

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO RÚMEN NA PROMOÇÃO
DO CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA**

Lívia de Paula Silveira Mello

Bacharel em Biotecnologia

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO RÚMEN NA PROMOÇÃO
DO CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA**

Lívia de Paula Silveira Mello

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

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

2019

M527b	Mello, Livia de Paula Silveira Bactérias probióticas do rúmen na promoção do crescimento de milho e soja / Livia de Paula Silveira Mello. -- Jaboticabal, 2019 50 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Everlon Cid Rigobelo 1. BPCP. 2. Bioinoculante. 3. Rúmen. 4. Probiótico. 5. Agricultura. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

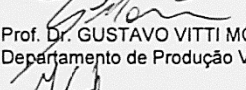
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO RÚMEN NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA

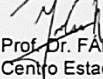
AUTORA: LÍVIA DE PAULA SILVEIRA MELLO

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. GUSTAVO VITTI MÔRO
Departamento de Produção Vegetal (Fitotecnia) / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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

Jaboticabal, 28 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lívia de Paula Silveira Mello – nascida em 19 de agosto de 1990, na cidade de Aguaí/SP. Filha de Eliane de Paula Silveira Mello e Antônio Celso de Mello, irmã de Thaís de Paula Silveira Mello. No ano de 2013 se graduou como bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG). Obteve experiência profissional trabalhando entre os anos de 2015 e 2016 em uma fábrica de alimentos na cidade de Rio Claro, onde exercia papel de Auditora de Processos, sendo posteriormente promovida à Analista de Microbiologia. Em 2017 concluiu seu MBA em Engenharia e Inovação pela Universidade Estácio de Sá e iniciou o mestrado em Microbiologia Agropecuária pelo programa de pós-graduação da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Jaboticabal (Unesp/FCAV).

EPIÍGRAFE

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino (O Encontro Marcado)

DEDICO

Essa conquista é dedicada à Deus e à minha família.

Meus amados pais, exemplos de força e determinação, base da minha vida, em quem me espelho todos os dias e pelos quais busco ser melhor. À minha irmã, amiga e companheira de todos os momentos. Obrigada por tanto, pelo apoio e dedicação, por acreditarem em mim.

Amo vocês.

“Viva a família!”

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Everlon Cid Rigobelo pelo aceite no grupo de pesquisa, acreditando no meu trabalho. Por sempre incentivar a mim e a todos do grupo, prezando pelo bom ambiente de trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora pelo seu tempo e contribuição.

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

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 por toda a ajuda, paciência e apoio na realização das pesquisas. Também por todos os momentos compartilhados e por fazerem o ambiente de trabalho leve e agradável.

À minha família, sempre, uma gratidão eterna.

À Juliana, essencial, pelo companheirismo, dedicação e apoio incondicionais. Por caminhar junto, dividindo felicidades e dificuldades, pela paciência.

Ao Diego, melhor-amigo-irmão, pela motivação diária, por sempre acreditar no meu potencial e me estimular a ser melhor.

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

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cultura do Milho	3
2.1.1. Importância Comercial do Milho	4
2.2. Soja.....	4
2.2.1. Importância Comercial da Soja.....	5
2.3. Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas.....	6
2.3.1. Fatores de promoção de crescimento	7
2.3.1.1. Fixação biológica do nitrogênio.....	7
2.3.1.2. Solubilização de fósforo	8
2.3.1.3. Produção de fito-hormônios	9
2.3.1.4. Produção de sideróforos	9
2.4. Bactérias probióticas do rúmen.....	10
2.4.1. Ruminobacter amylophilus	11
2.4.2. Fibrobacter succinogenes	12
2.4.3. Enterococcus faecium	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Localização do experimento.....	13
3.2. Preparação do solo e plantio.....	13
3.3. Isolados bacterianos e Inoculação	14
3.4. Delineamento experimental.....	15
3.5. Análises dos isolados.....	15
3.5.1. Produção de AIA	15
3.5.2. Fixação de nitrogênio em tubo de ensaio.....	17
3.5.3. Solubilização de fósforo em tubo de ensaio	17
3.5.4. Detecção de Sideróforos	17

3.6. Avaliações na planta	18
3.6.1. Altura e massa seca	18
3.6.2. Teores de fosforo e nitrogenio na planta	19
3.7. Avaliações no solo	19
3.7.1. Contagem de microrganismos em solo	19
3.7.2. Carbono da Biomassa Microbiana.....	20
3.8. Análises dos dados	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Isolados microbianos	21
4.2. Milho	21
4.3. Soja.....	24
4.3.1. Soja Campo.....	26
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO.....	30
REFERENCIAS.....	31

BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO RÚMEN NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA

RESUMO - As bactérias probióticas ruminais possuem características de atuação semelhantes às bactérias promotoras de crescimento de plantas, as quais têm sido introduzidas como inoculantes biológicos. Essa tecnologia tem se mostrado uma das mais eficientes em complementar e diminuir o uso de fertilizantes minerais, sendo utilizadas para a promoção do desenvolvimento vegetal. O presente estudo verificou que os isolados bacterianos *Ruminobacter amylophilus*, *Fibrobacter succinogenes* e *Enterococcus faecium*, possuem habilidades quanto à fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fósforo, a produção de fito-hormônio e composto sideróforo ao serem testados em laboratório. O experimento foi realizado em casa de vegetação para as culturas de milho e soja, e em campo para a cultura da soja. Os parâmetros da planta analisados foram de massa seca da parte aérea e raiz, concentração de fósforo e nitrogênio. Para solo, foi feita a contagem total de microrganismos presentes, assim como carbono da biomassa. Em condições de casa de vegetação, as plantas de milho inoculadas com *F. succinogenes* apresentaram aumento de massa seca de raiz, enquanto que as inoculadas com *R. amylophilus* e *E. faecium* apresentaram menor concentração de fósforo na parte aérea de milho. Verificou-se também o aumento de carbono da biomassa do solo sob aplicação de *R. amylophilus* no plantio de milho, indicando o estabelecimento da bactéria no ambiente. Para o campo, os resultados se mostram pouco eficientes. Mais estudos são necessários para se identificar quais cultivares e espécies agrícolas aumentariam o efeito positivo da interação entre as plantas e essas espécies bacterianas relacionados à promoção de crescimento vegetal, uma vez que, o presente estudo mostrou algumas potencialidades da inoculação que ainda podem ser melhoradas.

Palavras-chave: BPCP; Bactérias ruminais; Biofertilizantes; Inoculantes; Produção Agrícola.

RUMINAL PROBIOTIC BACTERIA IN THE GROWTH PROMOTION OF MAIZE AND SOYBEAN PLANTS

ABSTRACT – Ruminal probiotic bacteria have similar performance characteristics to plant growth promoting bacteria, which have been introduced as biological inoculants. This technology has been shown to be one of the most efficient in complementing and reducing the use of mineral fertilizers, being used to promote plant development. The present study verified that the bacterial isolates *Ruminobacter amylophilus*, *Fibrobacter succinogenes* and *Enterococcus faecium*, have abilities regarding biological nitrogen fixation, phosphorus solubilization, phytohormonium production and siderophore compound when tested in the laboratory. The experiment was carried out under greenhouse conditions for corn and soybean crops and in field for soybean crops. Plant parameters analyzed were shoot and root dry mass, phosphorus and nitrogen concentration. For soil, the total count of microorganisms present was made, as well as carbon of the biomass. Under greenhouse conditions, corn plants inoculated with *F. succinogenes* showed increased root dry mass, while those inoculated with *R. amylophilus* and *E. faecium* showed lower phosphorus concentration in the corn shoot. It was also verified the carbon increase of the soil biomass under *R. amylophilus* application in the corn planting, indicating the establishment of the bacteria in the environment. For the field, the results are inefficient. Further studies are needed to identify which cultivars and agricultural species would increase the positive effect of plant-to-plant bacterial interaction related to plant growth promotion, as the present study showed some potential for inoculation that could be further improved.

Keywords: PGPB; Ruminal bacteria; Biofertilizers; Inoculants; Agricultural production.

LISTA DE TABELAS**Página**

Tabela 1. Análise química do solo	14
Tabela 2. Quantidade de AIA, solubilização de fósforo e fixação de nitrogênio produzida pelos isolados.	21

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Gráfico da curva padrão encontrado para as leituras das diferentes concentrações de AIA, após leitura em espectrofotômetro.	16
Figura 2. Comparação entre as alturas dos tratamentos analisados.....	22
Figura 3. Parâmetro massa seca da parte aérea (A) e raiz (B) comparado entre os tratamentos testados.....	22
Figura 4. Concentração de nitrogênio na parte aérea (A) e na raiz (B) e concentração de fósforo na parte aérea (C) e na raiz(D).	23
Figura 5. Análises de (A) Carbono da Biomassa e (B) Contagem de unidades formadores de colônias comparadas entre os tratamentos testados.	23
Figura 6. Parâmetro Altura da planta comparado entre os tratamentos testados.....	24
Figura 7. Média das massas seca parte aérea (A) e raiz (B) comparado entre os tratamentos testados nas plantas de soja.	24
Figura 8. Média das concentrações de nitrogênio na parte aérea (B) e na raiz (B) e médias das concentrações de fósforo na Parte Aérea (C).	25
Figura 9. Análises de Carbono da Biomassa (A) e Contagem de unidades formadores de colônias (B) comparadas entre os tratamentos testados.	26
Figura 10. Média dos valores de massa seca (A), fósforo da parte aérea (B), nitrogênio da parte aérea (C) e carbono da biomassa (D) para a soja do campo.....	27

1. INTRODUÇÃO

A introdução de microrganismos como inoculantes biológicos tem se mostrado uma tecnologia eficiente na complementação e diminuição do uso de fertilizantes minerais na agricultura (Ramakrishna; Yadav; Li, 2019). As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) afetam diretamente o metabolismo das plantas, fornecendo nutrientes que geralmente são escassos. Essas bactérias são capazes de fixar o nitrogênio, solubilizar o fósforo e de produzir hormônios vegetais. Além disso, melhoram a tolerância das plantas aos estresses, como a seca, alta salinidade, toxicidade do metal e aplicação de defensivos (Matthews et al., 2019).

Dentre os fitohormônios, as auxinas são as substâncias predominantes e mais encontrada nas plantas, o ácido indol acético (AIA), cujo principal efeito é a promoção de desenvolvimento radicular e de parte aérea vegetal, também pode ser produzido por alguns microrganismos (Ye et al., 2019).

A fixação do nitrogênio aparece como principal benefício direto da atuação das BPCP. O nitrogênio é o principal elemento exigido pelas plantas que, embora esteja na atmosfera de maneira abundante, sua assimilação depende da conversão para a forma amônia realizada por microrganismos através da fixação biológica do nitrogênio (Ke et al., 2019). Outro benefício direto desses microrganismos é a solubilização de fósforo que está relacionada ao armazenamento e transferência de energia na planta, na forma de ATP. Apesar de o solo apresentar reservas de fósforo, a maior parte dele está na forma insolúvel e não assimilável não podendo assim ser absorvido pelas plantas, limitando seu crescimento (Schmidt; Gaudin, 2018).

