 g/l CaCl₂.2H₂O; 0,1 g/l MgSO₄.7H₂O; 10 g/l glicose; 0,5 g extrato de levedo; 1000 ml H₂O; 5 g de Apatita de Araxá (Ca₃(PO₄)₂.CaF₂). O pH do meio foi ajustado para 7.

Procedimentos: Em Erlenmeyer de 120 ml contendo 50 ml de meio Nahas, foi adicionado 200 µL de inóculo de cada isolado. Os Erlenmeyers foram incubados por 48 h a ± 28 °C em agitação a 180 rpm, após a incubação 5 ml de cada amostra foram transferidos para tubos e centrifugados a 9000 rpm por 15 min. Em seguida 1 ml do sobrenadante de cada isolado + 4 ml de água destilada e 1 ml do reagente molibdato-vanadato de amônio, foram adicionados em um novo tubo para posterior leitura (após 5 min) em espectrofotômetro a 470nm.

3.1.7 Quantificação de Nitrogênio em tubos de ensaio

Depois do Carbono, Hidrogênio, Oxigênio é o elemento mais demandado pelos vegetais. Sua fonte primária é o N₂, presente na atmosfera terrestre. Entretanto, para que o elemento seja utilizado biologicamente, ele precisa ser fixado e combinado com outros elementos, tornando-o solúvel e assimilável. Alguns micro-organismos possuem a capacidade de captar o nitrogênio do meio, transformar em amônia e transportar para as plantas.

Nas análises para quantificação de nitrogênio pelos isolados, foi utilizado o método de Kuss et al., (2007).

Procedimentos: Preparou-se um pré- inóculo em caldo nutriente e este foi colocado em B.O.D 24h. Adicionou-se 650 µl do pré inóculo em frascos com 15 ml de meio NFb semi-sólido, em triplicatas. * Como controle utilizou-se

somente meio sem inoculação com bactérias. Os frascos foram incubados 30°C por cinco dias. Após o crescimento bacteriano, adicionou-se 9,5 ml solução resultante (meio + conteúdo celular) em tubos para digestão pelo método semi-micro Kjeldhal (Neto e Barreto, 2011). Prosseguiu-se com a digestão (1h a 100 °C, 1h a 200°C e 1h a 300°C - manteve até a mistura apresentar a cor verde-palha). Após a digestão, foi colocado no tubo 10 ml água destilada e prosseguiu com destilação adicionando 25 ml de NaOH. Foi feita a titulação com ácido sulfúrico 0.05 N, e o cálculo de Nitrogênio fixado foi apresentado em microgramas por mililitro de meio.

3.2. Fase 2

3.2.1 Projeto experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi feito em blocos casualizados com 5 tratamentos e 6 blocos, sendo eles: T1= Controle; T2= *Bacillus cereus*; T3= *Lactobacillus acidophilus*; T4= *Succinovibrio dextrinosolvens*; T5= "MIX" (mistura dos três micro-organismos). As análises foram executadas usando o software AgroEstat .Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os delineamentos foram os mesmos para as culturas de milho e soja

3.2.2 Plantio

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, pertencente ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da UNESP-FCAV (coordenadas- Latitude: 21° 14' 05" S Longitude: 48° 17' 09" W). Para os estudos com a cultura do milho utilizou-se sementes da variedade 2B587PW Dow Agro-Science-transgênico[®]; nos experimentos com soja foi usado sementes da variedade 95R95IPRO Piornner[®]. Em ambos os casos, as sementes foram pré-inoculadas com *B. cereus*, *L. acidophilus* e *S. dextrinosolvens*, depositadas em vasos (5L), preenchidos com solo, do tipo latossolo vermelho eutrófico, peneirado e adubado. A adubação foi feita conforme análise química do solo e o recomendado para as culturas. (Tabela 3).

Tabela 3- Análise Química do solo anterior a montagem do experimento.

pH CaCl ₂	MO g dm ³	P mgdm ³	S mgdm ³	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V%
			mmol _c dm ³						
6,5	11	20	12	0,7	19	5	17	24,4	41,3	59

3.2.3. Inoculações

Efetou-se quatro inoculações sendo a primeira via sementes, em que estas foram imersas em tubos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de caldo nutritivo em concentração bacteriana de 10⁸ UFC ml⁻¹ por 15 minutos em

agitação orbital de 120 rpm e depois semeadas. A segunda, terceira e quarta inoculação das bactérias foram feitas uma a cada semana, sete dias após a semeadura, via solo, adicionando 20 ml de cada inóculo na mesma concentração citada anteriormente.

3.2.4 Avaliações nas plantas de milho e soja

3.2.4.1 Massa seca

De ambas as culturas foram coletadas as raízes e parte aérea, estas foram secas em estufa sob aeração forçada a 65°C por aproximadamente 72 horas até atingirem peso constante. Posteriormente realizou-se a determinação da massa (g) de matéria seca das raízes (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA), através da pesagem em balança analítica.

3.2.4.2. Concentração de Nitrogênio na parte aérea e raiz

Para determinação da concentração de nitrogênio (N) o material vegetal foi moído em moinho tipo Willey (malha 20) e submetido à análise foliar de N através do método proposto por Bremner (1996) e Mulvaney (1996), modificado segundo Bezerra Neto e Barreto (2011). Pesou-se pesado 0,1 g da amostra vegetal e transferido para tubo digestor, adicionando-se 7 ml de mistura digestora esse material seguiu para digestão em bloco digestor obedecendo determinada sequência de tempo e temperatura (1h a 100°C, 1H a 200°C e 1h a 300°C). Após resfriamento o material digerido foi dissolvido utilizando

aproximadamente 10 ml de água destilada e a destilação foi realizada em destilador semi-micro Kjeldahl, com auxílio de 25 ml de NaOH (50%). O material destilado foi recolhido em 10 ml de solução indicadora de ácido bórico, obtendo-se 20 ml de destilado. A titulação da amônia destilada foi feita com a utilização de uma solução padrão de H₂SO₄ 0,05N. Para a mistura de indicador utilizada, o ponto final da titulação corresponde a mudança de cor: de verde para vermelho claro. Considera-se que 1,0mL do ácido sulfúrico 0,05 N gasto na titulação corresponde a 0,7 mg de N na amostra.

