

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**DIVERSIDADE BACTERIANA E FUNCIONAL NA
RIZOSFERA DE PLANTAS DE *Carica papaya* L. SOB SISTEMA DE
CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

JULIANA MELO DA CONCEIÇÃO

VILA VELHA
DEZEMBRO / 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**DIVERSIDADE BACTERIANA E FUNCIONAL NA
RIZOSFERA DE PLANTAS DE *Carica papaya* L. SOB SISTEMA DE
CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecosistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

JULIANA MELO DA CONCEIÇÃO

VILA VELHA
DEZEMBRO/2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C744d Conceição, Juliana Melo da.
Diversidade bacteriana e funcional na rizosfera de plantas de *Carica papaya* L. sob sistema de cultivo orgânico e convencional / Juliana Melo da Conceição. – 2014.
83 f.: il.
Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.
Tese (doutorado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2014.
Inclui bibliografias.
1. Mamão - Cultivo. 2. Solubilização biológica - Fosfato. 3. Fertilizante orgânico. 4. Microbiologia – Adubos e fertilizantes. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 634.651

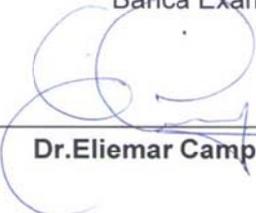
JULIANA MELO DA CONCEIÇÃO

**DIVERSIDADE BACTERIANA E FUNCIONAL NA
RIZOSFERA DE PLANTAS DE *Carica papaya* L. SOB SISTEMA
DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

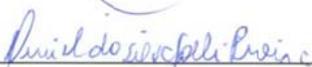
Tese apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em
Ecologia de Ecossistemas, para a
obtenção do título de Doutor em
Ecologia.

Aprovada em 17 Dezembro de 2014,

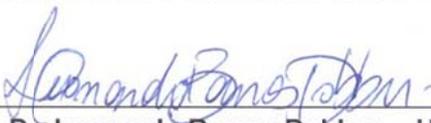
Banca Examinadora:



Dr. Eliemar Campostrini – UENF



Dra. Muriel da Silva Folli Pereira – UVV



D. Leonardo Barros Dobbss – UVV



Dr. Alessandro Coutinho Ramos – UENF
Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais, Elias da Conceição e Eni de Fátima Melo da Conceição, à minha irmã Tiara Melo, aos meus amigos e ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus pela força, saúde, calma e perseverança que me foi concedida para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha família por me ofertar confiança, apoio e amor durante toda essa jornada e por sempre acreditar no meu sucesso, sem eles não teria chegado até aqui.

Agradeço em especial ao meu orientador, Dr. Alessandro Coutinho Ramos, que foi um verdadeiro pai, sempre me apoiando e aconselhando, passando ensinamentos que levarei para o resto da vida. Agradeço-o por ter me ensinado a ser uma profissional e uma pessoa melhor. Obrigada pela confiança e por acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu mesma não acreditava. Agradeço também à Adriana por todo carinho e paciência durante esses anos nas madrugadas de trabalho.

Agradeço à minha querida co-orientadora professora Dr^a Cristina Cruz que me recebeu tão bem no período que estive em Portugal, que me ensinou muito e foi fundamental para desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à professora Dr^a Manuela Carolino pelo carinho e auxílio no desenvolvimento do trabalho. Agradeço aos colegas do laboratório de Ecologia da Faculdade de Ciências de Lisboa, Patrícia Correia, Luís Carvalho, Raquel Costa, Marte Delagado, Catarina Gouveia e Herculana que me acolheram e me auxiliaram muito no ano que estive em Portugal. Sem vocês não teria conseguido. Muito Obrigada a todos.

Aos professores do Doutorado do Programa de Ecologia de Ecossistemas pelo aprendizado.

Aos colegas do Doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB).

Agradeço aos meus amigos Inês Meleiro, Ana Fernades, Lena Fernades, Jean Fernades, Joana Santos e Catariana Gonçalves (as ladies), enfim, todos os meus amigos portugueses que me acolheram como parte da família.

Aos amigos, Sávio Bastos, Romildo Rocha, Gabriela Canton, Amanda Bertolazi, Júlia Gallon, Nágila Simoura que estiveram ao meu lado e me ajudaram na construção deste trabalho. Aos colegas Rodrigo Campos, Andreza Marques e Fernanda Pavessi pela ajuda nas coletas e na parte prática do trabalho.

Agradeço o companherismo de todos citados acima, pelas conversas engraçadas e a ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos professores Dr Leonardo Dobbss, Dra Muriel Folli e Dr Eliemar Campostrine por terem aceitado o convite para participar da banca. Sei que vossas sugestões serão de grande importância para o melhor deste trabalho. Muito Obrigada!

Agradeço à FAPES e CAPES pelo suporte financeiro, pois, sem esse apoio a execução deste projeto seria muito difícil. Obrigada!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas e à Universidade Vila Velha pelo suporte dado ao desenvolvimento deste trabalho.

“...que seja infinito enquanto dure...”

Vinicius de Moraes

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1.1 REFERÊNCIAS.....	8
CAPÍTULO I. O sistema de cultivo pode influenciar na funcionalidade fisiológica e interação social das bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de solo rizosférico de <i>Carica papaya</i> L.!	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3. RESULTADOS.....	20
4. DISCUSSÃO.....	28
5.CONCLUSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO II: Efeito do sistema de cultivo de <i>Carica papaya</i> L. sobre a eficiência de solubilização de fosfato, atividade antifúngica, produção de auxina e sideróforos por rizobactérias promotoras do crescimento nativas.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3. RESULTADOS.....	45
4. DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

MELO, Juliana. Universidade Vila Velha - ES, 17 de Dezembro de 2014. **Diversidade bacteriana e funcional na rizosfera de plantas de *Carica papaya* L. sob sistema de cultivo orgânico e convencional.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

A inoculação de micro-organismos simbiotes vem sendo empregada em várias culturas e tem como objetivo, por ação direta ou indireta, promover o crescimento vegetal. Porém, a atividade dos mesmos no solo pode ser influenciada por variáveis ambientais e pelo tipo de sistema de manejo empregado. O sistema de cultivo convencional é dependente de uma grande quantidade de insumos agrícolas, como fertilizantes e defensivos cuja utilização frequente pode levar à contaminação do solo e dos recursos hídricos. Por outro lado, o sistema orgânico tem como conceito um manejo diferenciado, ecologicamente sustentável, substituindo fertilizantes sintéticos e pesticidas por insumos biológicos que visam proteger a qualidade do meio ambiente e dos produtos agrícolas. Nesse contexto, os processos microbianos são essenciais para a produtividade vegetal, desempenhando papel crucial na sustentabilidade destes ecossistemas via ciclagem de nutrientes, manutenção da estrutura do solo, controle de patógenos e na melhoria da eficiência da aquisição de importantes nutrientes, como nitrogênio (N) e Fósforo (P). A cultura do mamoeiro é de grande relevância e interesse socioeconômico para o estado do Espírito Santo, onde o tipo de solo predominante é o latossolo, de fertilidade relativamente baixa, com limitada disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento vegetal. No presente estudo foram isoladas da rizosfera de *C. papaya*, 12 estirpes com capacidade de solubilizar fosfato pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Leclercia*. Das doze bactérias isoladas, 5 foram provenientes cultivo convencional e 7 bactérias solubilizadoras de fosfato do sistema de cultivo orgânico. A capacidade de solubilizar fosfato foi testada inicialmente em meio sólido NBRIP e, posteriormente, em meio líquido NBRIP para quantificar P livre no meio. As maiores concentrações de P livre, ou extracelular, foram encontradas no meio com crescimento de bactérias isoladas do sistema de cultivo orgânico. Uma cooperação fisiológica positiva foi encontrada na interação entre bactérias do sistema orgânico ou da mistura convencional/orgânico. A fixação de N foi observada

nas estirpes *B. cepacia* Je39-7 C, *B. cepacia*SAT1-2 O, *B. cepacia*Je39-7 O e *L. adecarboxylata* NS87 O. Com exceção da *L. adecarboxylata* NS87 O, os demais isolados apresentaram atividade antifúngica. As estirpes *B. cepacia*Je39-7 Ce *E. aerogenes* S18 C isoladas do cultivo convencional, e *E. asburiae* OS-1 e *B. cepacia*Je39-7 O, do cultivo orgânico, apresentaram eficiência em solubilizar fosfato, produzir fitormônios, sideróforos e inibir o crescimento micelial de fungos. Com isso, pretende-se empregar metodologias que tragam maior produtividade às culturas, utilizando processos naturais, de baixo impacto ao meio ambiente.

Palavras-chave: Diversidade Microbiológica, Bactérias Solubilizadoras de Fosfato, Cooperação Bacteriana.

