



Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM
ATIVIDADES PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO COMUM**

CLÁUDIA MARIA DA SILVA

2018

CLÁUDIA MARIA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM ATIVIDADES
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO
COMUM**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Doutora”.

Orientadora
Prof.^a Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro

JANAÚBA
2018

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

S586c Silva, Cláudia Maria da
Prospecção de rizobactérias com atividades promotoras de crescimento do feijoeiro comum [manuscrito] / Cláudia Maria da Silva. – 2018.
104 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2018.
Orientadora: Prof.^a Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Feijão. 3. Fosfatos. I. Ribeiro, Regina Cássia Ferreira. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 635.652

Catálogo: Joyce Aparecida Rodrigues de Castro Bibliotecária CRB6/2445

CLÁUDIA MARIA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS COM ATIVIDADES
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DO FEJJOEIRO
COMUM**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Doutora”.

Aprovada em 29 de Junho de 2018.

Prof.^a Dra. Regina C. F. Ribeiro
(Orientadora)
UNIMONTES

Prof.^a Dra. Adelica A. Xavier
(Coorientadora)
UNIMONTES

Prof. Dr. Edson Hiydu Mizobutsi
UNIMONTES

Prof. Dr. José Augusto S. Neto
UNIMONTES

Prof. Dr. Sérgio A. Mota Nobre
UNIMONTES

Pesq.^a Dra. Alniusa Maria de Jesus
EPAMIG

**JANAÚBA
2018**

Aos meus pais, Francisco e Maria, e à minha avó, Alzira (in memoriam).

Dedico.

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte não temerei mal nenhum, porque Tu estás comigo (...).”
(Salmo 23.4)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força e coragem a cada dia para seguir em frente e por colocar as pessoas certas para me auxiliarem a cumprir essa jornada.

À minha família, muito obrigada. Cada um, à sua maneira, foi fundamental nessa jornada. Souberam me incentivar, lidando com as minhas inseguranças e foram meu exemplo de perseverança, integridade, honestidade e humildade.

Ao meu esposo, Autair Cleiton de Moraes, que foi paciente e compreensivo durante os momentos de minha ausência para a dedicação ao Doutorado. Agradeço, também, por ter me dado Heitor, o maior presente que já ganhei em minha existência. Sinto-me mais feliz e abençoada com essa vida que estou gerando e, por isso, agradeço também a Heitor, por ter me dado a calma necessária para finalizar este trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Regina e à Coorientadora Prof.^a Dra. Adelica, por me receber no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido e por ter compartilhado o conhecimento necessário. Agradeço também pela paciência, dedicação e esforço para a conclusão dessa jornada.

Ao Prof. Dr. José Augusto, por ter auxiliado em várias fases deste experimento e, principalmente, pela paciência e por estar sempre disposto a compartilhar o seu conhecimento.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pela disposição de tempo para contribuir na melhoria deste trabalho.

Eterna gratidão aos colegas do laboratório de Fitopatologia da Unimontes pelo convívio agradável, em especial àqueles que foram fundamentais para a execução deste trabalho: Isabelle, Gleika, Thaís, Renato e Helena. Agradeço a vocês pelo compromisso e seriedade durante o auxílio.

Ao Prof. Dr. Abner e à Doutoranda Marina, membros do laboratório de Grandes Culturas da Unimontes, pela doação das sementes de feijão.

Aos colegas de trabalho da UFVJM e da FAVENORTE pelo apoio e torcida. Em especial, àqueles dos Laboratórios de Química e de Biologia, e Técnicos Administrativos I, e às Diretoras Prof. Dr^a Renata e Prof. Dr^a Patrícia da UFVJM.

À CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa e à Universidade Estadual de Montes Claros, pelo ensino gratuito e de qualidade ofertado durante toda a minha vida acadêmica. Tenho orgulho de ter nascido e crescido profissionalmente nesta Universidade e dizer que sou fruto da Unimontes.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO GERAL	4
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3 REFERENCIAL TEÓRICO	7
3.1 Rizobactérias promotoras de crescimento	7
3.1.1 Aspectos gerais	7
3.1.2 Mecanismos de promoção de crescimento em plantas	8
3.1.2.1 Solubilização de fosfato inorgânico	9
3.1.2.2 Produção de ácido indol-3-acético	11
3.1.2.3 Fixação biológica de Nitrogênio	14
3.1.2.4 Produção de sideróforos	16
3.1.2.5 Produção de enzimas	19
3.2 A cultura do Feijão	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE BANANEIRA PRATA-ANÃ	38
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Seleção dos isolados e preparo das suspensões bacterianas	42
2.2 Solubilização de fosfato inorgânico a partir de diferentes fontes de fósforo	44
2.3 Quantificação da solubilização de fosfato inorgânico	44
2.4 Detecção da atividade da fosfatase ácida	45
2.5 Quantificação da produção de Ácido indol-3- acético	45
2.6 Atividade de fixação de nitrogênio	46
2.7 Produção de sideróforos	47
2.8 Produção de enzimas	47
Lipase	47
Protease	48
Quitinase	48
2.9 Análises estatísticas	48

3 RESULTADOS	49
3.1 Solubilização de fosfato inorgânico e atividade da fosfatase ácida	49
3.2 Quantificação da produção de ácido indol-3-acético.....	54
3.3 Produção de sideróforos	55
3.4 Produção de enzimas	56
Lipase	56
3.5 Atividade de fixação de nitrogênio, produção de protease e produção de quitinase	58
4 DISCUSSÃO	59
4.1 Solubilização de fosfato e atividade da fosfatase ácida.....	59
4.2 Quantificação da produção de ácido indol-3-acético.....	62
4.3 Produção de sideróforos	64
4.4 Produção de enzimas	66
5 CONCLUSÕES	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO II - DESEMPENHO DO FEIJOEIRO COMUM INOCULADO COM BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO	76
RESUMO	76
ABSTRACT	77
1 INTRODUÇÃO	78
2 MATERIAL E MÉTODOS	80
2.2 Tratamento de sementes com rizobactérias no desenvolvimento e produção de feijoeiro adubado com duas fontes de fósforo	80
3 RESULTADOS	83
3.1 Tratamento de sementes com rizobactérias no desenvolvimento e produção de feijoeiro adubado com duas fontes de fósforo	83
3.2 Análise foliar	93
4 DISCUSSÃO	96
5 CONCLUSÕES	101
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

RESUMO GERAL

SILVA, Cláudia Maria. **Prospecção de rizobactérias com atividades promotoras de crescimento do feijoeiro comum**. 2018. 104 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG¹.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa muito consumida no mundo e o seu cultivo é uma das atividades mais importantes na economia brasileira. A produtividade do feijão pode ser afetada pela deficiência de minerais do solo e pelo ataque de patógenos e insetos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar, fisiologicamente, isolados de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e investigar o potencial de rizobactérias solubilizadoras de fosfato no desenvolvimento do feijoeiro comum em casa de vegetação. Para a caracterização fisiológica, foram utilizados 86 isolados oriundos de raízes de bananeira Prata-Anã coletados na região Norte do Estado de Minas Gerais. Todos os isolados foram submetidos às avaliações de atividade bioquímica, conforme protocolos estabelecidos, para a solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético, fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e produção das enzimas lipase, protease e quitinase. Nove isolados solubilizadores de fosfato foram levados para casa de vegetação para avaliar o desempenho do feijoeiro comum em resposta à microbiolização das sementes com rizobactérias. O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados, com 6 repetições, em esquema fatorial $9 \times 2 + 2$, sendo nove isolados de rizobactérias e duas fontes de fósforo (Fosfato Natural de Gafsa e super simples). Os tratamentos adicionais constituíram das duas fontes de fósforo sem bactéria. Os dados obtidos para o experimento *in vitro* foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, ao teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade, para comparação das médias. Os dados dos atributos agronômicos do feijoeiro foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial e, quando significativos, ao teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade, para comparação das médias. Os tratamentos foram comparados com o tratamento adicional pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. As rizobactérias avaliadas apresentaram potencial para a solubilização de fosfato de cálcio tribásico inorgânico, além de possuir habilidade para a produção da fosfatase ácida. Em contrapartida, todos os isolados avaliados quanto à solubilização de fosfato de alumínio e de ferro foram negativos. Dos 86 isolados investigados, 54,6% formaram halo de solubilização característico para fosfato de cálcio tribásico inorgânico, 7% foram produtoras de AIA, somente quando submetidas à via do Tryptofano, 27,9% foram produtores de sideróforo, e 47,7% foram produtores de lipase. Todos os isolados avaliados neste trabalho foram negativos para a atividade da fixação de nitrogênio, além de não serem produtoras de protease e quitinase. As rizobactérias associadas às fontes de fosfato promoveram aumento nas variáveis de crescimento e produção de plantas. Quatro rizobactérias associadas ao super simples aumentaram o teor de fósforo na parte aérea em relação ao super simples isolado. Oito rizobactérias associadas ao super simples aumentaram a absorção de fósforo em relação ao fosfato natural de gafsa. Nenhuma das rizobactérias promoveu aumento no acúmulo de fósforo a partir do fosfato natural de gafsa. Conclui-se que as rizobactérias avaliadas são solubilizadoras de fosfato, produtoras de AIA e de sideróforos, além de produtoras da enzima lipase. As rizobactérias avaliadas promovem incremento aos atributos agronômicos avaliados e aumento na absorção de fósforo.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento, *Phaseolus vulgaris*, *Bacillus* sp.,

¹ Comitê orientador: Prof.^a Regina C. F. Ribeiro DCA/UNIMONTES (Orientadora); Prof.^a Adélica Aparecida Xavier- DCA/UNIMONTES (Coorientadora). Prof. Dr. José Augusto S. Neto - DCA/UNIMONTES (Conselheiro).

Lysinibacillus sp., *Paenibacillus* sp., Fosfato de cálcio.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Cláudia Maria. **Prospection of common bean growth promoting rhizobacteria**. 2018. 104 p. Thesis (PhD in Crop Production in the Semi-Arid) – State University of Montes Claros, Janaúba, MG².

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a very consumed legume in the world and its cultivation is one of the most important activities in the Brazilian economy. Bean productivity can be affected by soil mineral deficiency and by pathogen and insect attack. The objective of this work was characterize physiologically isolated of plant growth promoting rhizobacteria and investigate the potential of rhizobacteria solubilizing phosphate in the development of common bean in greenhouse. For the physiological characterization, were used 86 isolates from Prata-anã banana roots collected in the northern region of the State of Minas Gerais. All isolates were submitted to biochemical activity evaluations, according to established protocols, for phosphate solubilization, indole-3-acetic acid production, biological nitrogen fixation, siderophores production and production of lipase, protease and chitinase enzymes. Nine phosphate solubilizers were taken into greenhouse to evaluate the performance of common bean in response to the microbiolization of the seeds with rhizobacteria. The experiment was carried out in a randomized complete block design, with 6 replicates, in a 9x2 + 2 factorial scheme, nine of which were rhizobacteria isolates and two phosphorus sources (Gafsa and Super Simple Natural Phosphate). The additional treatments consisted of two sources of phosphorus without bacteria. The data obtained for the in vitro experiment were submitted to analysis of variance and, when significant, to the Scott and Knott test, at 5% probability, for comparison of the means. The agronomic attributes data of the bean were submitted to analysis of variance in factorial escheme and, when significant, to the Scott and Knott test, at 5% probability, for comparison of the means. Treatments were compared with the additional treatment by the Dunnet test at 5% probability. The evaluated rhizobacteria presented potential for the solubilization of inorganic tribasic calcium phosphate, besides being able to produce the acid phosphatase. In contrast, all the isolates evaluated for solubilization of aluminum phosphate and iron phosphate were negative. Of the 86 isolates investigated, 54.6% formed characteristic solubilization halo for inorganic tribasic calcium phosphate, 7% were EIA producers, only when submitted to the Tryptophan path, 27.9% were siderophore producers, and 47.7% were lipase producers. All the isolates evaluated in this work were negative for nitrogen fixation activity, besides not producing protease and chitinase. The rhizobacteria promoted increase in biomass for the evaluated attributes. It is concluded that the rhizobacteria evaluated are phosphate solubilizers, producing AIA and siderophores, as well as lipase enzyme producers. The evaluated rhizobacteria increase the agronomic attributes evaluated. Of the 86 isolates investigated, 54.6% formed characteristic solubilization halo for inorganic tribasic calcium phosphate, 7% were AIA producers, only when submitted to the Tryptophan path, 27.9% were siderophore producers, and 47.7% were lipase producers. All the isolates evaluated in this work were negative for nitrogen fixation activity, besides not producing protease and chitinase. The rhizobacteria promoted increase in biomass for the evaluated attributes. It is concluded that the rhizobacteria evaluated are phosphate solubilizers, producing AIA and siderophores, as well as lipase enzyme producers. The evaluated rhizobacteria increase the agronomic attributes evaluated.

Key words: Growth promoting bacteria, *Phaseolus vulgaris*, *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Paenibacillus* sp., Calcium phosphate.

²Steering committee: Prof.^aRegina C. F. Ribeiro DCA/UNIMONTES (Advisor); Prof.^aAdelica Aparecida Xavier-DCA/UNIMONTES (Co-advisor). Prof. Dr. José Augusto S. Neto - DCA/UNIMONTES (Counselor).

1 INTRODUÇÃO GERAL

As culturas para apresentarem alta produtividade necessitam ser provenientes de sementes sadias e/ou certificadas; estas devem ser semeadas em solo adequadamente preparado; as plantas devem ser submetidas ao manejo correto de irrigação, de nutrição e de insetos e patógenos. No entanto, a utilização de aplicações contínuas de adubos e agrotóxicos para o controle de doenças tem gerado impactos ambiental e econômico. Neste sentido, pesquisas têm sido realizadas com rizobactérias visando à sua utilização como biofertilizantes no crescimento de plantas (BASHAN et al., 2014; MAJEED et al., 2015) e produtos biológicos de controle de fitopatógenos (GHOSH et al., 2015; TORRES et al., 2017). Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) são microrganismos capazes de colonizar as raízes, podendo beneficiar a planta de diversas maneiras (SOUZA et al., 2016; NGHIA et al., 2017).

No crescimento de plantas, estudos apontam que os mecanismos, frequentemente envolvidos no aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, como o fósforo, ocorrem por meio da solubilização de fosfato (KUMAR et al., 2015) e do ferro, por meio da produção de sideróforos (GHOSH et al., 2015). Algumas rizobactérias são produtoras de fitormônios (como as auxinas, giberelinas e citocininas) (ALMONEAFY et al., 2014; NGHIA et al., 2017) e outras estão envolvidas na fixação biológica de Nitrogênio (FBN) (BALDANI et al., 2014; SAAVEDRA et al., 2017).

Os mecanismos de antagonismo direto relacionados ao controle biológico de fitopatógenos, normalmente, envolvem a produção de enzimas líticas como lipases (TIPRE; PINDI; SHARMA, 2015), proteases e quitinases (DUTTA; THAKUR, 2017), antibióticos (ROCHA; MOURA, 2013; GONG et al., 2014; PRABHUKARTHIKEYAN; KEERTHANA; RAGUCHANDER, 2018). Esses compostos inibem o crescimento de diversos microrganismos fitopatogênicos, promovendo, portanto, um eficiente controle biológico na natureza (JHA et al., 2013; MAJEED et al., 2015) (SHARMA; SHARMA, 2017). Por isso, trabalhos vêm sendo realizados com a utilização de rizobactérias com o objetivo de estudar sua ação contra fitopatógenos e promover a melhoria nas características agrônômicas de plantas cultivadas (JHA et al., 2013; GHOSH et al., 2015; DUTTA; THAKUR, 2017).

A produtividade do feijão pode ser afetada por diversos fatores, dentre os quais se destacam a dificuldade na absorção de minerais do solo, especialmente o fósforo e o ataque de uma grande diversidade de patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, o que pode

causar prejuízos à produtividade(GALON et al., 2017). Neste sentido, a investigação de alternativas para a melhoria da absorção de nutrientes do solo e o controle de patógenos é importante para o sucesso do cultivo do feijão, podendo ser realizado por vários métodos, como o químico e o biológico(JHA et al., 2013).

Os métodos químicos são muito utilizados, porém, o elevado preço e a preocupação ambiental são questões da agricultura que devem ser consideradas(MAJEED et al., 2015). Por isso, os agentes biológicos, quando comparados aos métodos químicos, podem ser vantajosos por serem economicamente viáveis e por minimizarem o dano ambiental(JHA et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar fisiologicamente isolados de rizobactérias e investigar o potencial de rizobactérias solubilizadoras de fosfato no desenvolvimento do feijoeiro comum em casa de vegetação.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a capacidade de isolados de rizobactérias solubilizarem fosfato inorgânico.
- Investigar capacidade de isolados de rizobactérias produzirem ácido indol-3-acético.
- Pesquisar a capacidade de isolados de rizobactérias quanto à fixação de nitrogênio.
- Pesquisar capacidade de isolados de rizobactérias quanto à produção de sideróforos.
- Averiguar capacidade de rizobactérias quanto à produção das enzimas lipase, protease e quitinase.
- Averiguar o efeito de bactérias solubilizadoras de fosfato associadas a diferentes fontes de fosfato no feijoeiro comum.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Rizobactérias promotoras de crescimento

3.1.1 Aspectos gerais

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) são microrganismos capazes de colonizar as raízes, podendo beneficiar a planta através de diversos mecanismos (DUTTA; THAKUR, 2017; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). De maneira geral, podem ser classificadas em RPCPs extracelulares (eRPCP), quando presentes na rizosfera, no rizopiano ou nos espaços entre as células do córtex da raiz, e em RPCPs intracelulares (iRPCP), quando presentes no interior de células de raízes, geralmente em estruturas nodulares especializadas (GRAY; SMITH, 2005; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018).

As mais estudadas são encontradas entre as *Pseudomonas* spp. não fluorescentes e fluorescentes; espécies de *Bacillus* (ALMONEAFY et al., 2014), *Streptomyces* (AFZAL et al., 2016), *Rhizobium* (RUBIO-CANALEJAS et al., 2016), *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*; *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* (SHARMA et al., 2013) e *Burkholderia cepacia* (GONTIA-MISHRA; SAPRE; TIWARI, 2017). Essas populações microbianas têm sido descritas como agentes que contribuem para desenvolvimento das plantas por favorecerem a absorção de nutrientes, além de protegerem a planta contra os fitopatógenos (PARK et al., 2013; SHARMA; SHARMA, 2017).

Estudos com rizobactérias na agricultura iniciaram-se na década de 1960 na China, sendo, atualmente, difundido para promoção de crescimento ou para controle de fitopatógenos, com o intuito de aumentar a produção, diminuir os custos e, ao mesmo tempo, diminuir os danos ambientais causados por agroquímicos (VIEIRA JUNIOR et al., 2013; JHA et al., 2013; GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015). Vale citar que, na China, já foram registrados aumentos médios de 21% em produtividade devido à utilização desses microrganismos (FIGUEIREDO et al., 2010).

Os estudos com RPCPs proporcionam ganho de conhecimento sobre esses microrganismos, aumentando a possibilidade da sua aplicação na agricultura, visto que podem trazer benefícios para o desenvolvimento das plantas (MAJEED et al., 2015). Neste sentido, a atuação de rizobactérias na promoção de crescimento de plantas envolve métodos diretos e indiretos. Em relação aos métodos diretos, destaca-se a solubilização de fosfato (KUMAR et al., 2015), produção de hormônios (como ácido indol-3-acético) (NGHIA et al., 2017),

fixação biológica de nitrogênio (SAAVEDRA et al., 2017) e produção de sideróforos (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015). Dentre os métodos indiretos, pode-se citar aqueles envolvidos no controle biológico de fitopatógenos como a produção das enzimas lipase (TIPRE; PINDI; SHARMA, 2015), protease, quitinase (DUTTA; THAKUR, 2017), além da produção de antibióticos (PRABHUKARTHIKEYAN; KEERTHANA; RAGUCHANDER, 2018).

Pesquisa com *Bacillus megaterium* ST2-9, isolada do solo, por exemplo, mostrou que a rizobactéria é produtora de AIA e estimulou o crescimento de raízes de arroz. Desse modo, os resultados permitiram aos autores sugerirem que as bactérias estudadas são inoculantes eficientes como biofertilizantes para promover o crescimento das plantas (NGHIA et al., 2017). Rizobactérias solubilizadoras de zinco exibiram características promotoras de crescimento para a cultura do arroz em pesquisa realizada. Estas bactérias estimularam atributos como comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, biomassa fresca e seca da planta. Os nove isolados de rizobactérias estudados se dividem em 4 gêneros distintos, pertencentes aos filos proteobactérias e β -proteobactérias e identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia picketti*, *Burkholderia cepacia* e *Klebsiella pneumoniae* (GONTIAMISHRA; SAPRE; TIWARI, 2017).

No controle biológico, foi observado que duas estirpes bacterianas rizosféricas, *Burkholderia cenocepacia* VBC7 e *Pseudomonas poae* VBK1, e três estirpes diferentes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produziram zonas de inibição significativas contra *Rhizopus stolonifer* que causa podridão na cultura da jaca. As rizobactérias induziram ao rompimento de micélio do patógeno *in vitro* e, quando aplicadas às plantas, as bactérias reduziram ou preveniram a doença. Além disso, quando aplicadas na pós-colheita, a incidência da doença foi reduzida (GHOSH et al., 2015). Em outra pesquisa, foi avaliado o potencial *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* em feijoeiro-comum. Neste trabalho, foi observado que todos os isolados das rizobactérias estudadas inibiram o crescimento de patógeno (LEÃO et al., 2016).

Assim, as informações adquiridas sobre esses microrganismos podem servir para direcionar a utilização deles em formulações de produtos, contribuindo para uma agricultura sustentável, já que pode diminuir o uso de fertilizantes e agrotóxicos (BASHAN et al., 2014; SONG et al., 2015).

3.1.2 Mecanismos de promoção de crescimento em plantas

A importância das bactérias benéficas na agricultura tem resultado em muitos esforços para entender a comunidade bacteriana associada à rizosfera ou endosfera, a fim de elucidar seus mecanismos na promoção do crescimento das plantas e manejo de doenças (PASSARI et al., 2016). Desse modo, investimentos vêm sendo realizados na área da pesquisa no sentido de se descobrir novos microrganismos com atributos para a promoção de crescimento em plantas (HARIPRASAD; VENKATESWARAN; NIRANJANA, 2014; SARATHAMBAL et al., 2015). Esses estudos incluem mecanismos diretos, como a solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético, fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos, e indiretos, como produção de enzimas como lipase, protease e quitinase (MIHALACHE et al., 2015; NGHIA et al., 2017; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018).

3.1.2.1 Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo é um macronutriente, do qual as plantas necessitam em quantidades maiores. Está ligado ao metabolismo vegetal, participando da fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, transferência de genes e reprodução (GRANT et al., 2001; KHAN; ZAIDI; AHMAD, 2014). Durante as fases iniciais do desenvolvimento da planta, a disponibilidade adequada de fósforo é importante para o estabelecimento dos primórdios das partes reprodutivas, aumento da ramificação e resistência das raízes, conferindo, assim, vitalidade e capacidade de resistência a doenças. Além disso, contribui na formação de sementes e no início da maturação de culturas como cereais e leguminosas. Neste sentido, esse nutriente é de grande importância para a agricultura, uma vez que a baixa disponibilidade ou deficiência de fósforo reduz acentuadamente o tamanho e o crescimento da planta (SHARMA et al., 2013).

Encontrado nas formas orgânicas e inorgânicas, o fósforo é limitado na maioria dos solos. Aqueles destinados à atividade agrícola, por exemplo, possuem grandes quantidades de fósforo, porém, a maior parte desse nutriente não se encontra disponível às plantas (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015). Desse modo, apesar da ampla distribuição do fósforo na natureza, a sua deficiência na agricultura é comum por causa da forma altamente insolúvel encontrada, principalmente, em solos ácidos de regiões tropicais e subtropicais (SOUCHIE et al., 2005). Nesses ambientes, a interação do fósforo com o cálcio, o alumínio e o ferro, que fazem parte da constituição do solo, além de sua lenta taxa de difusão na solução do solo, faz com que esse nutriente fique menos prontamente disponível para as plantas (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

Devido à importância do fósforo para as plantas e seu alto custo, os estudos para encontrar métodos alternativos para otimizar sua absorção são prioridade para os sistemas agrícolas (MATOS et al., 2017). Dentre esses métodos, é promissora a utilização de rizobactérias que podem atuar diretamente ou indiretamente no crescimento de plantas (XIANG et al., 2017). Dos mecanismos diretos, merece destaque aquele relacionado à solubilização de fosfato, que torna o fósforo disponível às plantas (PRAKAMHANG et al., 2014; TIPRE et al., 2015).

As rizobactérias podem disponibilizar o fósforo às plantas através da solubilização do fósforo orgânico e inorgânico, produzindo exsudatos orgânicos como ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido glucônico, ácido láctico, ácido succínico, ácido propiônico) e sideróforos (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015), excreção de prótons pela assimilação de amônio, e produção de enzimas solubilizadoras como as fosfatases ácidas (SHARMA et al., 2013; GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015; MATOS et al., 2017). As fosfatases, dependendo de seu pH ótimo, podem ser divididas em fosfomonoesterases ácidas, predominantes em solos ácidos, e alcalinas, predominantes em solos alcalinos. Ambas podem ser produzidas pelos microrganismos solubilizadores de fosfato dependendo das condições externas (JORQUERA et al., 2014).

Através do conhecimento dos mecanismos de solubilização de fósforo por rizobactérias, pesquisadores vêm estudando a sua utilização na agricultura para o aumento na produção de culturas de interesse econômico (KUMAR et al., 2015; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Em trabalho realizado com o tomateiro, por exemplo, verificou-se que, após 7 dias de crescimento, as rizobactérias do gênero *Pseudomonas* avaliadas solubilizaram 10 vezes mais fósforo que o controle, aumentando a biomassa da raiz do tomate em 1,7 vezes. Além disso, a biomassa da parte aérea aumentou 44% em relação à bactéria controle, levando-se à conclusão de que as rizobactérias podem ser úteis para melhorar o crescimento de outras culturas (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

Para a cultura do trigo, pesquisa mostrou que entre nove isolados de rizobactérias, avaliadas quanto aos vários mecanismos de crescimento de plantas, quatro foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. Em condições de campo, estudos com a inoculação em plantas de trigo indicaram que esses isolados de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) proporcionaram um aumento significativo no comprimento e na biomassa da parte aérea e da raiz. O estudo indica o potencial dessas RPCPs para a produção de inóculos ou biofertilizantes para melhorar o crescimento e teor de nutrientes do trigo e outras culturas em condições de campo (MAJEED et al., 2015).

Diante disso, observa-se que é fundamental a investigação do potencial das rizobactérias na solubilização de fosfato para otimizar a assimilação do fósforo pelas plantas e contribuir para o seu desenvolvimento (LACERDA et al., 2016).

3.1.2.2 Produção de ácido indol-3-acético

Auxinas são um grupo de hormônios que estão ligados ao alongamento celular diferencial e são sintetizados, principalmente, pelos meristemas apicais caulinares, nas folhas jovens e nas sementes em desenvolvimento. Esses hormônios se espalham até as outras zonas da planta, principalmente para a base, onde se estabelece um gradiente de concentração (PEDRO; JOÃO; WELLINGTON, 2001).

Entre as auxinas, o ácido indol-3-acético (AIA) é o fitormônio mais estudado e o mais produzido pelas bactérias, sendo requerido em baixas concentrações pelas plantas. Ele é conhecido por sua capacidade de auxiliar no desenvolvimento da raiz, divisão celular e multiplicação celular. Isso leva ao aumento do comprimento e do número de pelos radiculares e da parte aérea vegetal, aumentando, assim, a captação de nutrientes pelas plantas (DJORDJEVIC et al., 2017). Neste sentido, na agricultura, a produção de AIA por rizobactérias podem contribuir para o aumento na produção, devido ao incremento nos atributos agronômicos das culturas com o melhor desenvolvimento vegetal, além da contribuição de modo indireto no controle de fitopatógeno (AHMED et al., 2014; NGHIA et al., 2017).