Algumas bactérias possuem a habilidade de síntese de sideróforos que são compostos de baixo peso molecular com alta afinidade a ferro. Sendo um co-fator essencial em quase 140 enzimas, o ferro catalisa reações bioquímicas e processos de sínteses enzimáticas. Ele é um elemento escasso no solo e essencial para o crescimento microbiano e os isolados que apresentam sideróforos são mais adaptados a se desenvolverem nesse ambiente e a eliminar patógenos de solo através da competição por ferro (Melo et al., 2016).

Assim como as BPCP, existem os probióticos que também são microrganismos que em quantidades adequadas promovem benefícios ao hospedeiro (Martín; Langella, 2019).

As bactérias *Ruminobacter amylophilus*, *Fibrobacter succinogenes* e *Enterococcus faecium* são bactérias probióticas do trato ruminal. Os ruminantes dependem de uma simbiose entre o hospedeiro e a microbiota do rúmen para a absorção dos nutrientes provenientes da alimentação (Anderson, 1995; Pinloche et al., 2013).

A *Ruminobacter amylophilus* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica, que foi isolada e descrita por Hamlin e Hungate em 1956 (Hamlin; Hungate, 1956). Ela fermenta carboidratos não estruturais (amido, pectina, açúcares), e utiliza tanto amônia como peptídeos e aminoácidos como fonte de N e pode produzir amônia (Russell et al., 1992). Hungate também isolou pela primeira vez a bactéria ruminal *Fibrobacter succinogenes* em 1950 (Hungate, 1950). Ela é também Gram-negativa, anaeróbica, e desempenha papel fundamental no rúmen (Béra-Maillet et al., 2004). É uma bactéria fermentadora de carboidratos estruturais, como a celulose (Oliveira et al., 2007). A bactéria *Enterococcus faecium* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota comensal do intestino do homem e dos animais. São anaeróbicas facultativas, fermentam glucose e outros carboidratos obtendo como produto final ácido láctico (Carvalho, 2010). *E. faecium* especificamente tem um fenótipo proeminente de tolerância ao estresse nutricional, apontando para adaptações específicas nesta espécie que ajudam a explicar sua persistência ambiental (Gao et al., 1986).

Na literatura existem poucos relatos a respeito da aplicação dessas bactérias como efeito probióticos em animais e nenhum estudo sobre a utilização dessas bactérias como promotoras de crescimento de plantas. Em estudos laboratoriais preliminares, foi verificado que essas bactérias possuem habilidades de promoção de crescimento de plantas e por isso o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da inoculação dessas bactérias nas culturas da soja e do milho relacionados quanto à promoção de crescimento vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do Milho

O milho (*Zea mays*) é uma monocotiledônea, sendo uma das culturas economicamente mais significativas do mundo, possui excepcional diversidade fenotípica e molecular. Além disso, dada a sua disseminação no plantio em monocultura, o milho pode ser visto como um ecossistema fortemente responsável por moldar o ambiente agrícola para espécies que coabitam, como os microrganismos (Peiffer et al., 2013).

A cultura do milho necessita que os índices dos fatores climáticos, principalmente a temperatura, a precipitação pluviométrica e o fotoperíodo, estejam em níveis considerados ótimos, para que o seu potencial genético de produção se expresse ao máximo. A temperatura ideal para o desenvolvimento do milho, da emergência à floração, é compreendida entre 24 e 30 °C. O milho é uma cultura muito exigente em água, entretanto, pode ser cultivado em regiões onde as precipitações vão desde 250 mm até 5000 mm anuais, sendo que a quantidade de água consumida pela planta, durante seu ciclo está em torno de 600 mm (Cruz et al., 2010).

A radiação solar é um dos parâmetros de extrema importância para a planta de milho, sem a qual o processo fotossintético é inibido e a planta é impedida de expressar o seu máximo potencial produtivo. Grande parte da matéria seca do milho, cerca de 90%, provém da fixação de CO₂ pelo processo fotossintético. O milho é uma planta do grupo C₄, altamente eficiente na utilização da luz. Uma redução de 30% a 40% da intensidade luminosa, por períodos longos, atrasa a maturação dos grãos ou pode ocasionar queda na produção (Cruz et al., 2010).

A cultura do milho é dividida em duas grandes fases: vegetativa (V) e reprodutiva (R). As subdivisões dos estádios vegetativos são designadas numericamente até V_n, onde n representa o último estágio vegetativo anterior ao pendoamento. Cada estágio vegetativo é definido de acordo com a última folha completamente expandida ou fora do cartucho. As fases reprodutivas iniciam-se no pendoamento e vão até a maturação fisiológica, estágio onde os grãos apresentam a camada preta na inserção entre o grão e o sabugo. A camada é um conjunto de células

mortas que impedem a entrada de nutrientes para dentro dos grãos e marca a fase de perda de água. O estágio de crescimento de uma lavoura é definido quando, no mínimo, 50% das plantas estiverem no mesmo estágio (Fancelli, 2015).

2.1.1. Importância Comercial do Milho

Uma das culturas mais importantes mundialmente, o milho, tanto do ponto de vista econômico quanto social, destaca-se por ser o grão mais produzido no mundo (Sologuren, 2015).

A utilização do milho é bastante ampla, sendo empregado como alimento, assim como no uso industrial e energético; seu destino é, principalmente, a produção de rações para uso animal. No entanto, a abrangência de destinos industriais do milho é também muito diversa. Pode ser utilizado na produção de alimentos básicos, como fubás, farinhas, canjicas e óleos, como também em produtos mais elaborados, como xarope de glucose (utilizado na produção de balas, gomas de mascar, doces em pasta etc.), maltodextrinas (produção de aromas e essências, sopas desidratadas, produtos achocolatados e outros) e corantes caramelo (produção de refrigerantes, cervejas, molhos etc.) (Sologuren, 2015).

Seu uso vai além do setor alimentício como, por exemplo, os amidos industriais, que podem ser utilizados na produção de papelão ondulado, adesivos e fitas gomadas. O etanol produzido a partir do milho também tem significativa importância global: nos Estados Unidos, é a principal fonte de bioenergia do país (Sologuren, 2015).

O terceiro levantamento do USDA em julho/2019 para a produção global do milho mostrou EUA, China e Brasil como os grandes produtores mundiais do grão, sendo EUA e Brasil os maiores exportadores atualmente (Fiesp, 2019a).

2.2. Soja

A soja (*Glycine max L.*) faz parte da família Fabaceae e possui origem asiática. É uma dicotiledônea cuja estrutura é formada pelo conjunto de raízes e parte aérea,

sendo seu desenvolvimento dividido em dois períodos, o estágio vegetativo (V) e o estágio reprodutivo (R), assim como no milho (Mundstock; Thomas, 2005).

O estágio vegetativo (V) se inicia desde a semeadura até o florescimento. Durante o período de germinação, a semente de soja necessita absorver água no volume correspondente a 50% de seu peso para iniciar o processo de germinação. Geralmente a emergência ocorre de 7 a 10 dias após a semeadura, podendo variar dependendo do vigor da semente, profundidade de semeadura, umidade, textura e temperatura do solo. A fase reprodutiva da soja, compreende o florescimento, desenvolvimento dos legumes, enchimento de grãos e maturação (Mundstock; Thomas, 2005).

A água constitui aproximadamente 90% do peso da planta e atua praticamente em todos os processos fisiológicos e bioquímicos, sendo de grande importância principalmente em dois períodos de desenvolvimento da soja: a fase de germinação/emergência e floração/enchimento de grãos (Embrapa, 2013; Farias et al., 2007).

As condições ótimas de temperatura para a cultura da soja estão entre 20 °C e 30 °C. Ela apresenta também alta sensibilidade ao fotoperíodo (comprimento do dia), variável com a cultivar (Embrapa, 2013, Farias et al., 2007).

2.2.1. Importância Comercial da Soja

Com uma composição quase completa, a soja é caracterizada como fonte de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, ácidos graxos saturados e insaturados e fitoquímicos importantes em diferentes atividades metabólicas como as isoflavonas, além de ser uma boa fonte de minerais como ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre, fósforo, manganês e vitaminas do complexo B e fornecer diferentes nutrientes ao organismo. É ainda considerada um alimento funcional, pois apresenta diversos benefícios para a saúde, auxiliando na redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas (Penha et al, 2012).

Atualmente ela está entre as mais importantes culturas na economia mundial, seus grãos são muito usados pela agroindústria, indústria química, de alimentos e como fonte alternativa de biocombustível (Freitas, 2011).

A constante expansão da cultura da soja no país está diretamente ligada às pesquisas científicas e aos avanços das tecnologias ao setor produtivo. Alguns fatores favorecem essa expansão, como a criação de cultivares com maior produtividade, o desenvolvimento tecnológico relacionado ao manejo de solos e adubação, o combate de pragas e doenças, e principalmente a identificação e solução para os principais fatores responsáveis pela diminuição de produtividade nos processos de plantio, colheita e estocagem (Freitas, 2011).

O terceiro levantamento do USDA em julho/2019 para a produção global da soja mostrou Brasil, EUA e Argentina como os grandes produtores mundiais do grão, sendo Brasil e EUA os maiores exportadores atualmente (Fiesp, 2019).

2.3. Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas

As plantas obtêm a maior parte de seus nutrientes a partir do solo, principalmente na forma de íons inorgânicos que, após terem sido absorvidos pelas raízes, com ou sem a participação de outros organismos como fungos e bactérias, são translocados para diversas partes da planta para cumprirem suas funções biológicas (Taiz, L.; Zeiger, 2009). O solo brasileiro, entretanto, não possui altas taxas de fertilidade natural, tornando o país o quarto consumidor de fertilizantes do mundo (Deagro, 2016).

A introdução de microrganismos na forma de inoculantes biológicos pode ser bastante vantajosa para o setor agrícola, sendo uma das tecnologias mais eficientes em substituir métodos convencionais de adubação com fertilizantes minerais, sendo utilizado principalmente em culturas de leguminosas (Silveira, 2008).

Alguns estudos mostram que utilização de microrganismos tais como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum* podem ser uma alternativa para a diminuição de fertilizantes minerais sem a redução da produtividade (Choudhury; Kennedy, 2005).

Bactérias em habitats naturais colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem

ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (Mariano; et al., 2004).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas possuem várias habilidades, afetando diretamente o metabolismo das plantas, fornecendo nutrientes que geralmente são escassos. Essas bactérias são capazes de fixar o nitrogênio, solubilizar o fósforo e de produzir hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas, citoquininas e etileno. Além disso, elas melhoram a tolerância das plantas aos estresses, como a seca, alta salinidade, toxicidade do metal e carga de inseticidas. Microrganismos promotores de crescimento de plantas (PGPB), promovem indiretamente o crescimento das plantas, evitando os efeitos deletérios dos microrganismos fitopatogênicos (bactérias, fungos e vírus) (Bashan; De-Bashan, 2005).