3.2.4.3. Concentração de fósforo na parte aérea e raiz

As concentrações de fósforo (P) foram determinadas por digestão nitro-perclórica seguida pelo método colorimétrico do molibdo-vanadato segundo metodologia proposta por Haag et al. (1975) com modificações (Bezerra Neto e Barreto, 2011). Foi pesado 0,5 g da amostra vegetal e transferida para tubo digestor, adicionando-se 5 ml de ácido nítrico concentrado e 1 ml de ácido perclórico concentrado, deixando-se em repouso de um dia para o outro (pré-digestão nitro-perclórica). Após o repouso foi realizada a digestão completa em bloco digestor obedecendo determinada sequência de tempo e temperatura (1h a 80°C, 1h a 120°C, 1h a 150 °C e 1h a 180°C). O material digerido foi lavado com água destilada obtendo-se 50 ml de extrato. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 470 nm utilizando-se 5 ml do extrato mais 1 ml do reagente específico, formado pela mistura de volumes iguais de molibdato de amônio a 5% e vanadato de amônio a 0,25%.

3.2.5. Avaliações no solo

3.2.5.1. Fósforo solúvel

Para a determinação do fosfato solúvel, foi utilizado o método de Watanabe e Olsen (1965) onde, 0,6 g de solo seco foram transferidos para Erlenmeyer de 250 ml, contendo 12 ml de solução extratora de bicarbonato de sódio e levadas a agitação em agitador horizontal por 30 minutos e filtrado em papel de filtro Whatman nº40. Na determinação, foi pipetado 2 ml do filtrado, 0,2 ml de solução de ácido sulfúrico 5M e 0,8 ml do —Reagente BII em tubo de ensaio 13X150 mm, agitou-se e seguindo-se com incubação a 45°C, por 20 minutos. Após incubação, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 820 nm. Em cada leitura foi utilizado um branco, com 2 ml de bicarbonato de sódio 0,5 M, pH 8,5, no lugar do extrato de solo. Os cálculos foram efetuados com base numa curva padrão com solução KH_2PO_4 , contendo 100 $\mu\text{g P/mL}$ -1. O reagente B foi preparado imediatamente antes de ser utilizado dissolvendo 1,056 g de ácido ascórbico em 200 ml do reagente A. E para preparo do reagente A foram dissolvidos 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.

3.2.5.2. Nitrogênio total

Foi determinado pelo método Kjeldahl. A digestão sulfúrica foi utilizada para a obtenção do extrato e a determinação do nitrogênio total envolveu a destilação em aparelho semi-micro Kjeldahl e titulação com ácido sulfúrico a 0,02 mol L⁻¹.

Procedimentos: Pesou-se 1 g de solo seco em tubo de ensaio tipo Kjeldahl de 100 ml e adicionou-se 1,1 g/l de mistura catalítica e 3,0 ml de ácido sulfúrico concentrado, procedendo à digestão, por 3 horas. Após o resfriamento do frasco, o volume foi completado para 15 ml com água deionizada. Seguindo a destilação. Adicionou-se 20 ml de NaOH 10M, iniciando a destilação do nitrogênio, foi recolhido 30 ml em erlenmeyer de 50 ml, previamente pipetado com 5 ml de solução indicadora de ácido bórico. Em seguida, o destilado seguiu para titulação com solução de ácido sulfúrico 0,02 M até a mudança da cor verde para rosa. Em cada avaliação foi feito um branco omitindo-se o solo.

O teor de nitrogênio total foi calculado com base numa curva padrão determinada com solução de sulfato de amônia.

3.2.5.3. Contagem de bactérias totais

A contagem de bactérias totais foi realizada utilizando o método de diluição seriada proposto por (WOLLUM,1982). Adicionou-se 10g de solo fresco em erlenmeyers de 250mL contendo 95mL de solução salina de pirofosfato de sódio 0,1% (p/v). Agitou-se por 1h em agitador horizontal. 1mL do conteúdo do Erlenmeyer foi transferido para tubos de ensaio de 10x180 mm onde continha 9mL da solução de pirofosfato de sódio, e deste para o próximo até que se atingiu a diluição desejada. Da diluição desejada, adicionou-se 0,1mL em triplicata em placa de petri contendo 20mL de meio de cultura. As placas foram mantidas em estufa BOD a 30°C, e posteriormente realizado a quantidade de UFC com auxílio de uma lupa com aumento de seis vezes, após 24, 48 e 72h.

3.2.5.4 Carbono da Biomassa

As análises de carbono da biomassa foram realizadas de acordo com o método proposto pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Os seguintes reagentes e soluções foram utilizados: Solução de Sulfato de Potássio 0,5M; Solução de Dicromato de Potássio 0,066M Solução de Sulfato Ferroso Amoniacal 0,03M Solução indicadora de Ferroin

3.2.5.4.1. Preparo das amostras:

As análises foram conduzidas em triplicata, cada amostra continha 10g de solo guardado sob refrigeração e foram divididas em irradiadas (expostas a radiação de forno micro-ondas por 15 segundos), e não irradiadas.

3.2.5.4.2. Procedimento analítico

Pesou-se 10g da amostra de solo em dois Erlenmeyer devidamente identificados, um para irradiado e outro para não irradiado. Submeteu-se metade das amostras a irradiação por 15 segundos cada. Acrescentou-se aos dois Erlenmeyer (irradiado e não irradiado) 40mL de K_2SO_4 0,5M e agitou-se por 30 minutos em agitador horizontal. As amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos e filtradas em papel filtro qualitativo, recolheu-se o filtrado em Becker de vidro. Em seguida, Pipetou-se 10mL de cada extrato filtrado para Erlenmeyer de 125mL; Adicionou-se quantitativamente 2mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,066M e 10mL de ácido sulfúrico concentrado; Após esfriar, adicionou-se 50mL de água destilada e 4 gotas do indicador ferroin; Fez-se a titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,03M. Quatro provas em branco foram realizadas, sendo 2 contendo todos os reagentes e mais 10mL de K_2SO_4 0,5M e 2 apenas com os reagentes sem o sulfato de potássio.

3.2.5.4.3. Cálculos

Os valores do Carbono da Biomassa presente na biomassa microbiana foram calculados a partir da seguinte equação:

$$C \text{ irr. nlr} = (V_b - V_m) \times (\text{conc. Sulfato ferroso}) \times 3 \times 1000 \times (\text{vol. extrator}) / (\text{vol. Estrato}) \times (\text{peso solo}).$$

Onde: V_b - média dos volumes gasto na titulação dos brancos; V_m - média dos volumes gasto na titulação das amostras; Conc Sulfato Ferroso- 0,03M.