O AIA é comumente produzido por várias RPCPs como, por exemplo, *Bacillus* sp. , *Lysinibacillus* sp. (ANGULO et al., 2014), *Paenibacillus* sp. (PADDA et al., 2017), *Aeromonas veronae*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp. e *Enterobacter* sp. (BISHNOI, 2015). A produção de AIA por estas bactérias é, em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada sob diversas vias biossintéticas (Figura 1). A biossíntese do AIA triptofano-dependente pode ocorrer por meio das vias: ácido indol-3-pirúvico (AIP); indol-3-acetamida (IAM); triptamina (TAM); e indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Figura 1) (SOLANO; BARRIUSO; GUTIÉRREZ-MAÑERO, 2008).

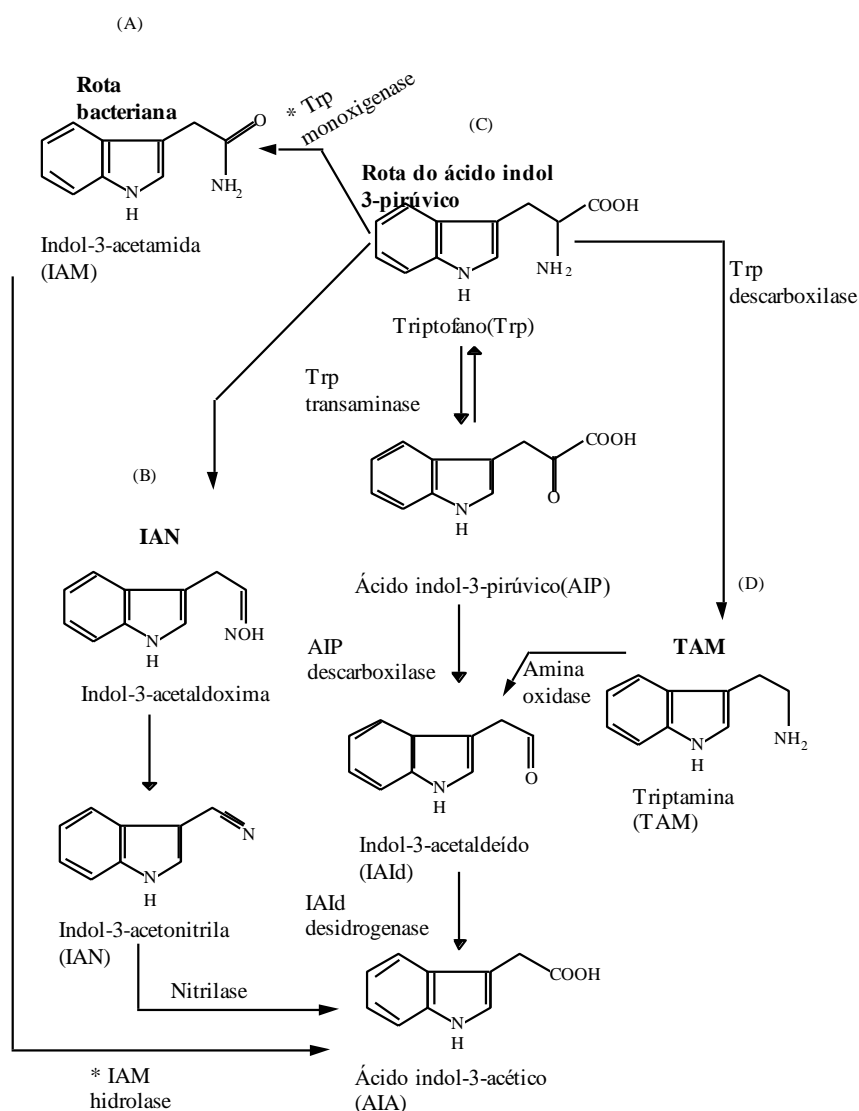


FIGURA 1. Rotas biossintéticas do ácido indol-3-acético (AIA) a partir do aminoácido triptofano em bactérias e plantas. As enzimas em asterisco estão presentes somente em bactérias.

Com base nesses conhecimentos, pesquisas têm sido realizadas com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas objetivando o aumento na produtividade agrícola (BHARUCHA; PATEL; TRIVEDI, 2013). Muitas delas realizam essa investigação baseando-se na informação de que a promoção de crescimento vegetal pode ocorrer por meio de fitormônios reguladores de crescimento como o AIA (NGHIA et al., 2017).

Investigação científica com rizobactérias, por exemplo, avaliou a capacidade delas em produzir AIA, além de outros mecanismos de promoção de crescimento, e sua habilidade como bioinoculante em mudas de tomateiro. Observou-se que as rizobactérias possuem potencial como produtoras de AIA e que, dos 10 isolados selecionados, 9 mostraram potencial

significativo para colonização da superfície radicular em tomateiro. Isolados de *Bacillus* sp. foram mais eficientes em formação de biofilme, demonstrando potencial para suportar vários estresses bióticos e abióticos. Além disso, *Bacillus* sp. aumentou significativamente a altura das raízes e dos ramos, bem como no peso fresco após 45 e 60 dias de inoculação (PASSARI et al., 2016).

Em outro trabalho, foi realizada a caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas à cana-de-açúcar, além de avaliar a capacidade dessas bactérias em promover o crescimento vegetal na cultura do milho. Das 136 bactérias isoladas, 83 delas produziram algum fator de crescimento vegetal, sendo que 57 % foram produtoras de AIA. Neste experimento, os sete melhores isolados, avaliados quanto à promoção de crescimento milho, pertencem à família *Enterobacteriaceae* e aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pantoea*. Desses, cinco isolados promoveram o crescimento vegetal em experimentos em casa de vegetação, sendo potenciais candidatos a bioinoculantes (RODRIGUES et al., 2016).

Com o objetivo de buscar alternativas para a substituição à utilização de produtos químicos na agricultura e aumentar a produção, pesquisa foi realizada com *Bacillus megaterium*, *Azotobacter chroococcum* para verificar a capacidade em produzir AIA e seu efeito sobre sementes de milho. O estudo mostrou efeito estatisticamente superior da altura da raiz de plantas inoculadas com as rizobactérias em comparação com o controle. De acordo com os autores, os isolados bacterianos avaliados no estudo podem ser recomendados como bactérias promotoras de crescimento, devido a seus efeitos positivos e, eventualmente, podem ser usadas para reduzir as doses de fertilizantes químicos na agricultura (DJORDJEVIC et al., 2017).

No controle biológico, estudo com rizobactérias revelou que os isolados selecionados com base na capacidade de inibir *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* possuem vários atributos de promoção de crescimento que fazem biocontrole indiretamente. Os isolados selecionados exibiram capacidades *in vitro* relacionadas à regulação do crescimento de planta, bem como para características antifúngicas e nematicidas. Eles foram positivos para a fixação de nitrogênio atmosférico, produção de amônia, ácido indolacético (AIA), sideróforos, solubilização de fosfato e de zinco. O potencial no biocontrole foi registrado contra alguns fungos fitopatogênicos e uma espécie de nematoide (*Meloidogyne incognita*) em vários graus (EL-SAYED et al., 2014).

3.1.2.3 Fixação biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é de fundamental importância para as plantas, pois faz parte da constituição de biomoléculas como os aminoácidos, que compõem as proteínas, os ácidos nucleicos, ATP, NADH, NADPH, clorofila e inúmeras enzimas (NELSON; COX, 2014). Na agricultura, a disponibilidade de nitrogênio é quase sempre um fator limitante, influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente e, por isso, é o elemento mais importante para elevadas produções (OKUMURA; MARIANO; ZACCHEO, 2011).

O nitrogênio representa 80% da atmosfera na forma gasosa, mas as plantas não conseguem utilizá-lo. Para contornar este problema, na agricultura, é comum o uso de fertilizantes nitrogenados, que acabam emitindo para a atmosfera quantidade excessiva de óxido de nitrogênio (N₂O), um gás que agrava o efeito estufa (RODRIGUES et al., 2017).

Uma alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados é a utilização de bactérias chamadas diazotróficas ou fixadoras de N₂ (FBN), que são capazes de transformar o N₂ da atmosfera em NH₃ ou aminoácidos, tornando o nitrogênio disponível para as plantas. As bactérias diazotróficas são, geralmente, classificadas como bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio (*Rhizobiaceae*, com plantas leguminosas e *Frankia*, com plantas não leguminosas) e bactérias fixadoras de nitrogênio não simbióticas, que podem ser de vida livre, associativa ou endofítica (MOREIRA et al., 2010). Entre essas bactérias fixadoras, pode-se citar aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e cianobactérias (ANDRADE et al., 2014).

Sob condições de limitação de nitrogênio mineral, as rizobactérias induzem a formação de nódulos simbióticos nas raízes de leguminosas. Nesses nódulos, a bactéria, na forma de bacteróide, converte nitrogênio atmosférico em amônia, através da nitrogenase, que é utilizada pela planta como fonte de nitrogênio. A amônia é, posteriormente, transformada em elementos essenciais para a planta, como as proteínas (SANTOS; REIS, 2008). Essa habilidade dos microrganismos fixarem nitrogênio em simbiose com leguminosas é de considerável importância agrícola e ambiental, visto que as leguminosas têm, a seu dispor, duas fontes de nitrogênio: o mineral, proveniente do solo e/ou fertilizante e o nitrogênio gasoso, fixado biologicamente (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

A fixação assimbiótica de nitrogênio está ligada com a capacidade do microrganismo de invadir e proliferar nos tecidos da planta hospedeira e permanecer endofiticamente. Desse modo, ele ultrapassa as barreiras físicas e químicas que a planta estabelece, instituindo vias de infecção e sítios de colonização, mas em equilíbrio com a planta (KUSS, 2006). A fixação assimbiótica de nitrogênio já foi considerada ineficiente por alguns

pesquisadores(RUSCHEL; BRITTO, 1966). Entretanto, hoje, sabe-se que alguns microrganismos, como aqueles do gênero *Bacillus*, fixam nitrogênio assimbioticamente, podendo servir como inoculantes e proporcionando o nitrogênio necessário para o bom desenvolvimento de plantas cultivadas(ETESAMI; MAHESHWARI, 2018).

A rizobactéria *Paenibacillus polymyxa* já foi avaliada quanto à fixação biológica de nitrogênio e promoção do crescimento de *Pinus (Pinus contorta var. latifolia)*. No final do período de crescimento, a rizobactéria reduziu a mortalidade de plântulas em 14% e o N foliar aumentou 79% e duplicou a biomassa de plântulas em comparação com os controles. Os resultados sugerem que a fixação de nitrogênio por *P. polymyxa* aumentou o crescimento de plântulas de pinus e apoiou a hipótese de que diazotróficos associados a plantas capazes de colonização podem satisfazer uma proporção significativa do nitrogênio requerido por plântulas de árvores crescendo sob condições limitadas desse nutriente (ANAND; GRAYSTON; CHANWAY, 2013).

Pesquisa com combinações triplas diferentes de bactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) foi realizada para cultivar de bananeira Prata Anã micropropagada, em termos de crescimento e absorção de nutrientes. Entre os mecanismos de crescimento exibidos pelas bactérias avaliadas, encontra-se a fixação biológica de nitrogênio. Observou-se que houve incremento significativo para todos os atributos avaliados. Os resultados revelaram que *B. subtilis* (EB-40), *Bacillus pumilus* (EB-51), *Lysinibacillus* sp. (EB-53), *Paenibacillus* sp. (EB-144) e *Bacillus* sp. (EB-194) têm o potencial de serem explorados como inoculantes por melhorarem o crescimento das plântulas de bananeira. Além disso, os autores indicam as espécies selecionadas para a aplicação para aumentar a diversidade microbiana, bem como a qualidade e a saúde do solo(SOUZA et al., 2016).

A inoculação de *Azospirillum brasilense* e a adubação nitrogenada modificaram o comprimento total da densidade radicular de plantas de milho. Os resultados demonstraram que as duas variáveis são complementares para avaliar o efeito dessas duas práticas agronômicas na produção de milho. Os resultados referentes aos efeitos da inoculação com *A. brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* e adubação nitrogenada em algumas comunidades microbianas são uma contribuição para o conhecimento da ecologia da rizosfera do milho em condições de campo. Eles podem ser usados para melhorar a resposta da cultura a essas inoculações de RPCPs em interação com a fertilização química e a caracterização de risco ambiental de ambas as práticas agronômicas para uma produção agrícola mais sustentável(DI SALVO et al., 2018).

Assim, os estudos com rizobactérias são importantes, devido à contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas naturais ou manejados (MARRA, 2012).

3.1.2.4 Produção de sideróforos

É sabido que o sistema agrícola é composto por plantas cultivadas que, de modo geral, necessitam fazer a retirada de água e de nutrientes minerais presentes no solo, dentre eles o ferro. Este nutriente mineral, assim como outros, é adquirido primariamente na forma de íon inorgânico e levado para o interior da célula vegetal, predominantemente, através do sistema radicular da planta. Nesse processo, outros organismos, como os fungos (micorrízicos) e as bactérias da rizosfera, frequentemente, contribuem para a aquisição desses nutrientes (DUTTA; THAKUR, 2017).

Após a absorção, o ferro é transportado para as diversas partes da planta, onde é assimilado e utilizado em importantes funções biológicas (KHAN; ZAIDI; AHMAD, 2014). O ferro é um micronutriente importante para o desenvolvimento dos organismos vivos, incluindo microrganismos e plantas. Talelemento é requerido pelos microrganismos aeróbicos para redução do oxigênio na síntese de ATP, redução de precursores de DNA, formação do grupo heme e outras finalidades (SAHRAWAT, 2004; AGUADO-SANTACRUZ et al., 2012). Para as plantas, o ferro é fundamental para vários processos metabólicos que incluem fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA e de hormônios. Mais especificamente, esse nutriente faz parte da enzima nitrogenase, responsável pela conversão de nitrogênio em amônio, das leg-hemoglobinas, que controla a quantidade de oxigênio dentro dos nódulos contendo a bactéria, e dos citocromos, que são carreadores de elétrons no processo da respiração celular do bacteroide (KHAN; ZAIDI; AHMAD, 2014; JUCOSKI et al., 2016).

O maior interesse sobre a absorção do ferro está ligado diretamente à agricultura e à produtividade das culturas, uma vez que a produção agrícola depende fortemente da fertilização com elementos minerais como o ferro. No entanto, as plantas cultivadas, tipicamente, utilizam menos da metade dos fertilizantes aplicados (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015). O restante pode ser lixiviado para os lençóis subterrâneos de água, tornar-se fixado ao solo ou contribuir para a poluição do ar. Assim, torna-se de grande importância o aumento na eficiência de absorção e de utilização de nutrientes, reduzindo os custos de produção e contribuindo para evitar prejuízos ao meio ambiente (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018).

Apesar da alta abundância de ferro na maioria dos solos, ele é um dos fatores limitantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas devido à sua baixa disponibilidade (SCHMID et al., 2014). Sabe-se que os nutrientes do solo desempenham papéis importantes no crescimento das plantas e vários isolados de rizobactérias benéficas têm sido aplicados para melhorar a absorção de nutrientes, a biomassa e a tolerância a estresse abiótico ou biótico (ZHOU et al., 2016). O ferro pode estar no solo nas formas Fe^{2+} ou Fe^{3+} , sendo esse último menos solúvel. Em qualquer um dos casos, para que o ferro se torne disponível para microrganismos e plantas, é necessário que esses organismos lancem mão de mecanismos para a captura do ferro, como, por exemplo, a produção de sideróforos (DUTTA; THAKUR, 2017).

Plantas evoluíram duas estratégias para adquirir ferro de solos, incluindo a produção de sideróforos (BRUMBAROVA; BAUER; IVANOV, 2015). As monocotiledôneas e dicotiledôneas não gramináceas utilizam, principalmente, a estratégia baseada na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , pela quelato redutase (FRO2), através da liberação de prótons na rizosfera por meio da H-ATPase (AHA2) (estratégia I). O Fe^{2+} reduzido é transportado através da membrana plasmática para as células epidérmicas da raiz através do transportador de metal bivalente IRT1. As monocotiledôneas gramináceas adquirem ferro com base na liberação de fitossideróforos na rizosfera que se ligam ao ferro, que é então transportado para células epidérmicas de raiz (estratégia II) (ZHOU et al., 2016). Além disso, monocotiledôneas e dicotiledôneas não gramináceas foram descritas empregando outra estratégia de aquisição de ferro baseada na quelação pela exsudação de compostos fenólicos (SCHMID et al., 2014).

Sideróforos (do grego: "transportadores de ferro") são compostos orgânicos de baixo peso molecular, ligantes específicos de íons de ferro, que são produzidos por plantas e microrganismos como as rizobactérias, com a função de incorporar este mineral no metabolismo celular (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002; ZHOU et al., 2016).

Existem vários tipos de moléculas orgânicas representantes dos sideróforos bacterianos, que foram classificadas em quatro classes principais: carboxilato, hidroxamatos, catecolatos de fenol e pioverdinas (OLIVEIRA, 2009; BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002). Estes compostos possuem tal agrupamento com base em seus grupos funcionais de coordenação de ferro, características estruturais e tipos de ligantes (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012).

Muitos microrganismos conhecidos podem sintetizar sideróforos, como bactérias entéricas, bactérias patogênicas de humanos, de animais, de fungos e de plantas,

microrganismos do solo, bactériasfixadoras de nitrogênio, algumas leveduras, dentre outros (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002)

O papel dos sideróforos na captura de ferro do meio ambiente é tornar este elemento químico essencial disponível para a célula microbiana (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002). São secretados por microrganismos em resposta à baixa disponibilidade de Fe^{3+} em solução (OLIVEIRA, 2009), beneficiando as plantas tanto no controle de patógenos, visto que estes ficam privados de ferro, quanto no crescimento de plantas, principalmente, em solos alcalinos que possuem limitação de ferro (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

Na agricultura, quanto ao desenvolvimento de plantas, a atividade de produção de sideróforos por rizobactérias no solo desempenha um papel fundamental, visto que aumenta a absorção de ferro por plantas que são capazes de reconhecer o complexo sideróforo-ferro bacteriano. Isso permite o transporte desse complexo para o interior da célula da planta, com o intuito de que o micronutriente possa ser aproveitado no metabolismo celular da planta (DIMKPA et al., 2009).

Desse modo, a pesquisa sobre a produção de sideróforos por rizobactérias pode contribuir para a formulação de bioprodutos que podem servir para o aumento na produção do sistema agrícola. Em trabalho realizado com rizobactérias, 48 isolados avaliados exibiram propriedades antifúngicas incluindo a produção de sideróforos (DUTTA; THAKUR, 2017).

Jimtha et al. (2014), por exemplo, isolaram espécies de *Bacillus* sp. Estas bactérias demonstraram possuir várias propriedades promotoras de crescimento de plantas, incluindo a produção de sideróforos. Em outro trabalho, a capacidade de solubilização de fósforo de fontes orgânica (Fitato) e inorgânica ($FePO_4$) por bactérias produtoras de sideróforos foi investigada, com inoculação em mudas de tomateiro. Nele, foi observado que bactérias produtoras de sideróforos solubilizaram as duas fontes de fósforo avaliadas. Foi verificado que o fósforo solubilizado a partir de Fitato e de fosfato de ferro melhorou significativamente o crescimento e nutrição do tomateiro. Desse modo, as bactérias avaliadas, produtoras de sideróforos, podem solubilizar tanto fontes orgânicas e inorgânicas de fósforo, disponibilizando fósforo e ferro que contribui para o crescimento das plantas (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

Para a sustentabilidade agrícola, há uma necessidade urgente de aumentar a capacidade de as plantas assimilarem o Fe de solos com baixa disponibilidade de tal elemento (ZHOU et al., 2016). Espécies do gênero *Paenibacillus*, por exemplo, são consideradas de grande importância para o crescimento das plantas e são amplamente utilizadas na agricultura sustentável para a absorção de ferro (ANAND; GRAYSTON;

CHANWAY, 2013). Em trabalho realizado, foram relatados os mecanismos de assimilação de Fe de plantas induzidas por microrganismos, nos quais a bactéria promotora de crescimento de plantas (PGPR) *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 estimulou os mecanismos de aquisição de Fe em plantas de *Arabidopsis*. Estudos mostram que o *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 ativa o fator de transcrição 1 (FIT1) induzido pela deficiência de Fe, aumentando, assim, a expressão de IRT1 e FRO2. Além disso, verificou-se que *P. polymyxa* BFKC01 induz respostas sistêmicas em plantas com a transcrição aumentada de MYB72, e as vias biossintéticas de compostos fenólicos também são ativadas. Os dados revelaram que compostos fenólicos abundantes são detectados na exsudação radicular das plantas inoculadas com *P. polymyxa* BFKC01, o que, eficientemente, facilita a mobilidade de Fe sob condições alcalinas. Além disso, a bactéria pode secretar auxina e melhorar ainda mais os sistemas radiculares, o que aumenta a capacidade de as plantas adquirirem Fe a partir dos solos. Como resultado, as plantas inoculadas com *P. polymyxa* BFKC01 têm mais Fe endógeno e maior capacidade fotossintética sob condições alcalinas quando comparadas às plantas controle (ZHOU et al., 2016).

Isolados foram identificados e avaliados quanto à capacidade de produção de sideróforos, além de enzimas e outros compostos, que são importantes no desenvolvimento de plantas. Bactérias pertencentes a vários gêneros, incluindo os gêneros *Lysinibacillus* e *Bacillus*, foram identificadas como produtoras de sideróforos, sendo, no total, 95% das bactérias identificadas (RODRIGUES, 2014).

3.1.2.5 Produção de enzimas

As RPCPs possuem potencial biotecnológico para a produção de enzimas, destacando-se na indústria em diversos setores, além de desempenharem papel fundamental na agricultura através da promoção de crescimento vegetal, uma vez que podem inibir a ação de fitopatógenos (TIPRE; PINDI; SHARMA, 2015). A preferência pelas enzimas produzidas por microrganismos ocorre devido ao rápido crescimento, espaço limitado de cultivo e fácil manipulação genética. Nessa perspectiva, as lipases, proteases e quitinases são algumas das enzimas produzidas por microrganismos do solo e associados às plantas que têm recebido muita atenção em pesquisas científicas (CHOUDHURY; BHUNIA, 2015).

Nos últimos anos, a pesquisa se concentrou nas interações entre bactérias e fitopatógenos, em especial sobre rizobactérias no controle de fungos e nematoides patogênicos. Por exemplo, enzimas hidrolíticas, principalmente, proteases, colagenases e

quitinases, têm sido relacionadas ao efeito nematicida de rizobactérias, demonstrando ser um importante fator envolvido na degradação de diferentes constituintes químicos de nematoides em distintos estágios de desenvolvimento. Além disso, os metabólitos exudados também podem alterar o processo de reconhecimento da planta pelo nematoide ou criar um ambiente hostil para os nematoides na rizosfera. As cepas específicas de bactérias responsáveis pela produção de toxinas, como as proteínas Cry, também são uma das estratégias utilizadas pelas rizobactérias. Dessa forma, a caracterização do modo de ação da rizobactéria pode fortalecer o desenvolvimento de produtos comerciais para o controle de populações de patógenos parasitas de plantas (CASTANEDA-ALVAREZ; ABALLAY, 2016).

As lipases são enzimas, hidrolases, que podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo as últimas as mais utilizadas, pois apresentam diversas aplicações biotecnológicas, além de facilidade de produção em massa (COLLA; L. M.; CHRISTIAN; JORGE, 2012)(CHOUDHURY; BHUNIA, 2015). Elas atuam em ligações éster do grupo carboxílico, tais como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, acilação de mentóis e glicóis e síntese de peptídios (SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001)(CARVALHO et al., 2003). Essas enzimas catalisam a hidrólise do triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (CHOUDHURY; BHUNIA, 2015).

As lipases podem ser aplicadas na indústria em diversos setores, com a produção de cosméticos, medicamentos, detergentes, alimentos, no tratamento de efluentes (WHITELEY; LEE, 2006; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; CHOUDHURY; BHUNIA, 2015) e também na agricultura para o controle biológico de fitopatógenos (TIPRE; PINDI; SHARMA, 2015).

Microrganismos como fungos e bactérias têm sido estudados como fonte de lipases, devido à praticidade no cultivo, destacando-se as bactérias, visto que representam uma importante fonte dessas enzimas para a indústria. Várias espécies são descritas como produtoras, principalmente, aquelas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burhoderia*, *Chromobacterium* e *Acinetobacter* (HAKI; RAKSHIT, 2003; TIPRE; PINDI; SHARMA, 2015). Por atuarem em uma faixa de pH (9-10) alcalina e ter termoestabilidade (60-65°C), as lipases produzidas por *Bacillus subtilis* possuem maior aplicabilidade (WILLERDING, 2007). As rizobactérias que produzem tal enzima podem ser utilizadas no controle biológico de fitopatógenos por contribuírem para prevenção do estabelecimento de patógenos (SILVA, 2011).

Vários estudos têm relatado a utilização de rizobactérias produtoras de lipase no controle biológico de fitopatógenos. Estudo para avaliar o potencial biotecnológico de espécie

bacteriana do gênero *Bacillus* sp. foi publicado, demonstrando que a produção de lipase por espécies pertencentes a esse gênero contribui para a promoção de crescimento de plantas de forma indireta, pois a lipase atua em conjunto com outros mecanismos. Os parâmetros avaliados, além da produção da enzima lipase e amilase, foram a produção de ácido indoleacético, solubilização de fosfato, produção de amônia e produção de sideróforos. O isolado mostrou-se positivo para os parâmetros avaliados. Esses resultados indicam que as bactérias do gênero *Bacillus* sp. exibem uma variedade de propriedades benéficas que as tornam potenciais candidatas para aplicabilidade comercial, como um biofertilizante (TIPRE; PINDI; SHARMA, 2015).

A busca por alternativas ao uso intensivo de agrotóxicos no controle de doenças tem recebido grande atenção da pesquisa agrícola. Por exemplo, pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a eficácia de seis isolados de rizobactérias, pré-selecionadas, no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em casa de vegetação e relacionou este comportamento a produção de compostos *in vitro*. Foi avaliada a capacidade de estas rizobactérias produzirem quitinases, amilases, lipases, compostos antibióticos e de solubilizar fosfato. A microbiolização das sementes com a rizobactéria reduziu os valores das doenças em ambos os ensaios. Os autores salientam que o controle pode ter ocorrido devido à produção dos compostos responsáveis pela antibiose observada *in vitro* (ROCHA; MOURA, 2013).

Estudo com rizobactérias revelou que a atividade de lipase foi verificada em todos os isolados avaliados e o nível mais alto de atividade coincidiu com a mortalidade mais alta dos estágios móveis do nematoide. Por outro lado, a avaliação com o isolado *B. megaterium* FB133M (SBG) resultou em baixa atividade de lipase e nenhuma mortalidade significativa de *M. ethiopica* J2 foi registrada, demonstrando que existe uma correlação entre alta atividade de lipase e alta mortalidade de nematoide (ABALLAY et al., 2017).

As proteases são moléculas de interesse industrial que pertencem a uma classe de enzimas que quebram as moléculas de proteínas através da hidrólise das ligações peptídicas que ligam os aminoácidos entre si. Elas podem ter seu sítio de localização intracelularmente ou extracelularmente, sendo que, no primeiro caso, participam da regulação do metabolismo, enquanto que, no segundo, hidrolisam grandes proteínas a moléculas menores para que sejam absorvidas pela célula (TREMACOLDI, 2009).

Diversas funções vitais para a célula são realizadas por proteases, como a regulação do processamento de proteínas e dos níveis proteicos intracelulares e remoção de proteínas anormais ou danificadas. Desse modo, observa-se que elas estão envolvidas em vários papéis

extremamente importantes para a célula, pois atuam em processos como desenvolvimento, fisiologia, defesa e resposta ao estresse (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

Essas enzimas são encontradas em uma ampla diversidade de organismos vivos, desde animais a microrganismos, nos quais participam de funções fisiológicas, como na manutenção da homeostase e na participação em processos inflamatórios (TREMACOLDI, 2009).