ABSTRACT

MELO, Juliana. Universidade Vila Velha - ES, December 17, 2014. **Bacterial and functional diversity in the plant rhizosphere of *Carica papaya* L. under organic and conventional crops.** Advisor: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Inoculation of micro-organisms symbionts has been used in various cultures and aims, by direct or indirect action, to promote plant growth. However, the activity thereof in the soil can be influenced by environmental variables and the type of employee management system. The conventional farming system is dependent on a lot of agricultural inputs such as fertilizers and pesticides whose frequent use can lead to contamination of soil and water resources. On the other hand, the organic system is a different concept management, ecologically sustainable, replacing synthetic fertilizers and pesticides by biological inputs aimed at protecting the quality of the environment and agricultural products. In this context, the microbial processes are essential to plant productivity, playing a crucial role in the sustainability of these ecosystems through nutrient cycling, maintaining soil structure, pathogen control and improving the efficiency of the acquisition of important nutrients such as nitrogen (N) and phosphorus (P). The papaya crop is of great importance and interest to the socioeconomic status of the Holy Spirit, where the predominant soil type is latosol, with relatively low fertility, with limited availability of essential nutrients for plant growth. In the present study, 12 strains were isolated from the rhizosphere of *C. papaya*, with the capacity to solubilize phosphate belonging to the Burkholderia, Enterobacter and Leclercia. Of the twelve bacteria isolated, 5 were from conventional cultivation and 7 from the phosphate solubilizing bacteria organic farming system. The phosphate solubilizing capacity was initially tested in solid medium NBRIP and subsequently NBRIP liquid medium in order to quantify free P in between. The highest concentrations of P free, or extracellular, were found in the middle with growth of bacteria isolated from the organic farming system. A positive physiological cooperation was found in the interaction between bacteria of the organic system or conventional / organic mixture. N-fixation was observed in *B. cepacia* strains Je39-7 C, B. The *cepacia*SAT1-2, B. and *L. adcarboxylata cepacia*Je39-7 The NS87 O. Aside from *L. adcarboxylata* The NS87, the other isolates showed antifungal activity. Strains *B. cepacia*Je39-7 C, E. *aerogenes* S18 C isolated from conventional cultivation and *E. asburiae* OS-1 and *B.*

The cepaciaJe39-7, organic farming, showed efficiency in phosphate solubilizing, produce phytohormones, siderophores and inhibit mycelial growth of fungi. Thus, we intend to employ methodologies that bring greater productivity to crops, using natural processes, low impact on the environment.

Keyword: Microbial Diversity, Phosphate Solubilizing Bacteria, Bacterial Cooperation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A inoculação de microrganismos benéficos em plantas tem sido empregada para melhorar o crescimento da planta, produtividade e aumentar a tolerância à doenças, além de favorecer o estabelecimento frente a condições adversas, como de limitação nutricional, salinidade e estresse hídrico (Barrow & Osuna, 2002)

Dentre os grupos de microrganismos com comprovado potencial benéfico para as plantas, têm-se as bactérias do gênero rizóbio, bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) e fungos micorrízicos arbusculares (Ramos et al., 2005, Liu et al., 2007, Ahmad et al. 2008). Esses microrganismos podem beneficiar o desenvolvimento de mudas em viveiros, maximizando sua capacidade de estabelecimento em condições de campo (Babalola, 2010). As bactérias do gênero rizóbio são capazes de formar simbiose com espécies de leguminosas, possibilitando a fixação do N_2 atmosférico garantindo, assim, o suprimento desse elemento à planta (Souchie et al, 2005, Richardson et al. 2009)

Além da capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, é de interesse identificar microrganismos que atuem na solubilização de fosfatos inorgânicos (Chabot et al., 1998, Malboobi et al. 2009). A produção de hormônios de crescimento vegetal que fazem parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais (Bashan & Holguim, 1997, Oliveira, 2009). Podem exercer funções antagonistas à fitopatógenos devido à produção de enzimas, antibióticos e ácidos, produção de sideróforos e degradação de compostos poluentes, o que poderá despertar grande interesse da pesquisa para futuras aplicações na agricultura moderna (Oliveira, 2009, Ahmad et al. 2008).

Porém a atividade desses microrganismos no solo pode ser influenciada por variáveis ambientais e pelo tipo de sistema de manejo empregado (Barea et al.,

2005, Araújo et al., 2009; Ahemad & Khan, 2010). Práticas agrícolas convencionais e a utilização de insumos químicos associados a esse sistema de cultivo, aumenta cada vez mais a preocupação com a preservação ambiental. Entre estes estão a poluição ambiental, redução da biodiversidade (Dai et al., 2014) e erosão do solo (Marja et al., 2014). Como resultado dessas preocupações a sustentabilidade a longo prazo dos métodos de produção convencionais é questionável. Por outro lado o sistema de cultivo orgânicos é definido como um sistema de produção sustentável no tempo e no espaço, por meio de gestão e proteção dos recursos naturais, sem o uso de produtos químicos que são agressivos para os seres humanos e para o meio ambiente, mantendo a fertilidade, a vida do solo e diversidade biológica. Sendo assim esse sistema de cultivo pode reduzir os efeitos negativos atribuíveis ao sistema de cultivo convencional (Beltrán-Esteve & Reig-Martínez 2014; Marja et al., 2014 Perez et al., 2014). Mantendo assim, integridade do solo bem como as comunidade microbianas que desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes importantes para a manutenção das culturas como nitrogênio e fósforo van Diepeningen et al., 2006 Moeskops et al., 2010

O nutriente fósforo é um macronutriente de grande importância, constituindo cerca de 0,2% de massa seca das plantas. Participa como componente estrutural dos ácidos nucleicos e fosfolípidios e também de adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento-chave de vias metabólicas e bioquímicas, como as várias etapas das vias do ciclo de Calvin e glicólise (Singh et al., 2014). A maior parte do fósforo que se encontra no solo se apresenta não disponível para as plantas. Devido a isso, tornam-se necessárias aplicações de fósforo inorgânico no solo para garantir boa produtividade (Vassilev et al., 2006, Estrada et al., 2013).

Uma forma de reduzir os custos com a aplicação de fósforo é a utilização dos fosfatos naturais, embora os mesmos tenham como inconveniente o fato de serem

de baixa solubilidade e, portanto, pouco disponíveis às plantas. Uma alternativa que pode viabilizar a utilização de fosfatos naturais é o emprego de microrganismos com capacidade de solubilizá-los (Toro et al., 1998, Sing et al., 2014).

O tipo de solo de cultivo predominante no Estado do Espírito Santo é o latossolo que, segundo Massenssini (2007), constitui uma classe de solos intensamente intemperizados. Esses solos apresentam fertilidade relativamente baixa e limitada disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento vegetal. Um dos principais obstáculos para a produtividade do mamão papaya nestas regiões é justamente a baixa disponibilidade de fosfato(P) no solo (Silva-Filho et al., 2002). O mamoeiro é uma planta que extrai quantidades relativamente altas de nutrientes do solo e apresenta exigências contínuas durante o primeiro ano de cultivo (Trindade et al. 2006, Lyra, 2008). Dentre os macronutrientes, o fósforo se acumula nesta planta de forma crescente e uniforme, sendo necessária adubação constante deste elemento.

O Brasil ocupa atualmente a segunda posição em volume de produção de papaya e a terceira colocação em área colhida, superior a 34 mil hectares. O estado do Espírito Santo é o maior exportador mundial de mamão papaya e o segundo maior produtor nacional em uma área de aproximadamente 7,9 mil hectares. Considerando os dez estados brasileiros, maiores produtores de mamão, observa-se que o Espírito Santo apresenta o maior rendimento médio (FAEB, 2011; INCAPER 2014).

Na atualidade, uma alternativa ecológica para a otimização da absorção de nutrientes em solos pobres é explorar a biodiversidade de microrganismos dos solos, uma vez que muitos deles participam de processos ecológicos importantes, tais como a ciclagem de nutrientes, ciclos biogeoquímicos, manutenção da fertilidade e da estrutura de solos (Manfio, 2003, Chen et al., 2008) e também no

aumento da área de captação de íons (Ramos et al., 2005, 2008). A eficiência destes microrganismos foi comprovada, uma vez que alguns têm a capacidade de solubilizar fosfatos naturais liberando fosfato solúvel acima das necessidades, que é logo aproveitado pelas plantas (Barroti e Nahas 2000).

Metodologias que tragam maior produtividade à cultura, utilizando processos naturais de baixo impacto ao meio-ambiente, são de extrema importância para o desenvolvimento sustentável da agricultura. A fim de que esse tipo de metodologia se torne prática corrente, há necessidade, portanto, de estudos sobre a ecologia microbiana desses ambientes.