4. RESULTADOS

Os resultados das análises *in vitro* realizadas em laboratório para avaliar a capacidade ou não dos isolados em produzir sideróforos, atividade amilolítica e celulolítica, e os valores quantitativos das análises de produção de AIA, nitrogênio total e solubilização de fósforo em tubos, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4– Testes in vitro dos isolados *B.cereus*, *L. acidophilus* e *S.dextrinosolvens*

ISOLADO	Sideróforos	ATIV. amilolítica	ATIV. celulolítica	AIA	Solub. P (mg)	Fixação de N (mg)
<i>B. cereus</i>	-	+	-	9,08	16,13	0,7
<i>L.acidophilus</i>	+	-	-	6,45	5,58	0,5
<i>S.dextrinosolvens</i>	+	+	-	10,25 ¹	41,94	0,42

Para massa seca de raiz de milho (MSR) (Fig.A.1) a bactéria *L. acidophilus* (T3) promoveu um incremento 3,2 g ($p>0,05$) comparado com o tratamento controle. Para a massa seca de parte aérea (MSPA) (Fig.B.1), os tratamentos não diferiram entre si.

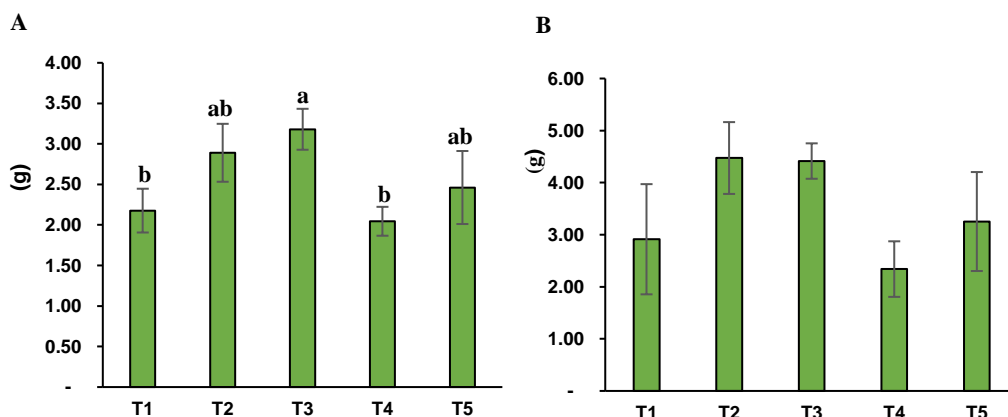


Figura 1. MSR (*CV=25,54) (A) e MSPA (*CV=47,85) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p\leq 0,05$). *Coeficiente de variação.



Figura 2 : Raiz de milho do tratamento controle (T1) (A), raiz de milho inoculada com *Lactobacillus acidophilus* (T3) (B).

O teor de nitrogênio nas raízes de milho variou de 25,36 a 30,73 g N/kg⁻¹, e não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos (Fig. A.2). O

teor de nitrogênio na parte aérea variou de 34,5 a 43,5 g N/kg⁻¹ e também não houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig.B.2).

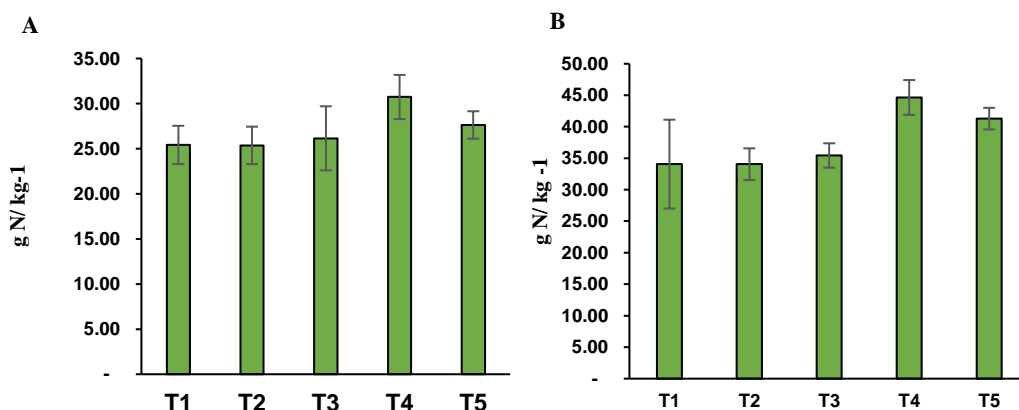


Figura 3. Concentração de Nitrogênio na Raiz (*CV=23,27) (A) e Concentração de Nitrogênio na Parte Aérea (*CV=25,57) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

O MIX (T5) de bactérias promoveu um incremento na concentração de fósforo 1,4 g de P/kg de planta comparado com o controle, seguido pelo tratamento com a inoculação da bactéria *L. acidophilus* (Fig. A.3). Alternando a isso, o MIX diminuiu a concentração de P na parte aérea 1,7 g de P/kg de planta de milho comparados com o controle 2,3 g de P/kg de planta (Fig.B.3).

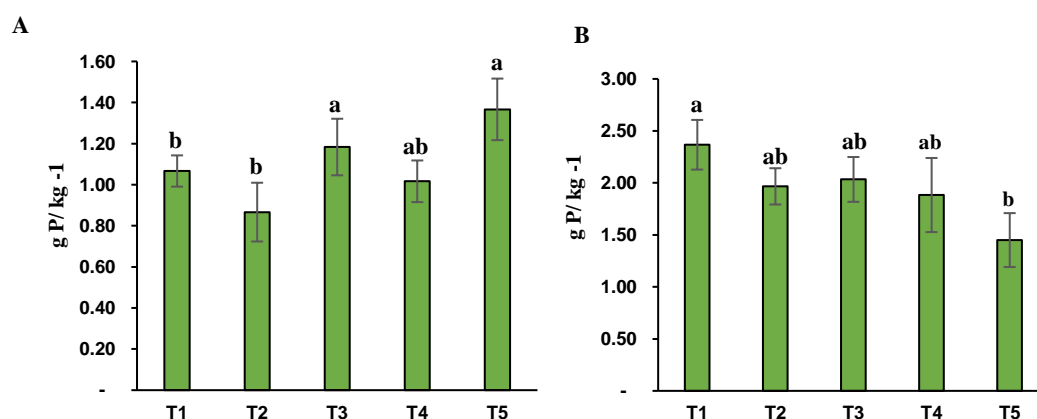


Figura 4. Concentração de Fósforo na Raiz (*CV= 25,00) (A) e Concentração de Fósforo na Parte Aérea (*CV= 29,04) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

Os valores das concentrações de nitrogênio variaram de 0,06 a 0,9 g de N/ kg de solo seco enquanto que, as concentrações de fósforo variaram de 5 e 35 g P/kg⁻¹ de solo seco. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig.A.4), (Fig.B.4).

