

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
MARIANE DA ROSA LEONCIO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO
ALHO (*Allium sativum*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO MILHO (*Zea
mays*).**

Curitibanos
2015

MARIANE DA ROSA LEONCIO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTERIAS DO
ALHO (*Allium sativum*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO MILHO (*Zea
mays*).**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, do campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Glória Regina Botelho

Curitibanos
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Leoncio, Mariane

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO ALHO
(Allium sativum) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO MILHO (Zea
mays). / Mariane Leoncio ; orientadora, Glória Botelho -
Curitibanos, SC, 2015.

32 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Promoção de crescimento. 3.
Rizobactérias. 4. Liliacea. 5. Milho. I. Botelho, Glória.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Rodovia Ulysses Gaboardi km3

CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC

TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

MARIANE DA ROSA LEONCIO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO ALHO (*Allium sativum*)
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO NO MILHO (*Zea mays*).**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador(a):

Data da defesa:

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Glória Regina Botelho
Titulação: Dra. Em Ciências
Área de concentração em Biotecnologia vegetal
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Sonia P. da Cruz

Titulação

Área de concentração em _____

Instituição

Membro Titular: Cláudio Roberto F. S. Soares

Titulação DOUTORADO

Área de concentração em MICROBIOLOGIA DO SOLO

Instituição UFPA

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida; por ser luz em meu caminho e estar sempre comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, Dilsonete e Braz, por me darem carinho, educação e suporte para vencer os desafios da vida de cabeça erguida e também pelo amor incondicional. Aos minhas irmãs Caroline e Clara, pelo apoio e carinho durante a caminhada.

Ao meu querido namorado e amigo Diogo, pelo amor, paciência, suporte e incentivo pessoal e profissional. Você tem sido uma peça fundamental na minha vida, pois sempre acredita em mim. Amo você e obrigada.

Agradeço a minha professora orientadora Glória Regina Botelho, pelas inúmeras conversas que tivemos, pelas dúvidas esclarecidas, também pelos puxões de orelha, conhecimentos passados e principalmente pela amizade. Professora, obrigada por tudo.

Aos meus amigos de Laboratório, nos auxílios durante o trabalho, aos técnicos de Laboratório da Universidade Federal de Santa Catarina, por sempre estarem dispostos a ajudar. Principalmente Elisa Coser e Marcielly Fleck Turatto, as ajudas no desenvolvimento do meu projeto.

Muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	10
2.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS E POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE VEGETAIS.....	11
2.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	12
2.4 POTENCIAL PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS <i>in vivo</i>	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
3.1 AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS DOS ISOLADOS.....	14
3.2 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO <i>in</i> <i>vitro</i>	17
3.3 IDENTIFICAÇÃO GÉNÉTICA DOS ISOLADOS	24
4 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	28

Isolamento e caracterização de rizobactérias do alho (*Allium sativum*) e promoção de crescimento do milho (*Zea mays*).

Mariane da Rosa Leoncio

Resumo

O alho possui grande importância econômica e social em Santa Catarina. O uso de fertilizantes químicos incrementa o custo de produção e pode causar danos ambientais. As Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) podem ser alternativas ao uso de insumos. Dentre as RPCPs, os gêneros mais estudados são *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas* do grupo fluorescente que tem demonstrado benefícios para o crescimento de várias espécies vegetais. Neste contexto, objetivou-se caracterizar, fenotípica e genotipicamente, isolados de RPCP obtidos da rizosfera de alho cultivados em cultivo protegido e realizar teste *in vivo* com a cultura do milho, também em cultivo protegido. Os testes bioquímicos utilizados foram Vermelho de Metila (VM), fermentação de glicose e sacarose, produção de catalase e hidrólise da ureia. O potencial de indução do crescimento vegetal foi avaliado mediante avaliação da capacidade de produção de AIA (Ácido Indol-Acético) e de solubilização de fosfatos de cálcio *in vitro*. Foram obtidos 27 isolados. Para os testes bioquímicos, o de glicose, 21 isolados foram positivos e para sacarose 26 foram positivos. Para os demais testes todos isolados foram positivos. Para os testes de mecanismos de promoção de crescimento vegetal, verificou-se que 81,5% e 66,6% dos isolados apresentaram produção de AIA e capacidade de solubilizar fosfato, respectivamente. O teste *in vivo*, com milho (*Zea mays*) indicou que os isolados (5E31, 5E34, 3E31, 4E332, 3E13) testados apresentaram similaridade com o tratamento com 100% de adubação nitrogenada recomendada. Os isolados testados foram identificados amplificação do gene 16S rRNA que identificou 14 (51, 85%) isolados como *Bacillus subtilis*, inclusive os testados *in vivo*. Pode-se afirmar que estes microrganismos, apresentam potencial para a promoção do crescimento dessa cultura.

Palavras-chave: Promoção de crescimento. Rizobactérias. Liliacea. Milho.

1 INTRODUÇÃO

O alho é a quarta hortaliça de maior relevância econômica do Brasil, sendo a mais importante socialmente, pois seu cultivo é feito, principalmente, por pequenos produtores (LEONÊZ, 2008). No estado de Santa Catarina, a cultura foi inicialmente introduzida na região do planalto Catarinense. O município de Curitibanos, por anos foi a região de maior produtividade de alho no estado, pois apresentava as características geográficas e climáticas favoráveis para a produção desta cultura (LUCINI, 2008). Entretanto, fatores econômicos e fitossanitários levaram à diminuição da produção. Atualmente, busca-se incrementá-la através de alternativas que promovam a diminuição de seus custos, como por exemplo, redução de insumos, especialmente de adubos nitrogenados.

A cultura do alho requer uma demanda elevada de nitrogênio, utilizando-se, em cobertura, aproximadamente 200kg/ha de adubação nitrogenada (LUCINI, 2010). Grande parte desta, pode se perder com o processo de lixiviação (AGOSTINHO; FERNANDO; CAMEIRA, 2007), causando perdas econômicas e ambientais.

O número de estudos relacionados com a diminuição do uso de insumos agrícolas vem crescendo, com a finalidade de diminuir a quantidade de insumos, mas mantendo a produtividade das áreas (BULLA; BALBINOT JUNIOR, 2012). Uma alternativa são as bactérias denominadas de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP). Os benefícios acarretados às plantas por intermédio de RPCP podem ser de modo direto ou indireto (VOISARD et al., 1994). O primeiro caso é consequência da solubilização de nutrientes do solo pelas RPCP, como no caso da solubilização de fosfatos minerais (SOUCHIE; ABOUD; CAPRONI, 2007). Estas bactérias podem ainda produzir hormônios vegetais, como o ácido-indol-acético (AIA) (CATTELAN, 1999). A conversão de triptofano em AIA é um mecanismo realizado por várias RPCP, por contribuir na redução do excesso deste aminoácido na rizosfera, o que pode ser deletério para as células bacterianas (BRUNETTA, 2006).