Os microrganismos são considerados como fonte principal de enzimas, como as proteases, devido ao seu rápido crescimento, ao espaço limitado requerido para o cultivo e à facilidade com que eles podem ser manipulados geneticamente. Assim, podem-se produzir novas enzimas com propriedades alteradas que são desejáveis para várias aplicações, como nas áreas científicas da química e engenharia de proteínas, e em diferentes processos industriais, tais como a síntese de alimentos, indústria farmacêutica e indústria de detergente (HAKI; RAKSHIT, 2003).

Na agricultura, a pesquisa sobre essas enzimas vem crescendo, com o objetivo de fornecer informação sobre sua utilização no controle biológico de fitopatógenos (DUTTA; THAKUR, 2017). Fungos e nematoides, por exemplo, possuem proteínas em suas paredes celulares que podem ser o alvo de estudos sobre a utilização de proteases no controle desses microrganismos. Por isso, pesquisas são realizadas com microrganismos produtores dessas enzimas, destacando-se aquelas com a utilização de rizobactérias (AFZAL et al., 2016; DUTTA; THAKUR, 2017; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018).

As rizobactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são registradas como as melhores produtoras de protease extracelular (NASCIMENTO; LEAL MARTINS, 2004; AFZAL et al., 2016). Neste sentido, pesquisas são realizadas com bactérias pertencentes a esse gênero, para o controle biológico de patógenos como os nematoides, que podem atuar por vários mecanismos, incluindo a produção de protease (XIANG et al., 2017).

Dutta e Thakur (2017) isolaram rizobactérias do chá indígena em propriedades localizadas em Bengala Ocidental, na Índia. Foram obtidos 150 isolados de rizobactérias que foram investigadas quanto à atividade antagonista em relação a seis fungos fitopatogênicos. Estes foram *Nigrospora sphaerica* (KJ767520), *Pestalotiopsis thea* (ITCC 6599), *Curvularia eragostidis* (ITCC 6429), *Glomerella cingulata* (MTCC 2033), *Rhizoctonia solani* (MTCC 4633) e *Fusarium oxysporum* (MTCC 284). Dos 150 isolados de rizobactérias, 48 eram antagonistas a pelo menos um patógeno fúngico utilizado. Estes 48 isolados exibiram propriedades antifúngicas variadas como a produção de enzimas como a protease. Além disso, quatro isolados foram selecionados para o estudo de crescimento de plantas em duas cultivares comerciais de chá TV-1 e Teenali-17 em condições de viveiro. O estudo de

promoção de crescimento de plantas mostrou que a inoculação de consórcios desses quatro isolados de rizobactérias aumentou significativamente o crescimento de plantas de chá em condições de viveiro. Assim, o estudo desses pesquisadores retrata o potencial comercial de rizobactérias para o cultivo de chá sustentável.

A quitina, um homopolímero linear de β 1-4 N-acetilglicosamina, é o mais difundido aminopolissacarídeo natural da natureza, sendo o principal constituinte dos esqueletos de artrópodes, crustáceos, parede celular de fungos e casca de ovo de nematoides. Atua nestes organismos como componentes estruturais de suporte celular e de superfície do corpo (DIAS et al., 2013).

Na estrutura da quitina, enzimas denominadas quitinases podem atuar, sendo objeto de estudo, por exemplo, para o controle de organismos fitopatogênicos (KUMAR; DUBEY; MAHESHWARI, 2017). As quitinases pertencem a um conjunto de enzimas que degradam a quitina, através da clivagem de ligações glicosídicas, resultando em oligômeros e monômeros de N-acetilglucosamina, podendo ser denominadas como endoglicosil-hidrolases. Podem ser produzidas a partir de diferentes fontes que incluem bactérias, fungos, plantas e animais (NITSCHKE et al., 2011; DIAS et al., 2013).

Inúmeras pesquisas relatam a potencial utilização biotecnológica das quitinases em diferentes áreas, incluindo aplicações no ramo da indústria e da agricultura. Podem ser utilizadas no controle de fungos fitopatogênicos, nematoides e insetos e, por isto, há um crescente interesse na produção de oligossacarídeos de quitina biologicamente ativos através da utilização das quitinases (ROCHA; MOURA, 2013; ABALLAY et al., 2017). Desta forma, nota-se o universo de processos biotecnológicos em que a quitinase pode estar envolvida, o que a torna um importante objeto de estudo na atualidade (AFZAL et al., 2016; DUTTA; THAKUR, 2017; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018).

Entre os vários microrganismos produtores dessa enzima, destacam-se as rizobactérias, em especial aquelas pertencentes ao gênero *Bacillus* (AFZAL et al., 2016). O uso de rizobactérias é uma alternativa de controle potencial, por exemplo, de doenças como a fusariose. Em pesquisa realizada, objetivou-se avaliar a influência de três culturas monocotiledônicas sobre a atividade de rizobactérias antagonistas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop). As rizobactérias foram isoladas de maracujazeiro e avaliadas para a produção de compostos difusíveis e voláteis, bem como quitinases que inibem Fop. De um total de 167 isolados, 32 produziram quitinases, demonstrando que estas enzimas são importantes para a ação no controle da fusariose (SANTOS; ISAQUE; MACAMO, 2017).

Em outro trabalho, rizobactérias foram avaliadas quanto à produção de fatores de crescimento, sendo que foram positivas para a produção de AIA, sideróforo e solubilização de fosfato insolúvel. Os isolados exibiram, ainda, atividade de quitinase, β -1,3-glucanase e ACC deaminase juntamente com a inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum*. Também causou degradação e digestão dos componentes da parede celular, resultando na perfuração da hifa, perda da integridade estrutural do micélio, juntamente com a degradação dos conídios. Os resultados revelaram aumento do rendimento de grãos em 40% do feno-grego em relação ao controle em campo. O índice máximo de vigor, o número de nódulos, a biomassa de raízes e parte aérea foram registrados para os tratamentos com rizobactérias em comparação com o controle. Para os autores, o estudo apresenta o potencial de rizobactérias a ser usado como um bioinoculante para a promoção do crescimento de feno-grego, juntamente com a proteção contra *F. oxysporum* (KUMAR; DUBEY; MAHESHWARI, 2017).

Os mecanismos de ação atribuídos às rizobactérias incluem atividade lipolítica, proteolítica e quitinolítica, bem como a ação através da promoção de crescimento de plantas (SANTOS; ISAQUE; MACAMO, 2017; DUTTA; THAKUR, 2017; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Portanto, é possível supor que as rizobactérias atuam por diferentes mecanismos e que, quando combinadas, possam apresentar um comportamento superior ao obtido nas avaliações de forma individualizada (CORRÊA, 2012).

A ação de exoenzimas de rizobactérias em diferentes nematoides parasitas de plantas tem influência na eficácia nematicida do microrganismo. Rizobactérias foram avaliadas *in vitro* quanto à atividade nematicida no índice de *Meloidogyne ethiopica* e *Xiphinema*. A produção das exoenzimas lipase, protease, quitinase e colagenase, além dos metabólitos cianeto de hidrogênio e sulfeto de hidrogênio associados à mortalidade de nematoides foi investigada. A exposição dos estádios móveis do nematoide ao filtrado bacteriano revelou um efeito nematicida até 93,7% no índice *Xiphinema* e até 83,3% no *M. ethiopica*. O controle da eclosão dos ovos variou entre 35 e 85%. Uma correlação positiva foi encontrada entre a mortalidade dos estágios móveis dos nematoides e as atividades combinadas das enzimas bacterianas, bem como o nível dos metabólitos voláteis. O efeito nematicida das linhagens de rizobactérias varia entre os gêneros de nematoides e entre os estádios de desenvolvimento avaliados (ABALLAY et al., 2017).

Enzimas como as lipases, proteases e quitinases microbianas são biodegradáveis e tornam os processos de produções industriais mais eficientes e menos dispendiosos, proporcionando a obtenção de produtos de melhor qualidade. Desse modo, observa-se que

uma importante fonte de desenvolvimento biotecnológico encontra-se na investigação de microrganismos que possam ser potenciais produtores dessas enzimas (FELESTRINO, 2013).

3.2A cultura do Feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris*L.) é pertencente taxonomicamente à classe Dicotyledoneae, família Leguminosae, subfamília Papilionoidae e gênero *Phaseolus*. Este gênero possui em torno de 55 espécies das quais apenas cinco são cultivadas, sendo elas o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*L.); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão Tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus*(MENEZES, 1960).Dentre estas, a espécie *P. vulgaris*, vulgarmente designada por feijão comum, é a mais difundida e consumida em diversos países(ESPÍNDOLA, 2016).

O feijão comum é a espécie do gênero *Phaseolus* mais extensivamente cultivada em todo o mundo, devido ao seu papel social e econômico (SNAPP; RAHMANIAN; BATELLO, 2018), sendo o Brasil considerado o maior produtor e consumidor (POSSE; SILVA; ROCHA, 2010;CONAB, 2018). As principais regiões brasileiras produtoras se encontram no Sul, Sudeste e Nordeste, destacando-se os estados do Paraná com 21,6%, Minas Gerais com 17,1% e Bahia com 10,1% de participação na produção nacional (CONAB, 2018).

Constitui-se no alimento proteico básico na dieta diária brasileira, com um consumo per capita de 16 kg in natura/ano, além de ser responsável por fornecer quantidades consideráveis de outros nutrientes como cálcio, ferro, vitaminas e fibras. (SILVA;COSTA, 2003; CASTRO-GUERRERO et al., 2016).

A cultura é bastante difundida em pequenas e médias propriedades e destaca-se na geração de renda e trabalho, principalmente, para a agricultura familiar. Além disso, é um alimento de baixo custo, representando fonte de nutrientes importantes para famílias de baixa renda. No Brasil, alguns agricultores conseguem fazer com que o cultivo ocorra praticamente o ano todo e nos mais variados sistemas(CAMPOS et al., 2015). Isto é possível devido ao acesso à alta tecnologia para otimizar a produção, incluindo cultivares mais produtivos, irrigação, população de plantas adequada e maiores níveis de adubação, o que pode permitir a obtenção de produtividades de grãos em torno de 3.000 kg ha⁻¹ (VIEIRA, 2006).

O cultivo também ocorre em áreas menores, ou pequenas propriedades localizadas em todo território nacional, sendo fonte de renda alternativa, pois podem ser cultivados com o uso de tecnologia simples e poucos insumos químicos(ARAUJO, 2011). Apesar disso e da grande importância do feijão para o Brasil, o seu rendimento médio, de maneira geral, é muito

baixo, de 500 a 600 kg/ha, se comparado a outros países produtores, como os Estados Unidos, onde a média de produção chega a mais de 1800 Kg/há (IBGE, 2016; CONAB, 2018).

A baixa produtividade da cultura no Brasil ocorre devido à dificuldade na absorção de alguns minerais do solo e à existência de doenças que limitam a produção e reduzem a qualidade fisiológica, sanitária, nutricional e comercial do produto (OLIVEIRA et al., 2018).

A nutrição do feijoeiro inclui a utilização de macro e micronutrientes que são fundamentais para a qualidade e produtividade das sementes (NASCENTE et al., 2014). Entre esses nutrientes, destaca-se o fósforo, que é um macronutriente de teores, geralmente, baixos na solução da maioria dos solos (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015). Esse nutriente é requerido durante todo o ciclo da cultura do feijão, sendo fundamental para o crescimento e desenvolvimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2018). Entretanto, o aproveitamento do fósforo disponível no solo pela cultura varia de 5 a 25%, que é considerado baixo em virtude da importância desse nutriente para o metabolismo da planta (NASCENTE et al., 2014).

A deficiência de fósforo pode comprometer a respiração e a fotossíntese, o que prejudica a formação das folhas, principalmente nas primeiras fases do ciclo da cultura. Isso ocorre devido à redução na síntese de ácido nucléico e de proteína, com consequente acumulação de compostos nitrogenados solúveis no tecido. O resultado é a diminuição na altura da planta, atraso na emergência das folhas, redução na brotação e desenvolvimento de raízes secundárias, além de redução na produção de matéria seca e na produção de sementes (GRANT et al., 2001; SHARMA et al., 2013).

A resposta da cultura do feijão em relação às fontes de fósforo tem sido relatada como positiva, sendo registrado, por exemplo, o aumento para altura de planta, número vagens por planta, massa seca da parte aérea e para produtividade de grãos (SCHONINGER et al., 2015). Dentre as fontes disponíveis no mercado, os super fosfatos e fosfato natural gafsa ocupam posição de destaque devido ao menor custo e por contribuírem na melhoria dos atributos agronômicos de plantas cultivadas (CHAVES; ZUCARELI; DE OLIVEIRA JUNIOR, 2013).

O feijoeiro comum está exposto a uma grande diversidade de doenças que, além de prejudicar a produtividade da cultura, diminuem a qualidade do produto ou podem até mesmo inviabilizar áreas para o cultivo. Tais doenças podem ser ocasionadas por fungos, bactérias, vírus, nematoides, entre outros (MARLENE; AFONSO, 2010; OLIVEIRA et al., 2018).

Em relação às doenças fúngicas, existem aquelas da parte aérea e as de solo. De parte aérea, destacam-se a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a mancha-angular

(*Phaeoisariopsis griseola*), a ferrugem (*Uromyces phaseoli*), o oídio (*Erysiphe polygoni*), a mancha-de-alternária (*Alternaria alternata*), e o carvão (*Microbotryum phaseoli*). No caso das doenças de solo, as principais são o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), a mela (*Thanatephorus cucumeris* (Frank)), a podridão-radicular-de-Rhizoctonia (*Rhizoctonia solani*), podridão-radicular-seca (*Fusarium solani*), a murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum*) e a podridão-cinzenta-do-caule (*Macrophomina phaseolina* Goid)(OLIVEIRA et al., 2018).

Entre as doenças bacterianas que atacam o feijão, destaca-se o crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e a murcha-de-Curtobacterium (*Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* (Hedges))(SILVA et al., 2013). Dentre os vírus, aqueles que estão mais comumente associados com doenças no feijoeiro são o *Bean common mosaic virus* (BCMV), o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e o *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)(FIALLOS, 2010; KITAJIMA, 2013).

Além das doenças citadas, o feijoeiro está sujeito ao ataque de nematoides e os prejuízos causados por esses microrganismos podem ser totais, dependendo da espécie, da cultivar e do estágio de desenvolvimento da planta; umidade e temperatura do solo; espécies, raça fisiológica e densidade populacional do nematoide. Dentre as espécies de nematoides identificadas, as mais comuns nessa cultura são: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*(nematoides das galhas) e *Pratylenchus brachyurus*(MORESCO, 2016).

Os nematoides das galhas são os principais responsáveis por redução de produtividade da cultura. Os nematoides fitoparasitas do gênero *Meloidogyne* prejudicam as plantas pela ação nociva das galhas formadas sobre o sistema radicular, afetando a absorção e a translocação de nutrientes, o que leva à alteração da fisiologia da planta. Além disso, esses organismos podem predispor a planta a doenças e a estresses ambientais ou atuarem como transmissores de outros patógenos (BOMFIM JUNIOR, 2013).

Métodos alternativos vêm sendo estudados para o manejo dos fitopatógenos, em geral, devido à crescente pressão pública por uma agricultura sustentável. Sob esta perspectiva, a utilização de agentes biológicos, como as rizobactérias, é uma alternativa viável e seu estudo vem se destacando no cenário mundial(JHA et al., 2013; MAJEED et al., 2015; SHARMA; SHARMA, 2017), principalmente aqueles que visam à caracterização fisiológica desses microrganismos (NGHIA et al., 2017).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALLAY, E.; PRODAN, S.; ZAMORANO, A.; CASTANEDA-ALVAREZ, C. Nematicidal effect of rhizobacteria on plant-parasitic nematodes associated with vineyards. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1-14, 2017.
- AFZAL, I.; IQRAR, I.; SHINWARI, Z. K.; YASMIN, A. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, 2016.
- AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; MORENO-GÓMEZ, B.; JIMENEZ, B.; MOYA, E. G. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 35, n. 1, p. 9-21, 2012.
- AHMED, E. A.; HASSAN, E. A.; TOBGY, K. M. K. E.; RAMADAN, E. M. Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 2, p. 273-280, 2014.
- ALMONEAFY, A. A.; KAKAR, K. U.; NAWAZ, Z.; LI, B.; SAAND, M. A.; CHUN-LAN, Y.; XIE, G. L. Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus strains* against *Ralstonia solanacearum*. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 63, n. 2, p. 59-70, 2014.
- ANAND, R.; GRAYSTON, S.; CHANWAY, C. N₂-Fixation and Seedling Growth Promotion of *Lodgepole Pine* by Endophytic *Paenibacillus polymyxa*. **Microbial Ecology**, New York, v. 66, n. 2, p. 369-374, 2013.
- ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M.; PEREIRA, M. C.; PEREIRA, D. F. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27-34, 2014.
- ANGULO, V. C.; SANFUENTES, E. A.; RODRIGUEZ, F.; SOSSA, K. E. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 46, n. 4, p. 338-347, 2014.
- ARAUJO, L. C. **Avaliação de linhagens melhoradas de feijão de vagem em Bom Jesus do Itabapoana, RJ**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011.
- ARF, O.; LEMOS, L. B.; SORATTO, R. P.; FERRARI, S. (Eds.). **Aspectos gerais da cultura do feijão *Phaseolus vulgaris* L.** Botucatu: FEPAF, 2015.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S.; BODDEY, L. H. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, The Hague, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, The Hague, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

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

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, 2002.

BHARUCHA, U.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. B. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). **Agricultural Research**, Washington, v. 2, n. 3, p. 215-221, 2013.

BISHNOI, U. PGPR Interaction: An Ecofriendly Approach Promoting the Sustainable Agriculture System. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 75, n. 3, p. 81-113, 2015.

BOMFIM JUNIOR, M. F. **Nematoides em feijoeiro-comum: ocorrência nos Estados do Paraná e São Paulo, e interação de cultivares com *Pratylenchus brachyurus*, *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica***. 2013. Tese (Doutorado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

BRUMBAROVA, T.; BAUER, P.; IVANOV, R. Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 124-133, 2015.

CARVALHO, P. D. O.; CAMPOS, P. R. B.; MAXIMILIANO, D. A. N.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTANEDA-ALVAREZ, C.; ABALLAY, E. Rhizobacteria with nematicide aptitude: enzymes and compounds associated. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 32, n. 12, p. 1-7, 2016.

CASTRO-GUERRERO, N. A.; ISIDRA-ARELLANO, M. C.; COZATL, D. G. M.; VALDÉS-LÓPEZ, O. Common Bean : A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc, and Phosphate Deficiencies. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-7, 2016.

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, 2013.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: a review. **Biopharm Journal**, v. 1, n. 2, p. 41-47, 2015.

COLLA, L. M.; CHRISTIAN, O. R.; JORGE, A. V. C. Applications and Production of

Microbial Lipases. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos safra 2017/2018**. Brasília, DF: CONAB, 2018. v. 5.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B.; SOMAVILLA, L.; ROCHA, D. J. A.; ANTUNES, I. F. Potencial da microbiolização de sementes de feijão com rizobactérias para o controle de nematoide das galhas. **Nematropica**, Bradenton, v. 42, n. 2, p. 343-350, 2012.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, 2014, p. 184-191, 2013.

DI SALVO, L. P.; CELLUCI, G. C.; CARLINO, M. E.; GARCIA, I. E. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation and nitrogen fertilization increase maize (*Zea mays* L.) grain yield and modified rhizosphere microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 126, n. 5, p. 113-120, 2018.

DIMKPA, C. O.; MERTEN, D.; SVATOS, A.; BUCHEL, G.; KOTLE, E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 5, p. 1687-1696, 2009.

DORDEVIC, S.; STANOJEVIC, D.; VIDOVIC, M.; MANDIC, V.; TRAJKOVIC, I. The use of bacterial indol-3-acetic acid (IAA) for reduce of chemical fertilizers doses. **Hemijaska Industrija**, Simanovci, v. 71, n. 3, p. 195-200, 2017.

DUTTA, J.; THAKUR, D. Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. **Plos one**, v. 12, n. 8, p. 1-24, 2017.

EL-SAYED, W. S.; AKHKHA, A.; EL-NAGGAR, M. Y.; ELBADRY, M. In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-11, 2014.

ESPÍNDOLA, C. J. Ciclo de Crescimento da Economia Brasileira e Desempenho do Agronegócio Catarinense. **Geografia**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 91-109, 2016.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture : Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 30, n. 156, p. 225-246, 2018.

FELESTRINO, E. B. **Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microrganismo associados à interação *Langsdorffia hypogaea*-hospedeira-rizosfera**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

- FIALLOS, F. R. G. Doenças causadas por vírus na cultura de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciencia y Tecnologia**, San José, v. 3, n. 2, p. 1-6, 2010.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.M.; STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M. Microrganismos promotores do crescimento de plantas. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. de P.; SANTOS, C. E. de R. e S.; STAMFORD, N. P. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF: Instituto Agronômico de Pernambuco Recife, 2010. cap. 4. p. 385-414.
- GALON, L.; TREVISOL, R.; FORTE, C. T.; TIRONI, S. P.; REICHERT JÚNIOR, F. W.; RADUNZ, A. L. Competitive ability of bean cultivars with hairy beggarticks. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 30, n. 4, p. 855-865, 2017.
- GHOSH, P.; RATHINASABAPATHI, B.; MA, L. Q. Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. **Chemosphere**, Oxford, v. 134, p. 1-6, 2015.
- GHOSH, R.; BARMAN, S.; MUKHOPADHYAY, A.; MANDAL, N. Biological control of fruit-rot of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 83, p. 29-36, 2015.
- GONG, Q.; ZHANG, C.; LU, F.; ZHAO, H. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. **Food Control**, Guildford, v. 36, n. 1, p. 8-14, 2014.
- GONTIA-MISHRA, I.; SAPRE, S.; TIWARI, S. Zinc solubilizing bacteria from the rhizosphere of rice as prospective modulator of zinc biofortification in rice. **Rhizosphere**, v. 3, n. 1, p. 185-190, 2017.
- GRANT, C. A.; TOMASIEWICZ, D. J.; FLATEN, D. N.; SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações agronômicas**, Piracicaba, n. 95, p. 1-5, 2001.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.
- HARIPRASAD, P.; VENKATESWARAN, G.; NIRANJANA, S. R. Diversity of cultivable rhizobacteria across tomato growing regions of Karnataka. **Biological Control**, Orlando, v. 72, p. 9-16, 2014.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola LSPA**. 2016. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201->

levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=o-que-e. Acesso em: 19 fev. 2018.

JHA, P. N.; GUPTA, G.; PRAMEELA, J.; MEHROTRA, R. Association of Rhizospheric / Endophytic Bacteria with Plants : A Potential Gateway to Sustainable Agriculture. **Greener Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 2, p. 73-84, 2013.

JIMTHA, J. C.; SMITHA, P. V.; ANISHA, C.; THOMAS, D. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 57-66, 2014.

JORQUERA, M.; MARTINEZ, O. A.; MARILEO, L. G.; SOBARZO, J. A. Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 99-107, 2014.

JUCOSKI, G. O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A. Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 4, p. 720-728, 2016.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Eds.). **Phosphate Solubilizing Microorganisms**. New Delhi: Springer International Publishing Switzerland, 2014.

KITAJIMA, E. W. (Coord.). **Lista comentada dos vírus de plantas descritos no Brasil**. Fapesp: Programa Biota/Micro-Organismos, 2013. p. 1-139.

KUMAR, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; WALIA, A. Plant growth-promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from *Hippophae rhamnoides* L. (Sea-buckthorn) growing in cold desert Trans-Himalayan Lahul and Spiti regions of India. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 3, p. 1-12, 2015.

KUMAR, H.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Seed-coating fenugreek with *Burkholderia* rhizobacteria enhances yield in field trials and can combat *Fusarium wilt*. **Rhizosphere**, v. 3, p. 92-99, 2017.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

LACERDA, J. R. M.; SILVA, T. F.; VOLLÚ, R. E.; MARQUES, J. M.; SELDIN, L. Generally recognized as safe (GRAS) *Lactococcus lactis* strains associated with *Lippia sidoides* Cham. are able to solubilize/mineralize phosphate. **Springer Plus**, v. 5, n. 1, p. 828, 2016.

LEÃO, E. U.; SILVA, J. C.; MEDEIROS, F. R.; MACEDO, G. S. S. R.; ADORIAN, G. C.; MARINGONI, A. C. Potencial in vitro de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 4, p. 360-362, 2016.

MAJEED, A.; ABBASI, M. K.; HAMEED, S.; IMRAN, A.; RAHIM, N. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-10, 2015.

AFONSO, S. M. E. **Caracterização físico-química e actividade antioxidante de novas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar)-Escola Superior Agrária de Bragança, 2010.

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

MATOS, A. D. M.; GOMES, I. C. P.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; GOMES, W. S.; SANTOS NETO, J. A.; PEREIRA, M. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 2945-2954, 2017.

MENEZES JÚNIOR, J. B. F. O Feijão comum: taxinomia, morfologia, histologia, parasitologia, microbiologia, composição química e usos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 20, n. 1, p. 83-104, 1960.

MIHALACHE, G.; ZAMFIRACHE, M.; MIHASAN, M.; IVANOV, I.; STEFAN, M.; RAUS, L. Phosphate-solubilizing bacteria associated with runner bean rhizosphere. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, v. 67, n. 3, p. 793-800, 2015.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MORESCO, E. R. **Uso da cultura do trigo no controle de fitonematoides**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2016. Comunicado Técnico, 367.

NASCENTE, A. S.; COBUCCI, T.; SOUSA, D. M. G.; LIMA, D. P. Produtividade do feijoeiro comum afetada por fontes de fósforo com ou sem cálcio. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 57, n. 2, p. 180-185, 2014.

NASCIMENTO, W. C. A.; LEAL MARTINS, M. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 1-2, p. 91-96, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGHIA, N. K.; TIEN, T. T. M.; NGUYEN, T. K. O.; NUONG, N. H. K. Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid Producing Halophilic Bacteria from Salt Affected Soil of Rice – Shrimp Farming System in the Mekong Delta , Vietnam. **Agriculture, Forestry and Fisheries**, v. 6, n. 3, p. 69-77, 2017.

NITSCHKE, J.; ALTENBACH, H. J.; MALOLEPZY, T.; MOLLEKEN, H. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. **Carbohydrate**

Research, Amsterdam, v. 346, n. 11, p. 1307-1310, 2011.

OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C.; ZACCHEO, P. V. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava, v. 4, n. 2, p. 226-244, 2011.

OLIVEIRA, M. G. C.; OLIVEIRA, L. F. C.; WENDLAND, A.; GUIMARÃES, C. M.; QUINTELA, E. D.; BARBOSA, F. R.; CARVALHO, M. C. S.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVEIRA, P. M. **Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos**. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 2018.

OLIVEIRA, Z. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional**. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia)-Universidade de São Paulo, 2009.

PADDA, K. P.; PURI, A. Z.; QINGWEI, C.; CHRIS, P., WU, X. Effect of GFP-tagging on nitrogen fixation and plant growth promotion of an endophytic diazotrophic strain of *Paenibacillus polymyxa*. **Botany**, Ottawa, v. 95, n. 9, p. 933-942, 2017.

PARK, K.; PARK, J. W.; LEE, S. W.; BALARAJU, K. Disease suppression and growth promotion in cucumbers induced by integrating PGPR agent *Bacillus subtilis* strain B4 and chemical elicitor ASM. **Crop Protection**, Guildford, v. 54, p. 199-205, 2013.

PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; LEO, W.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. P. Phytohormone production endowed with antagonistic potential and plant growth promoting abilities of culturable endophytic bacteria isolated from *Clerodendrum colebrookianum* Walp. **Microbiological Research**, Jena, v. 193, p. 57-73, 2016.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 241-248, 2011.

POSSE, S. C. P.; SOUZA, E. M. R. S.; SILVA, G. M.; FASOLO, L. M.; SILVA, M. B.; ROCHA, M. A. M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2009-2011**. Vitória: Incaper, 2010.

PRABHUKARTHIKEYAN, S. R.; KEERTHANA, U.; RAGUCHANDER, T. Antibiotic-producing *Pseudomonas fluorescens* mediates rhizome rot disease resistance and promotes plant growth in turmeric plants. **Microbiological Research**, Jena, v. 210, p. 65-73, 2018.

PRAKAMHANG, J.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAMTISONG, K. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 85, p. 38-49, 2014.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada

por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 423-430, 2013.