1.1 REFERÊNCIAS

- Ahmad F, Ahmad I, Khan, MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research* 163: 173-181.
- Barroti G, Nahas E. (2000).População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo.Pesquisa Agropecuária Brasileira. 35: 2043-2050.
- Barrow JR, Osunaw P.(2002). Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.*Journal of Arid Environments*.51: 449–459.
- BashanY, Holguin G. (1997).*Azospirillum* plant relations: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 103-121.
- Beltrán-Esteve M, Reig-Martínez E. (2014). Comparing conventional and organic citrus grower efficiency in Spain *Agricultural Systems*. 129:115–123.
- Chabot R, AntouN H, Cescas MP. (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil*, 184:311-321.
- Chen CR, Condrón LM, Xu ZH. (2008). Impacts of grassland afforestation with coniferous trees on soil phosphorus dynamics and associated microbial processes: A review. *Forest Ecology and Management*. 255: 396–409.
- Dai M, Hamel C, Bainard LD, Arnaud MSt, Grant CA, Lupwayi NZ, Malhi SS , Lemke R (2014). Negative and positive contributions of arbuscular mycorrhizal fungal taxa to wheat production and nutrient uptake efficiency in organic and conventional systems in the Canadian prairie. *Soil Biology & Biochemistry* 74:156-166.
- Estrada GA, Baldani VLD, Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake
- FAEB- Federação de Agricultura e Pecuária do Estado da Bahia. 2011.<http://www.faeb.org.br>.

- Liu B, Tu C, Hu S, Gumpertz M, Ristaino JB. (2007). Effect of organic, sustainable, and conventional management strategies in grower fields on soil physical, chemical, and biological factors and the incidence of Southern blight. *Applied Soil Ecology* 37: 202–214.
- Lyra GB, Ponciano NJ, Sousa EF, Bernardo S, Daher RF, Pereira MGA, Marinho B. (2008). Estimativa dos níveis ótimos e econômicos de irrigação no mamoeiro (*Carica papaya* L.) Cultivar golden nas condições do norte do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30: 390-395.
- Malboobi MA, Behbahani M, Madani H, Owlia P, Deljou A, Yakhchali B, Moradi M, Hassanabadi H (2009) Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteriain potato rhizosphere *World J Microbiol Biotechnol*25:1479– 1484.
- Manfio GP. (2003). Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do brasil. *Microbiota*. Ministério do Meio Ambiente.
- Marja R, Herzon I, Viik E, Elts J, Mänd M, Tschardt T, Batár P. (2014). Environmentally friendly management as an intermediate strategy between organic and conventional agriculture to support biodiversity. *Biological Conservation* 178: 146–154
- Massenssini AM. Solubilização de fosfatos mediada por microrganismos do solo de plantio de eucalipto. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- Moeskopsa B, Sukristiyonubowob, Buchana D, Sleutela S, Herawatyb L, Husenb E, Saraswatib R, Setyorinib D, Nevea S. (2010). Soil microbial communities and activities under intensive organic and conventional vegetable farming in West Java, Indonesia. *Applied Soil Ecology* 45:112–120.
- Oliveira SM. Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro. 77 p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2009.
- Pereza PG, Yea J, Wangb S, Wanga XL, Huang DF. (2014). Analysis of the occurrence and activity of diazotrophic communities in organic and conventional horticultural soils. *Applied Soil Ecology* 79 p. 37–48

- Ramos AC, Façanha AR, Feijó JA. (2008). Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 178:177-188.
- Ramos AC, Martins MA, Façanha AR. (2005). Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microssomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares - n.29, Vol 2. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 29: 207-214.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339
- Silva-Filho GN, Narloch C, Scharf R. (2002) Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 37: 847-854.
- Singh P, Kumar V, Agrawal S (2014) Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International Journal of Microbiology* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/426483>.
- Souchie EL, Campello EFC, Saggin-Júnior OJ, Silva EMR. (2005). Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. *Floresta*, Curitiba, PR, v. 35, n. 2.
- Toro M, Azcón R, Barea JM. (1998) The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphatesolubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. *New Phytologist*. 138: 265 – 273.
- Trindade AV, Siqueira JO, Stürmer SL. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi in papaya plantations of Espírito Santo and Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:283-289.
- van Diepeningen AD, de Vos OJ, Korthals GW, van Bruggen AHC. (2006). Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology* 31: 120–135

Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 137–144. Babalola OO. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters* 32: 1559-1570.

CAPÍTULO I

O sistema de cultivo pode influenciar na funcionalidade fisiológica e interação social das bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de solo rizosférico de *Carica papaya* L.!

MELO, Juliana. Universidade Vila Velha - ES, 17 de Dezembro de 2014. **O sistema de cultivo pode influenciar na funcionalidade fisiológica e interação social das bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de solo rizosférico de *Carica papaya* L.!** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

RESUMO

As práticas agrícolas podem afetar o ambiente do solo e, conseqüentemente, modificar a dinâmica das comunidades microbianas. A atividade microbiana do solo é fundamental para processos de ciclagem de nutrientes e de nutrição vegetal em condições naturais. O Fósforo (P) é um nutriente essencial para as plantas, no entanto, na maioria dos solos encontra-se na forma indisponível, pois tende a estar associado aos óxidos de ferro, alumínio e ao cálcio. Com isso, a utilização de microrganismos com capacidade de solubilizar formas insolúveis de fosfato vem ganhando destaque nas pesquisas. No presente trabalho, objetivou-se isolar bactérias presentes na rizosfera de *Carica papaya* L. cultivadas em sistema de plantio convencional e orgânico, avaliando sua capacidade em solubilizar fosfato e verificar se o tipo de manejo influencia na cooperação funcional em solubilizar fosfato no crescimento bacteriano e diversidade fisiológica bacteriana. Foram isoladas da rizosfera de *C. papaya*, 5 bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) do sistema de cultivo convencional e 7 bactérias solubilizadoras de fosfato do sistema de cultivo orgânico. A capacidade de solubilizar fosfato foi testada inicialmente em meio sólido NBRIP e, posteriormente, em meio líquido NBRIP para quantificar P livre no meio. As maiores concentrações de P livre, ou extracelular, foram encontradas no meio com crescimento de bactérias isoladas do sistema de cultivo orgânico. Um comportamento de cooperação no crescimento celular foi observado, sendo

independente do sistema de cultivo de origem. Porém, em relação a solubilização de fosfato, não foram observados casos de cooperação fisiológica entre isolados do sistema convencional. Uma cooperação fisiológica positiva foi encontrada na interação entre bactérias do sistema orgânico ou da mistura convencional/orgânico. O uso combinado dessas bactérias como bioinoculantes ecologicamente sustentáveis é uma alternativa viável para promover o crescimento de plantas *C. papaya* em solos tropicais. A cooperação fisiológica na funcionalidade de solubilizar fosfato apresentada em alguns casos é de extrema importância para tentar entender o comportamento desses microrganismos quando utilizados em conjunto como bioinoculantes.

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento, cooperação, sinergismo, fósforo orgânico.

1. INTRODUÇÃO

A atividade de microrganismos no solo pode ser influenciada por variáveis ambientais e pelo tipo de sistema de manejo empregado (Barea et al., 2005, Araújo et al., 2009; Ahemad & Khan, 2010).

O sistema de cultivo convencional é dependente de uma grande quantidade de insumos agrícolas, como fertilizantes e defensivos cuja utilização frequente pode levar à contaminação do solo e dos recursos hídricos (Bulluck et al., 2002; Liu et al., 2007; Oliveira, 2009). Por outro lado, o sistema orgânico tem como conceito um manejo diferenciado, ecologicamente sustentável, substituindo fertilizantes sintéticos e pesticidas por insumos biológicos que visam proteger a qualidade do meio ambiente e dos produtos agrícolas (Girvan et al., 2003; Chen et al., 2006; Liu et al., 2007). Nesse contexto, os processos microbianos são essenciais para a produtividade vegetal, desempenhando papel crucial na sustentabilidade destes ecossistemas via ciclagem de nutrientes, manutenção da estrutura do solo, controle de patógenos e na melhoria da eficiência da aquisição de importantes nutrientes, como nitrogênio (N) e Fósforo (P) (Liu et al., 2007; Babalola, 2010; Ahemad & Kibret, 2014).

O P é um macronutriente essencial para as plantas e as principais funções estão relacionadas com o aumento da biomassa destes organismos, os processos metabólicos de transferência de energia, biossíntese de macromoléculas, fotossíntese e respiração (Barea et al., 2005; Singh et al., 2014). No entanto, grande parte do fosfato inorgânico solúvel aplicado no solo, na forma de fertilizante, é rapidamente imobilizado após a aplicação, tornando-se indisponível para as plantas (Richardson & Simpson, 2011; Estrada et al., 2013). A fixação e precipitação de P no solo é geralmente dependente do pH e do tipo de solo. Logo, em solos ácidos, o P é adsorvido por óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, enquanto em solos alcalinos é

adsorvido pelo cálcio (Rodriguez & Fraga, 1999; Oliveira, 2009). Um segundo componente essencial de P no solo é a matéria orgânica. As formas orgânicas de P podem constituir 30-50% de P total na maior parte dos solos (Ahmed & Shahab 2009). A Grande parte do P-orgânico no solo encontra-se sob forma de fitato, sendo responsável por até 50% do total (Rodriguez & Fraga, 1999; Ahemad & Kibret, 2014).