2.3.1. Fatores de promoção de crescimento

2.3.1.1. Fixação biológica do nitrogênio

O primeiro relato de que bactérias são responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio em vegetais, foi realizado por Beijerinck (1988). No Brasil estes organismos vêm sendo estudados desde 1956 por Boddey e Dobereiner com a finalidade incrementar produtividade às culturas de interesse agrícola e foi na década de 80 que ficou comprovado os efeitos benéficos relacionados à disponibilização de nitrogênio em espécies de plantas não leguminosas, mostrando que estas também se associam a estes microrganismos. (Dobereiner et al., 1996; Beijerinck, 1988)

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 como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, podem estabelecer simbioses formando nódulos nas raízes de plantas leguminosas, como soja, ervilha, amendoim e alfafa, nas quais

convertem N_2 em amônia, que pode ser usada pela planta como nitrogênio (Murray, 2011).

Bactérias não simbióticas foram identificadas como fixadores de N_2 de vida livre (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*). Estas BPCP em potencial, podem fertilizar vários cultivos importantes (Boddey; Dobereiner, 1995; Silva et al., 2016). Nas plantas não leguminosas a associação e realização da FBN por várias bactérias diazotróficas, em simbiose endofítica, foi estudada e descrita por Dobereiner (1996). O estabelecimento da simbiose envolve interação complexa entre hospedeiro e simbiote, o mesmo pode ocorrer com os endofíticos, pois estes têm uma associação íntima com a planta e encontram condições favoráveis, uma vez que, colonizam o interior das plantas, para a fixação eficaz de N_2 e o fornecimento de nitrogênio fixado para as células vegetais (Bourassa et al., 2017; Dobereiner et al., 1996).

2.3.1.2. Solubilização de fósforo

O fósforo é um nutriente essencial para a planta, sendo indispensável para o crescimento e produção vegetal. Tem papel importante em processos como a fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, divisão celular, além de contribuir para o crescimento das raízes, qualidade dos frutos, grãos e formação das sementes (Khan et al., 2007).

Os níveis de P total encontrado na maioria dos solos pode ser alto, entretanto, as formas disponíveis para as plantas são baixas, porque a maioria do P no solo se encontra em formas insolúveis, enquanto as plantas absorvem apenas duas formas os ânions $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} (Bhattacharyya; Jha, 2012).

Os organismos 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).

O principal mecanismo de solubilização de fosfato inorgânico, como observado em muitos experimentos, é a produção de compostos de dissolução mineral, como

ácidos orgânicos, sideróforos, prótons, íons hidroxila e CO₂, reduzindo o pH para a liberação de P (Rodríguez; Fraga, 1999; Sharma et al., 2013).

O processo biológico de mineralização do P orgânico desempenha um papel importante no ciclo de fósforo. Estudos relataram o isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato de solos, entre elas, endofíticos capazes de aumentar a concentração de P no solo além de favorecer o aumento da diversidade microbiana naquele ambiente (Chen et al., 2014).

2.3.1.3. Produção de fito-hormônios

A fitoestimulação por microrganismos, ou regulação do crescimento vegetal, mostra que algumas bactérias podem ser responsáveis pela síntese de fito-hormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, estimulando o crescimento das plantas. Por exemplo, a auxina *ácido indol-3-acético* (AIA) aumenta a biomassa do sistema radicular e, portanto, melhora a absorção de nutrientes (Drogue, 2012).

O hormônio vegetal AIA interfere nos processos fisiológicos das plantas e afeta a divisão, extensão e diferenciação de células vegetais; estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta a taxa de desenvolvimento do xilema e da raiz; o aumento da área e comprimento da superfície da raiz proporciona à planta maior acesso aos nutrientes do solo, controla processos de crescimento vegetativo, além disso, pode influenciar na maior exsudação radicular que fornece nutrientes adicionais para apoiar o crescimento de bactérias da rizosfera (Glick, 2012).

Estudos têm demonstrado que diversos microrganismos, como o *Azospirillum sp.*, são capazes de sintetizar reguladores de crescimento vegetal in vitro. Sarwar e Kremer (1995) avaliaram 16 isolados da rizosfera de diferentes plantas e verificaram que os isolados associados à raiz das plantas eram mais eficientes na produção de auxinas do que os não associados às plantas (Kuss et al., 2007).

2.3.1.4. Produção de sideróforos

Os sideróforos bacterianos são compostos de baixo peso molecular com alta afinidade quelante ao Fe³⁺ (Sharma et al., 2003) responsáveis pela solubilização e

transporte desse elemento para as células bacterianas. Sendo um co-fator essencial em quase 140 enzimas, o ferro catalisa reações bioquímicas e processos de sínteses enzimáticas. Ele é um elemento escasso no solo e essencial para o crescimento microbiano, necessário em menor quantidade também às plantas (Melo et al., 2016).

Tem sido demonstrado que sideróforos podem, por si só, agir como ativadores eficientes de sistemas de resistência sistêmica induzida em plantas (Meziane et al., 2005). A habilidade dos sideróforos em atuar como supressores de patógenos depende da planta, do fitopatógeno a ser controlado, da composição do solo, das bactérias e da afinidade do sideróforo pelo ferro (Glick, 2012).

Este é um mecanismo de promoção do crescimento generalizado entre as bactérias, incluindo aquelas que são mais reconhecidas por outras atividades de estimulação do crescimento. A bactéria *Azospirillum brasilense*, por exemplo, diferenciada pela capacidade de fixar nitrogênio e produzir ácido indolacético (AIA), também é capaz de controlar o fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum* em morangueiro, produzindo sideróforos (Tortora, 2011).

2.4. Bactérias probióticas do rúmen

Assim como as bactérias promotoras de crescimento de plantas, existem os probióticos que também são microrganismos benéficos aos hospedeiros. O objetivo primário é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação, sendo amplamente conhecidos, principalmente os Lactobacilos e as Bifidobactérias no caso dos humanos Annuk et al. (2003) citam que dentre os aspectos funcionais dos probióticos incluem-se atividade antioxidante, produção de compostos antimicrobianos, capacidade de reduzir patógenos aderidos na superfície, habilidade de modulação da resposta imune e adesão no tecido intestinal. Dentre os aspectos tecnológicos importantes estão à capacidade de espécies probióticas de resistir as condições de produção industrial e sobreviver na formulação final do produto, além da habilidade das culturas em conservar sua função no trato gastrintestinal e coexistir com a microbiota própria do hospedeiro (Busanello et al., 2012).

Dada a importância da população microbiana na alimentação e conversão dos nutrientes em animais ruminantes, há estudos investigando a possibilidade de

manipular a fermentação do rúmen para aumentar a produtividade animal. Apesar do rúmen ser colonizado com procariotos, protozoários, fungos e Archaea metanogênica, a atenção é voltada à população bacteriana. Isso continua sendo um desafio, onde mais de 200 espécies bacterianas já foram isoladas, identificadas e seu metabolismo estudado em cultura pura, enquanto novos avanços na ecologia microbiana baseada em rRNA revelaram que ainda muitas espécies bacterianas habitam o rúmen (Pinloche et al., 2013).

A microflora ruminal também é responsável pela produção de outros produtos metabólicos, incluindo metano, dióxido de carbono e células microbianas, sendo que o último deles é digerido postruminalmente para suprir a maior parte dos requerimentos protéicos do hospedeiro (Suen et al., 2011).

As bactérias *Ruminobacter amylophilus*, *Fibrobacter succinogenes* e *Enterococcus faecium* são bactérias probióticas do trato ruminal encontrada em gado e ovelha. Os ruminantes dependem de uma simbiose entre o hospedeiro e a microbiota do rúmen, onde os microrganismos fornecem proteína, vitaminas e ácidos orgânicos de cadeia curta para o hospedeiro animal (Anderson, 1995; Pinloche et al., 2013).

2.4.1 *Ruminobacter amylophilus*

A *Ruminobacter amylophilus* é Gram-negativa, anaeróbica, com habilidades de quebrar a celulose disponibilizando os nutrientes que fazem parte de sua composição. Ela foi isolada e descrita por Hamlin e Hungate em 1956 e taxonomicamente designada como *Bacteroides amylophilus*. Em 1987, Stackebrandt e Hippe (1986) constataram que essa bactéria está associada com a bactéria roxa, um filo eubacterial diversificado que inclui bactérias entéricas e pseudomonas, reclassificando-a (Hamlin et al., 1986).

Grande parte do desenvolvimento de acidose láctica (aguda, subaguda e crônica) em ruminantes tem sido associada ao aumento das populações de espécies de *Lactobacillus*, *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis*, após o aumento da disponibilidade de amido solúvel fermentável no rúmen (Plaizier et al., 2012). Elas fermentam carboidratos não estruturais (amido, pectina, açúcares), e utilizam tanto

amônia como peptídeos e aminoácidos como fonte de N e podem produzir amônia (Russell et al., 1992).

2.4.2. *Fibrobacter succinogenes*

Hungate isolou pela primeira vez a bactéria ruminal *Fibrobacter succinogenes* em 1950, que foi nomeada como *Bacteroides succinogenes*. Em 1988, Montgomery et al. propôs um novo gênero, *Fibrobacter*, criado para organismos previamente classificados como *Bacteroides succinogenes*, renomeando-a (Hungate, 1950; Montgomery et al., 1988).

A *F. succinogenes* também é Gram-negativa, anaeróbica, e desempenha um papel fundamental no rúmen degradando a celulose em produtos metabólicos que estão disponíveis para espécies não celulolíticas, como *Streptococcus bovis*, que demonstraram crescer em celulose na presença da bactéria (Béra-Maillet et al., 2004).

Algumas categorias têm uma escassez de proteínas, incluindo a motilidade celular (N, 1%); biossíntese de metabolitos secundários, transporte e catabolismo (Q, 2%); e mecanismos de defesa (V, 2%). As composições dessas categorias estão de acordo com o estilo de vida de *F. succinogenes*, pois não é ativamente móvel e parece ter poucas defesas contra antibióticos. Uma característica fundamental da análise de COG (conjunto de análises de grupos ortólogos) de *F. succinogenes* é o grande número de proteínas não identificáveis (Suen et al., 2011).

2.4.3. *Enterococcus faecium*

A *Enterococcus faecium* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota comensal do intestino do homem e dos animais. São anaeróbicas facultativas, fermentam glucose e outros carboidratos obtendo como produto final ácido láctico (Carvalho, 2010).

As bactérias do gênero *Enterococcus* foram co-evoluindo com seus hospedeiros por centenas de milhões de anos. A genômica comparativa dos *Enterococcus* estabeleceu uma provável trajetória evolutiva, mostrando que *E. faecalis* e *E. faecium* emergiram independentemente. *E. faecium* especificamente tem um fenótipo

proeminente de tolerância à fome, apontando para adaptações específicas nesta espécie que ajudam a explicar sua persistência ambiental (Gao et al., 1986).