RODRIGUES, A. A.; FORZANI, M. V.; SOARES, R. S.; SIBOV, S. T.; VIEIRA, J. D. G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 2, p. 149-158, 2016.

RODRIGUES, R. A. R.; MELLO, W. Z.; CONCEIÇÃO, M. C. G.; SOUZA, P. A.; SILVA, J. J. N. Dinâmica do nitrogênio em sistemas agrícolas e florestais tropicais e seu impacto na mudança do clima. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 5, p. 1868-1886, 2017.

RODRIGUES, V. D. **Avaliação da biodiversidade de bactérias associadas a ambientes de Mina**. 2014. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)-Universidade Estadual de Campinas, 2014.

RUBIO-CANALEJAS, A.; CELADOR-LERA, L.; MENÉNDEZ, E.; FLORES-FÉLIX, J. D.; RIVAS, R. Selection of rhizobial PGPRs for basil crops. **New Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 426, 2016.

RUSCHEL, A. P.; BRITTO, D. P. P. S. Fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico em algumas gramíneas e na tiririca pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, p. 65-69, 1966.

SAAVEDRA, D. A. C.; MARTINEZ, H. F. C.; ROSERO, N. C.; CUENCA, F. F. G. Rizobacterias que promueven el desarrollo e incremento en productividad de *Glycine max* L. **Ciencia y Tecnologia**, San José, v. 10, p. 7-15, 2017.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 27, n. 8, p. 1471-1504, 2004.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação do nódulo em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. Documentos, 251.

SANTOS, L. O.; MACAMO, E. I. D.; HADDAD, F.; SILVA, H. S. A. Activity of rhizobacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* in soils cultivated with monocotyledonous plants 1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 47, n. 4, p. 472-479, 2017.

SARATHAMBAL, C.; KRISHNASWAMY, I.; BALACHANDAR, D. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 87, p. 1-10, 2015.

SCHMID, N. B.; GIEHL, R. F. H.; DOLL, S.; HANS-PETER, M.; STREHMEL, N.; SCHEEL, D.; KONG, X.; HIDER, R. C.; WIREN, N. V. Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-Dependent Coumarins Mediate Iron Acquisition from Alkaline Substrates in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v. 164, n. 1, p. 160-172, 2014.

SCHONINGER, E. L.; LANGE, A.; MENEGON, T. G.; CAIONE, G. Produtividade da cultura do feijoeiro submetido a doses de fósforo e nitrogênio. **Revista Agrarian**,

Dourados, v. 8, n. 30, p. 387-398, 2015.

SHARMA, I. P.; SHARMA, A. K. Effective control of root-knot nematode disease with *Pseudomonas* rhizobacteria filtrate. **Rhizosphere**, v. 3, p. 123-125, 2017.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SILVA, F. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; LELIS, F. M. V.; FIGUEIRA, A. R. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 1, p. 45-50, 2013.

SILVA, E. R. **Exsudação radicular e sua utilização por rizobactérias**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical)-Instituto Agronômico, Campinas, 2011.

SILVA, H. T.; COSTA, A. O. **Caracterização botânica de espécies silvestres do gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae)**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. Documentos, 156.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. D. S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007.

SNAPP, S.; RAHMANIAN, M.; BATELLO, C. **Pulse crops for sustainable farms in sub-Saharan Africa**. Rome: FAO, 2018.

SOLANO, B. R.; BARRIUSO, J.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, F. J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad, I.; Pichtel, J.; Hayat, S. (Eds.). *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. p. 41-54.

SONG, X.; LIU, M.; WU, D.; GRIFFITHS, B. S. Interaction matters: synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 89, p. 25-34, 2015.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. X.; COSTA, M. R.; PEREIRA, M. C. T.; SANTOS, M. A. Triple combinations with PGPB stimulate plant growth in micropropagated banana plantlets. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 103, p. 31-35, 2016.

TIPRE, S.; PINDI, P. K.; SHARMA, S. Biotechnological potential of a Halobacterium of family Bacillaceae. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 65-71, 2015.

TORRES, M. J.; BRANDAN, C. P.; SABATE, D. C.; PETROSELLI, G.; BALSELLS, R. E.; AUDISIO, M. C. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 105, p. 93-99, 2017.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas**. Belém: Empresa Amazônia Oriental, 2009. Documentos, 353.

VIEIRA, C. Adubação mineral e calagem. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 115-142.

VIEIRA JUNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; ANTUNES JÚNIOR, H.; SILVA, M. S.; SILVA, D. S. G.; SILVA, U. O. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. Documentos, 155.

WHITELEY, C. G.; LEE, D. J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 291-316, 2006.

WILLERDING, A. L. **Bactérias produtoras de Lipase e aplicação no processo de DE Hidrólise do óleo de Buriti (*Mauritia flexuosa* L.)**. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; KLOEPPER, J. W.; DONALD, P. A.; MCLNROY, J. A. Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. **Plos one**, v. 12, n. 7, p. 1-19, 2017.

ZHOU, C.; GUO, J.; ZHU, L.; XIAO, X.; XIE, Y.; ZHU, J.; MA, Z.; WANG, J. *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 enhances plant iron absorption via improved root systems and activated iron acquisition mechanisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 105, p. 162-173, 2016.

CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE BANANEIRA PRATA-ANÃ

RESUMO

SILVA, Cláudia Maria. **Caracterização fisiológica de rizobactérias isoladas de bananeira Prata-Anã**. 2018. 104 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG³.

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) destacam-se no desenvolvimento das plantas e no controle biológico de fitopatógenos por meio de vários mecanismos. Objetivou-se caracterizar fisiologicamente 86 rizobactérias isoladas de bananeira de diferentes municípios do Norte de Minas Gerais quanto à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, produção de ácido indol-3-acético, fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e produção das enzimas lipase, protease e quitinase. As bactérias foram cultivadas em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*), em placas de Petri por um período de 24h a 28°C. Em seguida, os isolados foram submetidos ao ajuste da densidade óptica a 1,0 de absorbância, no comprimento de onda (λ) a 540 nm em espectrofotômetro. Em seguida, todos os isolados foram submetidos às avaliações de atividade bioquímica, conforme protocolos estabelecidos, para a solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético, fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e produção das enzimas lipase, protease e quitinase. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, ao teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. As rizobactérias avaliadas apresentaram potencial para a solubilização de fosfato de cálcio tribásico inorgânico em meio NBRIP sólido e líquido e habilidade para a produção da fosfatase ácida. Em contrapartida, todos os isolados avaliados quanto à solubilização de fosfato de alumínio e de ferro foram negativos. Dos 86 isolados investigados, 54,6% formaram halo de solubilização característico para fosfato de cálcio tribásico inorgânico, 7% foram produtores de AIA, somente quando submetidas à via do triptofano, 27,9% foram produtores de sideróforo, e 47,7% foram produtores de lipase. Todos os isolados avaliados neste trabalho foram negativos para a atividade da fixação de nitrogênio, além de não serem produtoras de protease e quitinase. Dessa forma, conclui-se que os isolados avaliados são solubilizados de fosfato inorgânico, produtores de AIA e de sideróforos, além de produtores da enzima lipase, podendo ser fontes promissoras de biofertilizantes.

Palavras-chave: solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio, ácido indol-3-acético, sideróforos, enzimas.

³Comitê orientador: Prof.^aRegina C. F. Ribeiro/DCA/UNIMONTES (Orientadora); Prof.^aAdelica Aparecida Xavier- DCA/UNIMONTES (Coorientadora). Prof. Dr. José Augusto S. Neto - DCA/UNIMONTES (Conselheiro).

CHAPTER I – PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF RIZOBACTERIA ISOLATED FROM PRATA-ANÃ BANANA TREE

ABSTRACT

SILVA, Cláudia Maria. **Physiological characterization of rhizobacteria isolated from Prata-Anã banana tree.** 2018. 104 p. Thesis (PhD in Plant Production in the Semi-Arid) - State University of Montes Claros, Janaúba, MG⁴.

Plant growth promoting rhizobacteria (RPCPs) stand out in the development of plants and in the biological control of phytopathogens through several mechanisms. The objective of this study was to characterize 86 rhizobacteria isolated from banana plants from different municipalities in the North of Minas Gerais, Brazil, regarding the inorganic phosphate solubility, indole-3-acetic acid production, biological nitrogen fixation, siderophores production and lipase, protease and chitinase production. Bacteria were cultured in TSA medium (Tryptic Soy Agar) in Petri dishes for a period of 24 h at 28 ° C. Then the isolates were adjusted to the optical density at 1.0 absorbance, at wavelength (λ) at 540 nm in a spectrophotometer. Afterwards, all isolates were submitted to biochemical activity evaluations, according to established protocols, for phosphate solubilization, indole-3-acetic acid production, biological nitrogen fixation, siderophores production and production of lipase, protease and chitinase enzymes. The data were submitted to analysis of variance and, when significant, to the Scott and Knott test, at 5% probability. The evaluated rhizobacteria presented potential for the solubilization of inorganic tribasic calcium phosphate in solid and liquid NBRIP medium and ability to produce acid phosphatase. In contrast, all the isolates evaluated for solubilization of aluminum phosphate and iron phosphate were negative. Of the 86 isolates investigated, 54.6% formed characteristic solubilization halo for inorganic tribasic calcium phosphate, 7% were AIA producers, only when submitted to the tryptophan path, 27.9% were siderophore producers, and 47.7% were lipase producers. All the isolates evaluated in this work were negative for nitrogen fixation activity, besides not producing protease and chitinase. Thus, it is concluded that the isolates evaluated are solubilizers of inorganic phosphate, AIA and siderophores producers, as well as lipase enzyme producers, and may be promising sources of biofertilizers.

Key words: phosphate solubilization, biological nitrogen fixation, indole-3-acetic acid, siderophores, enzymes.

⁴Steering committee: Prof.^aRegina C. F. Ribeiro DCA/UNIMONTES (Advisor); Prof.^aAdelica Aparecida Xavier-DCA/UNIMONTES (Co-advisor). Prof. Dr. José Augusto S. Neto - DCA/UNIMONTES (Counselor).

1 INTRODUÇÃO

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) têm recebido bastante atenção, principalmente, no que diz respeito aos seus mecanismos de ação no desenvolvimento das plantas (JHA et al., 2013). Entre eles, merecem destaque aqueles relacionados à solubilização de fosfato, à produção de ácido indol-3-acético (AIA), à fixação biológica de nitrogênio; que são mecanismos de crescimento diretos, além da produção de lipase, sideróforos, protease e quitinase que representam mecanismos indiretos por atuarem no controle de fitopatógenos (PRAKAMHANG et al., 2014) (TIPRE; PINDI; SHARMA, 2015).

A solubilização de fosfato é um processo de grande relevância, visto que o fósforo é um nutriente que exerce papel importante no metabolismo vegetal, participando da fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, transferência de genes e reprodução (GRANT et al., 2001). Os solos agrícolas, de modo geral, possuem grandes quantidades de fósforo, porém, a maior parte desse nutriente não se encontra disponível às plantas. Desse modo, torna-se fundamental a participação das rizobactérias na solubilização de fosfato para que o fósforo seja assimilado pelas plantas e contribuir para o seu desenvolvimento (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

Entre as auxinas, o ácido indol-3-acético (AIA) é o fitormônio mais estudado e o mais produzido pelas bactérias, sendo requerido pelas plantas em baixas concentrações. Ele é conhecido por sua capacidade de auxiliar no desenvolvimento da raiz, divisão celular e multiplicação celular. Isso leva ao aumento do comprimento e do número de pêlos radiculares e da parte aérea vegetal, aumentando, assim, a captação de nutrientes pelas plantas (JHA et al., 2013).

A habilidade dos rizóbios para fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas é outro mecanismo de considerável importância agrícola e ambiental, visto que as leguminosas têm, a seu dispor, duas fontes de nitrogênio: o mineral, proveniente do solo e/ou fertilizante e o nitrogênio gasoso, fixado biologicamente (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Além desses benefícios, as enzimas produzidas por rizobactérias, como a lipase, protease e quitinase, constituem um importante grupo de enzimas, devido à versatilidade de suas propriedades e à fácil produção em massa. São amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna muito atrativas para a aplicação no controle biológico de doenças de plantas (AFZAL et al., 2016). Essas bactérias também podem produzir sideróforos, que são moléculas orgânicas extracelulares de baixo peso molecular, que são quelantes específicos de íons férricos, tornando-os disponíveis para as plantas (DUTTA; THAKUR, 2017).

Neste sentido, o ganho de melhor entendimento sobre os benefícios dos microrganismos no solo é muito promissor, possibilitando seu uso em substituição aos fertilizantes convencionais e contribuindo para controle biológico de doenças de plantas (ZILLI et al., 2003;PHILIPPOT et al., 2013).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os isolados de rizobactérias quanto à capacidade para a solubilização de fosfato inorgânico, produção de ácido indol-3-acético, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos e produção das enzimas lipase, protease e quitinase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos isolados e preparo das suspensões bacterianas

Foram utilizados 86 isolados oriundos de bananeira Prata-anã, sendo que alguns foram identificados com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA (Tabela 1). Os outros isolados estão em fase de identificação.

Foram caracterizados fisiologicamente 86 isolados de rizobactérias, provenientes de bananeiras de municípios do Norte de Minas Gerais, quanto à capacidade de solubilização de diferentes fontes de fosfato inorgânico, produção de ácido indol-3-acético, atividade de fixação de nitrogênio e, ainda, quanto à produção de sideróforos, lipase, protease e quitinase.

As bactérias foram cultivadas em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*), em placas de Petri por um período de 24h a 28°C. Em seguida, os isolados foram submetidos ao ajuste da densidade óptica a 1,0 de absorbância, no comprimento de onda (λ) a 540 nm em espectrofotômetro. Para isso, foram inoculados 100 μ L do isolado estoque que foi cultivado em 100 mL de meio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*), mantidos em agitador automático a 120 rpm e temperatura de 28°C por um período de 48h. Depois do período de crescimento, esses isolados foram transferidos para tubos que foram centrifugados por 10 minutos à velocidade de 10.000 rpm para precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e as suspensões foram preparadas adicionando-se ao precipitado a solução salina a 0,85% para posterior leitura no espectrofotômetro. Essa suspensão bacteriana padronizada foi utilizada para os estudos de solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido, detecção da fosfatase ácida, produção de ácido indol-3-acético, fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e produção das enzimas lipase, protease e quitinase.

TABELA 1. Identificação das rizobactérias oriundas de raízes de bananeira ‘Prata-Anã’ com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA.

Isolado	E value	Identidade	Organismo mais relacionado	Acesso no Genbank
RZ-3	0.0	98%	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	EU982902.1
RZ-5	0.0	98%	<i>Bacillus pumilus</i>	KF361365.1
RZ-6	0.0	98%	<i>Bacillus tequilensis</i>	KT758623.1
RZ-7	0.0	99%	<i>Bacillus altitudinis</i>	JX134625.1
RZ-12	0.0	99%	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KP137560.1
RZ-18	0.0	99%	<i>Bacillus cereus</i>	JN206614.1
RZ-19	0.0	99%	<i>Bacillus pumilus</i>	JF419325.1
RZ-21	0.0	99%	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	EU982902.1
RZ-22	0.0	99%	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KR010173.1
RZ-23	0.0	99%	<i>Bacillus tequilensis</i>	JF411319.1
RZ-25	0.0	99%	<i>Bacillus subtilis</i>	KC465728.1
RZ-26	0.0	99%	<i>Bacillus subtilis</i>	KR010179.1
RZ-31	0.0	98%	<i>Bacillus cereus</i>	JX025166.1
RZ-32	0.0	99%	<i>Bacillus altitudinis</i>	FJ174641.1
RZ-33	0.0	99%	<i>Bacillus pumilus</i>	JF419325.1
RZ-35	0.0	98%	<i>Bacillus aerophilus</i>	KT758422.1
RZ-38	0.0	99%	<i>Bacillusthuringiensis</i>	KP137560.1
RZ-39	0.0	98%	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	KP261025.1
RZ-40	0.0	99%	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KP137560.1
RZ-41	0.0	99%	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	HM372880.1
RZ-42	0.0	99%	<i>Bacillus subtilis</i>	GQ395245.1
RZ-43	0.0	98%	<i>Bacillus subtilis</i>	KJ655538.1
RZ-44	0.0	99%	<i>Bacillus pumilus</i>	JF419325.1
RZ-48	0.0	99%	<i>Paenibacillusalvei</i>	AB377108.1
RZ-50	0.0	99%	<i>Bacillus pumilus</i>	KF641839.1
RZ-51	0.0	99%	<i>Bacillus cereus</i>	KR071870.1
RZ-53	0.0	99%	<i>Bacillus stratosphericus</i>	KF535117.1
RZ-54	0.0	99%	<i>Bacillus aerophilus</i>	JN867128.1
RZ-59	0.0	99%	<i>Bacillus cereus</i>	KR071870.1
RZ-61	0.0	99%	<i>Bacillus aerophilus</i>	JN867128.1
RZ-62	0.0	98%	<i>Bacillus cereus</i>	KC876035.1
RZ-63	0.0	99%	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KP137560.1
RZ-65	0.0	98%	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	KJ870199.1
RZ-66	0.0	99%	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KF971833.1
RZ-67	0.0	99%	<i>Bacillus xiamenensis</i>	JX680066.1
RZ-71	0.0	98%	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	FJ174625.1
RZ-72	0.0	99%	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	FJ174625.1
RZ-73	0.0	98%	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	FJ174625.1
RZ-77	0.0	99%	<i>Bacillus altitudinis</i>	FJ174641.1
RZ-81	0.0	98%	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	FJ174625.1
RZ-84	0.0	99%	<i>Bacillus aquimaris</i>	KF358255.1
RZ-85	0.0	98%	<i>Bacillus subtilis</i>	EF423590.1
RZ-86	0.0	99%	<i>Bacillus aquimaris</i>	KF358255.1

2.2 Solubilização de fosfato inorgânico a partir de diferentes fontes de fósforo

A capacidade de solubilização de fósforo pelas rizobactérias foi avaliada a partir de distintas fontes de fósforo insolúvel por meio da metodologia descrita por (KATZNELSON, H.; BOSE, 1959), utilizando-se o meio de cultura NBRIP sólido. Foram utilizados 86 tratamentos para três fontes de fósforo com três repetições.

As seguintes fontes inorgânicas de fósforo foram utilizadas: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 . No centro da placa de Petri, foi realizada a adição de 10 μL da suspensão bacteriana padronizada e, no 15º dia, foi avaliada a formação de halo claro como positivo para solubilização de fósforo. Foi mensurado ainda o diâmetro do halo da colônia e da colônia e foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976). Como escala de eficiência do índice de solubilização, foi utilizada a escala de Silva Filho e Vidor (2000), sendo que índices inferiores a 2 caracterizam a baixa solubilização, índices entre 2 e 3 possuem média solubilização, e índices acima de 3 possuem alta solubilização.

2.3 Quantificação da solubilização de fosfato inorgânico

A quantificação de solubilização de fosfato inorgânico foi realizada para 47 rizobactérias que foram positivas na solubilização de fosfato. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os isolados que solubilizaram fósforo em meio sólido foram adicionados em meio líquido NBRIP contendo 0,1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g/L de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0,25 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5,0 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L de KCl e 10 g/L de glucose (NAUTIYAL, 1999). Os isolados bacterianos foram cultivados em meio líquido TSB durante 48 h e 100 μL da suspensão bacteriana ajustada ($\text{DO} = 1,0 \text{ ABS}, \lambda = 540 \text{ nm}$) foram transferidos para frascos de erlenmeyer, contendo 50 ml de meio líquido NBRIP, suplementado com a fonte de fósforo de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que apresentou halo de solubilização do fósforo. O controle foi composto por frascos sem inóculo e as amostras foram incubadas a 24°C com agitação constante por 72 horas. Após incubação, o meio líquido foi filtrado e a concentração de P no filtrado resultante foi determinada pelo método do ácido ascórbico em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 725 nm (Figura 2) (BRAGA, J.M.; DEFELIPO, 1981). Além disso, foi medido o pH do filtrado com o auxílio de um medidor de pH digital. O fósforo solubilizado foi estimado pela diferença entre P solúvel nas amostras inoculadas e não inoculadas nos frascos.

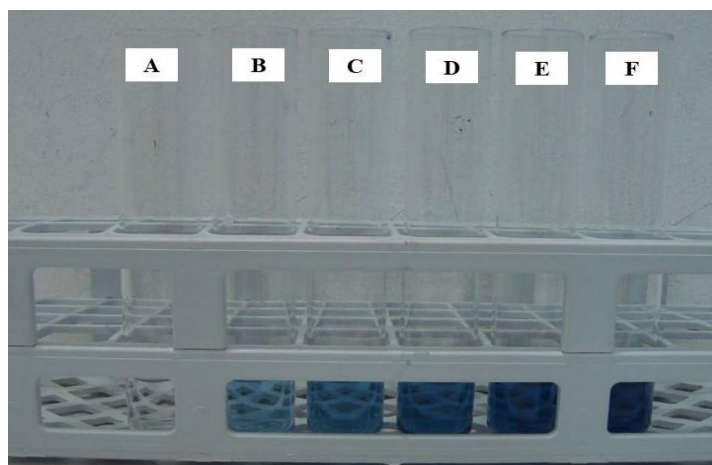


FIGURA 2. Escala de quantificação de fósforo (A, B, C, D, E e F representam 0, 1, 2, 3,4 e 5 mg de fósforo, respectivamente), utilizada no método do ácido ascórbico em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 725nm.

2.4 Detecção da atividade da fosfatase ácida

A atividade da fosfatase também foi investigada nos isolados que solubilizaram fosfato inorgânico. Assim, foi preparado o meio TSA no qual foram adicionados 2 ml de solução de difosfato de fenolftaleína a 0,5% (esterelizada e filtrada). Em um ponto da superfície do meio de cultura solidificado, foi adicionado 10 μ L da suspensão bacteriana ajustada em espectrofotômetro para 1,0 de absorvância. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas e a revelação da atividade da fosfatase foi realizada pela adição de algumas gotas de hidróxido de amônio (8,4%). Após 15 min, foi realizada a leitura e a atividade da fosfatase foi visualizada pela formação de uma zona cor de rosa em torno das colônias das bactérias (ROMEIRO, 2007).

2.5 Quantificação da produção de Ácido indol-3- acético

Para a quantificação de ácido indol-3-acético (AIA), o ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 86 tratamentos e três repetições.

A metodologia utilizada foi a descrita por (KUSS et al., 2007), que utiliza o meio TSA 10% suplementado com L-triptofano em solução com água destilada e filtrada com filtro tipo Millipore® 0,22 μ para concentração final de 5mM de L-triptofano.

Alíquotas de 0,250 mL da suspensão bacteriana ajustada para 1 foram adicionadas em meio de cultura, incubados por 48 horas a 28°C sob agitação constante de 120 rpm, na ausência de luz. Após esse período, 2,0 mL de cada uma das culturas homogeneizadas foram

transferidas para microtubos tipo Eppendorf de 2,0 mL e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio de 15,0 mL, sendo adicionados 2,0 mL de reagente de Salkowski. Os frascos foram incubados por, pelo menos, 30 minutos em ambiente escuro. A produção de AIA foi avaliada pela presença da coloração rosa nos frascos.

Foi realizado também o ensaio da capacidade de síntese de AIA por via alternativa ao triptofano, onde os isolados que apresentaram capacidade de síntese de AIA em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano foram inoculados em meio TSA 10% não suplementado.

A avaliação quantitativa de AIA foi realizada pela intensidade da cor por meio da leitura da absorbância das amostras com o auxílio do espectrofotômetro em densidade ótica de 530 nm de comprimento de onda.

A concentração de AIA foi determinada pela absorbância em espectrofotômetro de meio de cultura esterilizado não inoculado com concentrações conhecidas de AIA comercial de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, que foi normalizada em curva-padrão, gerando a equação para determinar a concentração de AIA das amostras (Figura 3).

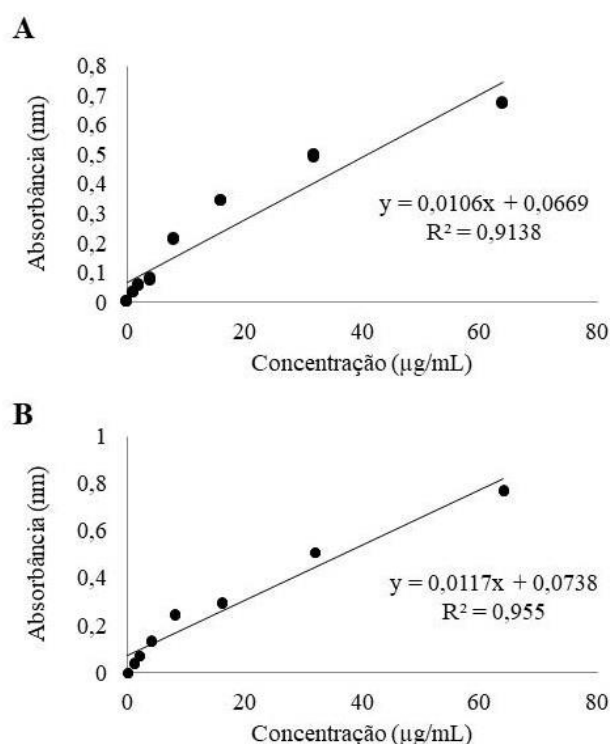


FIGURA 3. Curva-padrão de ácido indol-3-acético para o cálculo da concentração de AIA via triptofano dependente (A) e independente (B).

2.6 Atividade de fixação de nitrogênio

Para avaliar a capacidade dos isolados bacterianos em fixar nitrogênio *in vitro*, a suspensão de células bacterianas foi centrifugada, com solução salina (NaCl) 0,85%

esterilizada, por três vezes para eliminar resíduos de compostos nitrogenados. Após três centrifugações, a suspensão foi calibrada para DO de 0,5 de absorbância em comprimento de onda de 540 nm.

Foram utilizados tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, sem nitrogênio. As bactérias foram cultivadas em triplicatas no meio NFb a 28°C por 10 dias. Foi observada se houve a formação de película aerotóxica no meio de cultura que indica a capacidade de fixar nitrogênio (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

2.7 Produção de sideróforos

Para a avaliação da produção de sideróforos, foi utilizada a metodologia adaptada de (SCHWYN; NEILANDS, 1987). As bactérias calibradas foram cultivadas em frascos elenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de 1/10 de TSB. Os frascos foram incubados a 28°C por 24 horas sob agitação constante. Logo após, a suspensão de células foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 150 microlitros que foram transferidos para placas de Elisa, na qual foram adicionados 150 microlitros do corante cromoazurol CAS. Os isolados que converteram a cor azul da solução CAS para amarelo, dentro de 15 minutos, foram considerados produtores de sideróforos. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram analisados qualitativamente, classificando-se os isolados como positivo ou negativo. Desse modo, o número de isolados produtores de sideróforos foi expresso em porcentagem.

2.8 Produção de enzimas

Lipase

A partir das amostras com densidade ótica ajustada para 1 de absorbância, foi realizada a adição pontual, em triplicata, das amostras de bactérias no centro da placa contendo o meio com tributirina 1,0% p/v, NaCl 0,5% p/v e Agar 2,0% p/v e, posteriormente, elas foram incubadas por 48 horas. Os isolados apresentando um halo transparente ao redor da colônia foram considerados positivos para a produção de lipase, e o raio dos halos foi medido através do uso de um paquímetro digital. O índice enzimático ($IE=R/r$) expressa a relação entre o diâmetro do halo de degradação do substrato e o diâmetro de crescimento da colônia de microrganismo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Protease

A produção de protease pelos isolados foi verificada por método semiquantitativo descrito por Tiago e Silva(2007).Dez microlitros dos isolados bacterianos calibrados foram introduzidos em três pontos equidistantes da placa de Petri contendo meio Simmons (0,2 g/L de MgSO₄; 1,0 g/L de NH₄H₂PO₄; 2,0 g/L de K₂HPO₄; 2,0 g/L de citrato de sódio; 5,0 g/L NaCl e 15 g/L de agar) acrescido de caseína (1,0 g/L), em triplicata. As placas foram incubadas em estufa com controle de temperatura e luminosidade por 10 dias a 26°C. Após este período, adicionou-se nas placas solução de ácido tricloroacético (10%) para revelação dos halos de degradação que indicaria a ação das proteases sobre a caseína. A atividade proteolítica foi determinada pelo índice de revelação dos halos de degradação (IRE=D/d), em que D é o diâmetro total (colônia + halo) e d é o diâmetro da colônia.