Vários estudos vêm avaliando a capacidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar fosfato inorgânico insolúveis, tais como fosfato tricálcico, fitato e fosfato de rocha (Ahemad & Kibret, 2014; Sing et al., 2014). Uma população considerável destas bactérias solubilizadoras de P estão presentes no solo, porém a maior concentração desses microrganismos encontra-se na rizosfera das plantas (Rodriguez & Fraga, 1999; Mahdi et al.,2010).

As atividades funcionais da população microbiana ter um impacto crítico nas funções do solo, uma vez que esses microrganismos são forças motrizes para processos metabólicos fundamentais envolvendo atividades de enzimas específicas e muitas interações microbianas, que são regulados por moléculas ou sinais específicos (Pace, 1997), são responsáveis por processos ambientais fundamentais, como o ciclo biogeoquímico de nutrientes e na manutenção da qualidade do solo (Barea et al, 2004). A grande quantidade de insumos químicos utilizados na agricultura atual vem causando grande impacto no solo, gerando grande preocupação quanto a isso. Cada vez mais vem-se amentando o interesse em melhorar a compreensão das actividades de cooperação entre as populações microbianas da rizosfera e em como estas podem ser aplicadas à agricultura (Kennedy, 1998; Bowen e Rovira, 1999; Barea et al, 2004;. Lucy et al, 2004). Nesse contexto, uma alternativa mais econômica para produção de mudas é o uso de bactérias que apresentem funções benéficas às plantas, com capacidade de

solubilizar P, fixar N, produzir fitormônios e que cooperem entre si podendo, assim, atuar como biofertilizantes, contribuindo para nutrição e sanidade vegetal.

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América Tropical, é considerado uma das frutas mais consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o Brasil, um dos principais produtores mundiais (FAO, 2014). Por ser uma planta de crescimento rápido e contínuo, com floração e frutificação concomitantes e ininterruptas, necessita de suprimento de água e nutrientes constantes em todo o seu ciclo (Trindade et al., 2006; Mendonça et al., 2006). Sabendo do potencial de certas bactérias promotoras do crescimento em fixar N atmosférico e solubilizar fosfato, o objetivo do estudo foi isolar bactérias de solo rizosférico de *Carica papaya* L., cultivadas em sistema convencional e orgânico, avaliando a capacidade das bactérias em solubilizar, tentar perceber qual o mecanismo envolvido na solubilização do fosfato por esses microrganismos e também testar a hipótese de que o tipo de manejo da cultura influencia na interação social e fisiológica bacteriana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área amostral e análise química do solo rizosférico

O estudo foi realizado em uma área de cultivo de *Carica papaya* L., cultivar Golden, em dois sistemas de cultivo (convencional (19°12'22.9"S 40°05'52.0"W), e orgânico (19°14'13.40"S 40° 4'38.73"W)), no município de Sooretama no estado do Espírito Santo (ES, Brasil), em Outubro de 2012. Essa propriedade possui certificações de qualidade para produção de mamão orgânico, em 2004 obteve o Certificado "EUREPGAP Protocol for Fresh Fruits and Vegetable", e em 2009 o certificado orgânico IBD. A temperatura e a precipitação média anual são de 22° e 700-800 mm, respectivamente.

As amostras de solo rizosférico foram coletadas de 0 a 20 cm de profundidade, seguindo os procedimentos para coleta de amostra de solo (EMBRAPA, 2005). A delimitação foi realizada por parcelas contendo 6 plantas espaçadas de 20 m entre si. Ao redor de cada planta, foram coletadas 4 subamostras de solo próximas à raiz, a 8 cm do colo da planta, tendo, assim, uma amostragem composta do solo com 3 réplicas para cada sistema de cultivo.

As amostras de solo dos sistemas de cultivo convencional e orgânico foram coletadas e colocadas em sacos plásticos devidamente identificados, posteriormente foram acondicionadas em caixa de isopor para transporte até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, onde foram realizadas análises microbiológicas com amostras ainda frescas.

Para a análise química, parte das amostras do solo foi seca em estufa de circulação forçada de ar a 60-70°C, por um período de 24 horas. Após secagem, as amostras foram moídas, peneiradas em peneiras de 2 mm e acondicionadas em recipientes de plástico hermético para posteriores análises químicas. Nas amostras foram dosados os macros e micronutrientes incluindo, também, alumínio e sódio,

seguinte os procedimentos de Sarruge & Haag (1974). Após a digestão via seca, em mufla a 500°C e solubilização em HCl 3M (Martins & Reissmann, 2007), os minerais foram identificados, sendo que o P foi determinado por colorimetria com vanadato-molibdato de amônio, K, Al e Na, por fotometria de chama, e Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, B, e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. Características químicas do solo da área experimental do sistema de cultivo convencional: pH 5,5; P (mg/dm³) 355,3; K (mg/dm³) 189,0; Ca (cmolc/dm³) 4,4; Mg (cmolc/dm³) 0,6; Al (cmolc/dm³) 0,0; H+Al (cmolc/dm³) 2,3; Na (cmolc/dm³) 0,1; C (%)1,4; MO (g/dm³) 23,3; S.B. (cmolc/dm³) 5,6; T (cmolc/dm³) 7,9; t (cmolc/dm³) 5,6; m (%) 0,0; V (%) 70,7; Fe (mg/dm³) 26,8; Cu (mg/dm³) 2,8; Zn (mg/dm³) 22,6; Mn (mg/dm³) 10; S (mg/dm³) 127,5; B (mg/dm³) 0,9.

Características químicas do solo da área experimental do sistema de cultivo orgânico: pH 6,6; P (mg/dm³) 382,7; K (mg/dm³) 116,0; Ca (cmolc/dm³) 4,4; Mg (cmolc/dm³) 0,9; Al (cmolc/dm³) 0,0; H+Al (cmolc/dm³) 0,8; Na (cmolc/dm³) 0,2; C (%) 1,3; MO (g/dm³) 22,4; S.B. (cmolc/dm³) 5,7; T (cmolc/dm³) 6,5; t (cmolc/dm³) 5,7; m (%) 0,0; V (%) 87,3; Fe (mg/dm³) 21,3; Cu (mg/dm³) 8,6; Zn (mg/dm³) 14,0; Mn (mg/dm³) 23,0; S (mg/dm³) 35,3; B (mg/dm³) 1,4.

Avaliação do crescimento bacteriana em caldo nutritivo (NB)

Para avaliação do crescimento, foi realizado um pré inóculo de cada estirpe em 10 µL de caldo nutritivo, a 28°C, 160 rpm overnight. Após esse período, foram transferidos 20 µl do pré inóculo para uma microplaca de 96 poços contendo 180 µl de NB. A microplaca foi incubada a 28°C, 900 rpm em agitador de microplacas (Heidolph Tiramax 100) por 24 h. A leitura da absorvância foi realizada a cada duas horas, durante 24 horas, a 600 nm, usando um leitor de microplacas Rainbow Tecan Spectra Classic.

Avaliação quantitativa de solubilização de fosfato

Para a avaliação da capacidade de solubilização em meio líquido, foi feito um pré-inóculo com os isolados em caldo nutritivo. Em 10 mL de caldo, foi transferido uma alçada de 10 µl do inóculo a partir do meio sólido. Esse pré-inóculo foi incubado a 28°C, 160 rpm overnight. Após esse período, foi transferido 1mL do inóculo para um erlenmayer contendo 20 mL de meio NBRIP com fosfato tricálcico, que foi incubado a 28°C, 160 rpm por 24 horas. Posteriormente, foi retirado uma alíquota de 2 mL de cada inóculo, para determinação do fósforo solúvel. As amostras foram centrifugadas a 12.000 xg, 10 minutos para a sedimentação de partículas insolúveis presente no meio, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de papel de filtro Whatman 42. Após filtração, o sobrenadante foi utilizado para avaliação do fosfato solúvel pelo método verde malaquita adaptado de D'Angelo (2001). Neste método foram utilizados dois reagentes. O reagente 1 foi preparado a partir de 14.2 mmol L⁻¹ molibdato de amônio tetra hidratado em H₂SO₄ 3.1M. O reagente 2 foi preparado com 3.5 g L⁻¹ de uma solução aquosa de álcool polivinílico (PVA), por agitação com água desionizada a 80° C.

Depois de resfriado à temperatura ambiente, foi adicionado 0.35 g L⁻¹ de verde malaquita. Após o preparo dos reagentes, foi realizada a avaliação do P solúvel, para isso foram adicionados 180 µL de água MilliQ, 20 µL do sobrenadante e 40 µL do reagente 1 em microplaca de 96 poços de polietileno por 10 minutos com agitação de 900 rpm em agitador de microplacas (Heidolph Tiramax 100). Em seguida, foi adicionado 40 µL do reagente 2 em cada poço por 20 minutos com agitação de 900 rpm em agitador de microplacas (Heidolph Tiramax 100). A absorvância foi lida a 630 nm após os 20 minutos, usando um leitor de microplacas, e a concentração de P inorgânico dissolvido foi calculada a partir de uma curva

padrão com concentração: 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 $\mu\text{g mL}$ (D'Angelo et al., 2001). Para cada isolado, foram feitas três réplicas e, como controle, foi utilizado meio de cultura sem inóculo.