Diversos gêneros de rizobactérias já vêm sendo descritos, com interação com diversas culturas. Os gêneros mais estudados são: *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas* do grupo fluorescente, que auxiliam diversas culturas em seu desenvolvimento, desde a germinação até a produção (FILHO, FERRO, PINHO, 2010; MOREIRA 2010).

Além de poderem auxiliar a planta pela fixação biológica de nitrogênio, e produção de hormônios vegetais, os gêneros *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas* do

grupo fluorescente podem suprimir fitopatógenos, pela produção de sideróforos e antibióticos (LOPER; BUYER, 1991; VOISARD, et al., 1994).

O gênero *Azospirillum*, já vem sendo estudado em culturas como arroz, milho, trigo, demonstrando o potencial dessas bactérias, quando associadas a essas gramíneas (VOGEL et al, 2013; REPKE et al 2013; FIORINI et al 2012).

Já *Bacillus* quando inoculado a culturas, como de milho, feijão, algodão, soja, é descrito na literatura auxiliador do desenvolvimento dessas culturas. Além de ajudar no desenvolvimento destas, possuem o potencial antagonista de patógenos (LAZZARETI MELO, 2005; ARAUJO, 2008; ARAÚJO; HUNGRIA, 1999). Para o gênero *Pseudomonas* por sua vez, há trabalhos que descrevem seu potencial de auxílio a plantas, em culturas de milho, soja, arroz, esse gênero também apresenta potencial contra patógenos (CHAVES, ZUCARELI, OLIVEIRA JUNIOR, 2013; ASSUNPÇÃO et al 2009; FERREIRA, KNUPP, MARTIN-DIDONET, 2014).

Na literatura científica, poucas são as informações sobre a interação de bactérias benéficas dos gêneros citados com plantas da família das *Liliaceae*.

Sugere-se, então que as RPCP podem influenciar positivamente o desenvolvimento e crescimento das culturas, durante seu ciclo, diminuindo os gastos com adubação nitrogenada e obtendo uma apropriada produção. Objetivou-se isolar e caracterizar rizobactérias da cultura de alho (*Allium sativum*), testando o potencial *in vivo* dos isolados na cultura do milho (*Zea mays*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado entre 2013 a 2015, na Universidade Federal de Santa Catarina, *campus* Curitibanos Km 3, - Ulysses Gaboardy, Curitibanos - SC, 89520-000. Segundo a Prefeitura de Curitibanos (2013), as coordenadas geográficas do município são: Latitude: 27° 16' 60" Sul Longitude: 50° 35' 7" Oeste.

2.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

O solo utilizado foi coletado da fazenda Dias, na localidade da Horizolândia, no município de Curitibanos (SC). Foi classificado como Cambissolo associado à Nitossolo Bruno (Embrapa, 1998) e a coleta realizada seguindo os procedimentos descritos pela Comissão de Química e Fertilidade de Solo (2004). Foi utilizado para o plantio de bulbilhos de alho, em dois vasos de 5L, em casa-de-vegetação, sendo semeados quatro bulbilhos por vaso, irrigados quatro vezes por semana, com 50 mL de água por vaso, durante 90 dias.

Para o isolamento foram separadas amostras de 10g de solo e 10g de raízes. Para iniciar o procedimento de isolamento do solo, esse foi homogeneizado e pesada uma amostra contendo 10g. Essa foi transferida para um recipiente contendo 90 ml de solução salina 0,9% esterilizada, que foi agitado por 30 min a 150 rpm.

Para isolamento das bactérias, utilizou-se a metodologia para isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* sp. Realizou-se o procedimento de diluição seriada, com a retirada de 0,1 ml das diluições 10^3 , 10^4 e 10^5 , transferidos para frascos de penicilina contendo cinco ml de meio NFb semi-sólido (DOBEREINER et al., 1995). Para cada diluição, foram utilizadas três repetições, incubadas a 28° C, por sete dias. Após este período, foi observado o desenvolvimento de película na região superficial do meio, para determinar a presença da bactéria. A contagem da população bacteriana foi avaliada pela técnica de número mais provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições. Em seguida, as colônias foram purificadas.

Para isolamento das bactérias da raiz, utilizou-se a metodologia para isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* sp. Foram coletados 10g de raiz, que foram desinfetados com água sanitária 10% por 10 minutos, depois lavados três vezes com água destilada esterilizada. As amostras de raízes foram maceradas e transferidas, posteriormente, para frasco contendo 90 ml de solução salina 0,9%, seguindo o mesmo tempo e rotação descritos acima. Em seguida, processou-se a diluição seriada e de cada tubo, retirou-se 0,1 ml da solução que foi transferido para frascos de penicilina,

contendo cinco ml de meio NFB semi-sólido, descrito por DOBEREINER et al. (1995). Para cada diluição, foram utilizadas três repetições, incubados a 28° C, por sete dias para desenvolvimento da película na região superficial, que indica a presença de colônias bacterianas. A contagem da população bacteriana foi realizada pela técnica de número mais provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições de cada diluição. Em seguida, as colônias que desenvolveram película foram purificadas.

A purificação consistiu em repicar as colônias em meio NFB semi-sólido, por quatro vezes. Após esse processo, repicou-se as bactérias em meio NFB sólido, para obtenção de colônias puras. As culturas puras foram estocadas a -20°C em criotubos contendo glicerol 40%.

2.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS E POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE VEGETAIS

A caracterização fenotípica se iniciou com a análise morfológica realizada a partir do crescimento das colônias em meio Luria Bertani (LB) a 30°C, por 24h. As características observadas foram: diâmetro, borda, forma, elevação e transparência das colônias.

Os testes bioquímicos realizados para os isolados foram teste de Gram, fermentação de glicose e de sacarose, catalase, urease e vermelho de metila (DÖBEREINER et al. 1999) As bactérias foram crescidas em meio LB líquido durante 24 horas a 30 °C. Transferiu-se uma alíquota para os tubos contendo meios específicos para cada teste, em três repetições. Estes foram incubados a 30°C durante 48 horas. Para determinar a presença da enzima catalase, após crescidas as amostras foram transferidas para lâminas de microscopia. Acrescentou-se uma alíquota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). No caso de resultado positivo, houve bolhas, imediatamente, após adição do peróxido de hidrogênio.