Para o nosso conhecimento, ainda existem poucos relatos na literatura sobre tais bactérias, não existindo estudos que relacionem microrganismos do trato ruminal, que são probióticos, com a promoção de crescimentos em culturas agrícolas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Localização do experimento

O experimento em casa de vegetação foi desenvolvido de julho a agosto de 2018 (60 dias) para o milho e de novembro a dezembro de 2018 (30 dias) para a soja, na 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" SGr, 48° 17' 09" WGr e 615,01 m de altitude).

O experimento em campo, foi conduzido na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da Unesp na cidade de Jaboticabal, SP (21° 15' 04" SGr, 48° 17' 16" WGr e 576,64 m de altitude), cultivando-se soja entre os meses de novembro de 2018 à março de 2019.

Todas as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade, entre os anos de 2018 e 2019.

3.2. Preparação do solo e plantio

Para os dois experimentos, utilizou-se Latossolo vermelho eutrófico típico. Análises químicas foram realizadas prévias à semeadura, apresentando as características indicadas na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo

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

Para a casa de vegetação, vasos com capacidade de 3 litros foram preenchidos com o solo peneirado. A adubação foi realizada individualmente por vaso, de acordo com a análise de solo e as recomendações nutricionais (Malavolta, 1980).

Foram acrescentados nitrogênio (N: 1,3 g ureia), fósforo/cálcio/enxofre (3,3 g Super Simples), potássio (K: 0,66 g KCl) e magnésio (Mg: 0,2 g MgO). E uma solução de micronutrientes contendo zinco (Zn: 0,05 g ZnSO₄·7H₂O), boro (B: 0,0016 g H₃BO₃), cobre (Cu: 0,012 g CuSO₄), manganês (Mn: 0,03 g Mn(SO₄)) e molibdênio (Mb: 0,0005 g Na₂MoO₄·2H₂O) em cada vaso antes da semeadura.

A umidade foi mantida em torno de 70% da capacidade de campo com irrigações diárias. As temperaturas mínimas e máximas ficaram na média de 25 °C e 41 °C, respectivamente.

Quatro sementes de milho (2B587PW) e soja (95R95IPRO), cedidas pela fazenda da Unesp/FCAV, foram semeadas por vaso em cada experimento e, quinze dias após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por vaso.

Em campo, o sistema de plantio foi direto utilizando-se espaçamento de 0,45 m entre linhas e seis plantas por metro linear. Cada parcela experimental continha 6 m de comprimento por 3,6 m de largura. A coleta das amostras de solo e das plantas que foram utilizadas para análises foram feitas durante o pendoamento, em uma área útil de 9 m² dentro de cada parcela.

3.3. Isolados bacterianos e Inoculação

Foram utilizados três isolados liofilizados de bactérias, *Ruminobacter amylophilus*, *Fibrobacter succinogenes* e *Enterococcus faecium*, pertencentes ao acervo de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Solo da Unesp de Jaboticabal, sendo as três estirpes isoladas de ruminantes fistulados.

As bactérias utilizadas nos ensaios foram cultivadas em frascos erlenmeyers com caldo nutritivo a 28 °C durante 48 horas, sendo a concentração bacteriana de 10^8 UFC mL⁻¹.

No experimento em condições de casa de vegetação foram realizadas quatro inoculações. A primeira no sulco, no momento do plantio, atingindo diretamente as sementes, e as seguintes foram feitas na segunda, terceira e quarta semana após a semeadura, via solo com auxílio de uma proveta, adicionando 10 mL de cada inóculo na mesma concentração citada anteriormente em seus devidos tratamentos.

Para o campo, cada parcela recebeu a mistura de 240 mL de inóculo bacteriano e 1500 mL de água, facilitando a pulverização. As inoculações foram realizadas com auxílio de pulverizador costal, duas vezes, a partir de uma semana após a emergência, com espaçamento de uma semana entre uma e outra.

As inoculações foram realizadas na base e na parte aérea da planta. No controle foram utilizadas plantas sem nenhum tipo de inóculo

3.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental em casa de vegetação foi realizado em blocos casualizados, com cinco tratamentos e seis repetições, totalizando trinta vasos por experimento. O primeiro tratamento foi o controle sem inoculação, o segundo com a bactéria *Ruminobacter amylophilus*, o terceiro com a bactéria *Fibrobacter succinogenes*, o quarto com a bactéria *Enterococcus faecium* e o quinto tratamento com uma mistura das três bactérias (Mix).

Em campo, o delineamento experimental também foi feito em blocos casualizados, sendo dois tratamentos e cinco repetições. O primeiro tratamento foi considerado o controle, sem nenhuma inoculação e o segunda uma mistura das três bactérias estudadas.

3.5. Análises dos isolados

3.5.1. Produção de AIA

A produção do ácido indol acético (AIA) foi mensurada por meio da metodologia de Kuss et al., (2007).

Cada isolado bacteriano foi aplicado em 20 mL de meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose (DYGS) que contém em (g.L⁻¹): glicose: 2; peptona: 1,5; extrato de levedura: 2; dihidrogenofosfato de potássio: 0,5; sulfato de magnésio heptahidratado: 0,5; suplementado com 5mM de L – triptofano, incubadas por 48 horas, a 28 °C, sob agitação constante de 120 r.p.m. e na ausência de luz. Após esse período, 5 mL de cada cultura foi centrifugada a 10.000 r.p.m. por 10 minutos e transferidos, em seguida, 2 mL do sobrenadante para tubo de ensaio, contendo 2 mL do reagente de Salkowski 2% (p/v) (0,5M FeCl₃ em 35% de ácido perclórico) e incubados, na ausência de luz, por 30 minutos (Sarwar; Kremer, 1995).

A produção de AIA foi determinada, qualitativamente, pela coloração avermelhada da solução contida no tubo de ensaio. Para a avaliação quantitativa do hormônio, foi feita leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530 nm. A concentração foi obtida pela leitura de meio de cultura estéril, não inoculado, com concentrações conhecidas de AIA comercial (0, 20, 40, 60, 80 e 100 µgAIA/tubo). Para cada concentração foi feita triplicata, que foi normalizada pela curva padrão resultando na equação $y = 0,0121x - 0,1069$ ($R^2 = 0,9726$), onde “x” representa a concentração de AIA (µgAIA/tubo), e “y” é a absorbância média obtida no espectrofotômetro.

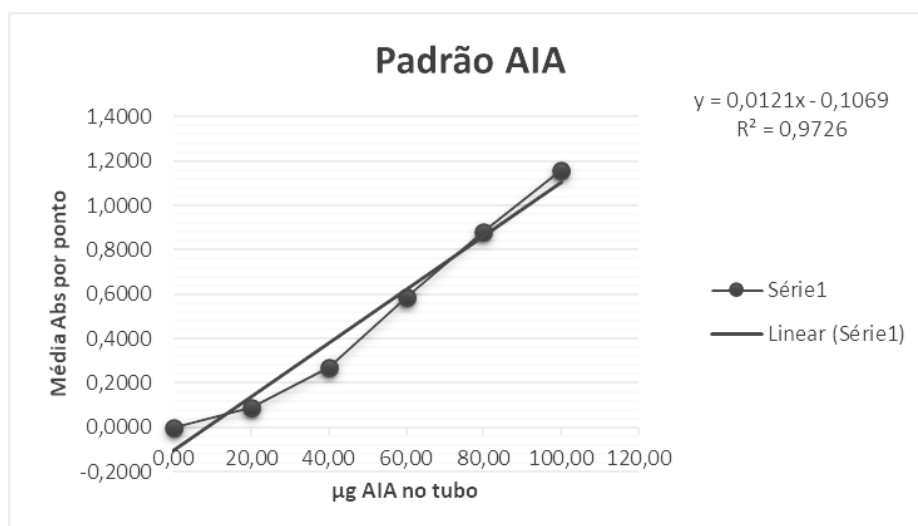


Figura 1. Gráfico da curva padrão encontrado para as leituras das diferentes concentrações de AIA, após leitura em espectrofotômetro.

3.5.2. Fixação de nitrogênio em tubo de ensaio

O nitrogênio total foi determinado seguindo o método proposto por Bremner e Mulvaney (1982). Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo NFB durante 48h. Pesou-se 1 mL de amostra em tubo de ensaio tipo Kjeldahl de 100 mL adicionando 1,1 g 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. Foi adicionado 20 mL de NaOH 10 M, iniciando a destilação do nitrogênio, recolhendo-se 30 mL em Erlenmeyer de 50 mL, previamente pipetado com 5 mL de solução indicadora de ácido bórico. Em seguida, o destilado foi titulado com solução de ácido sulfúrico 0,02 M até a mudança da cor verde para rosa (Bremner; Mulvaney, 1982).

Em cada avaliação foi feito um branco. O teor de nitrogênio total foi calculado com base numa curva padrão determinada com solução de sulfato de amônia.

3.5.3. Solubilização de fósforo em tubo de ensaio

A atividade da solubilização da fluorapatita em tubo de ensaio foi determinada transferindo 0,2 ml da suspensão de 1×10^7 UFC mL⁻¹ para um frasco de Erlenmeyer contendo o meio descrito por Nahas et al. (1994), suplementado com 5 g L⁻¹ fluorapatita (apatita de Araxá). Depois da inoculação a solução bacteriana foi incubada com agitação a 28°C por dois dias. Após o período de incubação, a solução bacteriana foi removida e centrifugada a 9.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e determinado a quantidade de fosfato (Ames, 1966; Nahas, 1994).

3.5.4. Detecção de Sideróforos

O procedimento foi feito de acordo com Schwyn e Neilands (1987). Inicialmente todo o material de vidro foi limpo com 6M HCl para remover quaisquer elementos traço e, em seguida, enxaguou-se com água destilada. Para o corante azul, foram feitas três soluções. Solução 1: Dissolveu-se 0,06 g de CAS (Fluka Chemicals) em 50 ml de H₂O. Solução 2: Dissolveu-se 0,0027 g de FeCl₃-6 H₂O em 10 ml de 10 mM de HCl.

Solução 3: Dissolveu-se 0,073 g de HDTMA em 40 ml de H₂O. Misturou-se a solução 1 com 9 ml de solução 2, e então com a solução 3. A solução obteve uma cor azul. Ela foi autoclavada e armazenada em um recipiente plástico.

Para a solução do meio dissolveu-se 15 g de KH₂PO₄, 25 g de NaCl e 50 g de NH₄Cl em 500 ml de H₂O. Para 20% de estoque de glicose dissolveu-se 20 g de glicose em 100 ml de H₂O. Para a solução estoque de NaOH, dissolveu-se 25 g de NaOH em 150 ml de H₂O. O pH ficou próximo de 12. Para a solução ácida Casamino, 3 g de ácido casamino foram dissolvidos em 27 ml de H₂O. Foi feita a extração com 3% de 8-hidroxiquinolina em clorofórmio para remover qualquer traço de ferro e, posteriormente filtrada esterilizada.