Quitinase

Para a avaliação da produção de quitinase, foram adicionados 8 g de quitina coloidal(RENWICK; CAMPBELL; COE, 1991), como única fonte de carbono, por litro de meio MLN, complementado com 0,78 g de NH₄NO₃ e 15 g de agar. Dez microlitros dos isolados calibrados foram adicionados nas placas com o meio MLN (Meio semi-sólido livre de nitrogênio), em triplicata, e incubados em estufa a 28°C por 10 dias. A formação de um halo claro indica a produção de quitinase.

2.9 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS

3.1 Solubilização de fosfato inorgânico e atividade da fosfatase ácida

As rizobactérias avaliadas apresentaram capacidade para a solubilização de fosfato de cálcio tribásico inorgânico em meio NBRIP sólido e líquido, além de possuírem habilidade para a produção da fosfatase ácida. Em contrapartida, todos os isolados avaliados quanto à solubilização de fosfato de alumínio e de ferro foram negativos.

Através das análises realizadas, verificou-se que houve diferença significativa na solubilização de fosfato de cálcio tribásico inorgânico, tanto em meio NBRIP sólido quanto em meio líquido, entre as rizobactérias estudadas ($p < 0,05$). Além disso, houve diferença significativa entre os valores do pH final entre as rizobactérias submetidas ao teste de solubilização em meio líquido NBRIP, suplementado com fosfato de cálcio tribásico inorgânico ($p < 0,05$).

Dos 86 isolados investigados, 47 (54,6%) formaram halo de solubilização característico para fosfato de cálcio tribásico inorgânico em meio sólido. O isolado 51 (*Bacillus cereus*) apresentou o maior índice de solubilização de fósforo, sendo classificado como de alta solubilização, visto que o IS foi maior que 3 (Figura 4).

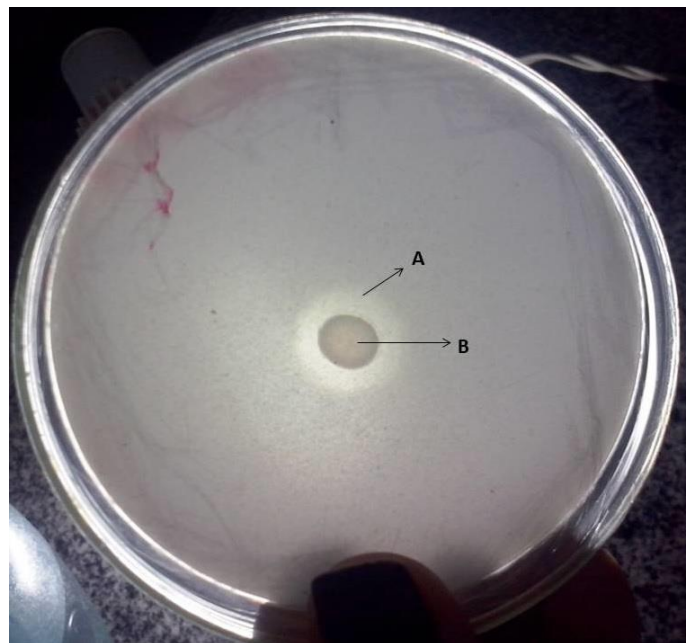


FIGURA 4. Halo (A) característico da solubilização de fosfato por *Bacillus cereus*(B) isolado de bananeira Prata-Anã. Solubilização para fosfato de cálcio tribásico inorgânico em meio sólido NBRIP.

O menor índice de solubilização foi registrado para o isolado 56, sendo classificado como de baixa solubilização, já que o IS foi menor que 2 (Tabela 2). Verificou-se, ainda, variação no diâmetro da colônia e do halo no ensaio de solubilização de fosfato em meio sólido ($p < 0,05$). O maior halo foi registrado para o isolado 2, com diâmetro médio de 30 mm, enquanto que o menor foi para o isolado 13, com diâmetro médio de halo de 7,7 mm. A maior colônia foi formada pelo isolado 56, com diâmetro médio de 18,3 mm, enquanto que foi observada a menor colônia para os isolados 13 e 50, ambos com diâmetro médio de 5,6 mm (Figura 5).

Quanto a solubilização de fosfato de cálcio tribásico em meio líquido, o melhor isolado foi a rizobactéria 41 ($8,94 \text{ mg/L}^{-1}$), enquanto o isolado 56 ($0,02 \text{ mg/L}^{-1}$) apresentou a menor solubilização (Figura 6). Os valores de pH apresentaram variações, visto que, no início, o pH do meio líquido NBRIP foi ajustado para 7 e, no final, ficou em 3,37, para o isolado 79 que promoveu a maior variação, e em 6,93 para o isolado 22 (*Bacillus thuringiensis*) que promoveu a menor variação de pH (Figura 6).

A avaliação da produção da fosfatase ácida, realizada para os isolados solubilizadores de fosfato de cálcio tribásico, comprova que a maioria produz a enzima. Das 47 rizobactérias avaliadas neste aspecto, 32 (68,1%) formaram halos de coloração rosa, característicos da produção da fosfatase ácida (Figura 7). Dentre elas, 9 (28,1%) formaram halos maiores que 1 cm de diâmetro e 23 (72%) formaram halos com até 1 cm de diâmetro (Tabela 2).

TABELA 2. Índice de solubilização para rizobactérias isoladas de bananeira Prata-Anã em meio sólido NBRIP, suplementado com fosfato de cálcio tribásico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, classificação de acordo com a escala de eficiência proposta por Silva Filho e Vidor (2000) e atividade da fosfatase ácida.

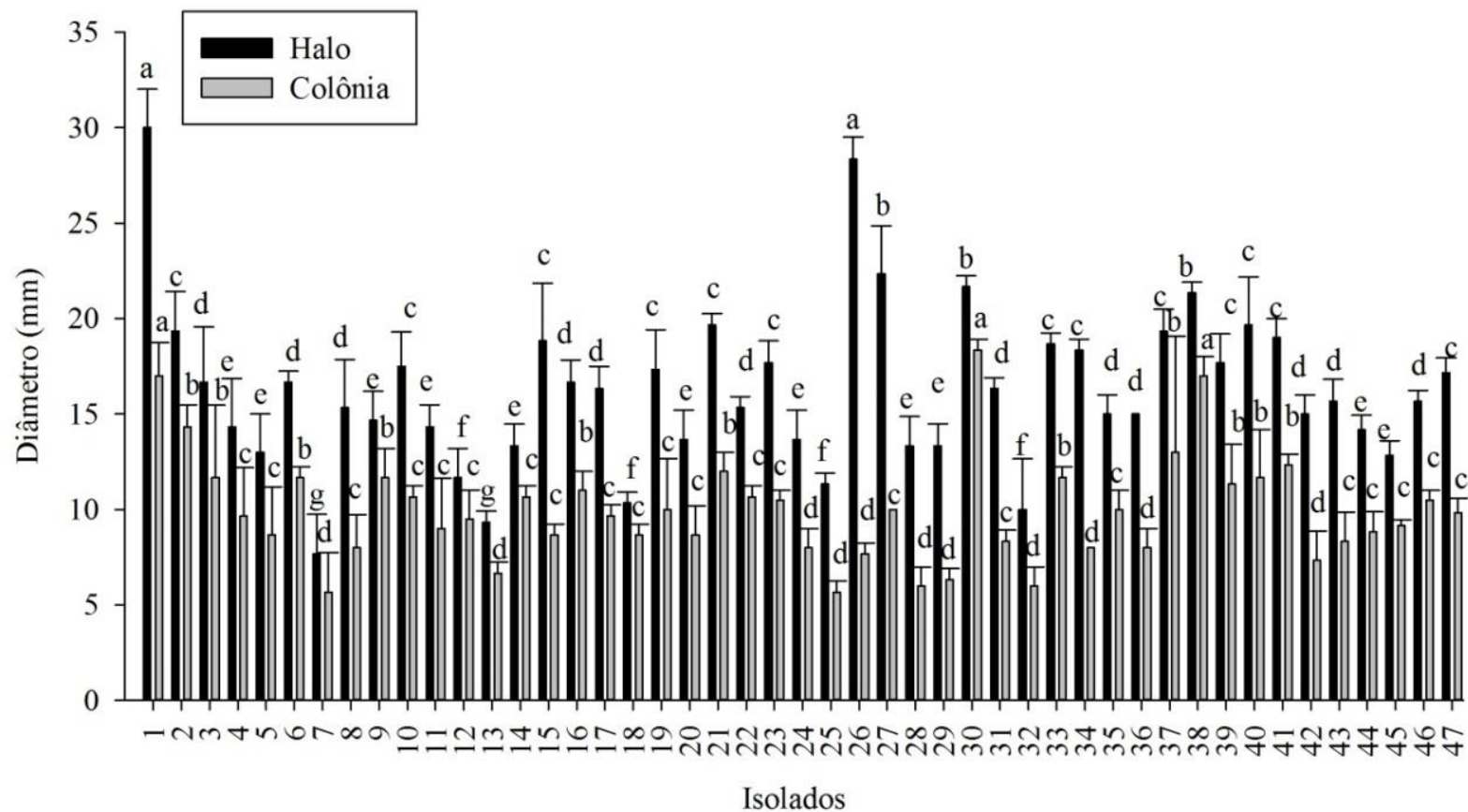
Isolado	Código/ figura 2 e 3	Gênero/espécie mais Relacionado	Índice de solubilização*	Classificação [†]	Fosfatase ácida [‡]
RZ-2	1		1,77 a	BS	-
RZ-6	2	<i>Bacillus tequilensis</i>	1,36 a	BS	-
RZ-7	3	<i>Bacillus altitudinis</i>	1,47 a	BS	++
RZ-8	4		1,51 a	BS	+
RZ-9	5		1,54 a	BS	+
RZ-11	6		1,43 a	BS	-
RZ-13	7		1,38 a	BS	++
RZ-15	8		1,98 b	BS	+
RZ-19	9	<i>Bacillus pumilus</i>	1,26 a	BS	-
RZ-22	10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,64 a	BS	-

RZ-24	11	<i>Bacillus tequilensis</i>	1,72 a	BS	+
RZ-25	12	<i>Bacillus subtilis</i>	1,23 a	BS	+
RZ-27	13		1,41 a	BS	+
RZ-28	14		1,25 a	BS	+
RZ-29	15		2,19 d	MS	-
RZ-30	16		1,52 a	BS	+
RZ-31	17	<i>Bacillus cereus</i>	1,69 a	BS	+
RZ-32	18	<i>Bacillus altitudinis</i>	1,19 a	BS	-
RZ-36	19		1,86 a	BS	+
RZ-39	20	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	1,59 a	BS	+
RZ-41	21	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	1,65 a	BS	++
RZ-42	22	<i>Bacillus subtilis</i>	1,44 a	BS	+
RZ-43	23	<i>Bacillus subtilis</i>	1,69 a	BS	+
RZ-46	24		1,71 a	BS	-
RZ-50	25	<i>Bacillus pumilus</i>	2,01 b	MS	+
RZ-51	26	<i>Bacillus cereus</i>	3,72 c	AS	-
RZ-53	27	<i>Bacillus stratosphericus</i>	2,23 b	MS	+
RZ-54	28	<i>Bacillus aerophilus</i>	2,24 b	MS	-
RZ-55	29		2,11 b	MS	-
RZ-56	30		1,18 a	BS	+
RZ-57	31		1,97 b	BS	+
RZ-58	32		1,66 a	BS	+
RZ-60	33		1,60 a	BS	+
RZ-61	34	<i>Bacillus aerophilus</i>	2,29 b	MS	-
RZ-62	35	<i>Bacillus cereus</i>	1,50 a	BS	+
RZ-63	36	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,90 b	BS	+
RZ-64	37		1,71 a	BS	+
RZ-65	38	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	1,26 a	BS	-
RZ-66	39	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,58 a	BS	++
RZ-67	40	<i>Bacillus xiamenensis</i>	1,71 a	BS	++
RZ-68	41		1,54 a	BS	-
RZ-70	42		2,08 b	MS	++
RZ-74	43		1,91 b	BS	++
RZ-76	44		1,61 a	BS	-
RZ-78	45		1,40 a	BS	-
RZ-79	46		1,49 a	BS	++
RZ-80	47		1,75 a	BS	++
CV (%)			15,15		

*Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,005$).

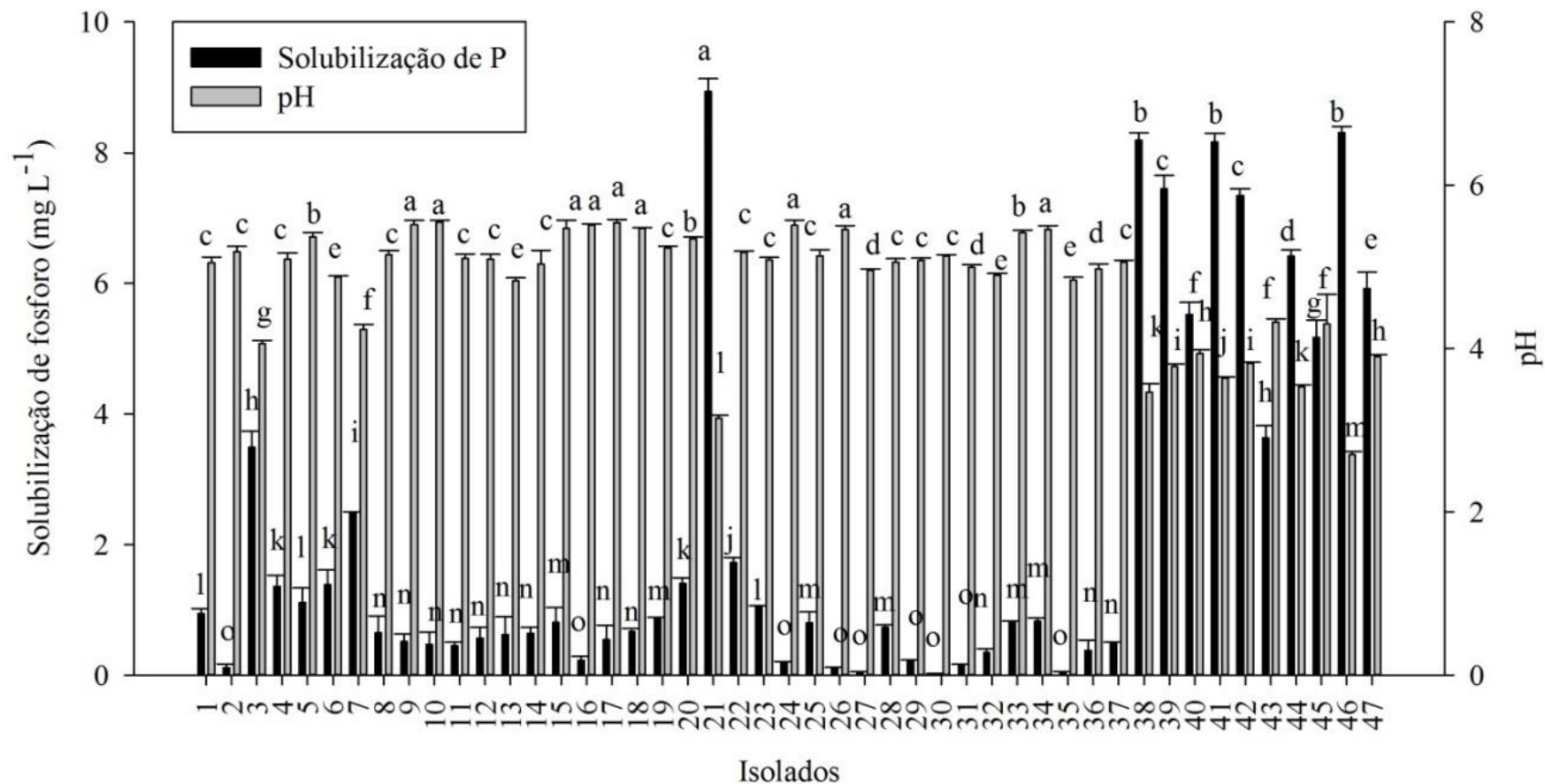
†AS, alta solubilização; MS, média solubilização; BS, baixa solubilização.

‡(+), Indica halos com até 1cm de diâmetro, (++) Indica halos maiores que 1cm de diâmetro (-) Indica isolado que não produz fosfatase ácida.



*Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas iguais não diferem entre si em diâmetro de halo e de colônia, respectivamente, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

FIGURA 5. Valores médios de diâmetro de halo de solubilização e diâmetro de colônia, em mm, em meio NBRIP suplementado com fosfato de cálcio tribásico $[Ca_3(PO_4)_2]$ por rizobactérias isoladas de raízes de bananeira Prata-Anã.



*Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

FIGURA 6. Médias da solubilização (mg/L^{-1}) em meio líquido NBRIP, suplementado com fosfato de cálcio tribásico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, por rizobactérias, respectivos valores de pH obtidos após a solubilização, e a classificação quanto a atividade da fosfatase ácida.

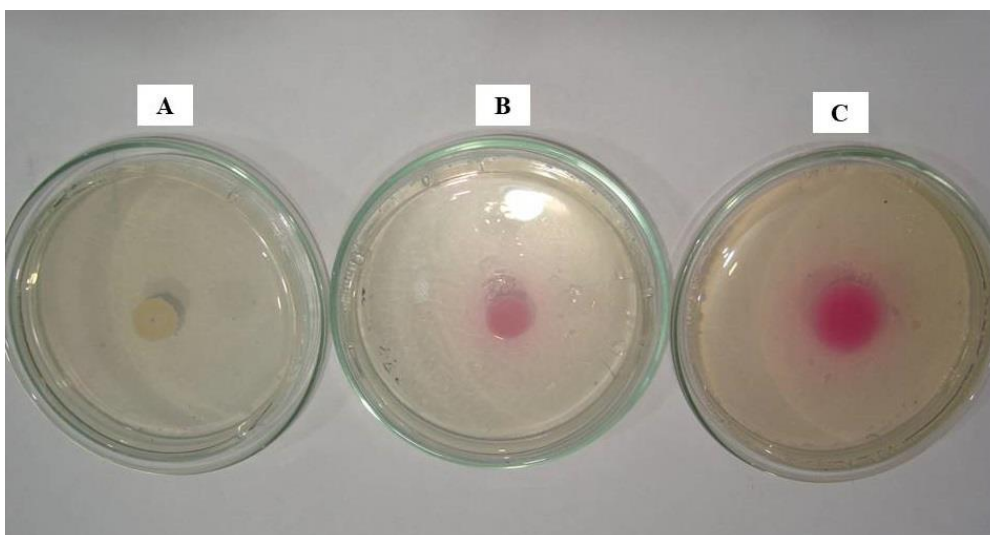


FIGURA 7. Avaliação da produção da fosfatase ácida, realizada para os isolados solubilizadores de fosfato de cálcio tribásico. Isolado negativo (A), halos de coloração rosa, característicos da produção da fosfatase ácida por rizobactérias (B e C).

3.2 Quantificação da produção de ácido indol-3-acético

As rizobactérias avaliadas neste experimento são produtoras de ácido indol-3-acético somente quando submetidas à via do triptofano. Dos 86 isolados, 6 (7%) foram produtores de AIA (RZ-15, RZ-55, RZ-83, RZ-19 (*Bacillus pumillus*), RZ-2 e RZ-81 (*Lysinibacillus sphaericus*)), sendo que, através das análises realizadas, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Além disso, observou-se que os melhores produtores de AIA foram os isolados RZ-2 e RZ-81 (*Lysinibacillus sphaericus*), com média de 4,3 e 4,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 8) (Tabela 3).

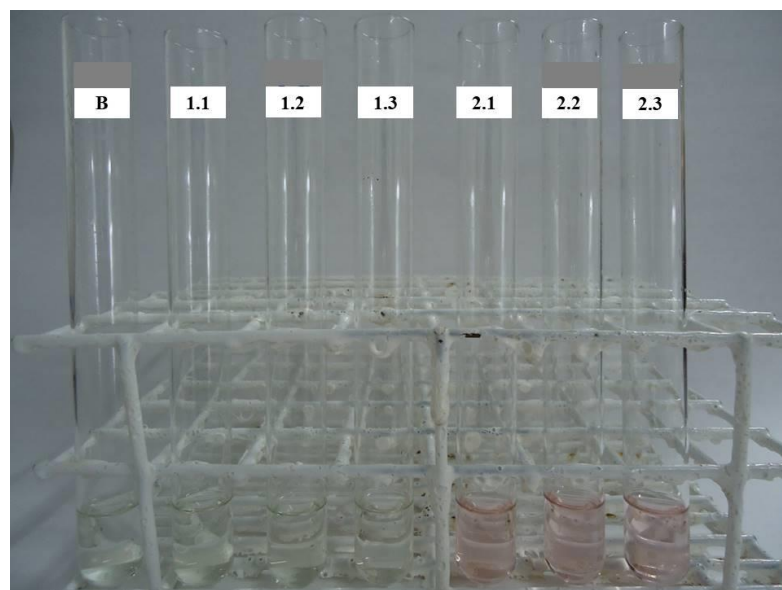


FIGURA 8. Resultado característico da produção de ácido indol-3-acético por rizobactérias isoladas de bananeira Prata-Anã. Branco (B), resultado para isolado negativo RZ-1 (1.1, 1.2 e 1.3) e resultado para isolado positivo RZ-2 (2.1, 2.2 e 2.3).

TABELA 3. Média da concentração de ácido indol-3-acético (AIA), em $\mu\text{g/mL}$, produzido por rizobactérias isoladas de bananeira Prata-Anã.

Tratamentos	Médias da concentração de AIA ($\mu\text{g/mL}$)
RZ-15	0,23 a
RZ-55	0,29 a
RZ-83	0,48 b
R-19(<i>Bacillus pumilus</i>)	1,86 c
RZ-2	4,03 d
RZ-81 (<i>Lysinibacillus sphaericus</i>)	4,06 d
CV (%)	91,86

*Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

3.3 Produção de sideróforos

Dos isolados avaliados, 27,9% foram produtores de sideróforos, visto que houve mudança de coloração de azul para amarelo, que indica resultado positivo para o fator avaliado (Figura 9). Os isolados positivos foram: RZ-7 (*Bacillus altitudinis*), RZ-8, RZ-9, RZ-10, RZ-12, RZ-18, RZ-19, RZ-21, RZ-23, RZ-26, RZ-27, RZ-28, RZ-29, RZ-30, RZ-31, RZ-32, RZ-33, RZ-35, RZ-36, RZ-38, RZ-40, RZ-48, RZ-58 e RZ-66.

Entre os isolados positivos para a produção de sideróforos, observou-se que houve diferença na tonalidade da coloração indicativa da positividade. Neste aspecto, os isolados RZ-7 (*Bacillus altitudinis*), RZ-8 e RZ-10 apresentaram a maior intensidade na coloração amarela.

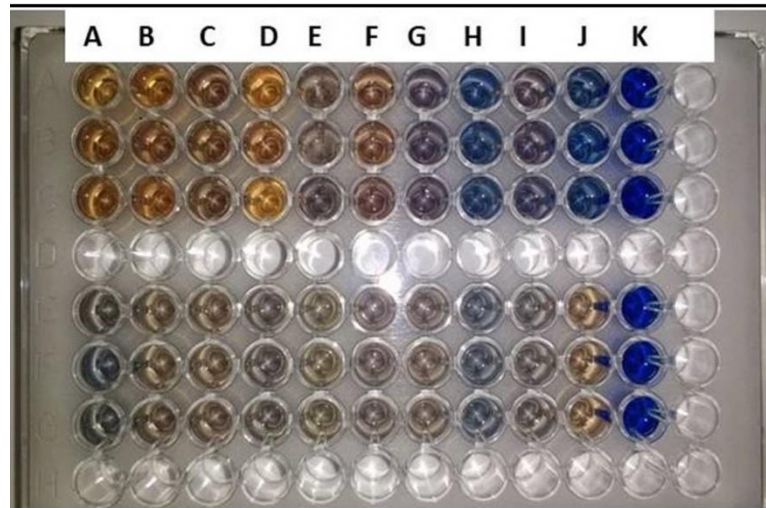


FIGURA 9. Avaliação da produção de sideróforos por rizobactérias isoladas de bananeira Prata-anã. Rizobactérias avaliadas (A-J) e controle negativo (K).

3.4 Produção de enzimas

Lipase

Dos 86 isolados avaliados, 47,7% foram produtores de lipase. Através das análises, observou-se que houve diferença significativa no diâmetro do halo, no diâmetro da colônia e no índice enzimático exibido entre os tratamentos ($p < 0,05$). O maior diâmetro do halo e da colônia foi registrado para o isolado RZ-37, sendo de 20,33 mm e 17,00 mm, respectivamente. Enquanto que os melhores índices enzimáticos foram registrados para os isolados *Bacillus xiamenensis*-67 (1,93), RZ-82 (2,00), *Bacillus subtilis*-43 (2,04), RZ 58 (2,07) e *Bacillus amiloquefaciens*-41 (2,14) (Figura 10) (Tabela 4).

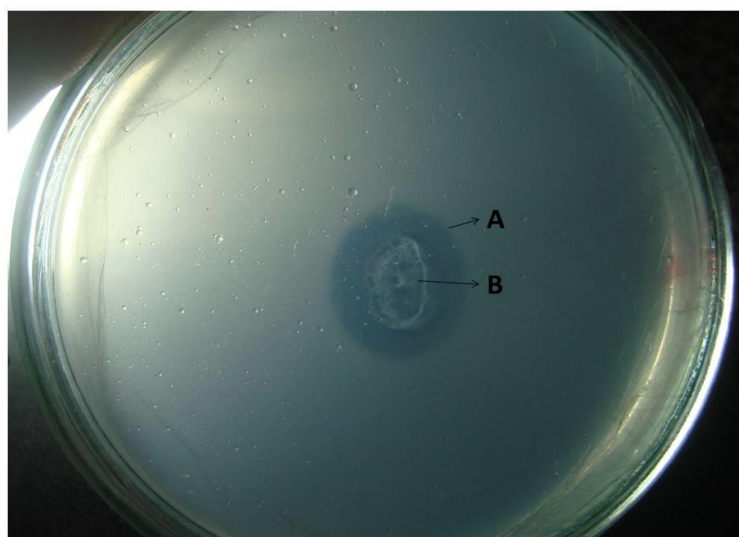


FIGURA 10. Halo característico da produção de lipase por rizobactérias isoladas de bananeira Prata-Anã, registrado para o isolado RZ-37.

TABELA4. Médias do diâmetro do halo, diâmetro da colônia e do índice enzimático (IE) resultantes da avaliação da produção de lipase por rizobactérias isoladas de bananeira Prata-anã.