Para os testes de potencial de indução de crescimento de plantas, determinou-se a capacidade de solubilização de fosfato e produção de AIA. Para avaliação da solubilização, foi utilizado meio contendo fosfato de cálcio tribásico (10g/L glicose; 5g/L deNH₄Cl; 1g/L de MgSO₄.7H₂O; 4 g/L de Ca₅(OH)(PO₄)₃; 15g/L de Agar; pH 6,5). Os isolados foram previamente crescidos em meio LB líquido a 30 °C por 24 horas. Em seguida, foi transferido 0,1 mL da suspensão bacteriana para placas contendo o meio de fosfato, estabelecendo-se quatro isolados por placa, dispostos em pontos

equidistantes. A avaliação foi conduzida com cinco repetições. Após incubação a 30 °C durante, sete dias, avaliou-se a capacidade solubilizadora de fosfato, mediante presença de halo incolor ao redor das colônias.

A produção de AIA foi avaliada, empregando-se método colorimétrico descrito por Bric et al. (1991), com modificações. Para isso, cada isolado foi inoculado em tubos de ensaio, contendo dois mL do meio de cultivo LB. Os tubos foram incubados por 24h a 30°C. Após esse período foram agitados a 150 rpm, por um período de cinco minutos. Em seguida, acrescentou-se em cada tubo, solução de Salkowski (CATTELAN, 1999), sendo incubada a temperatura ambiente, no escuro, por 2 horas. Verificou-se a mudança da coloração da colônia, que quando positivo, tornava-se rósea.

2.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Todos os isolados obtidos foram submetidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA, para determinação de gênero e ou espécie. Este procedimento foi realizado na EMBRAPA-Agrobiologia (Seropédica – RJ), com a colaboração do Dr. Jerri Edson Zilli.

2.4 POTENCIAL PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS *in vivo*

Devido ao grande número de estudos na cultura do milho com RPCP (MORAIS; BRITO, 2012; CARREIRA, et al. 2012; CHAVES, ZUCARELI, OLIVEIRA JUNIOR, 2013) e também, pela época de implantação do experimento, não ser apropriada ao cultivo do alho, mesmo em casa-de-vegetação, as bactérias foram testadas em milho.

Com as bactérias já caracterizadas fenotipicamente e com as avaliações dos mecanismos de indução de crescimento *in vitro* realizados, foram selecionados cinco isolados que se destacaram nestas avaliações.

O experimento continha oito tratamentos, dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo estes: cinco tratamentos contendo a inoculação de sementes com os isolados selecionados (5E31, 3E13, 3E31, 5E34, 4E332), e três tratamentos-controle, não inoculados, contendo, respectivamente, 0, 50, e 100% da concentração de N recomendada para a cultura, de KNO₃ 1,0 molar (101 g L⁻¹) de acordo com solução de HOAGLAND e ARNON (1950).

Para preparo do inóculo de cada isolado, foi preparado 2L de meio de cultura líquido LB, sendo 250 mL para cada tratamento. Inoculou-se os isolados no meio de

cultivo, deixando em estufa com temperatura de 30°C, durante 24h. As sementes foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 10%, depois lavadas 3x com água destilada estéril. Após esse período, acrescentou-se 20 sementes de milho Status, empresa Syngenta, por frasco, ficando em descanso por 1h. Para as testemunhas, as sementes foram imersas em meio LB, sem inoculação de bactérias. Por fim, as sementes foram dispostas sobre papel toalha para a secagem, durante 1h, em câmara de fluxo laminar.

Os vasos foram autoclavados e após secos, preenchidos com 50% de vermiculita, 25% de areia e 25% de brita. Cada vaso recebeu quatro sementes de milho. Os vasos foram dispostos, de acordo com o sorteio, em delineamento inteiramente casualizado, de maneira que todas as bactérias tivessem as mesmas condições.

A irrigação foi feita com água destilada 50mL por vaso, em dias intercalados. Após sete dias da semeadura, iniciou-se a aplicação da solução de nutritiva baseada em HOAGLAND e ARNON (1950) que era aplicada uma vez por semana. Quando as plantas de milho chegaram ao estágio V3, realizou-se o desbaste, deixando apenas duas plantas por vasos.

A instalação do experimento foi realizada em 26 de novembro de 2014. Aos 90 dias, o experimento foi coletado e foram analisados os seguintes parâmetros: altura da planta em centímetros, utilizando uma fita métrica, que compreendeu a distância entre a região da superfície do solo e a inserção da última folha expandida; peso úmido de raiz e da parte aérea; peso seco do colmo, que ficaram em estufa a 65°C, por 72 horas. Após esse período, foram pesados em balança semi-analítica. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey e Scott-Knott com 5%, significância, utilizando o sistema R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS DOS ISOLADOS

Foram obtidos 27 isolados, todos oriundos das raízes da planta. Do solo, não foram obtidos isolados. Através do meio de cultivo NFB semi-sólido, cria-se um ambiente com baixo nível de oxigênio e não há presença de nitrogênio, semelhante a condições encontradas no solo ou na planta, onde estão localizadas as bactérias diazotróficas associadas a raízes de plantas. No meio de cultivo ocorre o deslocamento das bactérias para o centro do meio, onde a taxa de difusão do O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração da bactéria. Ao atingirem alta concentração de células ocorre o saída de O₂, ativando a nitrogenase (DÖBEREINER et al 1995) (Figura 1).



Figura 1- Crescimento dos isolados em meio NFB semi-sólido, com a formação da película.

Todos isolados demonstraram reação negativa para o teste de Gram, assemelhando-se aos gêneros *Azospirillum* e *Pseudomonas* (SIVA, FELIPE, BACH, 2004; COELHO, 2006). O gênero *Bacillus* pode apresentar espécies de Gram positivas e de Gram negativas (BUGNO et al, 2007; GOMES, 2013; SILVA et al 2005) Em algumas espécies com reação positiva, quando realizado o teste com colônia jovem, pode ocorrer a reação negativa (GOMES, 2013).

Nas avaliações fenotípicas, em relação à estrutura morfológica das colônias, observou-se que: a coloração dos isolados foi para todos, branca. (Tabela 1) Quinze (55,5%) do total dos isolados, apresentaram-se branca opaca e 12 (44,5%), branca translúcida. O diâmetro das colônias variou de 0,5 a 4mm. Em relação à forma, a

circular foi predominante, em 25 (92,6%) e rizoidal, em apenas 2 (7,4%). Quanto ao bordo, 22 (81%) apresentaram-se liso e 5 (19%) ondulado. Referente à elevação das colônias, quinze (55,5%) apresentaram-se convexa e 12 (44,5%) plana.

Tabela 1- Características morfológicas dos isolados.