Avaliação da cooperação entre as células bacterianas para crescimento e solubilização de P

A avaliação sinérgica na solubilização foi realizada entre as bactérias do sistema convencional orgânico e convencional mais orgânico. Essa avaliação foi realizada com as bactérias sozinhas e em combinação com outra bactéria em meio líquido NBRIP, utilizando a mesma metodologia descrita para quantificação do fósforo em meio líquido. Porém, quando utilizadas em combinação, a inoculação de 1mL foi reduzida para 500 μL de cada bactéria para se manter o número de células aproximado (Malboobi et al., 2009).

A avaliação sinérgica do crescimento bacteriano foi realizada entre as bactérias do sistema convencional orgânico e convencional/orgânico. Essa avaliação foi realizada com as bactérias sozinhas e em pares em meio líquido NB, utilizando a mesma metodologia descrita para avaliação do crescimento bacteriano. Porém, quando utilizadas em combinação, a inoculação de 20 μL foi reduzida para 10 μL de cada bactéria para se manter o número de células aproximado (Malboobi et al., 2009).

Numa série de ensaios de cooperação, bactérias do cultivo convencional foram cultivadas isoladamente e em co-cultivo com outra bactéria do mesmo sistema de cultivo. O mesmo procedimento foi utilizado para bactérias do cultivo orgânico. A última série de ensaios de cooperação foi realizada com co-cultivo entre as bactérias do cultivo convencional e orgânico. Para que houvesse comportamento de cooperação em solubilizar fósforo, a solubilização final de P extracelular livre da

interação deveria ser maior do que a solubilização final de P extracelular livre dos isolados cultivados sozinhos. Quanto ao crescimento, a cooperação foi considerada positiva quando a densidade ótica (DO) da interação foi maior do que a DO dos isolados sozinhos.

Análise estatística dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram realizadas análises de variância e, quando cabível, o teste de médias. Para testar a normalidade, foi utilizado o teste de kolmogorov - smirnov ($p < 0,05$). Os dados coletados foram comparados por ANOVA ($p < 0,05$) seguido de Tukey ($p < 0,05$) para análise de significância quando comparado mais de duas médias e para comparativo de duas médias foi utilizado teste *t Student*.

3. RESULTADOS

Quantificação de P inorgânico extracelular

A quantidade de P inorgânico livre no meio de crescimento das BSFs dos dois sistemas de cultivo foi avaliada em meio líquido NBRIP. Todos os isolados do sistema convencional apresentaram capacidade de solubilizar o fosfato tricálcico em meio líquido. A quantidade de P liberado pelos isolados bacterianos do sistema convencional (*Enterobacter arogeneses* S18 C, *Enterobacter asburiae* OS-1 C1, *Enterobacter asburiae* OS-1 C2, *Burkholderia cepacia* Je39-7 C e *Enterobacter asburiae* OS-1 C3) variou de 109 µg/mL a 177 µg/mL (Figura 1A). A maior liberação de P no meio foi da *Burkholderia cepacia* Je39-7 C e a menor do *Enterobacter arogeneses* S18 C (Figura 1A). Em todas as amostras, houve uma redução no pH do meio de cultivo ao final de 24h de incubação, não havendo um efeito significativo do sistema de cultivo (Tabela 2).

Todas as bactérias do sistema orgânico (*Burkholderia cepacia* SAT-2 O, *Burkholderia cepacia* Je39-7 O, *Enterobacter asburiae* OS-1 O1, *Enterobacter asburiae* OS-1 O2, *Enterobacter asburiae* OS-1 O3 *Leclercia adecarboxylata* NS87 O e *Enterobacter asburiae* OS-1 O4) apresentaram capacidade de solubilizar o fosfato tricálcico em meio líquido. A quantidade de P liberado no meio variou de 11 µg/mL a 259 µg/mL (Figura 1B), a maior liberação de P foi observada no meio com *Enterobacter asburiae* OS-1 O4 e a menor liberação foi observada no meio com *Burkholderia cepacia* SAT-2 O (Figura 1B). Em todas as amostras do sistema orgânico, ocorreu redução no pH do meio cultura ao final de 24h de incubação (Tabela 2).

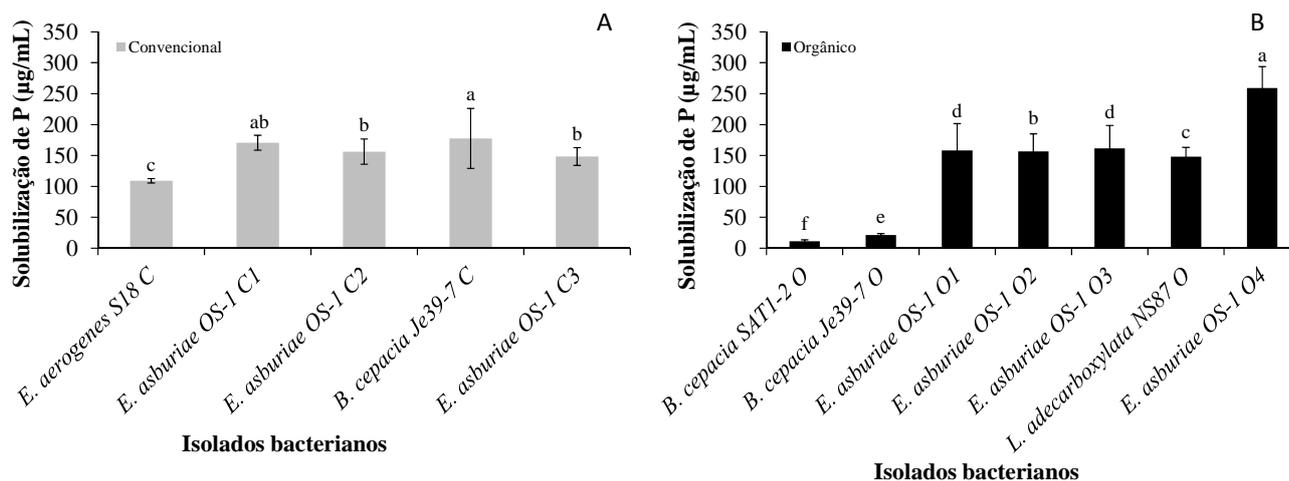


FIGURA 1. Quantificação de fosfato disponível em meio líquido NBRIP suplementado com fosfato tricálcico por bactérias solubilizadores do sistema de cultivo convencional (A) e sistema de cultivo orgânico (B)(n=3). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P < 0.05$).

Tabela 2. Alteração no pH extracelular após 24 horas de incubação dos isolados do sistema de cultivo convencional e orgânico (n=5).

Isolados	Sistema de Cultivo	pH Inicial	pH Final
<i>E. aerogenes</i> S18 C	Convencional	7,21	4,52 ± 0,02
<i>E. asburiae</i> OS-1 C1	Convencional	7,28	4,71 ± 0,01
<i>E. asburiae</i> OS-1 C2	Convencional	7,15	4,15± 0,05
<i>B. cepacia</i> Je39-7 C	Convencional	7,32	4,64± 0,07
<i>E. asburiae</i> OS-1 C3	Convencional	7,26	4,32± 0,02
<i>B. cepacia</i> SAT1-2 O	Orgânico	7,23	4,22 ± 0,03
<i>B. cepacia</i> Je39-7 O	Orgânico	7,14	4,54 ± 0,05
<i>E. asburiae</i> OS-1 O1	Orgânico	7,19	4,37 ± 0,08
<i>E. asburiae</i> OS-1 O2	Orgânico	7,30	4,78 ± 0,06
<i>E. asburiae</i> OS-1 O3	Orgânico	7,17	4,16 ± 0,02
<i>L. adecarboxylata</i> NS87 O	Orgânico	7,26	4,95 ± 0,03
<i>E. asburiae</i> OS-1 O4	Orgânico	7,31	4,64 ± 0,06

Avaliação da cooperação entre as células bacterianas na solubilização de P

Ao avaliar o grau de cooperação no crescimento celular bacteriano quando co-inoculadas, foi observado um sinergismo entre os isolados bacterianos, independente do sistema de cultivo (Figura 2A). Porém, quando avaliada a capacidade de cooperação entre bactérias isoladas do sistema convencional em solubilizar fosfato, constatou-se que bactérias desse sistema de cultivo não apresentaram cooperação que implica em alteração na taxa de solubilização de fosfato orgânico. Por outro lado, quando co-inoculadas as bactérias isoladas do sistema orgânico e na co-inoculação de bactérias do sistemas de cultivo convencional e orgânico, apresentaram um perfil de cooperação fisiológica que resultou em um incremento significativo na acumulação de fósforo inorgânico extracelular (Figura 2B). Isto sugere que a interação social entre as bactérias do sistema orgânico e entre os dois sistemas cooperam para maximizar a solubilização de P extracelular. Em relação ao possível aumento na solubilização de P_i por número de células, não foram observados casos positivos entre os isolados do sistema de cultivo convencional, porém alguns casos positivos foram observados entre os isolados do sistema de cultivo orgânico e os isolados co-inoculados dos dois sistemas de cultivo.