Isolado	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	Índice enzimático
RZ-37	20,33 f	17,00 g	1,20 a
RZ-30	9,66 a	7,66 c	1,26 a
RZ-32 (<i>Bacillus altitudinis</i>)	11,66 c	9,33 e	1,26 a
RZ-36	12,33 c	9,33 e	1,32 b
RZ-55	13,33 d	10,00 f	1,33 b
RZ-24	12,66 c	9,50 e	1,34 b
RZ-46	13,33 d	9,66 e	1,37 b
RZ-34	13,33 d	9,66 e	1,38 b
RZ-48 (<i>Paenibacillus alvei</i>)	9,26 a	6,66 c	1,38 b
RZ-26 (<i>Bacillus subtilis</i>)	12,00 c	8,66 d	1,39 b
RZ-61 (<i>Bacillus aerophilus</i>)	11,66 c	8,33 d	1,40 b
RZ-51 (<i>Bacillus cereus</i>)	12,33 c	8,33 d	1,40 b
RZ-49	10,33 b	7,33 c	1,41 b
RZ-47	15,50 e	10,66 f	1,45 c
RZ-20	13,33 d	9,10 e	1,47 c
RZ-33 (<i>Bacillus pumilus</i>)	11,00 b	7,33 c	1,50 c

RZ-52	12,66 c	8,33 d	1,52 c
RZ-42 (<i>Bacillus subtilis</i>)	13,33 d	8,66 d	1,54 c
RZ-65 (<i>Bacillus amiloquefaciens</i>)	11,16 b	7,23 c	1,54 c
RZ-50 (<i>Bacillus pumillus</i>)	14,66 e	9,33 e	1,57 c
RZ-38 (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	14,66 e	9,33 e	1,57 c
RZ-57	12,66 c	8,00 d	1,58 c
RZ-64	13,66 d	8,50 d	1,61 d
RZ-9	12,66 c	7,83 c	1,62 d
RZ-60	13,66 d	8,50 d	1,63 d
RZ-28	13,33 d	8,16 d	1,63 d
RZ-56	12,33 c	7,66 c	1,64 d
RZ-25 (<i>Bacillus subtilis</i>)	14,00 d	8,50 d	1,65 d
RZ-53 (<i>Bacillus stratosphericus</i>)	15,00 e	8,83 d	1,67 d
RZ-85 (<i>Bacillus subtilis</i>)	14,66 e	8,66 d	1,69 d
RZ-68	13,16 d	7,66 c	1,72 e
RZ-79	11,00 b	6,33 b	1,73 e
RZ-62 (<i>Bacillus cereus</i>)	11,50 b	6,50 b	1,77 e
RZ-74	15,93 e	9,00 d	1,77 e
RZ-77 (<i>Bacillus altitudinis</i>)	13,00 d	7,33 c	1,77 e
RZ-63 (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	10,33 b	5,66 a	1,82 e
RZ-67 (<i>Bacillus xiamenensis</i>)	11,00 b	5,66 a	1,93 f
RZ-82	13,66 d	6,83 c	2,00 f
RZ-43 (<i>Bacillus subtilis</i>)	14,33 e	7,00 c	2,04 f
RZ-58	11,00 b	5,33 a	2,07 f
RZ-41 (<i>Bacillus amiloquefaciens</i>)	15,50 e	7,23 c	2,14 f
CV (%)	11,25	12,72	11,51

*Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

3.5 Atividade de fixação de nitrogênio, produção de protease e produção de quitinase

Todos os isolados avaliados neste trabalho foram negativos para a atividade da fixação de nitrogênio, uma vez que não se observou a formação de película aerotóxica, que é um requisito para a indicação da positividade da característica avaliada. Da mesma forma, nenhuma das bactérias produziu protease e quitinase, visto que não foi observada a formação de halo de degradação, característico da produção das enzimas citadas, nos meios de cultura em que as bactérias foram avaliadas.

4. DISCUSSÃO

4.1 Solubilização de fosfato e atividade da fosfatase ácida

As rizobactérias utilizadas neste trabalho demonstraram ser potenciais para a solubilização de fosfato de cálcio tribásico inorgânico, uma vez que mais de 50% dos isolados formaram halo de solubilização no meio sólido e líquido NBRIP. De acordo com a identificação prévia dos isolados, a maioria deles pertence ao gênero *Bacillus*, e espécies deste gênero têm sido documentadas quanto à sua capacidade para aumentar a disponibilidade de fósforo no solo (ALMONEAFY et al., 2014; ANDRADE et al., 2014).

Estudos de avaliação da solubilização de fosfato com rizobactérias isoladas de bananeira Prata-Anã cultivadas em solos tropicais são fundamentais. Uma alta população de microrganismos solubilizadores de fósforo provenientes da rizosfera permite a mobilização mais eficiente do fósforo insolúvel e o torna disponível para as plantas, causando um impacto direto no crescimento, especialmente em solos pobres (KUMAR et al., 2015). O conhecimento desses organismos permite a sua manipulação para a melhoria da disponibilização do fósforo para plantas cultivadas em solos tropicais, já que nestes ambientes ele se encontra indisponível em sua maior parte (LACERDA et al., 2016).

O resultado negativo para o teste de solubilização em meio sólido NBRIP, quando suplementado com o fosfato de ferro e fosfato de alumínio, indica que os isolados avaliados apresentam incapacidade para a solubilização do fosfato ligado a esses elementos nas condições em que o experimento foi realizado. Tal fato pode ter ocorrido devido à natureza adaptativa das enzimas responsáveis pela solubilização de fosfatos anteriores (BANIK; DEY, 1982). Também à dificuldade ou, até mesmo, inexistência de mecanismos, por parte das bactérias estudadas, para disponibilizar o fósforo ligado a esses elementos (BASHAN et al., 2014).

De acordo com pesquisa, o aumento na disponibilidade de fósforo para a planta em áreas alagadas envolve a redução do fosfato férrico (Fe^{3+}) a fosfato ferroso (Fe^{2+}) e a liberação de fósforo a partir de compostos ligados a ferro e alumínio na solução do solo. Desse modo, é possível que as plantas não tenham a necessidade de atrair bactérias que solubilizam fósforo ligado a esses elementos (ETESAMI et al., 2014). Assim, os mecanismos de solubilização de rizobactérias podem estar associados a uma prévia seleção desses microrganismos, de acordo com a necessidade da planta no ambiente em que está inserida (BANIK; DEY, 1982).

Sabe-se que, nos solos tropicais, que possuem acidez, os fosfatos predominantes são

aqueles resultantes da associação do fósforo com o ferro e o alumínio, enquanto, nos solos com pH mais elevado, predominam as formas associadas ao cálcio (BARROSO; NAHAS, 2005). Então, como as rizobactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas de bananeira Prata-Anã cultivadas em solos tropicais, era de se esperar que as bactérias estivessem habituadas a solubilizar, além do fósforo ligado ao cálcio, o fósforo ligado ao alumínio e ferro, resultando em formação de halo no teste em meio sólido. Como isso não aconteceu, pode-se dizer que pode ter ocorrido uma prévia seleção de microrganismos especializados em solubilizar fósforo ligado ao cálcio. Em trabalho anterior, a avaliação da influência da irrigação com água calcária sobre as propriedades químicas do solo, no norte de Minas Gerais, permitiu constatar que o pH do solo aumenta 1,4 unidades em média no decorrer de quatro anos de irrigação, levando à redução da solubilidade de alguns nutrientes como ferro e alumínio, essenciais à nutrição das plantas (SILVA; CARVALHO, 2004).

As diferenças observadas entre os isolados para solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido e líquido e, ainda, a variação do pH, dos tamanhos dos halos e dos índices de solubilização são importantes para selecionar os melhores isolados para a realização de experimento em casa de vegetação. Assim, é fundamental que os resultados de solubilização de fosfato sejam interpretados com cautela, uma vez que a produção de ácido e a resposta metabólica podem variar devido a diferenças no metabolismo entre os organismos e, ainda, a resposta de um único organismo pode variar com o substrato. Portanto, categorizar organismos como solubilizadores e não solubilizadores de fosfato torna-se uma tarefa difícil. A atividade de solubilização pode, portanto, ser verdadeiramente significativa apenas no contexto dos ambientes dos microrganismos (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992).

As diferenças observadas nos halos de solubilização podem ter ocorrido devido ao comportamento dos isolados diante do substrato. Existe influência da composição do substrato sobre o diâmetro da zona de solubilização de fosfato de cálcio. Tanto a composição de nutrientes quanto a capacidade tampão do meio podem influenciar os resultados. (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992). A formação do halo característico de solubilização ocorre devido à presença de substâncias, como ácidos orgânicos, liberadas pelos microrganismos, classificando-os como solubilizadores de fosfato (SOUCHIE et al., 2005).

Apesar de muitos isolados apresentarem solubilização, apenas um isolado nesta pesquisa apresentou um índice de alta solubilização (AS), enquanto que a maioria dos isolados foi classificada como de baixa (BS) e de média solubilização (MS). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho realizado testando a solubilização de fósforo ligado a cálcio, no qual o maior índice de solubilização foi de 3,15 para um único isolado

(CHAGAS et al., 2010). Em outra pesquisa com 40 isolados de bactérias endofíticas, 37,5% solubilizaram fosfato inorgânico, sendo que somente um apresentou um alto índice de solubilização, enquanto que a maioria apresentou baixo índice(ANDRADE et al., 2014).

Os mecanismos pelos quais os microrganismos solubilizam o fosfato são vários, mas ainda não estão muito bem esclarecidos. No presente estudo, a variação entre o valor de pH inicial e final mostrou que existe uma relação entre o processo de liberação de íons H^+ no meio e a quantidade de fósforo liberada. Esta associação é comum, visto que a liberação de H^+ é descrita como um dos principais mecanismos de solubilização de fosfato(PARK; LEE; SON, 2009). A significativa diminuição do pH pode ter ocorrido em razão do consumo do açúcar do meio pela bactéria, resultando na produção de ácidos orgânicos. Desse modo, a diminuição nos valores de pH pode estar associada ao aumento da acidez no meio durante o crescimento da bactéria (BARROSO; NAHAS, 2008). Este comportamento dos microrganismos já foi observado anteriormente,deixandoclaro que a solubilização de fosfato inorgânico é acompanhada por uma diminuição no pH(PARK; LEE; SON, 2009;ZHANG et al., 2016). Em trabalho realizado por outros pesquisadores, observou-se que, à medida que ocorreu um aumento gradual na liberação de fósforo, houve uma redução drástica no pH do meio. No caso referido, o valor do pH caiu para 4,5 a partir de um valor inicial de 6,5 (MEHTA et al., 2014).

Visto que a excreção de ácidos orgânicos atuam na redução do pH em solos ácidos(PARK et al, 2009), é importante ressaltar que eles possuem sua eficiência aumentada dependendo do tipo do ácido que é liberado e da combinação entre eles, implicando em diferentes capacidades de dissolver as diversas formas de fosfato. Destacam-se, entre esses ácidos, o cítrico, propiônico, glucônico, cetoglucônicos, láctico e succínico. Eles atuam ligando-se a cátions como Ca, Fe e Al, implicando na dissolução do fósforo do solo (CHEN et al., 2006).

Na rizosfera, as raízes liberam H^+ e possibilita uma maior absorção dos cátions em relação aos ânions. Em solos alcalinos, ocorrem modificações no pH para mantê-lo em faixa de aproximadamente 7,3, favorecendo a solubilização do fósforo na região próxima às raízes, tornando o fósforo desta área disponível para a planta (HINSINGER et al., 2003).

Verifica-se ainda, neste trabalho, que existe uma forte influência da enzima fosfatase ácida com a solubilização de fosfato, visto que a maioria das bactérias solubilizadoras produziu a enzima.Assim, a solubilização de P pode ter sido realizada, também, por meio dessas enzimas (ZHANG et al., 2016). As enzimas fosfatase são hidrolases que convertem o fósforo insolúvel em formas solúveis por hidrólise. Elas utilizam fosfoésteres como substratos

e, normalmente, são secretadas em condições de ausência de P (KAPRI; TEWARI, 2010).

A principal fonte de fosfatases no solo é de origem microbiana e a atividade delas aumenta substancialmente na rizosfera (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Bactérias produtoras de fosfatases também já foram isoladas de várias rizosferas, mostrando que elas mineralizam uma ampla gama de fósforo tanto inorgânico (LACERDA et al., 2016) quanto orgânico (JORQUERA et al., 2008).

A identificação de microrganismos produtores da fosfatase ácida serve como indicador do potencial de solubilização de fosfato inorgânico (BERGKEMPER et al., 2016), visto que a síntese de fosfatase depende da concentração de P no meio de crescimento (SATO et al., 2016). Dessa forma, torna-se imprescindível o trabalho para identificar microrganismos produtores dessas enzimas e o estudo desses mecanismos no ambiente rizosférico.

4.2 Quantificação da produção de ácido indol-3-acético

Quanto à produção de AIA, pode-se dizer que poucos isolados(7%) foram produtores desse hormônio, quando se compara a quantidade total de isolados avaliados (86). Isso pode ser explicado devido à origem das bactérias estudadas, já que foram isoladas de regiões próximas às raízes de bananeira. Desse modo, a capacidade de produção de AIA pode estar ligada ao hábito do microrganismo.

Etesami et al. (2014) avaliaram e compararam a atividade bioquímica de isolados de rizobactérias e de bactérias endofíticas. Os resultados mostraram que o número de isolados e a capacidade em promover o crescimento em planta foram diferentes entre os isolados. Ademais, uma alta porcentagem de isolados endofíticos foram produtores de outros compostos promotores de crescimento, como sideróforos.

Em trabalho realizado com bactérias endofíticas, por exemplo, verificou-se que 57% dos isolados foram produtores de AIA. Os sete melhores isolados foram avaliados quanto à capacidade de promover o crescimento vegetal na cultura do milho. Os isolados pertencem à família *Enterobacteriaceae* e aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pantoea*. Cinco isolados promoveram o crescimento vegetal em experimentos em casa de vegetação, sendo potenciais candidatos a bioinoculantes(RODRIGUES et al., 2016).

Por outro lado, em pesquisa realizada com rizobactérias, o ácido indol-3-acético produzido foi detectado em 76,41% dos isolados avaliados, além de grande porcentagem de isolados positivos para outros atributos bioquímicos avaliados. Entre os isolados produtores de AIA, cinco foram avaliados quanto à promoção de crescimento e atividade antifúngica na cultura do tomateiro. Neste caso, *B. subtilis* CKS1 exibiu significante aumento no

comprimento da parte aérea (13,82 %), comprimento de raízes (25,07 %), peso seco da parte aérea (29,47 %) e peso seco da raiz (33,33 %). A promoção de crescimento e a atividade antifúngica de *B.subtilis* CKS1 mostrou que esse isolado pode ser utilizado como potencial biofertilizante de tomate (KUMAR et al., 2015).

Todos os trabalhos citados anteriormente comprovam que existe um mecanismo eficiente de promoção de crescimento exercido pelo AIA produzido pelas bactérias mencionadas. A rizobactéria com propriedade de produção de AIA ajuda a aumentar o comprimento da raiz e a área de superfície, além de afrouxar as paredes celulares das plantas, facilitando o acesso aos nutrientes do solo e estabelecendo intensa interação planta-micróbico acumulando mais exsudatos radiculares (GLICK, 2012).

Além disso, pode-se dizer que esse mecanismo é potencializado com a capacidade dessas bactérias em promover outros fatores de crescimento como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de enzimas. Desse modo, isolados eficientes como promotoras de crescimento avaliadas em condições de viveiro possuem potencial comercial para o desenvolvimento de bioformas microbianas e a aplicação desses biofertilizantes pode resultar em uma diminuição substancial no uso de fertilizantes químicos para os sistemas agrícolas (DUTTA; THAKUR, 2017)

No presente trabalho, as rizobactérias consideradas melhores produtoras pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*. É sabido que esse hormônio é comumente produzido por bactérias dos gêneros *Paenibacillus* sp. (PADDA et al., 2017), *Aeromonas veronas*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp. e *Enterobacter* sp. (BISHNOI, 2015), incluindo *Bacillus* sp. e *Lysinibacillus* sp. (ANGULO et al., 2014).

Pesquisa com *Bacillus megaterium* e *Azotobacter chroococcum* demonstrou que essas rizobactérias têm a capacidade de produzir AIA. Em tal estudo, observou-se que a inoculação de sementes de milho com esses microrganismos produtores desse hormônio proporcionou maior altura de raiz em comparação com o controle. Dessa forma, as cepas bacterianas avaliadas podem ser recomendadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas devido a seus efeitos positivos e, eventualmente, podem ser usadas para reduzir fertilizantes químicos (DJORDJEVIC et al., 2017).

Neste estudo, todas as rizobactérias produtoras de AIA utilizaram somente a via triptofano dependente. Pesquisadores observaram, em outro trabalho, que todas as cepas de rizobactérias avaliadas produziram AIA tanto na presença quanto na ausência de triptofano, mas elas variaram em sua capacidade de produzir auxina. A produção máxima foi registrada

pela cepa P10 que fornece resultados significativamente diferentes em comparação com outras cepas (ZAFAR-UL-HYE; AHMAD; SHAHZAD, 2013). Em outro trabalho, a produção de ácido indol-3-acético (IAA) via triptofano dependente foi monitorada em nove rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas do solo rizosférico de alfafa (*Medicago sativa*). O isolado que produziu quantidade máxima de AIA foi identificado como *Pseudomonas putida* UB1 (BHARUCHA; PATEL; TRIVEDI, 2013).

Dessa forma, o conhecimento de microrganismos produtores de AIA é valioso para a agricultura, já que eles podem contribuir para o aumento na produção, devido ao incremento nos atributos agronômicos das culturas, além de atuarem de modo indireto no controle de fitopatógeno (NGHIA et al., 2017).

4.3 Produção de sideróforos

Os isolados que foram positivos para a produção de sideróforos promoveram a mudança de coloração da solução de azul para amarelo. Este fenômeno acontece quando um ligante forte sequestra e complexa o ferro liberando o corante, o que causa a mudança de cor. No caso, o corante é o cromoazurol S (CAS) e o ligante é um ou mais sideróforos produzidos pelas bactérias. Observou-se ainda que a intensidade da coloração e o tempo de transformação da cor azul para amarela foi diferente entre os isolados avaliados. O tempo de transformação e a intensidade do amarelo são indicativos de maior ou menor produção de sideróforos (CATTELAN, 1999).

Para a agricultura, o entendimento sobre bactérias produtoras de sideróforos é de grande importância, pois estes compostos podem promover o crescimento de plantas por vários mecanismos. Como os sideróforos são ligantes específicos de íons de ferro (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002), as rizobactérias que os produzem podem ser utilizadas no controle biológico, uma vez que o ferro fica indisponível aos agentes fitopatogênicos (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012).

No presente trabalho, uma considerável porcentagem de isolados de rizobactérias (27,9%) foram produtores de sideróforos e podem ser utilizadas para a proteção de culturas de interesse econômico contra diversos fitopatógenos. A capacidade de produção de sideróforos permite que bactérias criem uma condição limitante de ferro que minimiza o crescimento de patógenos, visto que esse micronutriente deixa de participar de processos metabólicos importantes para a sobrevivência do fitopatógeno, como a síntese de DNA, respiração e ativação ou participação como componente de enzimas (SAHRAWAT, 2004). Os sideróforos quelam e internalizam Fe^{3+} , tornando-o disponível para o microrganismo produtor dessa

molécula e, conseqüentemente, diminui a disponibilidade de ferro para possíveis microrganismos patogênicos, sendo um promotor de crescimento indireto pelo controle de fitopatogênias (SAHRAWAT, 2004; JIMTHA et al., 2014).

É importante evidenciar que os sideróforos quelados a ferro também poderiam ser adquiridos pela planta, e isto influenciaria diretamente no seu desenvolvimento. Desse modo, podem auxiliar ainda no crescimento de plantas cultivadas, principalmente em solos alcalinos que possuem limitação de ferro e de fósforo. Neste tipo de solo, o ferro se encontra frequentemente ligado ao fosfato, formando fosfato de ferro (FePO_4) (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015). Isto gera a indisponibilidade desses dois nutrientes que são fundamentais para vários processos metabólicos das plantas, que incluem fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA e de hormônios (KHAN; ZAIDI; AHMAD, 2014; JUCOSKI et al., 2016). Dessa forma, a utilização de bactérias produtoras de sideróforos como biofertilizante pode ser promissora para disponibilizar ferro e fósforo nos sistemas agrícolas (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

Evidências experimentais também sugerem que o crescimento estimulado de plantas por essas bactérias é o resultado líquido de vários mecanismos de ação que são ativados simultaneamente (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Neste sentido, é crescente o número de pesquisas fomentadas no potencial de rizobactérias em promover o crescimento de plantas, a fim de disponibilizar dados sobre esses mecanismos para a produção de biofertilizantes. No trabalho de Jimtha et al. (2014), por exemplo, bactérias isoladas da cultura de suspensão de células foram identificadas como *Ralstonia* sp. e *Bacillus* sp. Estas bactérias demonstraram possuir várias propriedades promotoras de crescimento de plantas, incluindo a produção de sideróforos. O efeito no aumento do crescimento em mudas defeijão da China (*Vigna radiata*) promovido por *Ralstonia* sp. demonstrou resultados promissores e os parâmetros de crescimento foram estatisticamente significantes quando comparados ao controle.

A capacidade de solubilização de fósforo e produção de sideróforos de sete bactérias foi investigada em trabalho realizado anteriormente, com inoculação em mudas de tomateiro. Nele, foi avaliada a capacidade de produtores de sideróforos na solubilização de P de minerais inorgânicos como fosfato de ferro (FePO_4), rocha fosfática e fitato orgânico. Para confirmar que os sideróforos foram responsáveis pela liberação de P, mutantes de bactéria *Pseudomonas fluorescens* Pf5 (PchA), produtora de sideróforos, foram utilizadas como controle. Após 7 dias de crescimento, o controle solubilizou 10 vezes menos P que a linhagem PG12 avaliada, o que aumentou a biomassa da raiz do tomate em 1,7 vezes. Para a solubilização de fitatos por outra bactéria (PG6), a biomassa da parte aérea do tomateiro aumentou 44% em relação à

bactéria controle *Pseudomonas chlororaphis*. Desse modo, tal experimento demonstrou a eficiência de sideróforos em quelar íons ferro e torná-lo disponível para a planta (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

A possível contribuição das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal nos ciclos biogeoquímicos de elementos minerais, bem como sua capacidade de induzir e/ou regular respostas moleculares e bioquímicas em plantas, ainda está em discussão. Nesta perspectiva, já foi demonstrado que a presença da rizobactéria *Azospirillum brasilense* na rizosfera de plantas de pepino cultivadas em solos calcários poderia aumentar a nutrição de Fe, aliviando os sintomas de clorose de Fe. Destaca-se, ainda, que as respostas moleculares e fisiológicas das plantas de pepino à inoculação estão estritamente relacionadas ao estado nutricional de Fe, sugerindo a possível coexistência de múltiplos mecanismos de regulação. Esses resultados fortalecem ainda mais a informação sobre a capacidade das RPCPs, como o *Azospirillum*, de modular a aquisição de Fe nas plantas por meio da ativação de genes de maneiras diferentes (PII et al., 2016).

4.4 Produção de enzimas

Das três enzimas investigadas neste estudo (lipase, protease e quitinase), as rizobactérias produziram somente a lipase. Existem vários trabalhos na literatura que relatam a produção dessas enzimas por rizobactérias, mas observou-se que o número de trabalhos publicados com essas informações ainda é pequeno, principalmente quando se trata da produção de protease e quitinase. Estas, na maioria dos trabalhos, são produzidas por bactérias endofíticas (ETESAMI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016; AFZAL et al., 2016).

A diferença nos valores dos índices enzimáticos comprovou que é importante que um grande número de isolados seja avaliado para a produção de lipase, assim como foi realizado no presente trabalho. A pesquisa para a investigação da bactéria mais promissora para a produção de lipase deve ser estendida a um grande número de isolados, visto que diferentes representantes microbianos podem produzir quantidades diferentes de uma mesma enzima (ABALLAY et al., 2017).

Na agricultura, a utilização de formulações à base de rizobactérias produtoras de lipase é interessante, visto que cada vez mais está sendo exigida a utilização de produtos para o biocontrole de fitopatógenos nos sistemas agrícolas. Neste contexto, a pesquisa sobre os mecanismos enzimáticos de rizobactérias visando à sua utilização em bioformulações é crescente (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018).

A lipase, de modo geral, atua degradando as moléculas de lipídeos que estão presentes em diversas estruturas do patógeno, como, por exemplo, nas membranas. No caso dos nematoides, as lipases são importantes no controle desses patógenos por degradarem suas reservas energéticas e por atuarem nos lipídios de membrana (ABALLAY et al., 2017). Desde a fase de ovo até o estágio infectivo, os nematoides apresentam 30% de seu peso corporal constituído de lipídios, como a principal fonte energética para os gastos no processo de sobrevivência, locomoção, penetração e parasitismo do hospedeiro. Desse modo, tais enzimas podem atuar também nas reservas lipídicas que se encontram presentes nos ovos e no corpo de juvenis de fitonematoídeos, agindo como um microrganismo de biocontrole de doenças de plantas (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

De maneira geral, produtos de biocontrole à base de rizobactérias já se encontram no mercado e têm demonstrado resultados interessantes quando avaliados em pesquisa. Tais trabalhos, muitas vezes, não relacionam os mecanismos específicos envolvidos no crescimento de plantas e no controle de fitopatógenos, mas demonstram que as rizobactérias são prováveis produtoras dos compostos mencionados neste trabalho (SILVA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018).

Em estudo publicado recentemente, por exemplo, foi avaliado o efeito da aplicação de *Bacillus subtilis* (Nemathel®) no tratamento de mudas, do tipo chifre, de bananeira subgrupo Terra cv. Comprida, infectadas por uma população mista com *Radopholus similis*, *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. e *Helicotylenchus* spp. Foram avaliadas diferentes doses do produto (50; 100; 150; 200 e 250 mL/10 L de água), além das testemunhas positiva (nematicida) e negativa (água). A avaliação foi realizada após quatro meses e as doses de 200 e 250 mL do produto por 10 L de água proporcionaram as maiores reduções das populações dos nematoides em raízes e rizomas, confirmando que espécies do gênero *Bacillus* são promissoras para formulação de produtos de biocontrole (ARAÚJO et al., 2018). Neste sentido, rizobactérias têm revelado a capacidade para parasitar os ovos, formas juvenis e, em alguns casos, até as formas adultas de nematoides (SILVA et al., 2017).

Pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a eficácia de seis isolados de rizobactérias, pré-selecionadas, no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), em casa de vegetação e relacionou este comportamento à produção de compostos *in vitro*. Além disso, foi avaliada a capacidade de estas rizobactérias produzirem quitinases, amilases, lipases, compostos antibióticos e de solubilizar fosfato. A microbiolização das sementes com a rizobactéria reduziu os valores das doenças em ambos os

ensaios. Este controle pode ser associado à produção dos compostos responsáveis pela antibiose observada *in vitro*(ROCHA; MOURA, 2013).

5 CONCLUSÕES

Dos 86 isolados de rizobactérias, 47 solubilizaram fosfato de cálcio tribásico inorgânico em meio NBRIP sólido e líquido.

Dentre as 47 rizobactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio tribásico, 32 apresentam habilidade para a produção da fosfatase ácida.

Dos 86 isolados avaliados, 6,97% são produtores de AIA, 27,9% são produtores de sideróforos e 47,7% são produtores de lipase.

As rizobactérias avaliadas não apresentam potencial para a fixação biológica de nitrogênio e produção de protease e quitinase.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALLAY, E.; PRODAN, S.; ZAMORANO, A.; CASTANEDA-ALVAREZ, C. Nematicidal effect of rhizobacteria on plant-parasitic nematodes associated with vineyards. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1-14, 2017.
- AFZAL, I.; IQURAR, I.; SHINWARI, Z. K.; YASMIN, A. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 339-408, 2016.
- ALMONEAFY, A. A.; KAKAR, K. U.; NAWAZ, Z.; LI, B.; SAAND, M. A.; CHUN-LAN, Y.; XIE, G. L. Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus strains* against *Ralstonia solanacearum*. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 63, n. 2, p. 59-70, 2014.
- ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L.; NIETSCH, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M.; PEREIRA, M. C.; PEREIRA, D. F. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27-34, 2014.
- ANGULO, V. C.; SANFUENTES, E. A.; RODRIGUEZ, F.; SOSSA, K. E. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 46, n. 4, p. 338-347, 2014.
- ARAÚJO, J. J. S.; MUNIZ, M. F. S.; MOURA FILHO, G.; ROCHA, F. S.; CASTRO, J. M. C. *Bacillus subtilis* no tratamento de mudas de bananeira infectadas por fitonematoides. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 65, n. 1, p. 99-103, 2018.
- BANIK, S.; DEY, B. K. Alluvial soil microorganisms capable of utilizing insoluble aluminium phosphate as a sole source of phosphorus. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, Jena, v. 138, n. 6, p. 437-442, 1982.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, The Hague, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012. Supplement.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. D. P.; MACHADO, B. D. C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, 2002.

BERGKEMPER, F.; KUBLIK, S.; LANG, F.; KRUGER, J. Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 125, p. 91-97, 2016.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

BHARUCHA, U.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. B. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). **Agricultural Research**, Washington, v. 2, n. 3, p. 215-221, 2013.

BISHNOI, U. PGPR Interaction: an Ecofriendly Approach Promoting the Sustainable Agriculture System. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 75, n. 33, p. 81-113, 2015.