Isolado	Coloração (Branca)	Diâmetro (mm)	Forma	Bordo	Elevação
5E22	sólida	0,5	circular	lisa	convexa
5E31	sólida	0,5	circular	lisa	plana
3E32	translúcida	1	circular	ondulada	plana
4E12	translúcida	4	circular	lisa	plana
4E22	opaca	1	circular	lisa	convexa
3E13	translúcida	0,5	circular	lisa	plana
4E21	opaca	1	circular	lisa	convexa
3E14	opaca	1	circular	lisa	convexa
4E23	opaca	3	rizoidal	ondulada	plana
4E13	translúcida	1	circular	lisa	plana
4E212	opaca	1	circular	lisa	convexa
4E32	opaca	0,5	circular	lisa	plana
5E32	translúcida	3	rizoidal	ondulada	convexa
3E31	translúcida	0,5	circular	lisa	convexa
5E21	opaca	0,5	circular	lisa	plana
5E34	opaca	1	circular	lisa	convexa
3E21	opaca	1	circular	lisa	convexa
3E11	translúcida	1	circular	lisa	convexa
5E331	translúcida	3	circular	ondulada	plana
4E33	translúcida	0,5	circular	lisa	plana
5E23	opaca	1	circular	lisa	convexa
4E211	translúcida	0,5	circular	lisa	plana
3E13	opaca	1	circular	lisa	convexa
5E332	opaca	0,5	circular	lisa	plana
4E11	translúcida	1	circular	ondulada	convexa
4E332	opaca	2	circular	lisa	convexa
4E333	translúcida	1	circular	lisa	convexa

As características morfológicas observadas nos isolados assemelham-se a características dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Azospirillum* (CARDOSO, 2008; GOMES, 2013; BENTO, 2013).

As avaliações bioquímicas mostraram que para o teste de fermentação de glicose e da sacarose, obteve-se 21 (78%) e 26 (97%) dos isolados positivos, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com características encontradas nos gêneros

bacterianos estudados como RPCP. Bueno (2010) descreve que *Bacillus* possui capacidade de utilização de diversas fontes de carbono, entre elas glicose e sacarose. O *Bacillus*, por sua vez, utiliza-se de glicose para produção de ácidos e hidrolisa amido (LIMA, 2010). Segundo Holt et al (1994), *Azospirillum amazonense* é a única espécie capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono, como glicose e sacarose. As *Pseudomonas* apresentam, também, o potencial de utilização de fontes de C diversas (GOMES, 2015).

Para o teste de vermelho de metila, que verifica a capacidade de produção de diversos ácidos orgânicos, a partir da fermentação da glicose, todos os isolados obtiveram reação positiva, indicando a liberação de acetoína, como principal produto final (RIBEIRO, 2011).

No teste de presença de catalase, os isolados se demonstraram capazes de realizar a liberação de oxigênio, a partir de peróxido de hidrogênio. Essa característica é similar ao dos gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, pois apresentam a liberação de O₂, através da catalase (SILVA, 2013; FERREIRA; KNUPP; MARTIN; DIDONET, 2014; JESUS, 2013).

No teste de urease, observou-se em 100% dos isolados, a alcalinização do meio, através da mudança de coloração do indicador de pH, que de amarelo claro, passou para tons avermelhados, devido aos produtos que indicaram a presença da urease. Os gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, também apresentam a urease, indicando mais uma relação dos isolados com estes gêneros (JESUS, 2013; GOMES, 2013; MANDELBAUM; ALLAN; WACKETT, 1995).

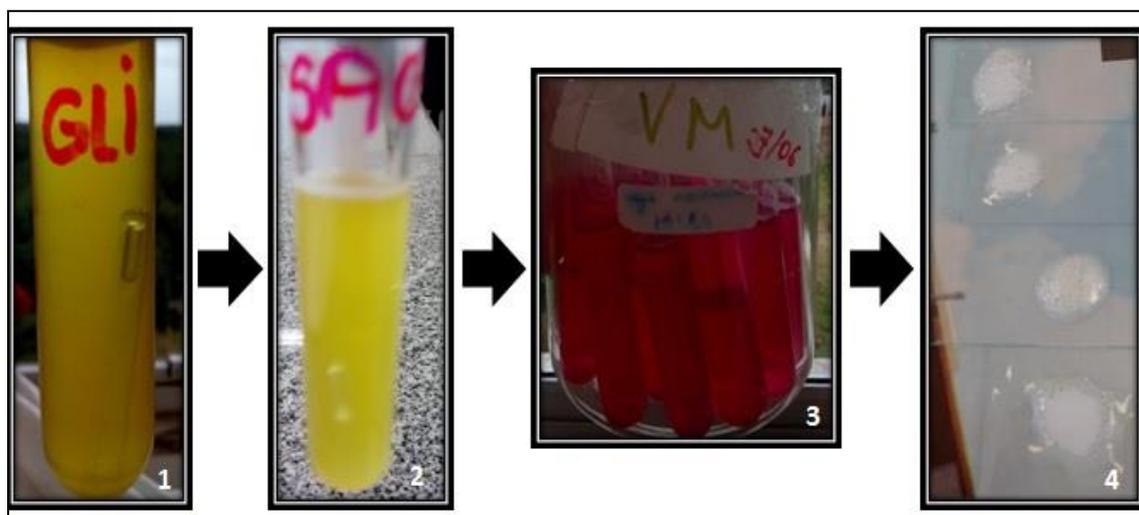


Figura 2- Testes bioquímicos. 1- Fermentação da glicose; 2- Fermentação da sacarose; 3- teste de vermelho de metila; 4- Presença de catalase.

3.2 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO *in vitro*.

As análises de potencial de indução de crescimento vegetal indicaram que 22 (81,5%) dos isolados foram positivos para a produção de Ácido-Indol-Acético (AIA). Kuss (2007) descreve que *Azospirillum* auxilia as plantas, não apenas pela fixação de N₂, mas também, por outros mecanismos, entre eles a produção de fitohormônios, como AIA que beneficia o crescimento radicular das plantas. Como consequência, há o favorecimento na absorção de água e nutrientes (BONILLA, 2011). As *Pseudomonas* sp. isoladas de rizosfera de hortaliças, também apresentaram a capacidade de produção de ácido-indol-acético (COELHO, 2009). Andrade (2012) relata que *Bacillus* pode sintetizar AIA, em cultura de banana, tanto por via dependente do triptofano, quanto por vias alternativas.



Figura 3- Teste de produção de ácido-indol-acético em tubos.