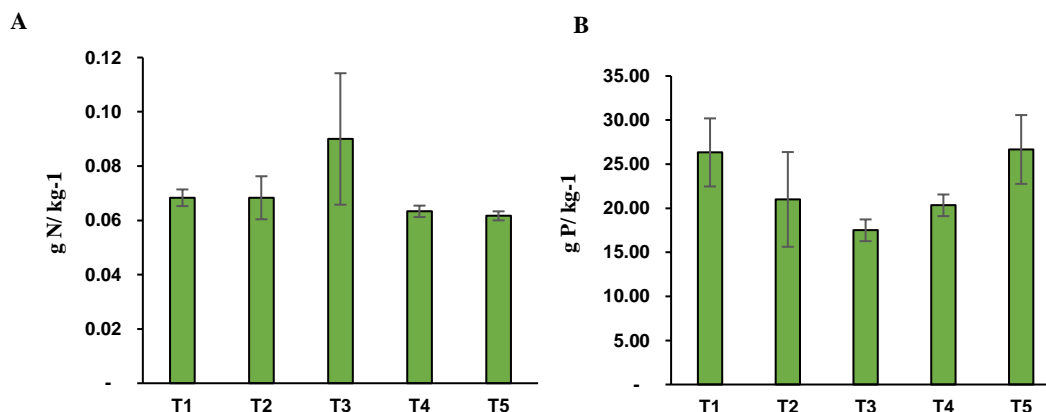


Figura 5. Concentração de Nitrogênio no solo(*CV=40,96) (A) e Concentração de Fósforo no solo(*CV=40,25) (B) de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

Quando feita a estimativa do número de bactérias viáveis no solo, observamos que os tratamentos apresentaram resultados próximos entre si.

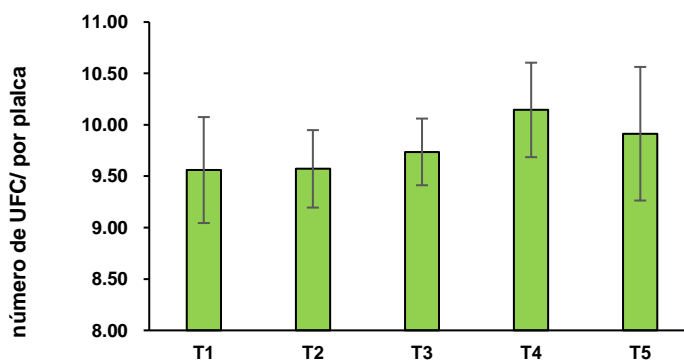


Figura 6. Unidade Formadora de Colônia (UFC) (*CV= 11,24) do solo de plantas de milho. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

No estudo de Carbono da biomassa microbiana, observamos uma maior quantidade de carbono armazenado nos tratamentos que receberam a aplicação da bactéria *Bacillus cereus*. Porém, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos.

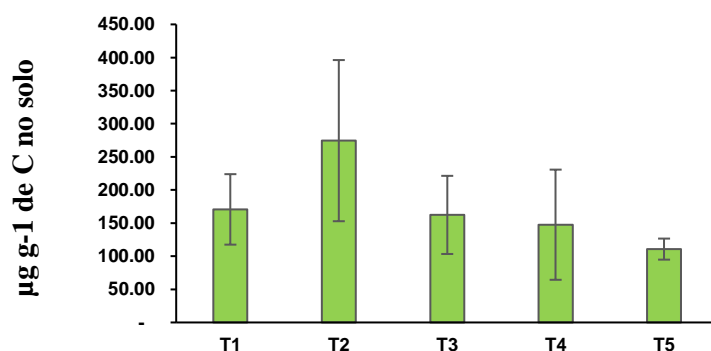


Figura 7. Carbono da biomassa do solo de plantas de milho (*CV= 15,3). Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

A bactéria *L. acidophilus* apresentou a maior massa seca de raiz nas plantas de soja comparada com o tratamento controle e com os outros tratamentos (Fig.A.5). Para matéria seca de parte aérea esse mesmo isolado foi o de melhor resultado (Fig.B.5).

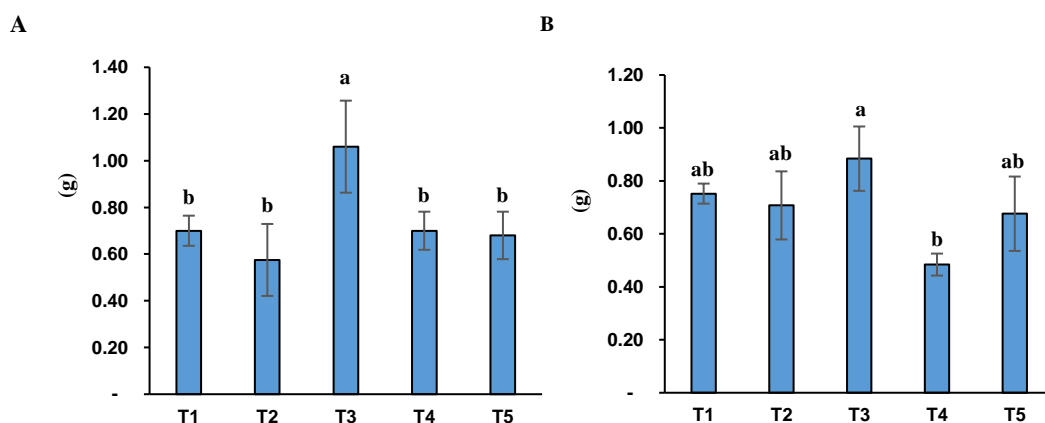


Figura 8. MSR (*CV=38,89) (A) e MSPA (*CV=35,24) (B) de plantas de soja Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