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. **Revista Ceres**, Brasília, v. 21, n. 113, p. 73-85, 1974.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. Documentos, 139.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; YOUNG, C. C. V. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2006.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1451-1458, 1992.

DORDEVIC, S.; STANOJEVIC, D.; VIDOVIC, M.; MANDIC, V.; TRAJKOVIC, I. The use of bacterial indol-3-acetic acid (IAA) for reduce of chemical fertilizers doses. **Hemijaska industrija**, v. 71, n. 3, p. 195-200, 2017.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotrotólicas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 1995.

DUTTA, J.; THAKUR, D. Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. **Plos one**, v. 12, n. 8, p. 1-24, 2017.

ETESAMI, H.; HOSSEINI, H. M.; ALIKHANI, H. A.; MOHAMMADI, L. Bacterial

Biosynthesis of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase and Indole-3-Acetic Acid (IAA) as Endophytic Preferential Selection Traits by Rice Plant Seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, p. 654-670, 2014.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture : Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 156, p. 225-246, 2018.

FERREIRA, D. F. SISVAR : a Computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GHOSH, P.; RATHINASABAPATHI, B.; MA, L. Q. Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. **Chemosphere**, Oxford, v. 134, p. 1-6, 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Cairo, p. 1-15, 2012.

GRANT, C. A.; TOMASIEWICZ, D. J.; FLATEN, D. N.; SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 95, p. 1-5, 2001.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Mycological Society of America The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; TANG, C.; JAILLARD, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 248, p. 43-59, 2003.

JHA, P. N.; GUPTA, G. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants : A Potential Gateway to Sustainable Agriculture. **Greener Journal of Agricultural Sciences**, Rajasthan, v. 3, n. 2, p. 73-84, 2013.

JIMTHA, J. C.; SMITHA, P. V.; ANISHA, C.; THOMAS, D. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 57-66, 2014.

JORQUERA, M.; MARTINEZ, O.; MARUYAMA, F.; MARSCHNER, P.; LUZ, Mora M. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 3, p. 182-191, 2008.

JUCOSKI, G. O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A. Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 4, p. 720-728, 2016.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* SPP. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 3,

2010.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolism activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5, p. p.79-85,1959., 1959.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. **Phosphate Solubilizing Microorganisms**. New Delhi: Springer International Publishing, 2014.

KUMAR, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; WALIA, A. Plant growth-promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from *Hippophae rhamnoides* L. (Sea-buckthorn) growing in cold desert Trans-Himalayan Lahul and Spiti regions of India. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 3, p. 37-38, 2015.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LACERDA, J. R. M.; SILVA, T. F.; VOLLU, R. E.; MARQUES, J. M.; SELDIN, L. Generally recognized as safe (GRAS) *Lactococcus lactis* strains associated with *Lippia sidoides* Cham. are able to solubilize/mineralize phosphate. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 828, 2016.

MEHTA, P.; WALIA, A.; KAKKAR, N.; SHIRKOT, C. K. Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylothrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 8, p. 2033-2045, 2014.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, n. 436, p. 265-270, 1999.

NGHIA, N. K.; TIEN, T. T. M.; OANH, N. T. K.; NUONG, N. H. K. Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid Producing Halophilic Bacteria from Salt Affected Soil of Rice – Shrimp Farming System in the Mekong Delta , Vietnam. **Agriculture, Forestry and Fisheries**, v. 6, n. 3, p. 69-77, 2017.

PADDA, K. P.; ZENG, P. A.; CHANWAY, C. P.; XIAQIN, W. Effect of GFP-tagging on nitrogen fixation and plant growth promotion of an endophytic diazotrophic strain of *Paenibacillus polymyxa*. **Botany**, Ottawa, v. 95, n. 9, p. 933-942, 2017.

PARK, K. H.; LEE, C. Y.; SON, H. J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 222-228, 2009.

PHILIPPOT, L.; SPOR, A.; HENAULT, C.; BIZOUARD, F.; JONES, C. M.; SARR, A.; MARONT, P. A. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. **The ISME**

Journal, v. 7, n. 8, p. 1609-19, 2013.

PII, Y.; MARASTONI, L.; SPRINGETH, C.; FONTANELLA, M. C.; BEONE, G. M.; CESCO, S.; MIMMO, T. Modulation of Fe acquisition process by *Azospirillum brasilense* in cucumber plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 130, p. 216-225, 2016.

PRAKAMHANG, J.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAMTISONG, K. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 85, p. 38-49, 2014.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agentes of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 20, p. 524-532, 1991.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 423-430, 2013.

RODRIGUES, A. A.; FORZANI, M. V.; SOARES, R. S.; SIBOV, S. T.; VIEIRA, J. D. G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane 1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 2, p. 149-158, 2016.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: UFV, 2007.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 27, n. 8, p. 1471-1504, 2004.

SATO, V. S.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; RODRIGUES, G. R.; LEMOS, E. G. M.; PIZAURO JUNIOR, J. M. Kinetic characterization of a novel acid ectophosphatase from *Enterobacter asburiae*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 106-113, 2016.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SILVA, J. O.; SANTANA, M. V.; FREIRE, L. L.; FERREIRA, B. S.; ROCHA, M. R. Biocontrol agents in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 10, p. 1-7, 2017.

SILVA, J. T. A.; CARVALHO, J. G. Propriedades do solo, estado nutricional e produtividade de bananeiras “Prata Anã”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 332-338, 2004.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. D. S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. S. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

TIAGO, P. V.; SILVA, R. J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não-cuticulares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 26-30, 2007.

TIPRE, S.; PINDI, P. K.; SHARMA, S. Biotechnological potential of a Halobacterium of family Bacillaceae. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 65-71, 2015.

ZAFAR-UL-HYE, M.; AHMAD, M.; SHAHZAD, S. M. Synergistic effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on the growth and nodulation of lentil seedlings under axenic conditions. **Soil and Environment**, v. 32, n. 1, p. 79-86, 2013.

ZHANG, B. H.; SALAM, N.; CHENG, J.; XIAO, M.; LI, H. G.; YANG, J. Y.; ZHA, D. M.; LI, W. J. *Citricoccus lacusdiani* sp. nov., an actinobacterium promoting Microcystis growth with limited soluble phosphorus. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 109, n. 11, p. 1457-1465, 2016.

ZILLI, J. É.; UMJNEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

CAPÍTULO II - DESEMPENHO DO FEIJOEIRO COMUM INOCULADO COM BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

RESUMO

SILVA, Cláudia Maria. **Desempenho do feijoeiro comum inoculado com bactérias solubilizadoras de fosfato**. 2018. 104 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG⁵.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se como a principal fonte de proteína vegetal, além de ser altamente nutritivo por fornecer fibras, carboidratos complexos, vitaminas e micronutrientes. Dentre os nutrientes que são fundamentais para o feijoeiro está o fósforo, que exerce papel importante no metabolismo vegetal, participando da fotossíntese, respiração, transferência de energia e reprodução. É considerado como um dos nutrientes que mais limitam a produção do feijoeiro devido à sua interação com outros constituintes do solo e sua lenta taxa de difusão no solo. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do feijoeiro comum inoculado com bactérias solubilizadoras de fosfato. Para isso, foram utilizados 9 isolados de rizobactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico *in vitro*, oriundos de raízes de bananeira Prata-anã coletados na região Norte do Estado de Minas Gerais. As bactérias foram cultivadas em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*), em placas de Petri por um período de 24 h a 28°C. Em seguida, os isolados foram submetidos ao ajuste da densidade óptica a 1,0 de absorvância, no comprimento de onda (λ) a 540 nm em espectrofotômetro. Os isolados com densidades óticas ajustadas foram utilizados para microbiolizar as sementes de feijão comum do cultivar BRS Estilo. O experimento foi realizado em esquema fatorial 9x2+2, sendo 9 isolados de rizobactérias, duas fontes de fósforo (Fosfato Natural Gafsa e Super simples); os tratamentos adicionais constituíram das fontes de fósforo sem bactéria. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com 6 repetições. Os dados dos atributos agrônômicos do feijoeiro foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial e, quando significativos, ao teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Os tratamentos foram comparados com o tratamento adicional pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Os resultados revelaram que as rizobactérias avaliadas promoveram aumento na biomassa para os atributos avaliados como matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca total, massa de vagem por planta, massa de grãos por planta, número de vagem por planta, número de grãos por planta e peso de 100 grãos e número de grãos por vagem (com o tratamento super simples + rizobactérias). Quatro rizobactérias associadas ao super simples aumentaram o teor de fósforo na parte aérea em relação ao super simples isolado. Oito rizobactérias associadas ao super simples aumentaram a absorção de fósforo em relação ao fosfato natural de gafsa. Nenhuma das rizobactérias promoveu aumento no acúmulo de fósforo a partir do fosfato natural de gafsa. Conclui-se que as rizobactérias avaliadas podem ser utilizadas para melhorar a produção da cultura do feijoeiro e contribuir com práticas agrônômicas para uma produção agrícola mais sustentável.

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento de plantas, fosfatase ácida, trifosfato de cálcio, *Bacillus* sp.

⁵Comitê orientador: Prof.^aRegina C. F. Ribeiro/DCA/UNIMONTES (Orientadora); Prof.^aAdelica Aparecida Xavier- DCA/UNIMONTES (Coorientadora). Prof. Dr. José Augusto S. Neto - DCA/UNIMONTES (Conselheiro).

CHAPTER II - PERFORMANCE OF COMMON BEAN INOCULATED WITH PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA

ABSTRACT

SILVA, Cláudia Maria. **Performance of common bean inoculated with phosphate solubilizing bacteria.** 2018. 104 p. Thesis (PhD in Plant Production in the Semi-Arid) - State University of Montes Claros, Janaúba, MG⁶.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) stands out as the main source of vegetable protein, as well as being highly nutritious in providing fiber, complex carbohydrates, vitamins and micronutrients. Among the nutrients that are fundamental to the bean is phosphorus, which plays an important role in plant metabolism, participating in photosynthesis, respiration, energy transfer and reproduction. It is considered as one of the nutrients that most limit the production of common bean. In order to solve the problem of the unavailability of phosphorus to the plants, without the use of chemical fertilizers, phosphate solubilizing rhizobacteria can be used. In this sense, the objective of this study was to evaluate the performance of common bean inoculated with phosphate solubilizing bacteria. For this, 9 inorganic phosphate solubilizing rhizobacteria isolates were used from the Prata-anã banana roots collected in the northern region of the State of Minas Gerais. Bacteria were cultured in TSA medium (Tryptic Soy Agar) in Petri dishes for a period of 24 h at 28 ° C. Then the isolates were adjusted to the optical density at 1.0 absorbance, at wavelength (λ) at 540 nm in a spectrophotometer. The isolates with adjusted optical densities were used to microbiolize the common bean seeds of the cultivar BRS Estilo, which were taken to greenhouse for the assembly of the experiment. The experiment was carried out in a 9 x 2 factorial scheme, 9 rhizobacteria isolates and two phosphorus sources (Gafsa Natural and Super Simple Phosphate). Additional treatments consisted of combinations of the sources of phosphorus with saline without bacteria. The experiment was conducted in a randomized complete block design with 6 replicates. The agronomic attributes data of the bean were submitted to analysis of variance in factorial escheme and, when significant, to the Scott and Knott test, at 5% probability, to compare the means by means of the statistical program Sisvar. Treatments were compared with the additional treatment by the Dunnet test at 5% probability. The results showed that the evaluated rhizobacteria promoted an increase in biomass for the attributes evaluated as aerial part dry matter, root dry matter, total dry matter, pod mass per plant, grain mass per plant, number of pod per plant, number of grains per plant and weight of 100 grains and number of grains per pod (with super simple treatment + rhizobacteria). It is concluded that the evaluated rhizobacteria promote an increase in the evaluated agronomic attributes, being able to be used to improve the production of the bean crop and to contribute with agronomic practices for a more sustainable agricultural production.

Keywords: Plant growth promoting bacteria, acid phosphatase, calcium triphosphate, *Bacillus* sp.

⁶Steering committee: Prof.^aRegina C. F. RibeiroDCA/UNIMONTES (Advisor); Prof.^aAdelica Aparecida Xavier-DCA/UNIMONTES (Co-advisor). Prof. Dr. José Augusto S. Neto - DCA/UNIMONTES (Counselor).

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais importante para consumo direto no mundo e mais extensivamente cultivada, devido ao seu papel social e econômico (SNAPP; RAHMANIAN; BATELLO, 2018). O Brasil é considerado o maior produtor e consumidor (POSSE; SILVA; ROCHA, 2010; CONAB, 2018), sendo que as principais regiões brasileiras produtoras se encontram no Sul, Sudeste e Nordeste, destacando-se os estados do Paraná com 21,6%, Minas Gerais com 17,1% e Bahia com 10,1% de participação na produção nacional (CONAB, 2018).

No Brasil, é o produto alimentício mais popular e conhecido, destacando-se como a principal fonte de proteína vegetal, além de ser altamente nutritivo por fornecer fibras, carboidratos complexos, vitaminas e micronutrientes (SALVADOR, 2013; CASTRO-GUERRERO et al., 2016).

Essa leguminosa apresenta ampla adaptação edafoclimática, o que permite seu cultivo durante todo o ano, em quase todas as unidades da federação brasileira, nas diferentes épocas e safras (SALVADOR, 2013). Entretanto, para que a cultura tenha alta produtividade, é importante o manejo de adubação das plantas, uma vez que o feijoeiro exige bons níveis de fertilidade do solo. Nesse tipo de cultura, as plantas precisam absorver quantidades significativas de nutrientes em pequeno período de tempo, devido ao seu ciclo relativamente curto, e também por causa do sistema radicular superficial e pouco desenvolvido, que limita a exploração de grande volume de solo (SCHONINGER et al., 2015).

Dentre os nutrientes que são fundamentais nesse processo está o fósforo, que exerce papel importante no metabolismo vegetal, participando da fotossíntese, respiração, transferência de energia e reprodução. É considerado como um dos nutrientes que mais limitam a produção do feijoeiro (NASCENTE et al., 2014).

Os solos agrícolas, de modo geral, possuem grandes quantidades de fósforo, porém, a maior parte desse nutriente não se encontra disponível às plantas. Assim, apesar da ampla distribuição desse nutriente na natureza, a sua deficiência é comum por causa da forma altamente insolúvel encontrada, principalmente, em solos ácidos de regiões tropicais e subtropicais (SOUCHIE et al., 2005). Nesses ambientes, a interação do fósforo com o cálcio, o alumínio e o ferro, que fazem parte da constituição do solo, além de sua lenta taxa de difusão na solução do solo faz com que esse nutriente fique menos prontamente disponível para as plantas (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015).

Para solucionar o problema da indisponibilidade do fósforo às plantas, sem a utilização de fertilizantes químicos, pode-se lançar mão de rizobactérias solubilizadoras de

fosfato. Elas são capazes de disponibilizar o fósforo às plantas através da solubilização do fósforo orgânico e inorgânico. Os mecanismos envolvidos neste processo incluem a produção de exsudatos orgânicos como ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido glucônico, ácido láctico, ácido succínico, ácido propiônico) e sideróforos (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015), excreção de prótons pela assimilação de amônio e produção de enzimas solubilizadoras como as fosfatases ácidas (SHARMA et al., 2013; GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015; MATOS et al., 2017).

Neste sentido, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de descobrir rizobactérias solubilizadoras de fósforo para a produção de biofertilizantes. Em estudo para a avaliação do potencial biotecnológico de rizobactérias, do gênero *Bacillus* no crescimento de soja e milho, por exemplo, mostrou que essas bactérias são fundamentais para a absorção de fósforo por essas culturas. Os resultados indicaram que as formulações utilizadas apresentaram potencial biotecnológico para incrementar o desenvolvimento e a nutrição das plantas de milho e soja (RATZ et al., 2017). Em outro trabalho realizado com o tomateiro, verificou-se que rizobactérias do gênero *Pseudomonas* solubilizaram 10 vezes mais fósforo que o controle, aumentando a biomassa da raiz do tomate em 1,7 vezes. Além disso, a biomassa da parte aérea aumentou 44% em relação à bactéria controle, levando-se à conclusão de que as rizobactérias solubilizadoras de fosfato podem ser útil para otimizar o crescimento de outras culturas (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015) como a do feijoeiro, visto que o fósforo é um elemento limitante na sua produção (NASCENTE et al., 2014).

Os estudos com RPCPs proporcionam ganho de conhecimento sobre o mecanismos de solubilização desses microrganismos, aumentando a possibilidade da sua aplicação na agricultura, visto que podem trazer benefícios para o desenvolvimento das plantas (MAJEED et al., 2015). Assim, as informações adquiridas sobre esses microrganismos podem servir para direcionar a utilização deles em formulações de produtos, contribuindo para uma agricultura sustentável, já que pode diminuir o uso de fertilizantes fosfatados (BASHAN et al., 2014). Desse modo, torna-se fundamental a investigação do potencial das rizobactérias na solubilização de fosfato para otimizar a assimilação do fósforo pelas plantas e contribuir para o seu desenvolvimento (LACERDA et al., 2016). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do feijoeiro comum inoculado com bactérias solubilizadoras de fosfato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2 Tratamento de sementes com rizobactérias no desenvolvimento e produção de feijoeiroadubado com duas fontes de fósforo

Este trabalho foi desenvolvido na casa de vegetação danematologia da Universidade Estadual de Montes Claros/UNIMONTES - *Campus Janaúba/MG*. Foram utilizados 9 isolados oriundos de raízes de bananeira Prata-Anãque apresentaram atividade positiva para a solubilização de fosfato de cálcio e produção de fosfatase ácida (*Bacillus altitudinis*-7, RZ-13, *Bacillus amiloquefaciens*-41, *Bacillus thuringiensis*-66, *Bacillus xiamenensis*-67, RZ-70, RZ-74, RZ-79, RZ-80). As sementes utilizadas foram do cultivar de feijão comum BRS Estilo, fornecidas pelo laboratório de Grandes Culturas da Unimontes.

O experimento foi realizado em esquema fatorial $9 \times 2 + 2$, sendo 9 isolados de rizobactérias e duas fontes de fósforo (Fosfato Natural Gafsa e Super simples). Os tratamentos adicionais constituíram de combinações das fontes de fósforo com solução salina sem bactéria. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com 6 repetições.

Para o tratamento das sementes de feijão comum, 2000 sementes foram desinfestadas com hipocloritode sódio a 1%, por dez minutos (CHUN; SCHNEIDER; COHN, 1997) e, em seguida, foi realizada a tríplice lavagem em água destilada estéril e colocadas para secar em fluxo laminar, por duas horas. Posteriormente, 1000 sementes desinfestadas foram colocadas em erlenmeyers contendo suspensão bacteriana calibrada (com densidade ótica igual a 1, conforme os tratamentos citados anteriormente, e 1000 sementes foram colocadas em solução salina 0,85% (tratamento adicional). Esses erlenmeyers foram deixados no shake em agitação por 2 horas a 100 rpm e, após esse período, as sementes foram colocadas sobre folhas de papel filtro em câmara de fluxo laminar para secar por 2 horas.

Para a montagem do experimento em casa de vegetação, foram utilizados vasos plásticos de três litros de capacidade, que receberam o solo previamente autoclavado (a 120 °C por 30 minutos, durante três dias consecutivos). O solo foi coletado na fazenda experimental da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) e uma amostra de 100 g foi enviada para o Centro de Tecnologia e Ambiental (CAMPO) para análise de macro e micronutrientes, além da análise de textura. As análises foram realizadas conforme Manual de Análises Química dos Solos, Plantas e Fertilizante (2ª edição revista e ampliada). O solo de textura argilosa apresentou as seguintes características químicas, conforme quadro 1:

QUADRO 1. Resultado da análise do solo coletado na fazenda experimental da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), *Campus Janaúba*.

Macronutrientes			Saturação do Complexo de Troca		
Parâmetros	Unidades	Resultado	K	%	9
pH em água	-	5,7	Ca	%	48
pH em CaCl ₂	-	5,2	Mg	%	17
M. O.	Dag	1,6	Na	%	0
C. Org.	%	0,9	H+Al	%	26
P	mg/dm ³	6,4	Micronutrientes		
K	mg/dm ³	257,5	Parâmetros	Unidades	Resultado
P rem.	mg/dm ³	40,9	B	mg/dm ³	0,6
S	mg/dm ³	10,9	Zn	mg/dm ³	2,2
Ca ²⁺	Cmol _c /dm ³	3,4	Fe	mg/dm ³	29,8
Mg ²⁺	Cmol _c /dm ³	1,2	Mn	mg/dm ³	56,5
Al ³⁺	Cmol _c /dm ³	<0,1	Cu	mg/dm ³	0,2
H+Al	Cmol _c /dm ³	1,8			
CTC	Cmol _c /dm ³	7,1			
V	%	74			
M	%	0			
Relações					
Ca/Mg	-	2,8			
Ca/K	-	5,2			
Mg/K	-	1,8			

Foram semeadas cinco sementes do cultivar de feijão comum BRS Estilo desinfestadas e tratadas, conforme descrito anteriormente, por vaso, de acordo com esquema fatorial citado. Após sete dias da germinação, realizou-se o desbaste, deixando apenas a planta mais vigorosa em cada vaso.

A irrigação foi realizada diariamente mantendo o solo constantemente úmido e a adubação de acordo com recomendações para a cultura (Anexo 1). Após 80 dias do plantio, foram avaliadas as variáveis agrônomicas: matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca total, massa de vagem por planta, massa de grãos por planta, número de vagem

por planta, número de grãos por vagem, número de grãos por planta, peso de 100 grãos (Figura 11).



FIGURA 11. Experimento em casa de vegetação para avaliação dos atributos agrônômicos do feijoeiro comum cultivar BRS Estilo.

A parte aérea e as raízes do feijoeiro foram lavadas cuidadosamente em água e, posteriormente, foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 60 °C por 48 horas, até peso constante, para determinação da massa seca e para a análise foliar.

A parte aérea foi pulverizada em moinho tipo Wiley com peneira de 20 mesh (0,85mm) e acondicionada em sacos de papel para a determinação do conteúdo mineral. Para determinar os teores de P, as amostras do material vegetal foram submetidas à digestão nítrico-perclórica (proporção 2:1), sendo os teores de P determinados por colorimetria pelo método azul de molibdênio, tendo ácido ascórbico como agente redutor(EPAMIG, 2018).

Os resultados do ensaio fatorial foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). Os tratamentos foram comparados com o tratamento adicional pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Tratamento de sementes com rizobactérias no desenvolvimento e produção de feijoeiro adubado com duas fontes de fósforo

Em relação à matéria seca da parte aérea do feijoeiro, todas as rizobactérias associadas às fontes de fosfato proporcionaram incremento quando comparadas com as fontes de fósforo sem as bactérias ($p < 0,01$). Em relação ao fatorial, não houve diferença significativa dos fatores fontes de fosfato e rizobactérias, além de não haver interação significativa entre os fatores ($p > 0,05$) (Tabela 5). Todas as rizobactérias associadas com ambas as fontes de fosfato proporcionaram maior matéria seca da raiz do feijoeiro em relação às fontes isoladamente ($p < 0,01$) (Tabela 5) (Figura 12). Desdobrando o fatorial e fixando as fontes de fosfato, verifica-se que quando se utilizou super simples não houve diferença de matéria seca de raiz entre as rizobactérias avaliadas. Por outro lado, quando se empregou o fosfato de gafsa, as rizobactérias RZ-13 e *B. thuringiensis*-66 foram as que proporcionaram maior matéria seca de raiz, com incremento de 279,63%. Fixando-se os isolados, verifica-se que RZ-13 e *B. thuringiensis*-66 proporcionaram maior matéria seca de raiz quando se utilizou fosfato de gafsa (Figura 13).

A matéria seca total do feijoeiro aumentou significativamente diante da inoculação com rizobactérias em comparação aos tratamentos adicionais ($p < 0,01$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os tratamentos tanto ao analisar as fontes de fosfato utilizadas associadas com as rizobactérias quanto ao analisar as fontes de fosfato separadamente ($p > 0,05$) (Tabela 6). Além disso, houve efeito significativo das rizobactérias na matéria seca total do feijoeiro ($p < 0,001$), destacando-se as rizobactérias RZ-80, RZ-13, *B. thuringiensis*-66 e *B. amiloquefaciens*-41 (Tabela 7).

Quanto à massa de vagens por planta do feijoeiro, verificou-se que todas as rizobactérias associadas às fontes de fósforo promoveram aumento em relação às fontes isoladamente ($p < 0,01$) (Tabela 8). Os tratamentos RZ-80, associado ao fosfato de gafsa, e *Bacillus amiloquefaciens*-41, associado ao super simples, aumentaram a massa de vagens em 128,63% e 238,50,54%, respectivamente, em relação aos tratamentos adicionais.

TABELA 5. Médias da matéria seca da parte aérea e raiz, em gramas, de feijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato		Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa		Super simples	Gafsa
	Matéria seca de parte aérea (g)			Matéria seca de raiz (g)	
RZ-74	8,4*	8,6*	RZ-70	6,0 aA*	6,8 aA*
RZ-79	8,7*	8,9*	<i>B. altitudinis</i> -7	6,2 aA*	6,0 aA*
<i>B. xiamensis</i> -67	8,7*	9,4*	RZ-13	6,5 aA*	8,2 bB*
RZ-13	8,9*	9,1*	<i>B. thuringiensis</i> -66	6,7 aA*	8,2 bB*
RZ-80	9,0*	8,9*	RZ-74	6,8 aA*	6,3 aA*
<i>B. altitudinis</i>	9,5*	8,7*	<i>B. xiamenensis</i> -67	6,8 aA*	5,7 aA*
RZ-70	9,2*	8,7*	<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	7,0 aA*	7,7 bA*
<i>B. thuringiensis</i> -66	9,7*	8,5*	RZ-79	7,3 aA*	6,2 aA*
<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	9,9*	8,7*	RZ-80	7,5 aA*	6,7 aA*
CV (%)	11,65		CV	15,44	
Super simples	5,9		Super Simples	2,4	
Gafsa	4,6		Gafsa	2,16	

* Médias diferem dos tratamentos adicionais pelo teste Dunnett a 5% de probabilidade. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



FIGURA 12. Parte aérea do feijoeiro comum para avaliação da matéria seca. Feijoeiro não inoculado com rizobactérias (A) e inoculado com *B. thuringiensis*-66 (B).



FIGURA 13. Raízes do feijoeiro comum para avaliação da matéria seca. Raízes de feijoeiro não inoculado com rizobactérias (A) e inoculado com *B. thuringiensis*-66 (B).

TABELA6. Médias da matéria seca total, em gramas, defeijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa
<i>B. altitudinis-7</i>	15,78*	14,67*
RZ-13	15,44*	17,24*
<i>B. amiloliquefaciens-41</i>	16,80*	16,33*
<i>B. thuringiensis-66</i>	16,30*	16,80*
<i>B. xiamenensis-67</i>	15,33*	15,09*
RZ-70	15,29*	15,34*
RZ-74	15,07*	15,00*
RZ-79	15,85*	15,10*
RZ-80	16,48*	15,64*
CV	8,37	
Super Simples	8,09	
Gafsa	6,77	

*Médias diferem dos tratamentos adicionais pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade.

TABELA7. Médias da matéria seca total, em gramas, defeijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Matéria seca total (MST)
<i>B. amiloliquefaciens-41</i>	16,67 a
<i>B. thuringiensis-66</i>	16,42 a
RZ-13	16,25 a
RZ-80	16,17 a
RZ-79	15,58 b
RZ-70	15,33 b
<i>B. altitudinis-7</i>	15,17b
RZ-74	15,08b

<i>B. xiamenensis</i> -67	15,08 a
CV	8,37

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

TABELA 8. Médias da massa de vagens, em gramas, defeijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa
<i>B. altitudinis</i> -7	7,15*	5,94*
RZ-13	6,61*	5,99*
<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	7,21*	6,20*
<i>B. thuringiensis</i> -66	6,97*	5,75*
<i>B. xiamenensis</i> -67	6,28*	6,13*
RZ-70	5,90*	6,18*
RZ-74	5,74*	5,90*
RZ-79	5,93*	5,95*
RZ-80	5,89*	5,67*
CV	12,09	
Super Simples	2,13	
Gafsa	2,48	

*Médias diferem do tratamento adicional pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade.