Para a análise de capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, observou-se que 18 (66,66%) dos isolados apresentaram reação positiva. A capacidade de solubilização do fosfato pode auxiliar a planta, em diversas condições em solo. Quando o solo apresenta fosfato na forma P-Ca insolúvel, devido o excesso de calagem, bactérias que possuem essa capacidade de solubilização de fosfato, conseguem ajudar a planta na absorção desse elemento (TIRLONI, 2006). Rodríguez e Fraga (1999) descreveram que *Bacillus* e *Pseudomonas* possuem capacidade de solubilizar compostos

de fosfato inorgânico. O gênero *Azospirillum* realiza a solubilização de fosfato e acelera o processo de mineralização dos nutrientes (OLIVEIRA, 2003).

Os resultados destes testes coincidem com o que é encontrado na literatura, em que a produção de AIA e solubilização de fosfato são comuns entre RPCP. Os isolados demonstraram-se mais capazes de realizar a produção de AIA, comparado à solubilização de fosfato de cálcio.

Tabela 2- Os resultados para os testes Ácido-Indol-Acético e Solubilização de fosfato de cálcio, os isolados que se apresentaram positivos (+) e/ou negativos (-), para os testes de

Isolado	Solubilização	
	de fosfato	AIA
5E22	+	+
5E31	+	-
3E32	+	+
4E12	+	+
4E22	+	+
3E13	+	-
4E21	-	+
3E14	+	+
4E23	-	+
4E13	+	+
4E212	-	-
4E32	-	+
5E32	+	+
3E31	+	+
5E21	-	-
5E34	+	+
3E21	+	+
3E11	-	+
5E331	+	+
4E33	-	+
5E23	-	+
4E211	+	+
3E13	+	+
5E332	+	+
4E11	+	+

4E332	+	+
4E333	+	+

No experimento, nenhum dos parâmetros ultrapassou 10% do coeficiente de variação (CV%), que analisa a precisão do experimento. Pelo teste de F, com nível de significância de 5%, em todos os parâmetros analisados, houve diferença estatística entre os tratamentos.

No teste de médias, utilizando Tukey a 5% de significância, referente ao parâmetro altura de planta, foi obtido o seguinte resultado:

Tabela 3- Teste de Tukey referente a análise de médias de altura de plantas.

Teste de Tukey		
Grupos	Tratamentos	Médias
a	T6	114,375
a	T7	111,625
a	T5	109,375
a	T8	106,25
a	T3	105,875
a	T2	100,25
a	T4	99,25
b	T1	59,875

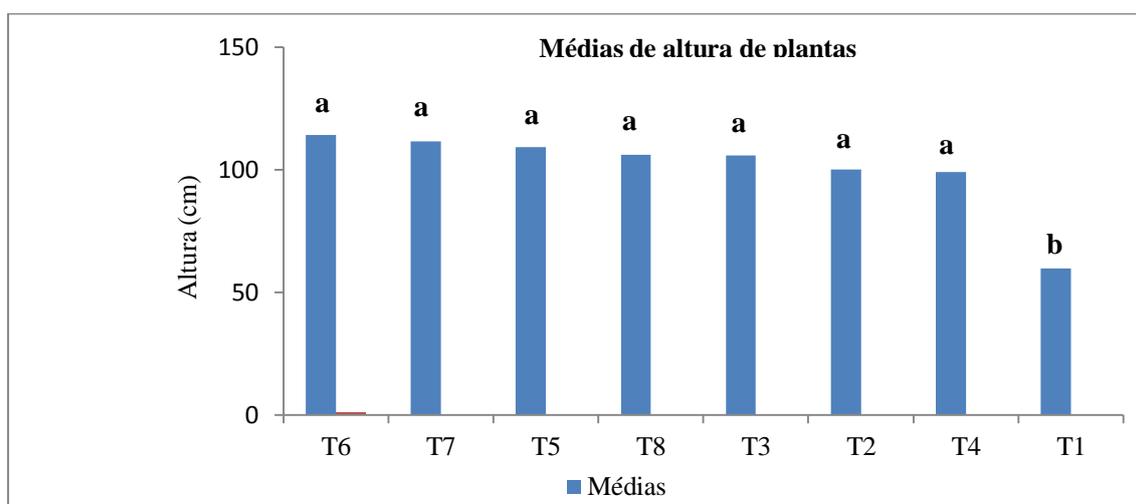


Figura 4- Médias relativas à altura de plantas dos tratamentos (T8= Isolado 5E31; T7= Isolado 5E34; T6=Isolado 3E31; T5= Isolado 4E332 ;T4=.Isolado 3E13; T3= 100% de N; T2=50% de N ; T1= 0% de N).

Pode-se observar que referente à altura de plantas, o único tratamento que diferiu estatisticamente foi o sem adubação nitrogenada. Os demais não diferiram entre si. Os tratamentos T6, T7, T5, T8 que foram inoculados com isolados, não difeririam estatisticamente do tratamento com a adubação recomendada de 100% N. Pode-se observar que os isolados apresentaram médias de alturas (Figura 4), semelhante ao da adubação de 100% de nitrogênio, indicando que os isolados foram capazes de manter o crescimento da planta, tanto quanto o tratamento de 100% de N. Este resultado coincide com os de outros trabalhos que utilizaram para inoculação de milho, *A. brasiliense*, estirpes BR11005 - Sp 245, AbV5 e AbV6, que proporcionaram plantas maiores e mais vigorosas (PEDRINHO, 2009; BASI, 2013). O mesmo foi observado quando *B. subtilis*, linhagem OG foi inoculado em feijão. Lazzareti e Melo (2005) observaram esse auxílio no crescimento da cultura. Oliveira (2010) também descreve que a inoculação com *Pseudomonas fluorescens* proporcionou maior altura de plantas de milho e tamanho de espiga.



Figura 5- Experimento aos 90 dias. Diferença entre tratamentos utilizados no experimento.

Para o peso seco e úmido do colmo, pelo teste de Tukey, obteve-se os seguintes resultados:

Tabela 4- Análise de média dos tratamentos, referente peso seco (A) e úmido (B) da parte aérea.