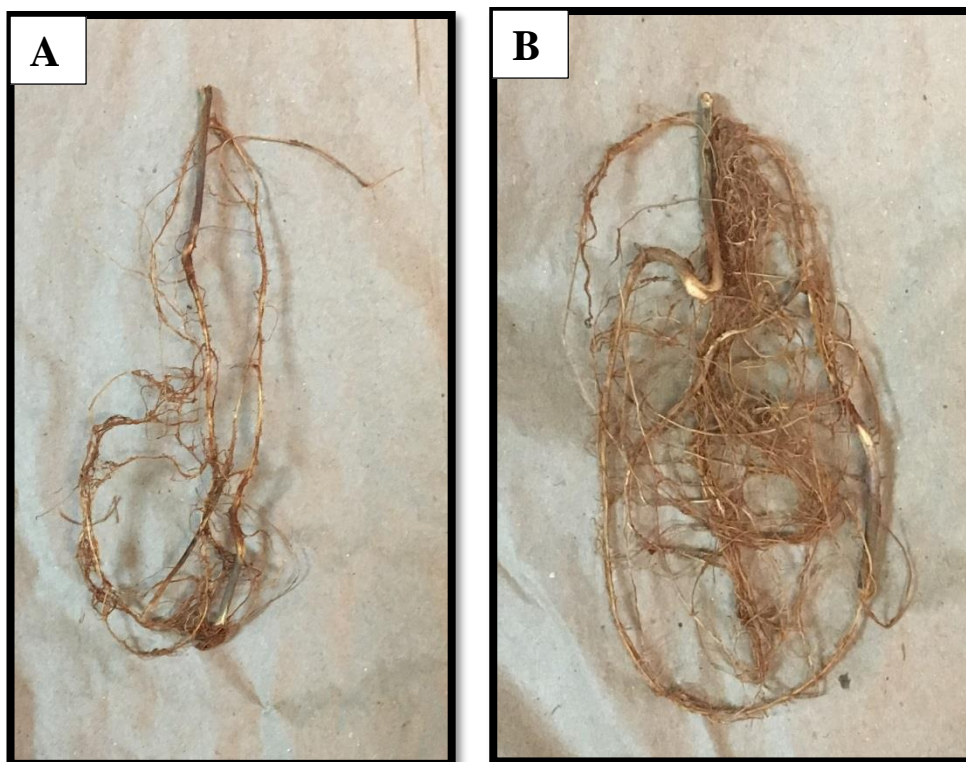


Figura 9: Raiz de soja do tratamento controle (T1) (A), raiz de soja inoculada com *Lactobacillus acidophilus* (T3) (B).

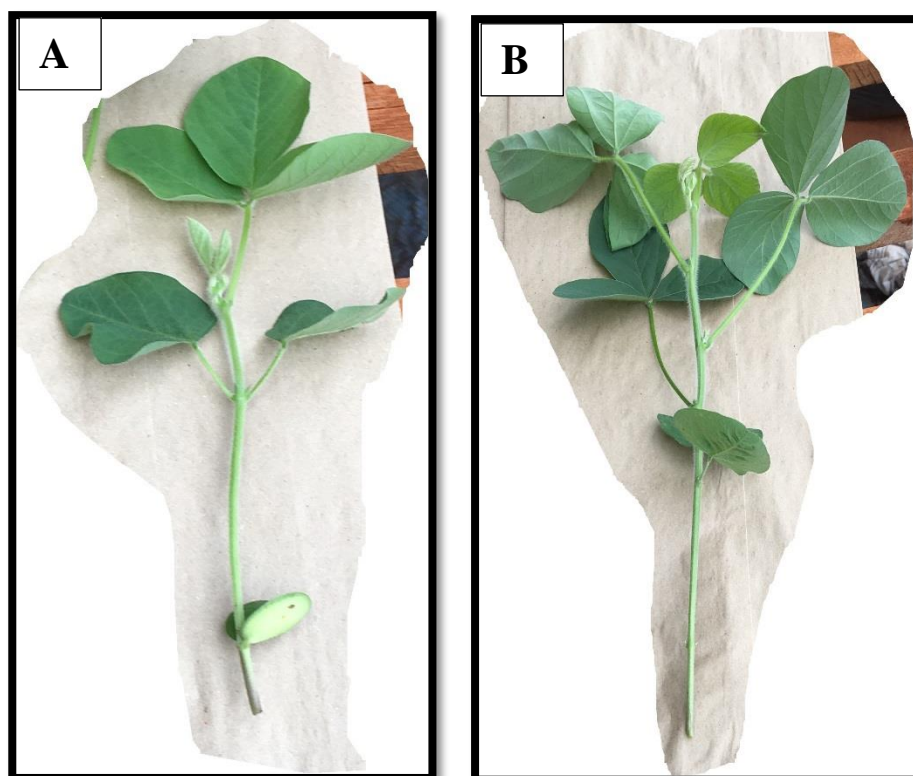


Figura 10. Parte aérea de soja do tratamento controle (T1) (A) e parte aérea de soja inoculada com *Lactobacillus acidophilus* (T3) (B).

Em relação a concentração de N, houve incremento significativo em raízes de plantas de soja que receberam a inoculação com as bactérias *L. acidophilus* e *S. dextrinosolvens*. Na parte aérea, o tratamento que recebeu a inoculação com *S. dextrinosolvens* apresentou incremento significativo no teor de N quando comparado com as plantas que receberam aplicação do MIX.

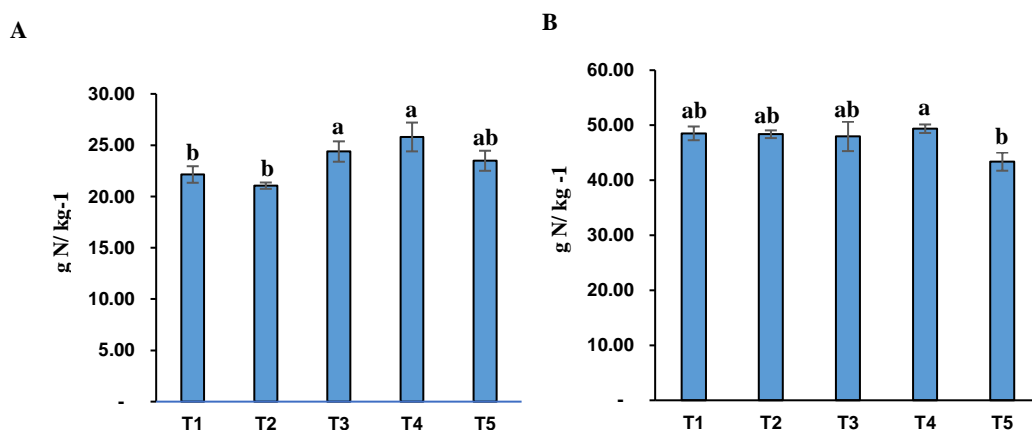


Figura 11. Concentração de nitrogênio na raiz (*CV=9,56) (A) e concentração de nitrogênio na parte aérea (*CV=8,22) (B) de plantas de soja. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

A bactéria *L. acidophilus* promoveu a maior concentração de fósforo na raiz 1,1 g de P /kg⁻¹ enquanto que a bactéria *S. dextrinosolvens* promoveu a maior concentração de fósforo na parte aérea 2,8 g de P/ kg⁻¹ comparado com os tratamentos controle ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às concentrações de P em raiz e parte aérea para os outros tratamentos (Fig. A.7), (Fig. B.7)