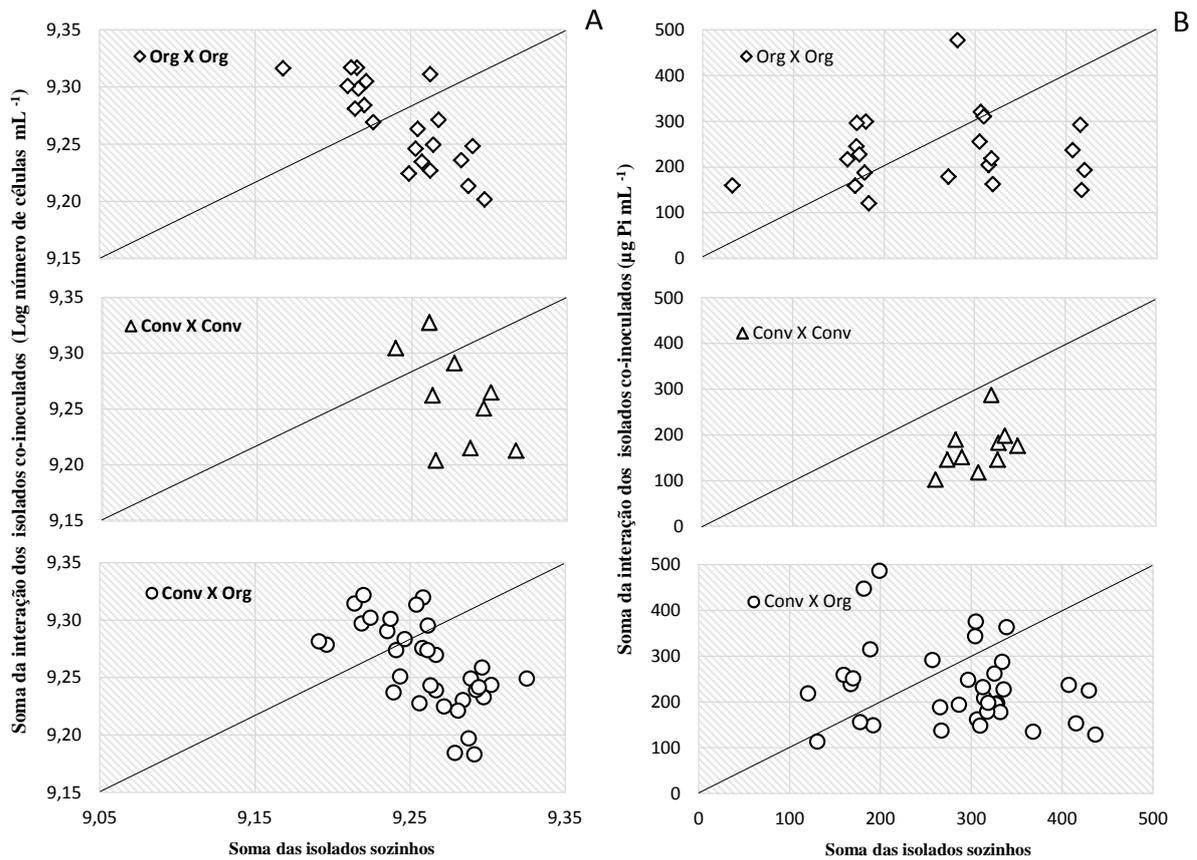


FIGURA 2. Interações pareadas de crescimento entre bactérias isoladas dos sistemas cultivo orgânico; convencional e orgânico vs convencional, em meio líquido Nutrient Broth (A). Interações pareadas entre bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas dos sistemas orgânico; convencional e orgânico vs convencional, em meio líquido NBRIP suplementado com fosfato tricálcico (B).

4. DISCUSSÃO

Todos os isolados avaliados no presente trabalho apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato de uma fonte insolúvel, tornando-o livre no meio para que possa ser utilizado por eles e pelas plantas uma vez que, esses microrganismos foram isolados da rizosfera de *C. papaya*.

O mecanismo utilizado por esses microrganismos para solubilizar fosfato pode estar relacionado com a produção de ácidos orgânicos. Embora não exista uma correlação positiva entre acidificação do meio e quantidade P inorgânico extracelular por cada BSFs estudada, observou-se, tal como outros autores, um decréscimo no pH final (Jorqueira et al., 2008; Alikhani et al., 2006 e Yu et al., 2011). Sendo assim, acredita-se que o principal mecanismo de liberação de fósforo de fontes insolúveis por microrganismos do solo seja atribuído, principalmente, à produção de ácidos orgânicos (Vyas & Gutali, 2009). Este mecanismo ocorre através dos grupos carboxílicos dos ácidos orgânicos, os quais quelam cátions (principalmente Ca_2^+) ligados ao fosfato, convertendo-os em formas solúveis com consequente liberação de íons protons e acidificação do meio (Vyas & Gutali, 2009; Castagno et al., 2011). Desta forma, a partir dos resultados do presente estudo, especula-se que a liberação de P inorgânico pelas BSFs estudadas possa envolver a produção de ácidos orgânicos.

Ecologicamente, o estado de cooperação entre microrganismos do solo acontece de forma natural (Mitri & Foster, 2013). A cooperação é também uma forma de interação social entre espécies de bactérias que pode ter múltiplos efeitos no crescimento celular e fisiologia. Os resultados do presente estudo evidenciam que o sistema de cultivo pode modificar a interação social entre as espécies de BSF que pode ter implicações ao nível de funcionalidade no ecossistema. Isto é comprovado pelo fato de que, quando duas BSFs, isoladas da rizosfera de plantas de *C. Papaya*

sob cultivo convencional, são co-cultivadas, nenhum incremento na solubilização de fosfato foi observado. Esta ausência de interação sinérgica entre as BSFs do sistema convencional pode estar relacionada ao fato da estabilidade ecológica e inexistência de competição por nutrientes pelas espécies bacterianas (Mitri & Foster, 2013), dado que o input de nutrientes nesses ambientes é elevado, e no caso do P está predominantemente livre e em concentrações adequadas.

Por outro lado, no co-cultivo de BSFs, isoladas da rizosfera de plantas com cultivo orgânico, observou-se que as espécies de BSFs apresentavam um estado de cooperação que refletiu na ativação da atividade de solubilização de fosfato se comparada quando foram cultivadas isoladamente. Estes mesmos resultados foram evidenciados por Foster & Bell (2011). Similarmente, o co-cultivo de BSFs oriundas do sistema convencional e do orgânico apresentaram o mesmo comportamento sinérgico na solubilização de fosfato. Resultados semelhantes foram encontrados por Malboobi et al. (2009), analisando bactérias isoladas da rizosfera de batata, onde casos sinérgicos entre seus isolados foram observados. Segundo Nahas (1996), existe uma dependência da solubilização de fosfato em relação ao tipo de ácido secretado pela espécie de BSF, assim, o efeito sinérgico permitiria uma complementação metabólica que refletirá no incremento da atividade de solubilização.

5. CONCLUSÃO

Os isolados estudados no presente trabalho, mostraram capacidade de solubilizar fofato orgânico. Os isolados do sistema de cultivo orgânico foram mais eficientes em liberar o fofato para o meio quando comparadas com os isolados do sistema de cultivo orgânico.

A cooperação no crescimento celular bacteriano não foi influenciada pelo sistema de manejo empregado. Porém, a cooperação em relação a solubilização de fofato foi influenciada pelo sistema de cultivo, uma vez que, bactérias do sistema de cultivo convencional quando co-inoculadas não apresentaram nenhum caso de cooperação, ou seja, não aumentaram a quantidade de P. Já as bactérias do sistema de cultivo orgânico quando co-inoculadas apresentaram um incremento significativo na solubilização de P e o mesmo comportamento foi observado quando os isolados do sistema de cultivo orgânico foram co-inoculados com os isolados do sistema de cultivo convencional.