Teste de Tukey			Teste de Tukey		
Grupos	Tratamentos	Médias	Grupos	Tratamentos	Medias
a	T2	21,11	a	T3	147,742
a	T3	18,12	a	T8	129,170
a	T8	15,01	a	T2	129,012
a	T7	14,55	a	T7	122,290
a	T5	14,23	a	T6	122,115
a	T6	13,51	a	T5	118,322
a	T4	12,27	a	T4	108,842
b	T1	2,57	b	T1	22,575
A			B		

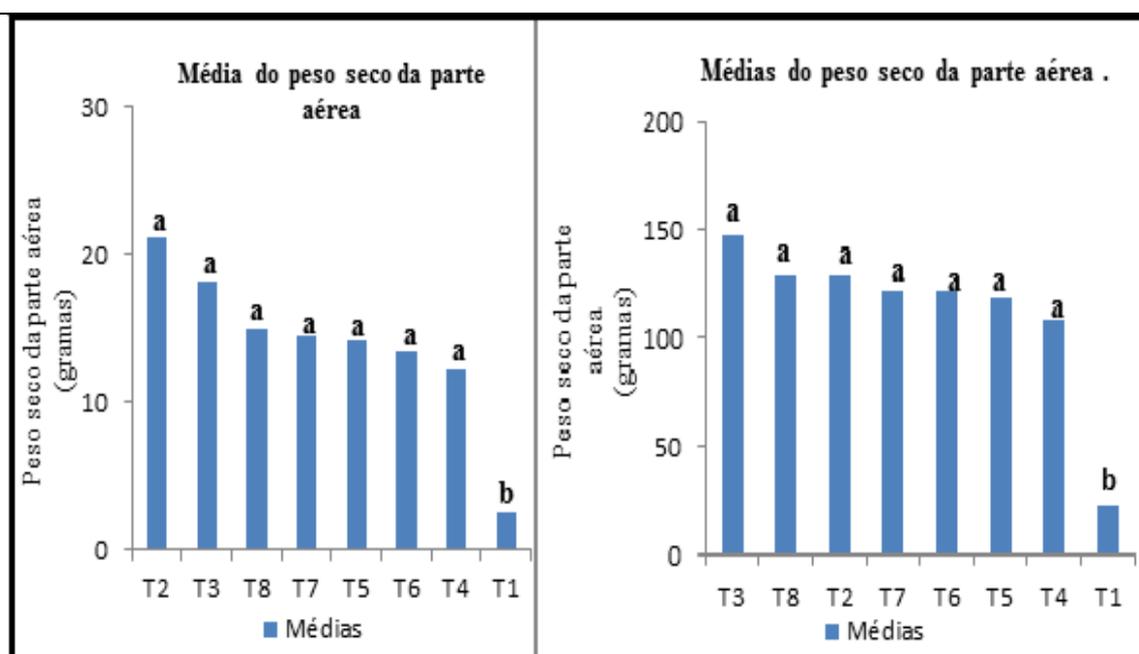


Figura 6- Média relativa ao peso seco (A) e úmido(B) da parte aérea..(T8= Isolado 5E31; T7= Isolado 5E34; T6=Isolado 3E31; T5= Isolado 4E332 ; T4=.Isolado 3E13; T3= 100% de N; T2=50% de N ;; T1= 0% de N).

A análise referente ao peso seco de colmo, demonstrou que os tratamentos com os isolados, foram semelhantes estatisticamente, ao tratamento com 100% e 50% da adubação nitrogenada indicada (Figura 6), sugerindo, a eficiência das bactérias no auxílio ao desenvolvimento de milho. Os resultados obtidos com os isolados concordam com trabalhos desenvolvidos com os gêneros *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, que descrevem o potencial desses, no desenvolvimento de milho. Ramos et al (2010)

citaram que a interação de *A lipoferum* estirpe BR 11084, com milho, apresentou satisfatório desenvolvimento da cultura analisada, tanto quanto a adubação nitrogenada. Mirini (2012) descreveu que ocorreu desenvolvimento adequado no estágio vegetativo de milho, quando presente bactérias do gênero *A brasiliense* Ab-V5 e Ab-V6, associada à adubação nitrogenada. Em relação à massa seca da parte aérea, também obteve respostas positivas.

Lima (2010) e Lazzareti e Melo (2005) descreveram que *Bacillus* apresentaram efeito positivo no desenvolvimento de plantas de milho e feijão. Na cultura de milho, quando associado *B. subtilis* (PRBS-1 e linhagem OG) com adubação nitrogenada, ocorreram respostas efetivas no crescimento e produtividades de grãos (LIMA, 2010).

Para as bactérias do gênero *Pseudomonas*, não se encontrou trabalhos relacionados ao peso de colmo. Porém, Oliveira (2010) descreve que *Pseudomonas* auxiliaram plantas de milho em seu crescimento, além de aumentar o comprimento e diâmetro de espigas.

Os resultados referentes aos testes de médias de Tukey referentes ao peso úmido das raízes estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 5- Análise de médias pelos teste de Tukey, referente ao peso úmido das raízes.

Teste de Tukey			
Grupos	Tratamentos	Médias	Médias Transformadas
a	T8	5,344	233,262
a	T7	5,291	205,072
a	T6	5,283	223,227
a	T3	5,089	165,115
a	T2	4,742	128,672
a	T5	4,726	119,180
a	T4	4,549	96,990
a	T1	4,48	93,740

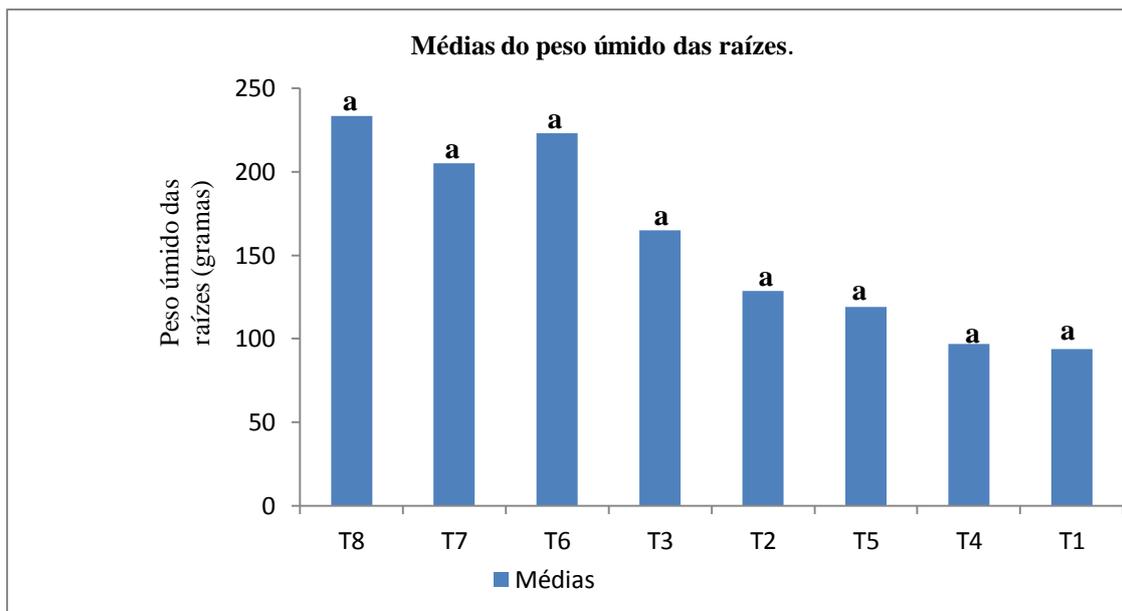


Figura 7- Média relativa do teste de Tukey, referente ao peso úmido das raízes dos tratamentos (T8= Isolado 5E31; T7= Isolado 5E34; T6=Isolado 3E31; T5= Isolado 4E332 ;T4=.Isolado 3E13; T3= 100% de N; T2=50% de N ;; T1= 0% de N).