A preparação do CAS ágar foi feita adicionando-se 100 ml de solução salina MM9 a 750 ml de H₂O e 32,24 g de piperazina-N, N-bis (2-ácido etanossulfônico). O pH foi elevado até 6, adicionando-se lentamente PIPES e aos poucos elevando novamente até 6,8. Posteriormente, adicionou-se 15 g de ágar Bacto. Depois de autoclavado, foi adicionado 30 ml de solução estéril de ácido casamino e 10 ml de solução de glicose estéril a 20% para MM9. Lentamente foi adicionado 100 ml de solução de corante azul ao longo da parede de vidro com agitação suficiente para misturar completamente. Por último, assepticamente, despejou-se nas placas.

Depois de secas, as placas foram divididas em 3 partes e em cada uma inoculou-se uma bactéria. O procedimento foi feito em triplicata. Para resultado positivo, a coloração do meio na placa muda de azul para laranja.

3.6. Avaliações na planta

3.6.1. Altura e massa seca

A medição da altura das plantas foi realizada com auxílio de fita métrica, iniciando na base da planta rente ao solo até o ápice.

Em seguida, as plantas foram devidamente coletadas e as raízes lavadas em água corrente para retirada do excesso de solo. A parte aérea foi separada das raízes e ambas secas em estufa sob aeração forçada a 65°C por aproximadamente 72 horas

até atingirem peso constante, visando determinação da matéria seca. Em sequência foram pesadas utilizando balança analítica.

3.6.2. Teores de fosforo e nitrogenio na planta

Depois de seco e pesado, o material vegetal foi moído em moinho tipo Willey (malha 20) e submetido à análise de materia seca de fósforo e nitrogênio total, seguindo metodologias descritas por anteriormente (Ames, 1966; Nahas, 1994; Bremner e Mulvaney, 1982).

3.7. Avaliações no solo

Amostras simples de solo da rizosfera foram retiradas em pontos aleatórios, sendo reunidas em amostra compostas, totalizando 200 g/amostra. Estas foram divididas em duas partes, sendo a primeira mantida em sacos plásticos à temperatura de 4°C até o momento de utilização para contagem de bactérias totais e a segunda seca ao ar e conservada em temperatura ambiente (28 °C).

3.7.1. Contagem de microrganismos em solo

As amostras coletadas foram mantidas 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^{-4} segundo Wollum II (1982). 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.

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. As contagens foram feitas com 24h, 48h e 72h em contador de colônias manual com 6x de aumento.

Foram consideradas apenas as contagens que variaram de 30 a 300 colônias (Black, 1965; Schortemeyer et al., 1996).

3.7.2. Carbono da Biomassa Microbiana

Para a determinação de biomassa microbiana do solo (BMS) utilizou-se o método da Embrapa (De-Polli; Guerra, 1997).

Iniciando a extração, pesou-se 10 g da amostra de solo em dois Erlenmeyers de 250 mL, devidamente identificados, um para ser *irradiado* e outro *não irradiado*. Os irradiados foram submetidos a 15 minutos no micro-ondas cada frasco. Aos Erlenmeyers (Irradiados e Não Irradiados) foram acrescentados 40 mL de K_2SO_4 0,5 M e colocados por 30 minutos em agitador horizontal. Deixou-se em repouso por mais 30 minutos após a agitação e foi feita a filtração em funil e papel de filtro qualitativo, recolhendo o filtrado (extrato) em Erlenmeyers de 50 mL.

Para a determinação, pipetou-se 10 mL de cada extrato filtrado para Erlenmeyer de 125 mL, adicionando quantitativamente 2 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,066M e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após diminuição da temperatura, adicionou-se 50 mL de água destilada e 4 gotas do indicador ferroin. A titulação foi feita com sulfato ferroso amoniacal 0,03 M.

Foram feitas 4 provas em branco, sendo 2 contendo todos os reagentes e mais 10 mL de K_2SO_4 0,5M e 2 apenas com os reagentes sem o sulfato de potássio.

3.8. Análises dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Teste F) comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa AgroEstat versão 1.0. (Barbosa; Maldonado JR., 2010)

4. RESULTADOS

4.1. Isolados microbianos

Os três isolados testados foram capazes de produzir AIA, sendo o teor quantificado e os valores calculados seguindo a curva padrão em metodologia previamente descrita (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de AIA, solubilização de fósforo e fixação de nitrogênio produzida pelos isolados.

Isolados	µg AIA/mL	mg de P/mL	mg de N /mL
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	9,69	7,37	12,34
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	9,20	9,31	11,23
<i>Enterococcus faecium</i>	7,60	2,53	10,34

As bactérias foram capazes de solubilizar o fósforo em condições de tubo de ensaio sendo *F. succiogenes* a bactéria que solubilizou a maior quantidade de fósforo, seguida pela *R. amylophilus* e *E. faecium*. Os isolados bacterianos também se mostraram capazes de fixar nitrogênio, sendo a bactéria que mais fixou nitrogênio em condições de tubo de ensaio foi *R. amylophilus*, seguida pela *F. succiogenes* e *E. faecium*.

A análise para detecção de sideróforos também apresentou resultados positivos para os três isolados testados, onde houve mudança da coloração do meio de cultura de azul para vermelho/laranja, através do ensaio CAS.

4.2. Milho

As alturas das plantas do milho variaram de 55 a 65 cm e os tratamentos apresentaram alturas similares quando comparadas com o controle, não ocorrendo diferença significativa.

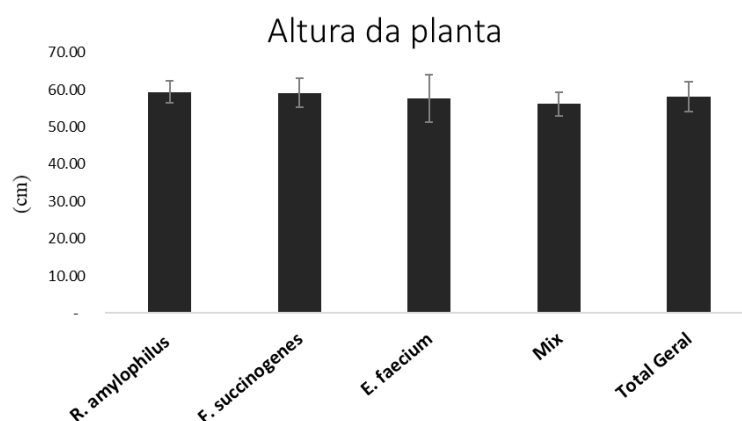


Figura 2. Comparação entre as alturas dos tratamentos de milho analisados.

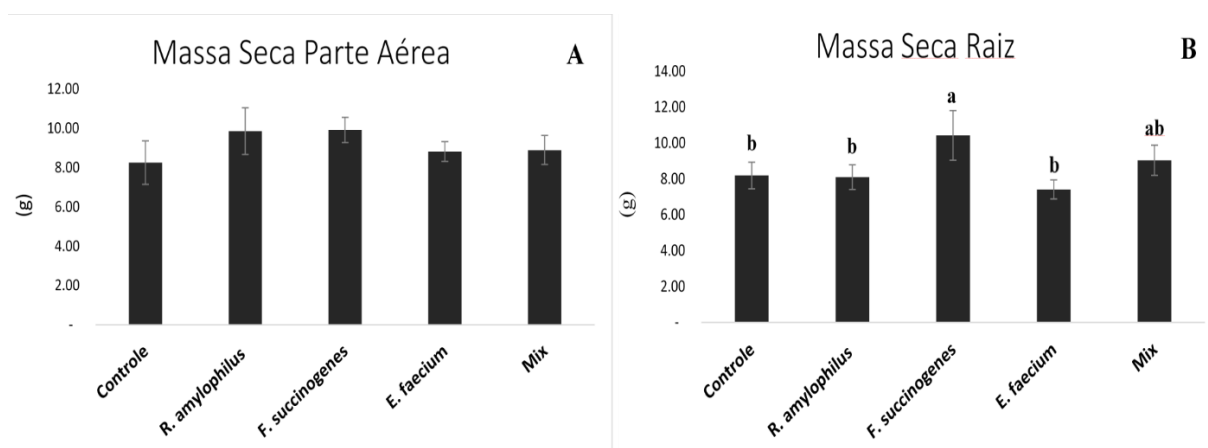


Figura 3. Parâmetro massa seca da parte aérea (A) e raiz (B) comparado entre os tratamentos testados.

Os tratamentos apresentaram valores de massa seca da parte aérea similares entre as plantas, não apresentando diferença significativa entre eles (Fig. 3 A). Já o tratamento contendo o isolado *F. succinogenes* apresentou maior valor de massa seca da raiz (MSR) das plantas de milho quando comparado ao controle (Fig. 3 B).

As bactérias *R. amylophilus* e *E. faecium* diminuíram a concentração de nitrogênio na parte aérea quando comparados ao tratamento controle (Fig. 4 A). Em relação a concentração de nitrogênio na raiz, os tratamentos não diferenciaram entre si (Fig. 4 B). Para a concentração de fósforo, tanto para parte aérea quanto para raiz, os tratamentos também não apresentaram diferença significativa (Fig. 4 C e D).

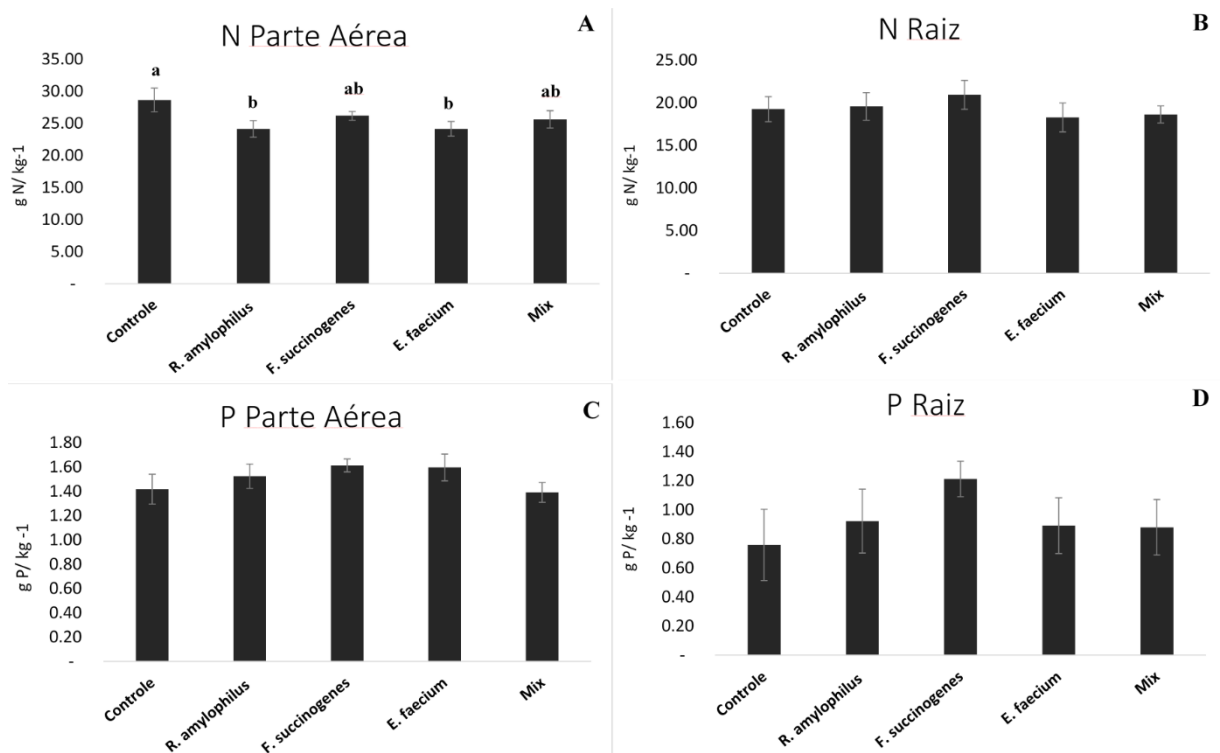


Figura 4. Concentração de nitrogênio na parte aérea (A) e na raiz (B) e concentração de fósforo na parte aérea (C) e na raiz(D).