6. REFERENCIAS

- Ahemad M, Khan MS. (2010). Plant growth promoting activities of phosphatesolubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by Fungicides. *EurAsian Journal of BioSciences* 4: 88-95
- Ahemad M, Kibret M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26:1-20.
- Ahmed N, Shahab S. (2009). Phosphate solubilization: their mechanism genetics and application. *The Internet Journal of Microbiology* 9:1-7.
- Alikhani HA, Saleh-Rastin N, Antoun H. (2006). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil* 287:35–41
- Araújo ASF, Leite LFC, Santos VB, Carneiro RFV. (2009). Soil Microbial Activity in Conventional and Organic Agricultural. *Systems.Sustainability*1: 268-276.
- Babalola OO. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters* 32: 1559-1570.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*56: 1761-1778.
- Berraqueiro FR, Baya AM, Cormenzana AR. (1976). Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *ARS Farmacéutica*17: 399-406.
- Bulluck LR, Brosius M, Evanylo GK, Ristaino JB. (2002). Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Applied Soil Ecology* 19:147–160.
- CastagnoLN, EstrellaMJ, SannazzaroAI, Grassano AE, Ruiz AO. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology* 110: 1151–1165
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33–41

- Dawwam GE, Elbeltagy A, Emara HM, Abbas IH, Hassan MM. (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science* 58:195–201.
- Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Procedimento para coleta de amostra de solos. Ministério de agricultura pecuária e desenvolvimento, EMBRAPA Agrobiologia. 2005. Disponível em: http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/analise_solos_coleta.html. Acesso em 15 de Outubro de 2012.
- Estrada GA, Baldani VLD, Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake
- D'Angelo E, Crutchfield J, Vandiviere M. (2001). Rapid, sensitive, microscale determination of phosphate in water and soil. *J. Environ. Qual.* 30, 2206–2209.
- FAO. Food and agriculture organization. FAO. FAOSTAT. Disponível: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>. Acesso em: 30 de março de 2014.
- Foster KR, Bell T. (2012). Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Current Biology* 22: 1845–1850.
- Girvan MS, Bullimore J, Pretty JN, Osborn MA, Ball AS. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1800-1809.
- Grantina L, Kenigvalde K, Eze D, Petrina Z, Skrabule I, Rostoks N, Nikolajeva V. (2011). Impact of six-year-long organic cropping on soil microorganisms and crop disease suppressiveness. *Žemdirbystė Agriculture* 98, 399–408.
- Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T, Borriss R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097–2109.
- Jorquera MA, Hernández MT, Rengel Z, Marschner P, Mora ML. (2008) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-

- solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol Fertil Soils* 44: 1025–1034.
- Liu B, Tu C, Hu S, Gumpertz M, Ristaino JB. (2007). Effect of organic, sustainable, and conventional management strategies in grower fields on soil physical, chemical, and biological factors and the incidence of Southern blight. *Applied Soil Ecology* 37: 202–214.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Hari K, Saravanan VS, Sa T. (2006) Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Pestic. Biochem Physiol* 84: 143–154
- Mahdi SS, Hassan GI, Samoon SA, Rather HA, Dar SA, Zehra B. (2010). bio-fertilizers IN organic agriculture. *Journal of Phytology* 10: 42-54.
- Malboobi MA, Behbahani M, Madani H, Owlia P, Deljou A, Yakhchali B, Moradi M, Hassanabadi H. (2009). Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World J Microbiol Biotechnol* 25, 1479– 1484.
- Martins APL, Reissmann CB. (2007). Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químicoanalíticos. *Scientia Agraria* 8: 1-17
- Mendonça V, Pedrosa C, Feldberg NP, Abreu NAA, Brito APF, Ramos JD. (2006) Doses of nitrogen and simple superphosphate on papaya Formosa plant growth. *Ciênc.agrotec., Lavras, v. 30:1065-1070.*
- Mitri S, Foster KR. (2013). The genotypic view of social interactions in microbial Communities. *Annu. Rev. Gene .* 47:247–73
- Nautiyal CS. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265- 270.
- Nahas E. (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 12:567-572.
- Naher UA, Othman R, Panhwar QA. (2013). Culturable total and beneficial microbial occurrences in long-term nutrient deficit wetland rice soil. *Australian Journal of Crop Science* 7:1848-1853.

- Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Guimarães CT, Schaffert RE, Sá NMH. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1782–1787.
- Richardson AE, Simpson RJ.(2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology* 156: 989–996.
- Rodríguez H , Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.*Biotechnology Advances* 17: 319–339.
- Sarruge JR, Haag HP. (1974). Análise química em plantas. Piracicaba, ESALQ, p56.
- Singh P, Kumar V, Agrawal S. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International Journal of Microbiology* (2014) <http://dx.doi.org/10.1155/2014/426483>.
- Shannon D, Sen AM, Johnson DB. (2002). A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. *Soil Use and Management* 18: 274-283.
- Trindade AV, Siqueira JO, Stürmer SL. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi in papaya plantations of espírito santo and bahia, brazil.*Brazilian Journal of Microbiology* 37:283-289.
- Unno Y, Okubo K, Wasaki J, Shinano T, Osaki M. (2005). Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environmental Microbiology* 7: 396-404.
- Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. (2011). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol Fertil Soils* 47:437–446.
- Vyas P, Gulati A. (2009). Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology* 9:1-15.

CAPÍTULO II

Efeito do sistema de cultivo de *Carica papaya* L. sobre a eficiência de solubilização de fosfato, fixação de N, atividade antifúngica, produção de auxina e sideróforos por rizobactérias promotoras do crescimento nativas

MELO, Juliana. Universidade Vila Velha - ES, 17 de Dezembro de 2014. **Efeito do sistema de cultivo de *Carica papaya* L. sobre a eficiência de solubilização de fosfato, atividade antifúngica, produção de auxina e sideróforos por rizobactérias promotoras do crescimento nativas.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

RESUMO

As rizobactérias promotoras do crescimento (RPCPs) são conhecidas por influenciar o crescimento das plantas via produção de fitormônios, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio (N) e atividade antimicrobiana pela produção de sideróforos e antibióticos. Esses mecanismos desenvolvidos pelas RPCPs têm motivado pesquisas para sua utilização em bioinoculantes comerciais que aumentem a produtividade agrícola com máxima intensificação sustentável. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo caracterizar morfológica e bioquimicamente estirpes de solubilizadoras de fosfato e, partindo desta caracterização, avaliar seu potencial como RPCPs de *Carica papaya* L. sob dois sistemas de manejo, convencional e orgânico, avaliando a sua capacidade em fixar nitrogênio atmosférico, produzir auxina (AIA) e sideróforos, e também em inibir crescimento de fungos fitopatogênicos. Os resultados revelaram que as 12 estirpes isoladas de solos rizosférico de *C. papaya*, nos dois sistemas de manejo, pertencem aos gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Leclercia*. A fixação de N foi observada nas estirpes *B. cepacia* Je39-7 C do cultivo convencional e *B. cepacia*SAT1-2 O, *B. cepacia*Je39-7 O e *L. adecarboxylata* NS87 O do cultivo orgânico. Com exceção da *L. adecarboxylata* NS87 O, as *B. cepacia* Je39-7 e SAT1-2 O, *E. asburiae* OS-1e *E. aerogenes* S18 C apresentaram atividade antifúngica. As estirpes *B. cepacia*Je39-7 Ce *E. aerogenes* S18 C isoladas do cultivo convencional, e *E. asburiae* OS-1 e *B.*

*cepacia*Je39-7 O, do cultivo orgânico, apresentaram eficiência em solubilizar fosfato, produzir fitormônios, sideróforos e inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Isso indica que essas estirpes são promissoras e a aplicação em testes de bioinoculantes para maximização da produção de culturas tropicais de importância econômica.

Palavras-chave: RPCPs, fixação de nitrogênio, rizosfera, fitopatógenos

1. INTRODUÇÃO

A agricultura atual vem enfrentando um grande desafio em produzir alimentos suficientes para uma crescente população mundial (Avis et al. 2008; Godfray et al. 2010). Porém, para manter essa produtividade, são utilizados grandes quantidades de insumos sintéticos que causam impactos no ambiente, afetando assim, a comunidade de microrganismos que prestam importantes serviços ambientais à agricultura (Avis et al. 2008; Srinivas et al. 2008; Ahemad & Khan, 2010).

Dentre estes microrganismos estão as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) que desempenham papel crucial no crescimento e nutrição vegetal e, ainda, têm aplicabilidade biotecnológica como constituinte de biofertilizantes (Chiarini et al. 1998). As RPCPs formam um grupo heterogêneo incluindo espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium* (Rodríguez & Fraga 1999; Ahmad et al. 2008).