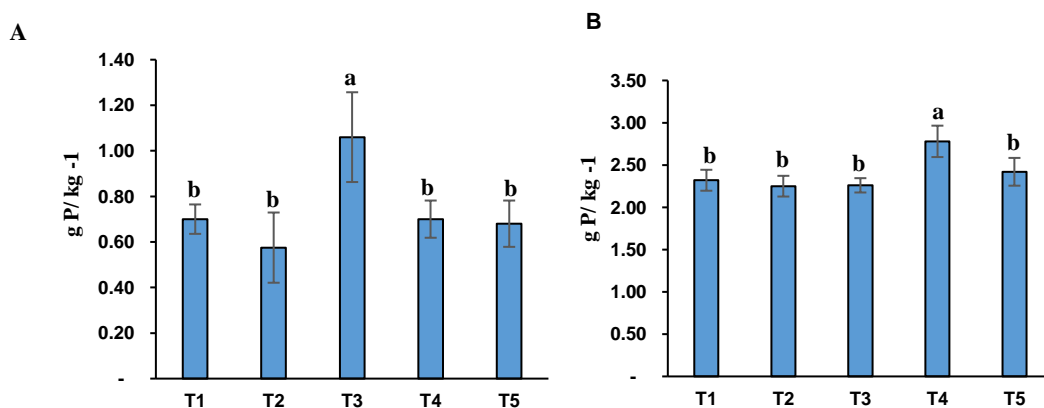


Figura 12. Concentração de fósforo na raiz (*CV=76,73) (A) e Concentração de fósforo na parte aérea(*CV=13,74) (B) de plantas de soja. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

Em relação ao nitrogênio no solo a bactéria *S. dextrinosolvens* promoveu a maior concentração 0,065 g de N/ kg⁻¹ comparado com o tratamento controle ($p > 0,05$). Por outro lado, a bactéria *L. acidophilus* diminuiu a concentração de nitrogênio no solo 0,05 g de N/ kg⁻¹ comparado com o tratamento controle (Fig.A.8). Em relação as concentrações de fósforo no solo não houve diferença significativa entre o controle e os outros tratamentos (Fig.B.8).

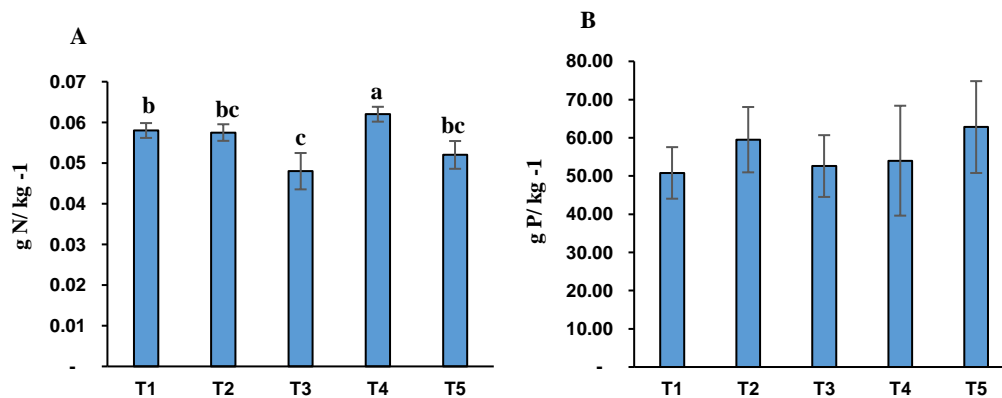


Figura 13. Concentração de nitrogênio no solo(*CV=11,24) (A) e Concentração de fósforo no solo(*CV=41,78) (B) de plantas de soja. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Avaliando a Unidade Formadora de Colônia (UFC), apesar da diferença numérica entre os tratamentos, colocando o micro-organismo *L. acidophilus* como o mais viável, estatisticamente os tratamentos não diferiram.

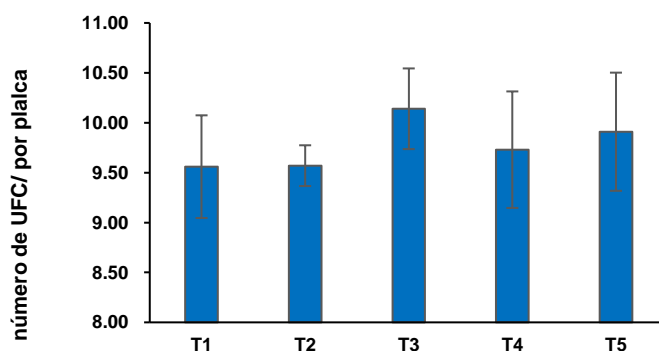


Figura 14. Unidade Formadora de Colônia (UFC) (*CV= 11,24) do solo de plantas de. Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

No estudo de Carbono da biomassa microbiana, observamos uma maior quantidade de carbono armazenado nos tratamentos que receberam a aplicação da bactéria *Succinovibrio dextrinosolvens* (T4).

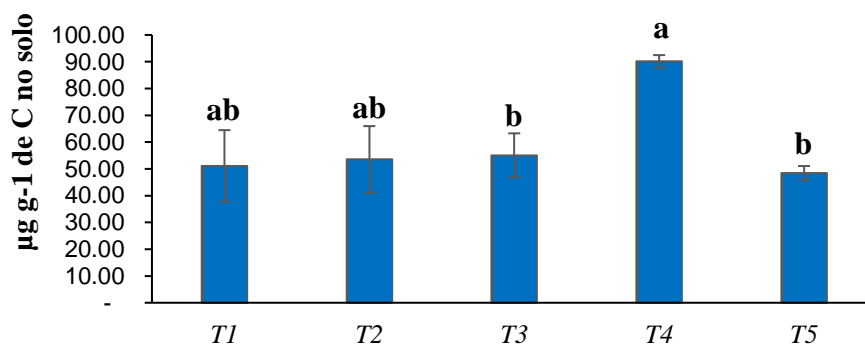


Figura 15. Carbono da biomassa do solo de plantas de milho (*CV= 15,3). Controle (T1), *B. cereus* (T2), *L. acidophilus* (T3), *S. dextrinosolvens* (T4), MIX (T5). As barras representam o erro padrão da média. As médias com diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. A estatística foi realizada de acordo com o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação.

5. DISCUSSÃO

As bactérias probióticas ruminais apresentaram importantes e inéditas características relacionadas à promoção de crescimento de plantas como síntese de sideróforos, ácido indol acético, fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo (Tabela 4).