R. amylophilus promoveu um aumento significativo no carbono da biomassa microbiana comparada com o tratamento controle (Fig. 5 A). Entretanto, não houve diferença significativa em relação a contagem total de bactérias do solo (Fig. 5 B).

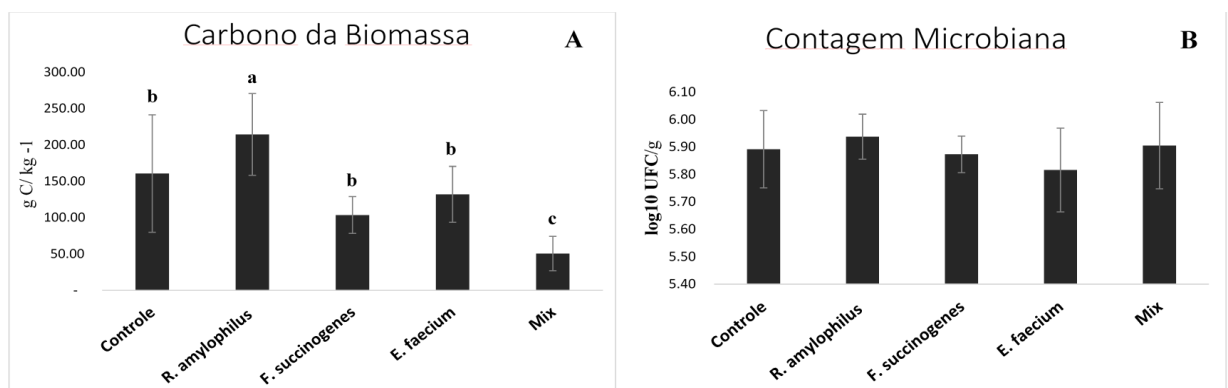


Figura 5. Análises de (A) Carbono da Biomassa e (B) Contagem de unidades formadoras de colônias comparadas entre os tratamentos testados.

4.3. Soja

A bactéria *R. amylophilus* promoveu um incremento significativo nas alturas das plantas de soja comparados com o tratamento controle (Fig. 6).

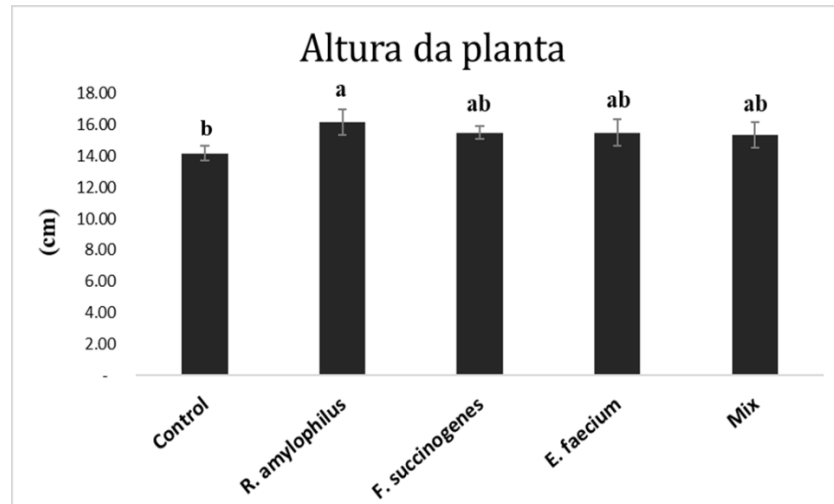


Figura 6. Parâmetro Altura da planta comparado entre os tratamentos testados.

Não houve diferença significativa entre as médias de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) entre os tratamentos entre as plantas de soja (MSPA) (Fig. 7).

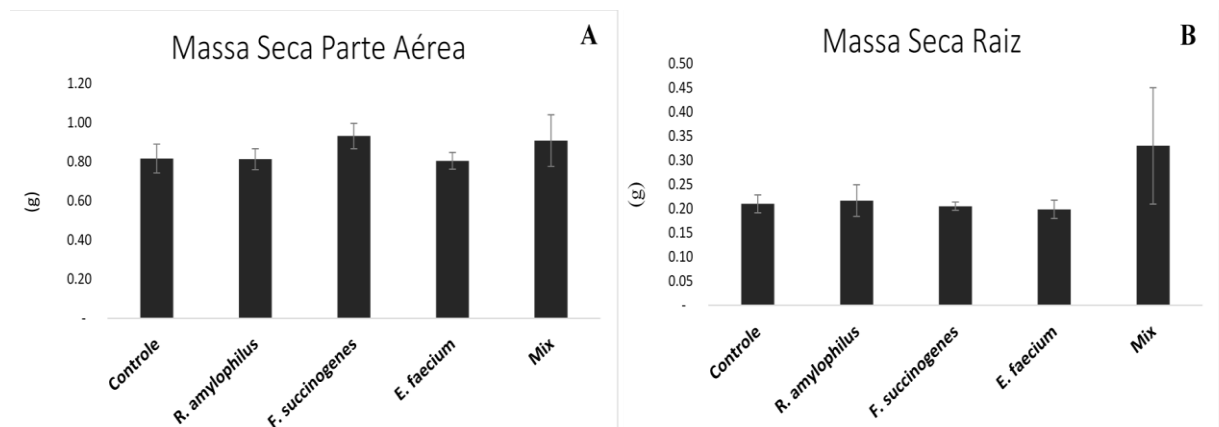


Figura 7. Média das massas seca parte aérea (A) e raiz (B) comparado entre os tratamentos testados nas plantas de soja.

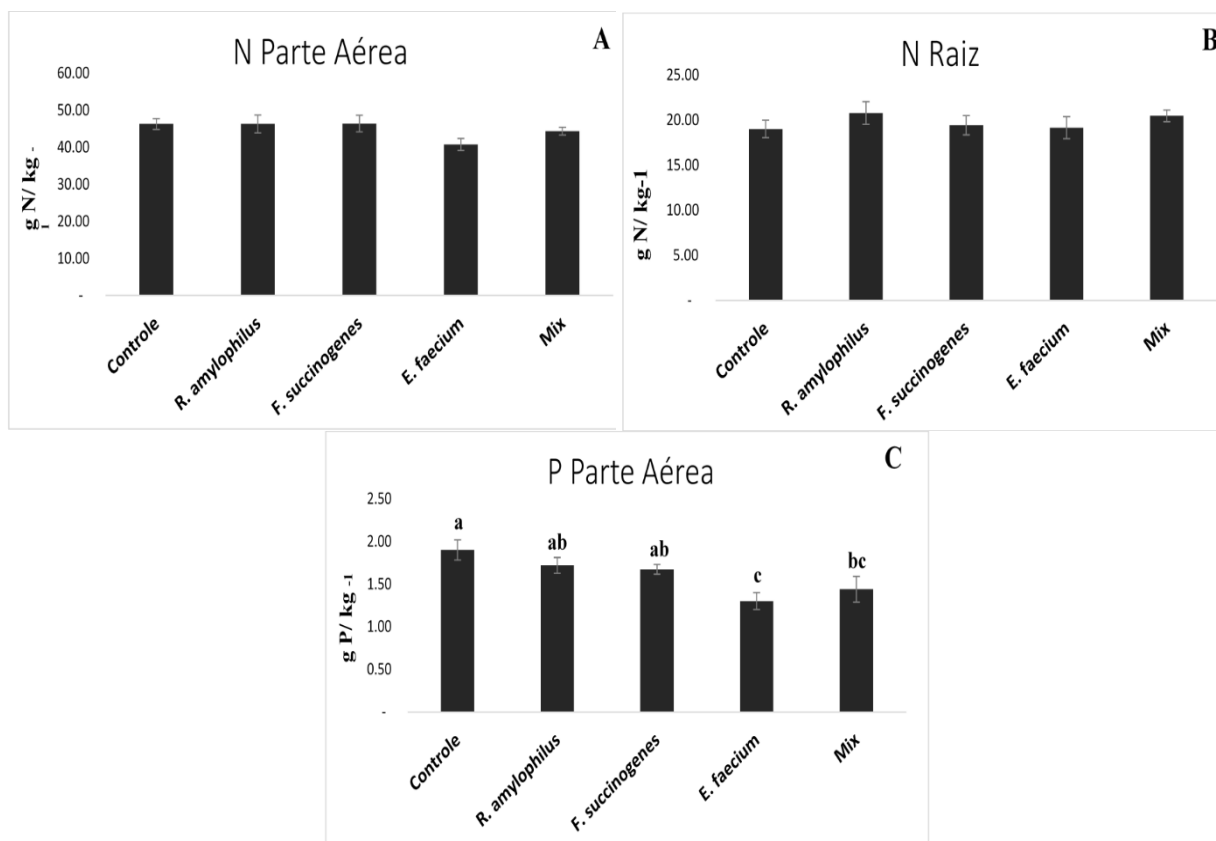


Figura 8. Média das concentrações de nitrogênio na parte aérea (A) e na raiz (B) e médias das concentrações de fósforo na Parte Aérea (C).

As concentrações de nitrogênio na parte aérea e raiz das plantas de soja que receberam as inoculações bacterianas não diferiram estatisticamente do tratamento controle (Fig.8 A e B). Para a concentração de fósforo na parte aérea a bactéria *E. faecium* e o Mix de bactérias diminuíram significativamente a concentração comparados com o tratamento controle (Fig. 8 C). Os valores de fósforo para raiz não foram suficientes para serem analisados estatisticamente.

O Mix de bactérias promoveu um incremento significativo no carbono da biomassa microbiana do solo comparado com os tratamentos controle sob o plantio de soja (Fig. 9 A). Não houve diferença significativa das contagens de bactérias totais do solo entre os tratamentos que receberam as inoculações bacterianas comparadas com o tratamento controle sob o plantio de soja (Fig.9 B).