O teste de Tukey não apresentou diferença estatística entre os tratamentos. Um fator que pode ter interferido nos resultados, é o grande desenvolvimento das raízes secundárias, que devido ao baixo volume do vaso (4,5L), para o tempo de 90 dias apresentaram um grande desenvolvimento, aderindo-se extremamente ao substrato, interferindo á coleta adequada das raízes.



Figura 9- Desenvolvimento das raízes de milho (*Zea mays*) no vaso.

3.3 IDENTIFICAÇÃO GÉNÉTICA DOS ISOLADOS

A identificação dos isolados por sequenciamento do gene 16S rRNA indicou que 14 isolados pertencem a espécie *Bacillus subtilis*.

Este resultado está de acordo com a caracterização fenotípica dos isolados utilizada, visto que muita das características condiz com aquelas observadas em *Bacillus*..

O *Bacillus subtilis* também apresenta a característica de fixação de N₂, assemelhando com a característica encontrada na formação de película no meio NFB semi-sólido e formato de colônia semelhante (ARAÚJO & HUNGRIA, 1999; FILHO, FERRO, PINHO, 2010).

Andrade (2012) e Lazzaretti e Melo (2005), descrevem o potencial de *B subtilis*, para produção de AIA, e também para solubilização de fosfato, auxiliando no crescimento de planta de feijão e banana. Assemelhando-se aos resultados encontrados nos testes realizados *in vitro* com os isolados.

Os demais isolados (treze), não apresentaram amostra de DNA suficiente para identificação. Isto será feito posteriormente.

4 CONCLUSÃO

Apesar da importância das avaliações fenotípicas, para caracterização dos isolados, estas tiveram que ser complementadas com a caracterização genética, pois, não foram suficientes para diferenciação de gêneros. O teste de Gram, quando realizado em cultura muito novas, no caso do gênero *Bacillus*, pode apresentar reações dúbias.

O sequenciamento mostrou que a maioria dos isolados pertence à espécie *Bacillus subtilis*.

Os cinco isolados testados *in vivo* apresentaram potencial para promoção de crescimento da cultura de milho (*Zea mays*).

Os isolados devem ser avaliados em condições de campo, com milho e alho, pois foi desta última cultura que foram isolados, para demonstrar, efetivamente, o desempenho destas bactérias, em toda fase de desenvolvimento das plantas.

Isolation and characterization of rhizobacteria garlic (*Allium sativum*) and corn growth promotion (*Zea mays*).

Mariane da Rosa Leoncio

Abstract

Garlic has great economic and social importance in Santa Catarina. The use of chemical fertilizers increase the production cost and may cause environmental damage. The Rhizobacteria Plant Growth Promoters (PGPR) can be alternatives to the use of inputs. Among the PGPR, the most studied are genera *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* fluorescent group has demonstrated benefits for the growth of various plant species. In this context, this study aimed to characterize biochemical, phenotypic and morphologically, PGPR isolates obtained from garlic rhizosphere grown in greenhouse and perform in vivo test with corn, also in greenhouse. Biochemical tests have been used Methyl Red (VM), glucose and sucrose fermentation, catalase production and hydrolysis of urea. The plant growth inducing potential was conducted by the IAA reviewed production capacity (indole acetic acid) and solubilizing vitro calcium phosphates. 27 isolates were obtained. For biochemical testing glucose, 21 strains were positive and 26 were positive sucrose. For the other tests were all positive. It was found that 81.5% and 66.6% of the isolates showed production IAA and ability to solubilize phosphate, respectively. The in vivo test with corn (*Zea mays*) indicated that three bacteria (3E31, 5E34, 4E332) indicated similarity with treatment with 100%. The tested isolates were identified 16S rRNA gene amplification that showed similarity of 14 (51, 85%) with *Bacillus subtilis*, including those tested in vivo. It can be said that these microorganisms have the potential to promote the growth of this culture.

Keyword : Promoting Growth. Rhizobacteria . Liliaceae . Corn.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, J.; FERNANDO, R.; CAMEIRA, M. R. **Avaliação do potencial de redução de lixiviação de nitratos na zona vulnerável nº1.** 2007. Disponível em: <<http://www.cotr.pt/informacao/web/Artigos/10.PDF>>. Acesso em: 14 set. 2014.
- ANDRADE, L. F. **Bactérias endofíticas de bananeira "prata-anã": fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético.** 2012. Disponível em: <http://www.producaovegetal.com.br/arquivos_upload/editor/file/Dissertacao_leandro_andrade.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2015.
- ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciênc. agrotec.** vol.32 no.2 Lavras Mar./Apr. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000200017>>. Acesso em: 14 nov. 2015.
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesq. agropec. bras.** vol.34 no.9 Brasília Sept. 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X1999000900014>>. Acesso em: 14 nov. 2015.
- ASSUMPÇÃO, L. C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. Agropec. Bras., Brasília**, v.44, n.5, p.503-510, maio 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v44n5/v44n5a10.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2015.
- BASI, S. **Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho.** 2013. Dissertação de mestrado. Disponível em: <http://tede.unicentro.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=213>. Acesso em: 23 set. 2015.
- BENTO, M. A. O. **Prospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias da serrapilheira e do solo em área de floresta atlântica do norte fluminense.** 2013. Disponível em: <<http://uenf.br/pos-graduacao/producao-vegetal/files/2014/06/DISSERTAÇÃO-FINAL-REVISADA-manu.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2015.
- BONILLA, G. A. E. **Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz.** 2011. Disponível em: <<http://cursos.ufrj.br/posgraduacao/ppgf/files/2013/08/Dissertação-PPGF-German-Andrés-Estrada-Bonilla.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2015.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. **Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.535-538, 1991.
- BRUNETTA, J. M. F. C. **Isolamento e seleção de rizobactérias para produção de mudas de *Pinus spp.*** 2006. 35 f. Tese. (Doutorado em Ciência Florestal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BUENO, S. M. et al. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Quím. Nova** vol.33 n.7 São Paulo 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700026>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

BULLA, Di.; BALBINOT JUNIOR, A. A. **Inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasiliense* em diferentes doses de nitrogênio**. 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101915/1/Inoculacao-de-sementes-de-milho-com-Azospirillum-brasiliense-em-diferentes-doses-de-nitrogenio.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2015.