Os isolados *Lactobacillus acidophilus* e *Succinovibrio dextrinosolvens* foram positivos para o teste de produção de sideróros. A literatura é carente de estudos em relação a produção dessa molécula por parte desses micro-organismos. Algumas bactérias liberam esse composto no meio para obtenção do ferro, assim, se a planta tiver associada a ela um organismo capaz de excretar sideróforo, vai haver obtenção do ferro, que poderá ser transportado para a planta.

Lemos et al., (2010) obteve valores para produção de ácido indolacético em estirpes do gênero *Azospirillum* valores que foram de 1,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA; Para os isolados testados nesse trabalho, foi encontrado valores de 6,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 10,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA. Inúmeras variações são comumente constatadas na literatura para a detecção de compostos indólicos produzidos por bactérias, entre eles, AIA (Balota et al., 1995).

Existe uma parcela importante da comunidade microbiana que possui habilidades de mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos, fixar nitrogênio, tornando esses nutrientes assimilável pelas plantas. Com os valores dos resultados de solubilização de fósforo dos testes in vitro dos micro-organismos estudados é possível que estes façam parte dessa comunidade.

Por isso, essas bactérias foram avaliadas nas culturas do milho e da soja para se verificar o potencial de cada uma quanto ao efeito de promoção de crescimento.

Bactérias probióticas são bactérias que em quantidades adequadas promovem qualquer benefício para o hospedeiro (Langella e Martín, 2019). Esses benefícios podem ser uma consequência do fornecimento de nutrientes e/ou a diminuição de patógenos que prejudicam o desenvolvimento do hospedeiro (Kleerebezem et al., 2019).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas geralmente são isoladas da rizosfera ou de dentro dos tecidos vegetais e possuem habilidades e promoção de crescimento (Calvo et al., 2019). Da mesma maneira que as bactérias probióticas promovem o desenvolvimento do hospedeiro as bactérias promotoras de crescimento de plantas também fornecem nutrientes e diminuem o efeito danoso dos fitopatógenos. De um certo modo, verifica-se que o modo de ação das bactérias probióticas e das bactérias promotoras de crescimento de plantas são muito semelhantes.

Em consequência dessas semelhanças as bactérias *B. cereus*, *L. acidophilus* e *S. dextrinosolvens* foram inoculadas nas plantas de milho e soja e alguns parâmetros de crescimento de plantas foram avaliados comparando-se com o tratamento controle.

Interessantemente, verificou-se que a bactéria *L. acidophilus* aumentou a massa seca de raiz e a concentração de fósforo nas raízes da planta de milho (Fig.A.1 e Fig. A.2). O *L. acidophilus* também aumentou matéria seca de raiz e a concentração de nitrogênio e fósforo nas raízes das plantas de soja (Fig. A.5, Fig. A.6 e Fig. A.7). Provavelmente esses efeitos promovidos pelo *L. acidophilus* foram devido a capacidade da bactéria em sintetizar fitohormônios que em determinadas quantidades podem estimular ou inibir o desenvolvimento radicular das plantas e como consequência disso, aumentar a concentração de determinados nutrientes na planta (Barnawal et al., 2019).

O incremento da concentração de fósforo nas raízes de milho e de fósforo e nitrogênio nas raízes de soja é um aspecto muito interessante promovido pela interação planta micro-organismos, no qual, a eficiência nutricional da planta é aumentada. Os nutrientes como o fósforo e nitrogênio são essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Stewart et al., 2019) (Klamer et al., 2019), e quando a associação com um micro-organismo permite sua absorção de forma mais eficiente, esse microrganismo possui um grande potencial para ser utilizado em um sistema de produção agrícola mais sustentável (Syed e Tollamadugu, 2019) permitindo uma redução do custo de produção e menor impacto ambiental (Baron et al., 2018).

A bactéria *S. dextrinosolvens* aumentou a concentração de nitrogênio nas raízes (Fig. A.6) e no solo (Fig. A.8), a concentração de fósforo (Fig. B.7) e a concentração de carbono da biomassa (Fig.15). Esses resultados são muito

interessantes do ponto de vista de nutrição de plantas e mostram que bactérias probióticas ruminais possuem um potencial para serem utilizadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas. Existe uma correlação positiva entre status nutricional de plantas, microbioma e produtividade (Pii et al., 2016). Nesse sentido a ação das bactérias como a *S. dextrinosolvens* e o *L. acidophilus* podem ser muito positivas para a produção vegetal.

A interação bactéria e plantas dependem de vários fatores como a espécie vegetal, tipo de solo, condições climáticas e as características que são intrínsecas aos microrganismos utilizados (Bulgarelli et al. 2013). As bactérias *L. acidophilus* e *S. dextrinosolvens* mostraram uma certa afinidade com as espécies de plantas testadas promovendo incrementos de desenvolvimento vegetal, nutricionais e de fertilidade de solo. Nesse sentido, mais estudos são necessários para se verificar as melhores condições de utilização dessas bactérias como dose, modo de aplicação e espécie vegetal para se utilizar as bactérias testadas com o objetivo de se otimizar os incrementos promovidos pelos microrganismos.

6. CONCLUSÃO

Esse é o primeiro relato da utilização de bactérias probióticas ruminais avaliadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas onde as bactérias se mostraram com grande potencial para essa utilização.

A bactéria *L. acidophilus* aumentou matéria seca vegetal nas plantas de soja e milho e a bactéria *S. dextrinosolvens* promoveu incrementos no status nutricional das plantas de soja e solo, desta forma, no futuro essas bactérias probióticas ruminais poderiam ser utilizadas na produção agrícola como inoculantes permitindo uma redução dos níveis de fertilizantes minerais e contribuindo para uma produção mais sustentável.

8. REFERÊNCIAS

Andrade, C. L.T., Brito, R.A.L., 2006. Cultivo do milho, Sistemas de Produção 1. versão eletrônica, 2ª edição.

Ângulo, V.C., Sanfuentes, E., Rodríguez, F., Sossa, K.E 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de Microbiología 46, 338–347.

Araújo, C.,2013. Microbiologia do Rúmen. Disponível em:< <https://www.ebah.com.br/content/ABAAAfsmAAJ/microbiologia-rumen>>. Acesso em fevereiro de 2019.

Araújo, F. F., 2008. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. Ciênc. agrotec.32, 456-462.

Araújo, F.F., Guerreiro R.T., 2010. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. Ciência e Agrotecnologia 34, 837–844.

Arcuri, P. B. MATOS, L. L., 1992. Microbiologia do Rúmen. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, MG.16, 5-8.