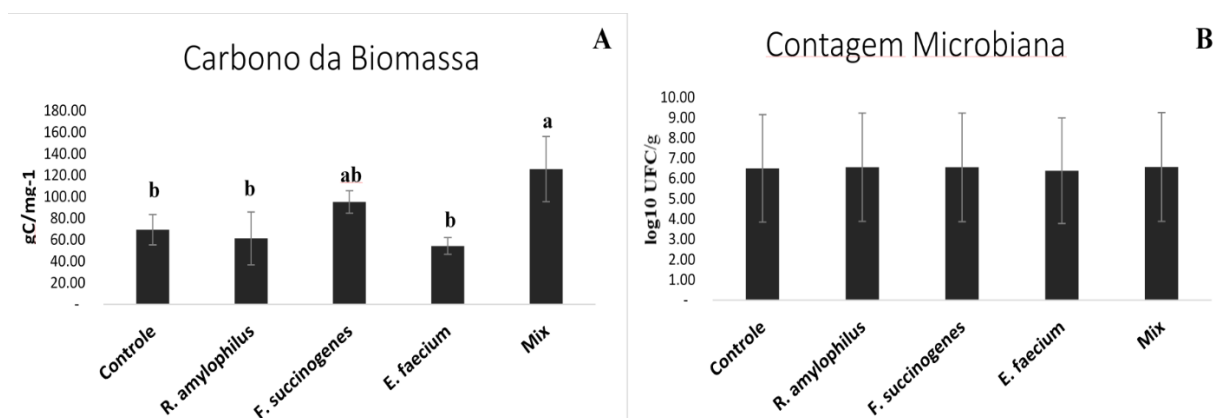


Figura 9. Análises de Carbono da Biomassa (A) e Contagem de unidades formadoras de colônias (B) comparadas entre os tratamentos testados.

4.3.1. Soja Campo

Os resultados das análises de massa seca realizadas com a parte aérea da soja coletada do campo não apresentaram variação significativa. As concentrações de nitrogênio e fósforo na parte aérea das plantas de soja que receberam as inoculações bacterianas também não diferiram estatisticamente do tratamento controle (Fig. 10)

Não houve diferença significativa para a análise de carbono da biomassa do solo, entre os tratamentos que receberam as inoculações bacterianas comparadas com o tratamento controle sob o plantio de soja em campo (Fig. 10).

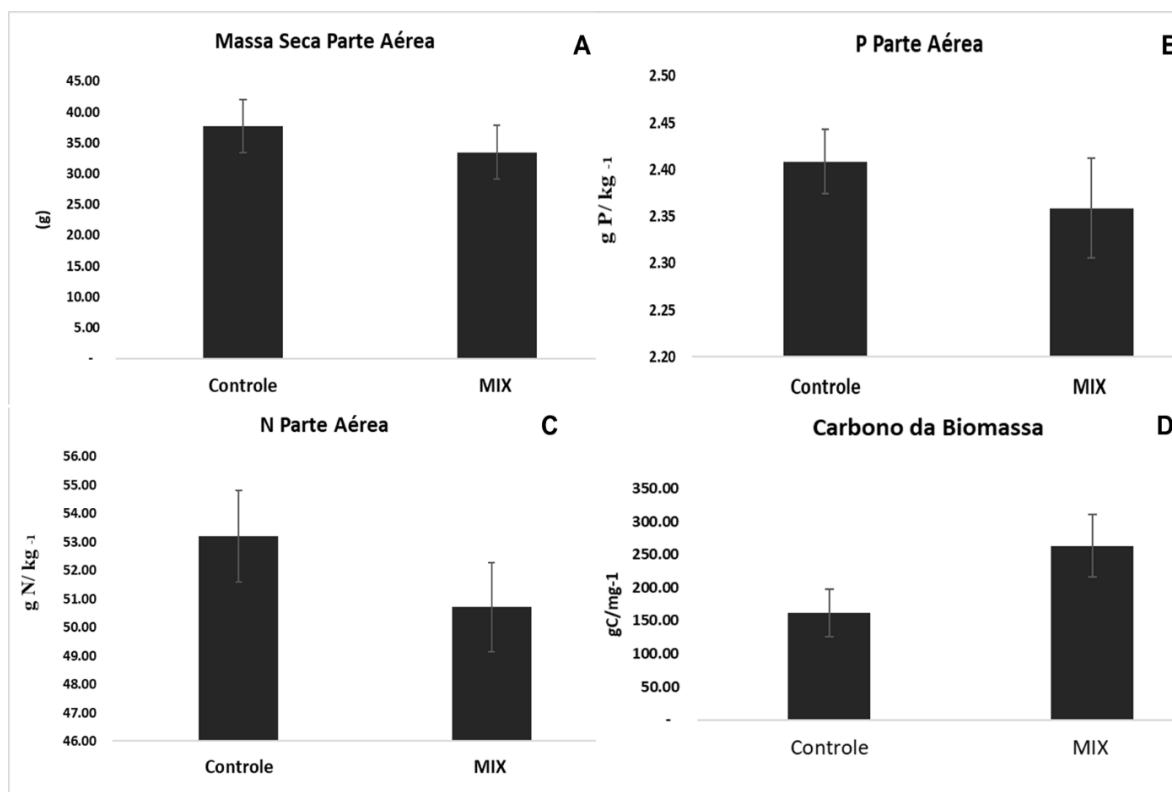


Figura 10. Média dos valores de massa seca (A), fósforo da parte aérea (B), nitrogênio da parte aérea (C) e carbono da biomassa (D) para a soja do campo.

DISCUSSÃO

Na interação microrganismo - hospedeiro um maior desenvolvimento do hospedeiro é promovido geralmente por três ações microbianas tais como um maior fornecimento de nutrientes, aumento da sua disponibilidade e uma melhor absorção. Especificamente para os microrganismos promotores de crescimento de plantas essas ações são consequências da produção de enzimas e ácidos orgânicos, que aumentam a solubilidade e a disponibilidade de nutrientes e também da produção de fitohormônios, que promovem o desenvolvimento radicular e consequentemente aumenta a eficiência de exploração de solo e de parte aérea aumentando também a eficiência fotossintética (Melo et al., 2016).

Os isolados bacterianos utilizados no presente estudo são de bactérias probióticas ruminais que quando estão presentes em quantidades adequadas promovem benefício ao hospedeiro. Elas desempenham um papel importante na

disponibilização de energia e nutrientes para os ruminantes através da quebra de macromoléculas provenientes da alimentação dos animais (Lerner et al., 2019).

As bactérias *R. amylophilus*, *F. succinogenes* e *E. faecium*, demonstraram, nesse estudo, importantes habilidades relacionadas à promoção de crescimento de plantas como síntese do fitohormônio ácido indol acético (AIA). O isolado que produziu uma quantidade maior de AIA foi o *R. amylophilus* 9,69 µg AIA/mL seguida pela bactéria *F. succinogenes* 9,20 µg AIA/mL e pela bactéria *E. faecium* 7,60 µg AIA/mL.

Fitohormônios são substâncias orgânicas que podem promover, inibir, ou modificar o desenvolvimento das plantas em baixas concentrações (Damam et al., 2016). Os fito-hormônios promovem a proliferação das células das raízes pela superprodução de células laterais e pêlos radiculares juntamente com o aumento da absorção de nutrientes e água (Sureshababu et al., 2016).

A *F. succinogenes* promoveu um aumento na matéria seca de raiz nas plantas de milho, entretanto, não houve diferença de matéria seca em relação ao controle para as plantas de soja. Não houve diferença quanto a produção de AIA entre as bactérias *F. succinogenes* e as bactérias *R. amylophilus* e esse incremento na MSR promovido pela *F. succinogenes* nas plantas de milho e não nas plantas de soja pode ser devido a maior interação das bactérias com a espécie vegetal. Os estudos mostram que o genótipo vegetal tem um papel muito importante na interação com os microrganismos e muitas vezes determinam o sucesso e o fracasso da interação (Bulgarelli et al., 2013).

As bactérias também foram capazes de solubilizar o fósforo em condições de tubo de ensaio, sendo *F. succinogenes* a bactéria que solubilizou a maior quantidade de fósforo 9,31 mg de P por mL, seguida pela *R. amylophilus* 7,37 mg de P por mL e a *E. faecium* 2,53 mg de P por mL. Essas habilidades de solubilização de fósforo pelas bactérias não se mostrou um benefício para as plantas, uma vez que, não houve um incremento na concentração de fósforo nas raízes e nem na parte aérea das plantas de milho e soja que receberam a inoculações bacterianas em relação ao tratamento controle. Ao contrário disso, a bactéria *E. faecium* promoveu uma diminuição da concentração de fósforo na parte aérea das plantas de soja.

Talboys et al. (2014) relataram uma diminuição da concentração de fósforo quando a planta de trigo foi inoculada com *B. amyloliquefaciens*. Este efeito negativo

pode ser devido a produção de auxinas pela bactéria em determinadas condições de fertilidade do solo, principalmente em solo com baixa disponibilidade de fósforo. Santos (2018) também verificou uma redução dos níveis de P no solo na cana de açúcar quando estas foram inoculadas com *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* e atribui esse efeito à elevadas concentrações de AIA sintetizadas pelos *Bacillus*. Interessantemente que, nesses dois estudos, a redução do fósforo ocorreram nas raízes e no presente estudo ocorreram na parte aérea e a síntese de AIA pelo *E. faecium* não foi a maior quantidade produzida em relação as três bactérias testadas. Nesse sentido, mais estudos são necessários para verificar o efeito da inoculação do *E. faecium* em soja e elucidar seus modos de ação.

Os três isolados bacterianos também se mostraram capazes de fixar nitrogênio, sendo a bactéria que apresentou o maior valor de fixação de nitrogênio em condições de tubo de ensaio foi a *R. amylophilus* 12,34 mg de N por mL, seguida pela *F. succiogenes* 11,23 mg de N por mL e a *E. faecium* 10,34 mg de N por mL. Moreira et al. (2013) mostraram que as BPCP são capazes de incrementar entre 20 a 30% nas concentrações de N em gramíneas. Neste estudo não foi possível verificar a melhor resposta dos isolados inoculados quanto ao acúmulo de N na parte aérea e raiz. Um resultado inesperado foi a diminuição dos teores de concentração de nitrogênio na parte aérea do milho pelas bactérias *R. amylophilus* e *E. faecium* quando comparados ao tratamento controle.

O Mix bacteriano aumentou o carbono da biomassa no solo sob o cultivo de soja. Esse resultado mostra que houve um estabelecimento microbiano no solo, a primeira etapa que precisa ser vencida para as BPCP terem um efeito positivo do desenvolvimento das plantas, demonstrando suas habilidades de interagir com a microbiota pré-existente (Bulgarelli et al., 2013). Entretanto, a contagem total de bactérias no solo não aumentou. Esse resultado sugere que pode ter ocorrido um rearranjo populacional, onde determinadas espécies microbianas podem ter aumentado e outras diminuído sem alteração no número total de microrganismos.