Na análise fatorial, verificou-se efeito significativo dos fatores individuais. Assim, destacaram-se no aumento de massa de vagens as bactérias RZ-13, *B. thuringiensis*-66, *B. altitudinis*-7 e *B. amiloqufaciens*-41 (Tabela 9).

TABELA9. Médias da massade vagem, em gramas, por planta de feijoeiro comum inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Massade vagem/planta (MVP)
<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	6,69 a
<i>B. altitudinis</i> -7	6,58 a
<i>B. thuringiensis</i> -66	6,37 a
RZ-13	6,32 a
<i>B. xiamenensis</i> -67	6,14 b
RZ-70	6,06 b
RZ-79	5,92b
RZ-74	5,84b
RZ-80	5,73b
CV	12,09

Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knot a 5% de probabilidade.

Com relação às fontes, verificou-se maior massa de vagens quando as plantas receberam super simples ($p < 0,01$) (Tabela 10).

TABELA10. Médias da massa de vagem de feijoeiro, em gramas, inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Massa de vagem/planta (MVP)
Super Simples	6,39*
Gafsa	5,97
CV	12,09

* Médias diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Todas as rizobactérias associadas a ambas as fontes de fósforo promoveram aumento na massa de grãos em relação às fontes isoladamente ($p < 0,05$). As rizobactérias RZ-79, RZ-80 associadas ao super simples, RZ-74 associada ao gafsa e *B. altitudinis*-7 associada ao super simples proporcionaram um incremento variando de 207,09% a 325,53% (Tabela 11).

TABELA11. Médias da massa de grãos, em gramas, por planta defeijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa
<i>B. altitudinis-7</i>	6,00 aA*	4,67 aB*
<i>B. thuringiensis-66</i>	5,83 aA*	4,50 aB*
<i>B. amiloliquefaciens-41</i>	5,83 aA*	5,33 aA*
RZ-13	5,17 aA*	4,50 aA*
<i>B. xiamenensis-67</i>	5,00bA*	4,83 aA*
RZ-74	4,83bA*	4,33 aA*
RZ-70	4,83bA*	4,83 aA*
RZ-80	4,33bA*	4,50 aA*
RZ-79	4,33bA*	4,67 aA*
CV	13,77	
Super Simples	1,41	
Gafsa	1,73	

*Médias diferem dos tratamentos adicionais pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O peso de 100 grãos foi significativo em relação aos tratamentos com as rizobactérias associadas às fontes de fosfato ($p < 0,05$), sendo que os maiores valores foram registrados para as rizobactérias *Bacillus altitudinis-7*, *Bacillus amiloliquefaciens-41* e *Bacillus thuringiensis-66* associadas ao fosfato Super simples (Tabela 12). Adicionalmente, observou-se que houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao tratamento adicional. O maior aumento foi proporcionado pelo *Bacillus amiloliquefaciens-41*, sendo de 87,78% em relação ao fosfato Super simples e de 43,81% em relação ao fosfato de Gafsa.

Os tratamentos RZ-80 com super simples, RZ-74 com super simples, RZ13 com super simples, RZ-70 com super simples, *B. thuringiensis-66* com super simples, *Bacillus amiloliquefaciens-41* com super simples, *Bacillus altitudinis-7* com super simples e *Bacillus amiloliquefaciens-41* com gafsa promoveram aumento significativo em relação às fontes isoladamente.

TABELA12. Médias do peso de 100 grãos, em gramas, por planta do feijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa
<i>B. altitudinis-7</i>	29,79 aA*	21,92 aB
<i>B. amiloliquefaciens-41</i>	28,11 aA*	24,75 aB*
<i>B. thuringiensis-66</i>	26,12 aA*	21,29 aA
RZ-70	23,98 bA*	21,75 aA
RZ-13	22,92bA*	21,40 aA
RZ-74	22,01bA*	18,95 aA
RZ-80	21,52bA*	19,98 aA
<i>B. xiamenensis-67</i>	19,57bA	21,58 aA
RZ-79	19,52bA	20,41 aA
CV	14,59	
Super Simples	14,97	
Gafsa	17,21	

*Médias diferem dos tratamentos adicionais pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O número de grãos por planta foi diferente, significativamente, em relação aos tratamentos com rizobactérias associados às fontes de fosfato analisadas ($p < 0,05$). Os maiores números de grãos por planta foram observados para os tratamentos com os isolados *Bacillus thuringiensis-66*, RZ-13, RZ-79 e *Bacillus xiamenensis-67* associados ao fosfato Super simples (Tabela 13).

TABELA13. Médias do número de grãos por planta defeijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa
<i>B. xiamenensis</i> -67	25,00 aA*	22,83 aA*
RZ-79	23,67 aA*	23,17 aA*
RZ-13	23,50 aA*	21,33 aA*
<i>B. thuringiensis</i> -66	22,67 aA*	21,83 aA*
<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	21,83bA*	21,33 aA*
RZ-74	21,83bA*	23,33 aA*
RZ-80	21,33bA*	22,67 aA*
RZ-70	20,67bA*	22,67 aA*
<i>B. altitudinis</i> -7	20,33bA*	21,67 aA*
CV	8,70	
Super Simples	9,00	
Gafsa	10,00	

*Médias diferem dos tratamentos adicionais pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade.*Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para o número de vagens por planta, as análises permitiram verificar que houve diferença significativa dos tratamentos quando comparado ao tratamento adicional ($p < 0,01$). Entretanto, o número de vagens por planta não apresentou diferença significativa entre os tratamentos avaliados neste experimento ($p > 0,05$) (Tabela 18).

TABELA18. Médias do número de vagens por planta defeijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa
RZ-80	6,66*	6,33*
RZ-79	5,83*	5,66*
RZ-74	6,33*	6,33*
RZ-70	6,67*	6,33*
<i>B. xiamenensis</i> -67	6,33*	6,5*
<i>B. thuringiensis</i> -66	6,50*	6,0*
<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	6,83 *	6,0*
RZ-13	6,17*	5,83*
<i>B. altitudinis</i> -7	5,56*	6,33*
CV	16,75	
Super Simples	2,17	
Gafsa	2,83	

*Médias diferem do tratamento adicional pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade.

3.2 Análise foliar

Houve efeito significativo dos fatores isoladamente no acúmulo de fósforo na parte aérea de feijoeiro. As bactérias que promoveram maior acúmulo de P foram *B. thuringiensis*-66, *B. amyloliquefaciens*-41, RZ-13 e *B. altitudinis*-7 (Tabela 19). A fonte super simples proporcionou maior acúmulo de fósforo na parte aérea (Tabela 20). Comparando-se os tratamentos pareados pelo teste Dunnet a 5%, verifica-se que *B. thuringiensis*-66 associado ao super simples, *B. amyloliquefaciens* associado ao super simples, RZ-13 associado ao super simples e *B. altitudinis* associado ao super simples promoveram incremento no acúmulo de fósforo em relação ao super simples sem rizobactéria. Nenhuma das bactérias promoveu aumento na absorção de fósforo quando associadas ao fosfato natural de gafsa. Com exceção do isolado RZ-79, todos os demais associados ao super simples aumentaram o teor de fósforo em relação ao fosfato natural de Gafsa isoladamente (Tabela 21).

TABELA 19. Conteúdo de fósforo da parte aérea de feijoeiro comum inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Conteúdo de fósforo
<i>B. thuringiensis</i> -66	4,49 a
<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	4,32 a
RZ-13	4,00 a
<i>B. altitudinis</i> -7	3,90 a
RZ-70	3,47 b
<i>B. xiamenensis</i> -67	3,42 b
RZ-80	3,41b
RZ-79	2,80b
RZ-74	2,73 b
CV	12,09

Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knot a 5% de probabilidade.

TABELA 20. Teor de fósforo por matéria seca de parte aérea de feijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Fontes	Conteúdo de fósforo
Super Simples	5,39*
Gafsa	1,84
CV	29,32

* Médias diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

TABELA 21. Conteúdo de fósforo de parte aérea de feijoeiro inoculado com rizobactérias, isoladas de bananeira Prata-Anã, associadas ao fosfato Super simples e ao fosfato natural Gafsa.

Isolados	Fonte de fosfato	
	Super simples	Gafsa
<i>B. thuringiensis</i> -66	6,24 ^{xy}	2,75
<i>B. amiloliquefaciens</i> -41	6,22 ^{xy}	2,97
RZ-13	6,01 ^{xy}	1,99
<i>B. altitudinis</i> -7	5,81 ^{xy}	1,99
RZ-70	5,37 ^y	1,47
<i>B. xiamenensis</i> -67	5,33 ^y	1,94
RZ-80	4,47 ^y	2,08
RZ-79	3,70 ^y	1,85
RZ-74	3,46	1,73
CV	29,32	
Super Simples	3,55	
Gafsa	1,38	

^x Médias diferem dos tratamentos adicionais pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade em relação ao super simples.^y Médias diferem dos tratamentos adicionais pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade em relação ao gafsa.

4 DISCUSSÃO

Todos os atributos agronômicos avaliados para o feijoeiro neste experimento foram incrementados com a utilização das rizobactérias avaliadas. Os resultados evidenciaram que a microbiolização das sementes de feijão comum com as rizobactérias otimizou a captação do fósforo das fontes de fosfato super simples e fosfato de gafsa pelas plantas. Todos os resultados revelaram que a associação das bactérias com as fontes de fósforo avaliadas foram melhores que o tratamento adicional (fontes de fósforo sem a bactéria). Além disso, observou-se que, para a maioria dos atributos avaliados, a associação das fontes de fósforo com rizobactérias foi melhor que o tratamento adicional independentemente da fonte de fósforo utilizada, demonstrando que os isolados dispõem de um mecanismo eficiente de solubilização.

A atividade solubilizadora, *in vitro*, varia em função do tipo de microrganismo e dos fatores nutricionais, indicando a presença de diferentes mecanismos de solubilização que podem influenciar na absorção de fósforo pelas plantas, quando inoculadas (FILHO; VIDOR, 2001).

O aumento nos atributos agronômicos avaliados no feijoeiro pode ser devido à disponibilização de formas lábeis e não lábeis de fósforo ou, ainda, devido à promoção de crescimento radicular, que contribui para a absorção de nutrientes do solo. Entre os mecanismos de crescimento de plantas, muito discutido na literatura atualmente, estão aqueles envolvidos na solubilização de fósforo por rizobactérias (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Na constituição química do solo utilizado neste experimento, classificado como argiloso, foram encontradas quantidades de cálcio ($3,4 \text{ Cmol/dm}^3$) que podem estar associadas com o fósforo no solo e que pode ter sido solubilizado pelas rizobactérias. Em experimento *in vitro* realizado anteriormente, verificou-se que os nove isolados de rizobactérias avaliados neste experimento são potenciais solubilizadoras de fósforo ligado a cálcio, o que pode ter contribuído para os resultados no incremento dos aspectos agronômicos do feijoeiro. Neste aspecto, corroborando com os resultados deste trabalho, pesquisa com combinações triplas de RPCPs revelou que a bioformulação, incluindo bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio *in vitro* (ANDRADE et al., 2014), estimulou o crescimento de plântulas de banana micropropagada (SOUZA et al., 2016). Para a cultura do tomateiro, em casa de vegetação, outros pesquisadores verificaram que a aplicação de rizobactérias solubilizadoras de fosfato como inoculantes promoveu o aumento na captação de fósforo, supressão de patógeno, além de melhorar o crescimento da cultura (SABER et al., 2015).

Além disso, foi verificado, previamente, que todos os isolados utilizados neste experimento são produtores da enzima fosfatase ácida. É descrito na literatura que as

rizobactérias podem disponibilizar o fósforo de forma eficiente às plantas através da solubilização do fósforo orgânico e inorgânico pela ação de enzimas solubilizadoras como as fosfatases ácidas (SHARMA et al., 2013; GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015; MATOS et al., 2017). Podem também exercer esse papel produzindo exsudatos orgânicos como ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido glucônico, ácido láctico, ácido succínico, ácido propiônico), produção de sideróforos (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015) e excreção de prótons pela assimilação de amônio (SHARMA et al., 2013; GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015; MATOS et al., 2017). Em trabalho realizado por outros pesquisadores, foi observado que rizobactérias solubilizadoras de fosfato e produtoras da enzima fosfatase ácida promoveram aumentos significativos na altura e peso da parte aérea, comprimento e peso de raízes, e diâmetro do caule de plantas de tomate, além de inibir o crescimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (GAO et al., 2015).

Tratando-se de plantas e microrganismos, esses diferentes mecanismos podem fornecer aumentos na eficiência de solubilização que, conseqüentemente, incrementem a biomassa da planta. Dessa forma, o melhor resultado dos atributos agrônômicos avaliados para o feijoeiro neste experimento com a utilização de fosfato super simples e fosfato de gafsa foi proporcionado pelas rizobactérias de forma eficiente independente do tipo de fonte de fosfato. Esse resultado pode ter ocorrido devido à diminuição do pH do solo, sendo favorecida pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos realizada pelas plantas e pelas rizobactérias na rizosfera, associadas à hidrólise do fosfato promovida pelas fontes solúveis. As rizobactérias podem aumentar a eficiência das fontes solúveis, além de favorecer a solubilização dos fosfatos naturais e, ainda, promover o crescimento radicular, permitindo assim maior exploração do solo e absorção de fósforo (CHAVES; ZUCARELI; DE OLIVEIRA JUNIOR, 2013).

Em estudo realizado por outros pesquisadores, no caso das brássicas, uma revisão realizada sobre pesquisas científicas revela que características físicas da raiz, exsudação de ácidos orgânicos (particularmente malato e citrato) e enzimas fosfatases são consideradas mecanismos potenciais de controle de respostas à deficiência de fósforo. A influência de rizodépósitos no desenvolvimento da comunidade microbiana da rizosfera foi discutida e as características específicas desta comunidade em resposta à deficiência de fósforo foram consideradas; especialmente a produção de fosfatases (HUNTER; TEAKLE; BENDING, 2014).

Estudos anteriores têm reportado que a inoculação de plantas com microrganismos podem aumentar a biomassa da planta (AUNG et al., 2015). A utilização de

rizobactérias desde os anos 90 já vem se destacando no cenário mundial como uma área potencial para pesquisa. Sob esta perspectiva, a inoculação de bactérias em cultivares específicos, ou no solo onde estas plantas serão cultivadas, tem sido amplamente utilizada na tentativa de promover o aumento na produção em diversos países. Em Cuba, por exemplo, muitos biofertilizantes já eram produzidos e comercializados para aplicação em diferentes culturas há muitos anos (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Hoje, com o avanço da pesquisa nessa área, vários mecanismos de promoção de crescimento têm sido associados às rizobactérias, promovendo incremento nos atributos agronômicos para diversas culturas, como milho (RODRIGUES et al., 2016), tomate (GHOSH; RATHINASABAPATHI; MA, 2015), trigo (MAJEED et al., 2015) e feijão (SÁNCHEZ et al., 2014).

Em pesquisa realizada por outros autores, o potencial promotor de crescimento de duas linhagens de rizobactérias positivas para a solubilização e produção de sideróforos (S4) e para a produção de ácido indolacético (S7) foi avaliado em plantas de feijão cultivadas em sistema de cultivo orgânico. A inoculação de sementes com linhagens de rizobactérias resultou em aumento das atividades fotossintéticas, eficiência no uso da água e teor de clorofila. Além disso, o tratamento S4 + S7 aumenta significativamente o rendimento de grãos com 27,58%. Os resultados indicam que a co-inoculação produziu uma influência mais pronunciada, enquanto a inoculação sozinha mostrou um efeito menor, provavelmente devido a um efeito sinérgico entre cepas inoculadas com rizobactérias. Os autores sugerem que as linhagens S4 e S7 podem ser utilizadas como biofertilizante para a produção de hortaliças em sistemas agrícolas sustentáveis e orgânicos (STEFAN et al., 2013).

Pesquisa realizada mostrou a efetividade de *Bacillus pumilus* em promover o crescimento e absorver césio 137 do solo em 4 espécies de brássicas em diferentes fazendas contaminadas com césio 137 no Japão. Observou-se um aumento na área de superfície radicular e no volume radicular que, conseqüentemente, promoveram maior concentração de césio no tecido vegetal e maiores valores de césio do que os demais vegetais. O resultado evidencia que as rizobactérias, além de promover o aumento na biomassa, podem servir para melhorar a qualidade do solo (AUNG et al., 2015).

Em outro trabalho, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) foram isoladas de nódulos de leguminosas, apresentando potencial para aumentar a nodulação, o crescimento e a produção de leguminosas quando co-inoculadas com *Rhizobium*. O estudo investigou o efeito da co-inoculação de *Rhizobium* e *Pseudomonas* em genótipos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Os autores observaram que a co-inoculação nativa de *Rhizobium* e *Pseudomonas* em relação à inoculação única de *Rhizobium* aumentou a nodulação,

os parâmetros de crescimento e a produtividade dos diferentes genótipos. Os resultados contribuem para o entendimento da interação entre *Rhizobium*, BPCP's e a planta hospedeira e, além disso, os autores sugerem que a co-inoculação com *Rhizobium pisi* e *Pseudomonas monteilii* pode ser uma estratégia eficaz de biofertilização para a produção de feijão(SÁNCHEZ et al., 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a importância de se notificar a existência de bactérias solubilizadoras que incrementam a biomassa de espécies cultivadas, visto que nem todos os isolados possuem essa mesma capacidade. Outra pesquisa, por exemplo, foi conduzida em casa de vegetação, para avaliar o efeito de biofertilizantes nas propriedades químicas do solo e no desempenho da bactéria *Paenibacillus polymyxa* na absorção de macronutrientes na cultura do feijão caupi. Houve efeito da fertilização na absorção dos macronutrientes, sendo os melhores resultados para P e K com SFT+KCL, e N, Ca e Mg para os biofertilizantes. Entretanto, a rizobactéria *P. polymyxa* não influenciou na absorção dos elementos na planta e os biofertilizantes e as rochas supriram a necessidade de nutrientes das plantas, revelando-se como potencial para uma agricultura sustentável(SILVA et al., 2015).

Para a cultura do arroz, pesquisadores investigaram os efeitos do potencial promotor do crescimento de plantas de rizobactérias. Os resultados revelaram que os isolados foram capazes de produzir fitohormônio, sideróforos, HCN, minerais solubilizados como P, K e Zn. Produziram também enzimas como a ACC desaminase, que pode modular o crescimento e desenvolvimento das plantas. Com base na presença de múltiplas características promotoras do crescimento das plantas, os isolados foram selecionados para estudos de inoculação que certificaram que as rizobactérias melhoraram significativamente o crescimento do arroz. Essas características promotoras de crescimento melhoraram os parâmetros de crescimento e o rendimento do arroz e indicam que as rizobactérias podem ser utilizadas como bioinoculantes para o arroz(SARATHAMBAL et al., 2015).

A análise dos teores de fósforo nas folhas poderia justificar o aumento na biomassa proporcionado pelos tratamentos com rizobactérias para o feijoeiro neste experimento. Outros pesquisadores, por exemplo, relataram em trabalho realizado, para melhorar a produtividade do milho, que houve aumentos no teor de fósforo nas folhas com a inoculação de RPCPs em relação aos tratamentos não inoculados. Os autores citam que isso pode ser explicado pela capacidade de solubilização de fosfato da rizobactéria que disponibilizou o fosfato inorgânico para a solução. Desse modo, ocorreu o aumento da concentração do fósforo no meio e, conseqüentemente, a planta obteve maior absorção foliar(CHAVES; ZUCARELI; DE

OLIVEIRA JUNIOR, 2013).

Neste trabalho, não houve incremento no número de grãos por vagem, o que foi corroborado por outra pesquisa, sem a utilização de bactérias, na qual praticamente todas as variáveis analisadas foram influenciadas pela aplicação de P, exceto o número de grãos por vagens (NGV) (SCHONINGER et al., 2015).

As respostas das culturas à inoculação com microrganismos são complexas porque envolvem interações planta-microrganismos, muitas delas ainda desconhecidas. Neste sentido, é necessário melhorar o conhecimento sobre a ecologia microbiana da rizosfera de culturas sob diferentes práticas agrícolas (DI SALVO et al., 2018). Assim, a avaliação dos efeitos de determinados inoculantes de RPCPs e adubação fosfatada para a cultura do feijão comum é importante, a fim de obter uma produção agrícola mais sustentável. As plantas cultivadas nos solos com os teores mais baixos de argila apresentam maiores teores de P na parte aérea, o que está de acordo com dados obtidos em outra pesquisa. (SILVA; RESENDE; CINTRA, 2001).

5 CONCLUSÕES

O tratamento de sementes de feijoeiro com rizobactérias associado à adubação com super simples ou fosfato natural de gafsa promove incremento no desenvolvimento e produção da cultura.

O tratamento de sementes de feijoeiro com quatro isolados de rizobactérias associado ao super simples promove aumento no acúmulo de fósforo na parte aérea em relação ao super simples isolado.

O tratamento de sementes de feijoeiro com oito isolados de rizobactérias associado ao super simples promove aumento no acúmulo de fósforo na parte aérea em relação ao fosfato natural de gafsa isolado.

Nenhuma rizobactéria associada ao fosfato natural de gafsa aumenta a absorção de fósforo em relação ao gafsa isolado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L.; NIETSCH, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M.; PEREIRA, M. C.; PEREIRA, D. F. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27-34, 2014.

AUNG, H. P.; DJEDIDI, S.; OO, A. Z.; AYE, Y. S.; YOKOYAMA, T.; SUZUKI, S.; SEKIMOTO, H.; BELLINGRATH-KIMURA, S. D. Growth and ¹³⁷Cs uptake of four Brassica species influenced by inoculation with a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus pumilus* in three contaminated farmlands in Fukushima prefecture, Japan. **The Science of the Total Environment**, v. 521-522, n. 1, p. 261-269, 2015.

BASHAN, Y. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

CASTRO-GUERRERO, N. A.; ISIDRA-ARELLANO, M. C.; COZALT, D. G. M.; VALDÉS-LÓPEZ, O. Common Bean : A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc , and Phosphate Deficiencies. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. May, p. 1-7, 2016.

CHAVES, D. P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JÚNIOR, 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, 2013.

CHUN, S. C.; SCHNEIDER, R. W.; COHN, M. A. Sodium Hypochlorite: Effect of Solution pH on Rice Seed Disinfestation and Its Direct Effect on Seedling Growth. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 7, p. 821-824, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos safra 2017/2018**. Brasília, DF: CONAB, 2018. v. 5.

DI SALVO, L. P.; CELLUCI, G. C.; CARLINO, M. E.; GARCIA, I. E. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation and nitrogen fertilization increase maize (*Zea mays* L.) grain yield and modified rhizosphere microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 126, p. 113-120, 2018.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Boletim de análises químicas de solo, tecido vegetal e água**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2018.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture : Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 156, p. 225-246, 2018.

FERREIRA, D. F. SISVAR : a Computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FILHO, G. N. S.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

GAO, M.; ZHOU, J. J.; WANG, E. T.; CHEN, Q.; XU, J.; SUN, J. G. Multiphasic characterization of a plant growth promoting bacterial strain, *Burkholderia* sp. 7016 and its effect on tomato growth in the field. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 9, p. 1855-1863, 2015.

GHOSH, P.; RATHINASABAPATHI, B.; MA, L. Q. Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. **Chemosphere**, Oxford, v. 134, p. 1-6, 2015.

HUNTER, P. J.; TEAKLE, G. R.; BENDING, G. D. Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorus availability and acquisition, with particular reference to Brassica. **Frontiers of Plant Science**, New Haven, v. 5, p. 27, 2014.

LACERDA, J. R. M.; SILVA, T. F.; VOLLÚ, R. E.; MARQUES, J. M.; SELDIN, L. Generally recognized as safe (GRAS) *Lactococcus lactis* strains associated with *Lippia sidoides* Cham. are able to solubilize/mineralize phosphate. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 828, 2016.

MAJEED, A.; ABBASI, M. K.; HAMEED, S.; IMRAN, A.; RAHIM, N. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-10, 2015.

MATOS, A. D. M.; GOMES, I. G. P.; NIETSCH, S.; XAVIER, A. A.; GOMES, W. S.; SANTOS NETO, J. A.; PEREIRA, M. C. T. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 2945-2954, 2017.

NASCENTE, A. S.; COBUCCI, T.; SOUSA, D. M. G.; LIMA, D. P. Produtividade do feijoeiro comum afetada por fontes de fósforo com ou sem cálcio. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 57, n. 2, p. 180-185, 2014.

POSSE, S. C. P.; SOUZA, E. M. R.; SILVA, G. M.; FASOLO, L. M.; ROCHA, M. B.; ROCHA, M. A. M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira**: 2009-2011. Vitória-ES: Incaper, 2010.

RATZ, R. J.; PALÁCIO, S. M.; ESPINOZA-QUINONES, F. R. Potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de milho e soja. **Engevista**, Niterói, v. 19, n. 4, p. 890-905, 2017.

RODRIGUES, A. A.; FORZANI, M. V.; SOARES, R. S.; SIBOV, S. T.; VIEIRA, J. D. G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane 1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 2, p. 149-158, 2016.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

- SABER, F. M. A.; ABDELHAFEZ, A. A.; HASSAN, E. A.; RAMADAN, E. M. Characterization of fluorescent pseudomonas isolates and their efficiency on the growth promotion of tomato plant. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 1, p. 131-140, 2015.
- SALVADOR, C. A. **Feijão**: análise da conjuntura agropecuária. Salvador: Departamento de Economia Rural, 2013. v. 1, n. 41, p. 1-16, 2013.
- SÁNCHEZ, A. C.; GUTIÉRREZ, R. T.; SANTANA, R. C.; URRUTIA, A. R.; FAUVART, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 62, p. 105-112, 2014.
- SARATHAMBAL, C.; KRISHNASWAMY, I.; BALACHANDAR, D.; GHARDE, Y. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 87, p. 1-10, 2015.
- SCHONINGER, E. L.; LANGE, A.; MENEGON, T. G.; CAIONE, G. Produtividade da cultura do feijoeiro submetido a doses de fósforo e nitrogênio. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 8, n. 30, p. 387-398, 2015.
- SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.
- SILVA, E. D. B.; RESENDE, J. C. F. DE; CINTRA, W. B. R. Resposta do feijoeiro a doses de fósforo em solo arenoso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 973-977, 2001.
- SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; SILVA, A. J. N.; MACEDO, G. R. Biofertilizers and performance of *Paenibacillus* in the absorption of macronutrients by cowpea bean and soil fertility. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 12, p. 1136-1142, 2015.
- SNAPP, S.; RAHMANIAN, M.; BATELLO, C. **Pulse crops for sustainable farms in sub-Saharan Africa**. Rome: FAO, 2018.
- SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.
- SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; PEREIRA, M. C. T.; SANTOS, M. A. Triple combinations with PGPB stimulate plant growth in micropropagated banana plantlets. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 103, p. 31-35, 2016.
- STEFANA, M.; MUNTEANU, N.; STOLERU, V.; MIHASANBM, M. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 151, p. 22-29, 2013.

Anexo1- Quadro de adubação do solo de acordo com recomendações para a cultura do feijoeiro.

ADUBO	RECOMENDAÇÃO	TOTAL P/ VASO (3,0 dm ³)	MOMENTO DA APLICAÇÃO
SUPERFOSFATO SIMPLES	3,8 g/dm ³	11,4 g	Semeadura
FOSFATO NATURAL REATIVO	3,8 g/dm ³	11,4 g	Semeadura
ENXOFRE AGROPECUÁRIO	0,3 g/dm ³	0,9 g	Semeadura
SULFATO DE COBRE	12 mg/dm ³	18 mg	Após 7 dias
		18,0 mg	Após a emergência aguardar 30 dias
NITRATO DE CÁLCIO	266,61 mg/dm ³	799,83 mg	1 vez p/semana início com 7 dias
CLORETO DE POTÁSSIO	104 mg/dm ³	312 mg	30 dias após a germinação - Repetir a cada 30 dias
ÁCIDO BÓRICO	6 mg/dm ³	18 mg	Após a emergência aguardar 30 dias