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA, T.; AURICCHIO, M. T. Detecção de bactérias gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 2007, vol.66, n.2, pp. 172-175. ISSN 0073-9855. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007398552007000200014&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 14 nov. 2015.

CAVALLET, L. E. et al. **Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.*** 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662000000100024>. Acesso em: 25 maio 2015.

CARREIRA, F. S. et al. **Efeito da *Azospirillum brasiliense* na produtividade de milho no sudoeste goiano**. 2012. Disponível em: <<http://rioverde.ifgoiano.edu.br/wp-content/uploads/dppg/resumos/iniciacao/agronomia/Efeito-da-Azospirillum-brasilense-na-produtividade-de-milho-no-sudoeste-goiano.pdf>>. Acesso em: 26 maio 2015.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA soja, 1999. 36p. (EMBRAPA soja. Documentos 139).

CHAVES, D. P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 57-72, jan./fev. 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/9543>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

COELHO, L. F. **Interação de *Pseudomonas spp.* e de *Bacillus spp.* com diferentes rizosferas**. 2009. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/posgraduacao/dissertacoes/pb1802804.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, 1995. 60 p.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*oryza sativa l.*) influenciado pela inoculação com bactérias

promotoras de crescimento de plantas. **Biosci. J. Uberlândia**, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014. Disponível em: <file:///C:/Users/Mariane/Downloads/18043-98408-1-PB.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2015.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C.. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** v. 4, n. 2, p. 12, 2010. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppga/arquivos/files/dissertacao ferreira.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2015

GOMES, M. J. P. **Gênero *Bacillus* spp.** 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero Bacillus 4-2013-1 versão 2013.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2015.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Pseudomonas* spp.** 2015. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero Pseudomonas e Burkholderia 4-2015_1.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2015.

HARTMANN A, MAHAVIR S, KLIGMALLER W. (1983) **Isolation and characterization of Azospirillum mutants excreting high amounts of indole acetic acid.** Canadian Journal of Microbiology, 29:916-922.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil.** California Agriculture Experimental Station Circular, 1950. 347 p.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9. ed. Baltimore: **Williams & Wilkins**, 1994. 787 p.

JESUS, J. A. **Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas.** 2013. Disponível em: <http://uenf.br/pos-graduacao/producao-vegetal/files/2014/08/Jucimara.pdf>. Acesso em: 22 set. 2015.

LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. **Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro.** Jaguariuna: EMBRAPA, 2005.

LEONÊZ, A. C. **Alho: Alimento e Saúde.** 2008. Disponível em: <http://bdm.unb.br/bitstream/10483/327/1/2008_AnaClaudiaLeonez.pdf>. Acesso em: 27 set. 2014.

LIMA, F. F. ***Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho.** 2010. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppga/arquivos/files/dissertacao ferreira.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2015.

LOPER, J. E., BUYER, J. S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Molecular plant-microbeinteraction, St Paul**, v. 4, p. 5-13, 1991.

LUCINI, M. A. **O alho no Brasil**: um pouco da história dos números do nobre roxo. Curitiba: EPAGRI, 2008.

LUCINI, M. A. **Conselhos para o plantio de alho**. Curitiba: EPAGRI, 2010. Disponível em: <<http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/tecnologia/conselhos.pdf>>. Acesso em: 21 set 2015.

MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L.; WACKETT, L. P. **Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine**. 1995. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/61/4/1451.full.pdf+html>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

MIRINI, D. **Resposta de híbridos de milho à associação com *Azospirillum brasiliense* e adubação nitrogenada**. 2012. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/tede/tde_arquivos/3/TDE-2012-12-15T110447Z-850/Publico/Deniele_Marini.pdf>. Acesso em: 29 set. 2015.

MORAIS, T. P.; BRITO, C. H. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasiliense* em híbridos de milho**. 2012. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/1712>>. Acesso em: 26 maio 2015.

MOREIRA, F. M. S. et al. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações**. 2010. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/896224/1/Bacteriasdiazotroficasassociativasdiversidadeecologiaepotencialdeaplicacoes.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2015.

OLIVEIRA, A. L. M. de; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: CNPAB, ago. 2003. 40 p. (**EMBRAPA-Agrobiologia. Documentos, 161**).

OLIVEIRA, M. A. de et al. **Adubação fosfatada associada à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desempenho agronômico do milho**. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v38n1/v38n1a04.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2015

OLIVEIRA, M. A. **Adubação mineral e inoculação a base de *Pseudomonas fluorescens* na cultura do milho**. 2010. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp129639.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2015

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103918/pedrinho_ean_dr_jabo.pdf?sequence=1>. Acesso em: 23 set. 2015.

Prefeitura Municipal de Curitiba. (2013). Localização do município. Disponível em: <<http://gpm.fecam.org.br/curitiba/cms/pagina/ver/codMapaItem/15395>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

PONS, A. L. Instituto de Pesquisa Agropecuária. **IP AGRO**, n. 23, p. 51,1980.

RAMOS, A. S. et al. **Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho.** 2010. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0C CwQFjACahUKEwi9t42_n5zIAhXFDpAKHdgABxI&url=http://www.gvaa.org.br/revista/index.php/RVADS/article/download/348/pdf_18&usg=AFQjCNGEtp3Vy5zd03hB WIMZvWwVTC72gQ&sig2=TWcqh83dXS wXdoSHgZEaHQ&bvm=bv.103627116,d.Y2I&cad=rja>. Acesso em: 22 set. 2015.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. **Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.** *Biotechnology Advances* **17** (1999) 319–339. Disponível em: <<http://www.bashanfoundation.org/hilda/hildaphosphate.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

SILVA, L. A. D. **Queratinases de *Bacillus subtilis* S14: produção, expressa e análise de enzimas mutantes.** 2013. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/90480/000912476.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 13 nov. 2015.

SILVA, C. M. R. **Uso do teste de Scott-Knott e da análise de agrupamentos, na obtenção de grupos de locais para experimentos com cana-de-açúcar.** 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11134/tde-12032008-151057/publico/cristianemarianadasilva.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, T. A.; BACH, E. E. **Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033).** 2004. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/929/92900304.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

SILVA, P. et al. **Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo.** Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/download/23479/24336>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C.S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. *Ciência Agrária, Londrina*, v.23, p.53-60, 2007.

TIRLONI, C. **Adição de ácido cítrico mais ativador enzimático e calagem na disponibilidade e movimentação de íons no solo.** 2006. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp027434.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2015.

VOISARD, C. et al. **Biocontrol of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches.** In: O’GARA, F., DOWLING, D. N., BOESTEN, B. (eds). *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms.* Germany: VCH, 1994. p. 67-89.