Em condição de campo, as bactérias promoveram nenhuma diferença em relação a matéria seca de parte aérea, concentração de nitrogênio e fósforo e carbono da biomassa microbiana na cultura da soja. Como seria possível as mesmas bactérias terem promovido incrementos em relação a promoção de crescimento de plantas em

condições de vasos e não terem promovido em condições de campo? A maior hipótese para a não-promoção de crescimento da soja em campo seria a ausência de colonização radicular, sugerindo fortemente que não houve o estabelecimento das bactérias inoculadas no solo. Uma microbiota nativa mais competitiva que os isolados testados também pode influenciar, uma vez que a promoção do crescimento só pode se expressar se houver colonização radicular, isto é, estabelecimento da interação de microrganismo e planta (Sottero, 2003).

Somado a isso, outro fator limitante pode ter sido que, no experimento em condições de casa de vegetação, as plantas receberam quatro inoculações durante todo o período, enquanto que o experimento de campo recebeu apenas duas, indicando que a quantidade de doses pode ter interferido diretamente nos resultados.

A ausência de resultados positivos com as inoculações das bactérias, em condições de campo, não condenam a utilização das mesmas como promotoras de crescimento de plantas, mas, exigem mais estudos para se estabelecer a melhor dose, a melhor época e forma de aplicação e a melhor variedade da cultura agrícola utilizada.

CONCLUSÃO

As bactérias probióticas ruminais apresentaram habilidades de promoção de crescimento de plantas quando analisadas em laboratório. Para os testes em casa de vegetação, as bactérias atuaram de formas distintas sobre os tratamentos, aumentando, diminuindo ou não alterando os parâmetros analisados em relação ao controle. Para o experimento em campo, não houve diferença significativa em nenhum deles, sugerindo o não estabelecimento dos inóculos naquele ambiente. Os resultados sugerem que as bactérias ruminais testadas possuem um potencial como BPCP e mais estudos são necessários como avaliação de dose, métodos e épocas de aplicação, espécies vegetais a fim de melhorar a interação planta - microrganismos e potencializar os efeitos positivos da inoculação microbiana nas plantas.

REFERENCIAS

Ames BN (1996) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 115–118.

Anderson, KL (1995) Biochemical analysis of starch degradation by *Ruminobacter amylophilus* 70. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1488–91.

Angulo VC, Sanfuentesa EA, Francisco RK, Sossa E (2014) Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, p. 338-347.

Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M (2003) Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 403–412.

Barbosa JC, Maldonado JR., W (2010) **AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Departamento de Ciências Exatas, Jaboticabal.

Bashan Y, De-Bashan LE (2005) Bacteria/Plant growth-promotion. **Encyclopedia of soils in the environment**, v. 1, p. 103–115.

Beijerinck M (1888) Die Bakterien de Papilionaceenknollchen. **Botanische Zeitung**, Vol. 46: 725-804. In *Milestones in Microbiology: 1556 to 1940*, translated and edited by Thomas D. Brock, ASM Press. 1998, p220.

Béra-Maillet C, Ribot Y, Forano E (2004) Fiber-Degrading Systems of Different Strains of the Genus *Fibrobacter*. **Society**, v. 70, n. 4, p. 2172–2179.

Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.28(4), p.1327-50.

Boddey R M, Dobereiner J (1995) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1–3, p. 241–250.

Bourassa DV, Kannenberg EL, Sherrier DJ, Buhr RJ, Carlson RW (2017) The Lipopolysaccharide Lipid A Long-Chain Fatty Acid Is Important for *Rhizobium leguminosarum* Growth and Stress Adaptation in Free-Living and Nodule Environments. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 30, n. 2, p. 161–175.

Bremner JM, Mulvaney CS (1982) Nitrogen-Total. In: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. Eds., **American Society of Agronomy**, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 595-624.

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Themaat EVL, Schulze-Lefert P (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838.

Busanello M, Pozza M, Barros PC, Sartório C, Eckstein II, (2012). Probióticos, seus Modos de Ação e a Produção Animal. **Scientia Agraria Paranaensis**. 11. 14-24.

Carvalho ITDe. (2010) Microbiologia de Alimentos. EDUFPRPE.

Choudhury, A. T. M. A.; Kennedy, I. R. (2005) Nitrogen Fertilizer Losses from Rice Soils and Control of Environmental Pollution Problems. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 36, n. 11–12.

Cruz JC (2010) Embrapa Milho e Sorgo Cultivo do Milho. v. 2, p. 10.

Damam M, Kaloori K, Gaddam B, Kausar R (2016) Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 37(1), p. 130–136.

De-Polli H, Guerra JGM (1997) Ministério da Agricultura e do Abastecimento Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método da fumigação-extração.

Deagro. Safra Mundial de Soja (2016) 10º Levantamento do USDA. **Departamento do Agronegócio-DEAGRO/FIESP**, v. 10, n. 11, p. 1.

Dobereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1996) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. EMBRAPA-SPI.

Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2012) Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research in Microbiology**, v. 163, n. 8, p. 500–510.

Embrapa, (2014) **Tecnologias de Produção de Soja** - Região Central do Brasil.

Fancelli AL (2015) Manejo baseado na fenologia aumenta eficiência de insumos e produtividade. Milho, p. 24–29.

Farias JRB, Nepomuceno AL, Neumaier N (2007) Ecofisiologia da soja. Londrina: Embrapa Soja, p. 9.

Federação Das Indústrias Do Estado De São Paulo (FIESP). **Safra Mundial De Milho**. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20190715143626-boletim milho julho 2019/>>. Acesso em: 31 jul. 2019a.

Federação Das Indústrias Do Estado De São Paulo (FIESP). **Safra Mundial De Soja**. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/attachment/file-20190715184045-boletim soja julho 2019/>>. Acesso em: 31 jul. 2019b.

Freitas MD (2011) A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 7, p. 1–12.

Gao W, Howden BP, Stinear TP (1986) ScienceDirect Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Current Opinion in Microbiology**, v. 41, p. 76–82.

Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15.

Hamlin LJ, Hungate RE (1956) Culture and physiology of a starch-digesting bacterium (*Bacteroides amylophilus* n. sp.) from the bovine rumen. **Journal of bacteriology**, v. 72, n. 4, p. 548–554.

Hungate RE (1950) The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. **Bacteriol. Rev**, v. 14, p. 1–49.

Ke X (2019) Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 248–260.

Kuss AV, Kuss VV, Lovato T, Flôres ML (2007). Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(10), 1459-1465.

Lerner A, Shoenfeld Y, Matthias T (2019) Probiotics: If It Does Not Help It Does Not Do Any Harm. Really? **Microorganisms**, v. 7, n. 4, p. 104.

MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral das plantas. **São Paulo: Agronômica Ceres**, p. 251, 1980.

Mariano RDLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA, Nascimento ARP, Donato VMTS (2004) Importância De Bactérias Promotoras De Crescimento E De Biocontrole De Doenças De Plantas Para Uma Agricultura Sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89–111.

Martín R, Langella P (2019) Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1047.

Matthews A, Pierce S, Hipperson H, Raymond B (2019) Rhizobacterial Community Assembly Patterns Vary Between Crop Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 581.

Melo J, Carolino M, Carvalho L, Correia P, Tenreiro R, Chaves S, Ramos AC (2016). Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1574.

Meziane H, VAN DER Sluis I, VAN Loon LC, Höfte M, Bakker PA (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants.

Molecular Plant Pathology, v. 6(2), p.177-85.

Montgomery L, Flesher B, Stahl D (1988) Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and Description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 22, p. 430–435.

Moreira F, Cares J, Zanetti R, Stümer SI (2013) Bactérias associativas fixadoras de nitrogênio atmosférico. In: **O Ecossistema Solo: Componentes, Relações Ecológicas e Efeitos Na Produção Vegetal**. Lavras.

Mundstock CM, Thomas AL (2005) Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. p. 31.

Murray JD (2011) Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 24, n. 6, p. 631–9.

Nahas E, Centurion JF, Assis LC (1994) Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.43-48.

Oliveira S, Zanine E, Mantovani A, Pereira H, Rosa O (2007). Microbial populations and chemical composition of *Panicum maximum*-grass silage inoculated with *Streptococcus bovis* isolated from the rumen. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, p. 35-40.

Peiffer J, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110 (16) p.6548-6553.

Penha LAO, Fonseca ICB, Mandarino JM, Benassi V (2014) Soja Como Alimento: Valor Nutricional, Benefícios Para a Saúde E Cultivo Orgânico. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 91–102.

Pinloche E, McEwan N, Marden JP, Bayourthe C, Auclair E, Newbold CJ (2013) The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7.

Plaizier JC, Khafipour E, Li S, Gozho GN (2012) Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 9-21.

Ramakrishna W, Yadav R, Li K (2019) Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10–18.

Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion. **Journal of Biotechnology Advances**, 17, 319-339.

Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ (1992) A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of animal science**, v. 70(11) p.3551-61.

Saghir Khan M, Zaidi M, Wani A, Parvaize (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n. 1, p. 29–43.

Santos RM, Kandasamy S, Rigobelo EC (2018) Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. **MicrobiologyOpen**, v. 7, n. 6, p. e00617.

Sarwar M, Kremer RJ (1995) Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20 (5), p. 282-285.

Schmidt JE, Gaudin ACM (2018) What is the agronomic potential of biofertilizers for maize? A meta-analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 7.

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160(1) p.47-56.

Sharma A, Johria BN, Sharma AK, Glick BR (2003) Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 887–894.

Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, p. 587.

Silva CE, Carrão-Panizzi MC, Mandarino JMG, Leite RSM, (2012) Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) Isoflavone contents of whole soybeans and their components, p. 150–156.

Silva TAD, da Silva PB, da Silva EAA, Cavarianil JNC (2016) Condicionamento fisiológico de sementes de soja, componentes de produção e produtividade. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 227–232.

Silveira ELD (2008) Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. p. 82.

Sologuren L (2015) Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. **Visão Agrícola**, v. 9, n. 13, p. 8–11.

Sottero AN (2003) Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias. Dissertação (mestrado em agricultura tropical e subtropical) – Instituto Agrônômico.

Stackebrandt E, Hippe H (1986) Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter* gen. nov., nom. rev. as *Ruminobacter amylophilus* comb. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 8, p. 204–207.

Suen G, Weimer PJ, Stevenson DM, Aylward FO, Boyum J, Deneke J, Drinkwater C, Ivanova NN, Mikhailova N, Chertkov O, Goodwin LA, Currie CR, Mead D, Brumm PJ (2011) The complete genome sequence of fibrobacter succinogenes s85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. **PLoS ONE**, 19;6(4):e18814.

Sureshababu K, Amaresan N, Kumar K (2016) Amazing Multiple Function Properties of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere Soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)**, v. 5, n. 2, p. 661–683.

Taiz L, Zeiger E (2009) **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed.

Talboys PJ, Owen DW, Healey JR, Whithers PJA, Jones DL (2014) Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 51.

Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, 2011.

Wollum II A (1982) Cultural methods for soil microorganisms. In: Miller, R.H. & Keeney, D. R. (Ed.). . **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. p. 781–802.

Ye J, Zhong T, Zhang D, Ma C, Wang L, Yao L, Zhang Q, Zhu M, Xu M (2019) The Auxin-Regulated Protein ZmAuxRP1 Coordinates the Balance between Root Growth and Stalk Rot Disease Resistance in Maize. **Molecular Plant**, v. 12, n. 3, p. 360–373.