Barbosa, J.C., Maldonado JR., W., 2010. AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Versão 1.0. Jaboticabal: Departamento de Ciências Exatas.

Baron, N. C., Costa, N. T. A., Mochi, D. A., & Rigobelo, E. C., 2018. First report of *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus brasiliensis* as phosphorus solubilizers in maize. Annals of Microbiology. 68, 863-870.

Barnawal, D., Singh, R., & Singh, R. P., 2019. Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes. In PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. Woodhead Publishing. 107-128.

Batista, B.D.,2012. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). 129 f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura —Luiz de Queiroz.

Bhattacharyya, P.N, Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1327–1350

Bezerra, N. E., Barreto L.P., 2011. Análises Químicas e Bioquímicas em Plantas. Recife. Editora Universitária da UFRPE.261.

Bremner, J.M., 1996. Nitrogen-total, in: *Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods*. 1085–1121.

Brian, C. L., D. H, and Aaron M. Lynne* *Department of Biological Sciences, Sam Houston State University, Huntsville, TX 77341.*

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P., 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 807-838.

Calvo, P., Zebelo, S., McNear, D., Kloepper, J., & Fadamiro, H.,2019. Plant growth-promoting rhizobacteria induce changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression of nitrate and ammonium uptake genes. *Journal of Plant Interactions.* 14, 224-231.

Chien, S. H., Prochnow, L. I., Tu, S. e Snyder, C. S., 2011. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 89, 229-255.

Conab., 2019. Acompanhamento Da Safra Brasileira Grãos, Monitoramento agrícola- Safra 2018/19 v 6. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>. Acesso em fevereiro 2019.

Cruz J.C, Karam. D., Monteiro M.A.R.,Magalhães P.C., 2008 A cultura do milho, ed. Sete Lagoas, MG. EMBRAPA. 517

Dehority, B. A. 1987. Rúmen microbiology. Wooster: ohio state university. 239.

Dechen, A. R., Ribeiro, G., 2007. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, Roberto Ferreira et al. Fertilidade do Solo. Viçosa, MG; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

Drogue, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? Research Microbiology 163, 500–510.

Feema, R.J., 1983.Nitrogênio Kjeldahl total (micro Kjeldahl). Manual do Meio Ambiente Volume II – Métodos 421.45

Fiesch, A.G., Poziomyck, K.A.,2014. The therapeutic use of symbiotics. ABCD Arq Bras Cir Dig, Porto Alegre. 206- 209.

Galvão, J. C. C., Miranda, G. V., Trogello, E. e Fritsche.N. R.,2014. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. Revista Ceres, 61, 819-828.

Glick B.R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**. 1–15.

Haag H.P, Sarruge J.R., Oliveira G.D., Dechen, A.R., 1975. Nutrição mineral do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*): I-deficiência dos macronutrientes-nota prévia. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz .32, 185–190.

Hungate, R.E.,1966. The Rumen And Its Microbs. New York: Academic Press. 533.

Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., Pedrosa, F. O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-425.

Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, L.C., 2007. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrado.

Klamer, F., Vogel, F., Li, X., Bremer, H., Neumann, G., Neuhäuser, B., Ludewig, U., 2019. Estimating the importance of maize root hairs in low phosphorus conditions and under drought. *Annals of botany*.

Kleerebezem, M., Binda, S., Bron, P. A., Gross, G., Hill, C., van Hylckama Vlieg, J. E., & Ouwehand, A. C., 2019. Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. *Current opinion in biotechnology*, 56, 55-60.

Koneman, E.W., 2001. Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido, Rio de Janeiro: Medsi, 5, 1660.

Kuss, A.V et al., 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 42, 1459- 1465.

Langella, P., Martín, R., 2019 Emerging health concepts in the probiotics field: streamlining the definitions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1047.

Magalhães, P.C., Durães, F.O.M., 2006. Fisiologia da produção de milho. *Embrapa milho e sorgo*. 8 – 10.

Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A., 1989. Solubilização de P e avaliação do estado nutricional de plantas. princípios e aplicação, Piracicaba. Potafos. 208.

Marco, M.L., Pavan S., Kleerebezem, M.,2004. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol.*17, 204-210.

Mendes, R.A., 2004. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. *Rev Nutr, Campinas.* 17, 255-261.

Moreira, F. M. S., Huising, E. J., Bignell, D. E., 2010. Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: UFLA. 368.

Mulvaney R.L., 1996. Nitrogen—inorganic forms, in: *Methods of Soil Analysis Part 3 Chemical Methods.* 1123–1184.

Murray, J.D., 2010. Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 631–639.

Rabinovitch, L.O., 2016. *Bacillus* e o *Bacillus cereus* com suas facetas como bactérias esporuladas gram-positivas. *Rev Ciências Farmacêuticas, Oswaldo Cruz.* 08-10.

Raij B.V. Cantarella. H., 1997 Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo, in: *Boletim Técnico* 100. Campinas. 56–59.

Ramachandra, M.; Crawford, D.L.; Pometto, A. L., 1987. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* sp. a comparative study of wild- type and genetically manipulated strains. *Applied and Environmental Microbiology.* 53, 2754- 2760.

Rodrigues, N. J., Malavolta, J. V. A., 1986. O Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica.*12, 16.

Russel, J.B.,1988. Ecology of rumen microorganisms: energy use. In: DOBSON, A. DOBSON, M. Aspect of digestive physiology in ruminants. Ithaca: Comstock Publ. Assoc. 74 -98.

Soest, P.J., 1982. Nutritional ecology of the ruminant. Corvallis: O e B Books.374

Stewart, S. D., Young, M. B., Harding, J. S., & Horton, T. W., 2019. Invasive nitrogen-fixing plant amplifies terrestrial–aquatic nutrient flow and alters ecosystem function. *Ecosystems*. 22, 587-601.

Syed, S., & Tollamadugu, N. P., 2019. Role of Plant Growth-Promoting Microorganisms as a Tool for Environmental Sustainability. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. 209-222.

Teixeira, J. C., 1991. Nutrição dos Ruminante, Lavras, MG: ESAL/ FAEPE.

Verneti, F. J., 1983. Origem da espécie, introdução e disseminação no Brasil. In: Fundação Cargill. Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras. Campinas. 3-123.

Watanabe, F., Olsen S.R., 1965. Test of an ascorbic acid method for determening P in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Science Society of America Proceedings*. 29, 677–678.

Pii, Y., Borruso, L., Brusetti, L., Crecchio, C., Cesco, S., & Mimmo, T., 2016. The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome. *Plant Physiology and Biochemistry*. 99, 39-48.