Os mecanismos pelos quais as RPCPs podem exercer efeitos positivos no crescimento das plantas, podem ser diretos ou indiretos. A síntese de substâncias ou modulação a nível enzimático que facilitam a absorção de certos nutrientes, como a solubilização dos fosfatos minerais, porém grande parte desses fosfatos presentes no solo encontram-se indisponíveis para as plantas. Desse modo, a utilização de micro-organismos com capacidade de solubilizar fosfato vem se tornando cada vez mais importante (Peix et al. 2003; Malboobi et al. 2009; Richardson & Simpson, 2011; Estrada et al., 2013). Fixação biológica de nitrogênio (Jackson et al. 2008; Richardson et al. 2009), síntese de hormônios vegetais, tais como os fitohormônios ácido giberélico, citocininas, etileno e ácido indol acético, fazem parte dos mecanismos diretos das PGPRs. Os mecanismos indiretos ocorrem quando RPCPs diminuem ou previnem os efeitos deletérios de um ou mais microrganismos

fitopatogênicos, seja pela produção de antibióticos (Bevivino et al. 1998; Rodríguez & Fraga 1999; Bevivino et al. 2000), ou pela produção de sideróforos (Ahmad et al. 2008). Os sideróforos produzidos pelas PGPRs tem uma alta afinidade com o Ferro III da rizosfera, conseqüentemente, retêm grande parte do ferro disponível aos fungos fitopatogênicos, impedindo, assim, a sua proliferação (Laslo et al., 2012; Santos-Villalobos, 2012).

Estes efeitos benéficos às plantas conferidos pelas RPCPs, por vezes, podem ser instáveis e altamente influenciados por condições ambientais e pela interação com as comunidades microbianas do solo, como consequência, resultados obtidos em condições *in vitro*, nem sempre podem ser reproduzidos em condições de campo (Ahmad et al. 2008; Babalola 2010). Para isso, recomenda-se que isolados candidatos a bioinoculantes sejam selecionados a partir de populações de RPCP nativas. E, assim, testar a capacidade deles em estimular o crescimento vegetal em microescala, posteriormente, testá-los em condições de campo para diferentes cultivares (Ahmad et al. 2008; Bashan et al. 2014).

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América Tropical, é considerado como uma das frutas mais consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o Brasil, um dos principais produtores mundiais (FAO 2014). Por ser uma planta de crescimento rápido e contínuo, com floração e frutificação concomitantes e ininterruptas, necessita de suprimento de água e nutrientes constantes em todo o ciclo (Trindade et al. 2006; Mendonça et al. 2006).

Considerando a importância das RPCPs no crescimento das plantas, redução do uso de fertilizantes e sustentabilidade dos agroecossistemas, a hipótese deste trabalho é que o sistema de manejo do solo influencia a comunidade microbiana e os mecanismos bacterianos envolvidos na promoção do crescimento vegetal. Assim,

o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológicamente e bioquimicamente estirpes de solubilizadoras de fosfato e, partindo desta caracterização, avaliar seu potencial como RPCPs cultiváveis de solo rizosférico de plantas de *C. papaya* sob dois sistemas de manejo do solo, convencional e orgânico, avaliando a capacidade dessas produzirem AIA e sideróforos, fixarem nitrogênio e inibirem crescimento de fungos fitopatogênicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área amostral e análise química do solo rizosférico

O estudo foi realizado em uma área de cultivo de *Carica papaya* L., cultivar Golden, em dois sistemas de cultivo (convencional e orgânico), no município de Sooretama no estado do Espírito Santo (ES, Brasil), em Outubro de 2012. A área de estudo escolhida possui certificações de qualidade, em 2004 obteve o Certificado “EUREPGAP Protocol for Fresh Fruits and Vegetable”, e em 2009 o certificado orgânico IBD.

A temperatura e a precipitação média anual são de 22° e 700-800 mm, respectivamente. As áreas experimentais apresentam topografia plana, solo profundo, classificado como Argissolo Amarelo Distrófico típico A moderado, textura arenosa/média.

O plantio das mudas foi realizado em covas de dimensões 40 x 40 x 40 cm, correspondente a um volume de 64 L, espaçadas em 3,0 x 2,0 m em sistema de fileiras simples, resultando em 1.666 plantas ha⁻¹. E adubação realizada na cova de cada planta.

O sistema de cultivo convencional (19°12'22.9"S 40°05'52.0"W), originalmente sob vegetação natural até 1994, passou a ser cultivado por culturas café conillon convencional. Em 2004, iniciou-se o cultivo convencional das plantas de *C. papaya* com a utilização de químicos industriais para fertilização do solo e defensivos químicos no controle de pragas. A irrigação foi realizada por meio de microaspersão.

O sistema de cultivo orgânico (19°14'13.40"S 40° 4'38.73"W), também originalmente sob vegetação natural até 1994, passou a ser cultivado também por culturas café conillon convencional, porém essa cultura foi abandonada em 1999. No ano 2000, essas plantas foram retiradas e o solo ficou em repouso de 2000 a 2004, coberto por gramíneas. Em 2005, iniciou-se o plantio de *C. papaya* Adubação via

solo mensal e com fertilizante líquido com a mesma formulação Turbofil complexo nutritivo de aminoácidos produzido na propriedade e utilizada após 40 dias. Para o controle de pragas, são utilizados enxofre em pó para controle de ácaro branco e água de manipueira (mandioca) semanal como repelente para outras pragas. A irrigação também foi realizada por meio de microaspersão.

As amostras de solo rizosférico foram coletadas de 0 a 20 cm de profundidade, seguindo os procedimentos para coleta de amostra de solo (EMBRAPA, 2005). Foram delimitadas parcelas contendo 6 plantas espaçadas de 20 m entre si. No entorno de cada planta, foram coletadas 4 subamostras de solo próximas à raiz, a 8 cm do colo da planta, tendo, assim, uma amostragem composta do solo com 3 réplicas para cada sistema de cultivo.

As amostras de solo dos sistemas de cultivo convencional e orgânico foram coletadas e colocadas em sacos plásticos devidamente identificados, posteriormente foram acondicionadas em caixa de isopor para transporte até o laboratório de microbiologia ambiental e biotecnologia, onde foram realizadas análises microbiológicas com amostras ainda frescas.

Para a análise química, parte das amostras do solo foi seca em estufa de circulação forçada de ar a 60-70°C, por um período de 24 horas. Após secagem, as amostras foram moídas, peneiradas em peneiras de 2 mm e acondicionadas em recipientes de plástico hermético para posteriores análises químicas. Nas amostras foram dosados os macros e micronutrientes incluindo, também, alumínio e sódio, seguindo os procedimentos de Sarruge & Haag (1974). Após a digestão via seca, em mufla a 500°C e solubilização em HCl 3M (Martins & Reissmann, 2007), os minerais foram identificados, sendo que o P foi determinado por colorimetria com vanadato-molibdato de amônio, K, Al e Na, por fotometria de chama, e Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, B, e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção

atômica. As características químicas do solo da área experimental estão apresentadas na (Tabela 1).

TABELA 1. Propriedades químicas do solo rizosférico de *Carica papaya* L. sob o sistema de cultivo convencional e orgânico.

Caracterização do solo	Sistemas de Cultivo	
	Convencional	Orgânico
pH	5,5	6,6
P (mg/dm ³)	355,3	382,7
K (mg/dm ³)	189	116
Ca (cmolc/dm ³)	4,4	4,4
Mg (cmolc/dm ³)	0,6	0,9
Al (cmolc/dm ³)	0	0
H+Al (cmolc/dm ³)	2,3	0,8
Na (cmolc/dm ³)	0,1	0,2
C (%)	1,4	1,3
MO (g/dm ³)	23,3	22,4
S.B. (cmolc/dm ³)	5,6	5,7
T (cmolc/dm ³)	7,9	6,5
t (cmolc/dm ³)	5,6	5,7
m (%)	0	0
V (%)	70,7	87,3
Fe (mg/dm ³)	26,8	21,3
Cu (mg/dm ³)	2,8	8,6
Zn (mg/dm ³)	22,6	14
Mn (mg/dm ³)	10	23
S (mg/dm ³)	127,5	35,3
B (mg/dm ³)	0,9	1,4

Isolamento de bactérias totais

As bactérias totais dos dois sistemas de cultivo foram isoladas a partir da técnica de diluição seriada em uma suspensão homogênea de 10 g de solo em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%), sob agitação de 250 rpm, por 30 minutos, a 25°C. Foram realizadas diluições de 10⁻² a 10⁻⁶ que foram plaqueadas em meio sólido Agar Nutriente. Sendo posteriormente incubadas por 5 dias, a 28°C. Os dados foram expressos em número de unidades formadoras de colônias (UFCs) / g de solo seco (Grantina et al., 2011).

Isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato

As estirpes foram isoladas a partir da técnica de diluição seriada em uma suspensão homogênea de 10 g de solo em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85 %), sob agitação de 250 rpm, por 30 minutos a 25°C. Foram realizadas diluições de 10^{-2} a 10^{-6} que foram plaqueadas em meio sólido National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP) (Nautiyal et al. 1999), contendo 10 g de glicose; 5g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5% de ágar e pH 7,0 para volume de 1L. As bactérias foram incubadas por 15 dias, a 28°C. Após o período de incubação, as bactérias que apresentaram um halo claro ao redor da colônia foram consideradas capazes de solubilizar o fosfato tricálcico. Os dados foram expressos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama (g) de solo seco. Essas estirpes foram repicadas para novas placas contendo meio sólido NBRIP, após a segunda passagem os isolados foram armazenados no meio de cultura DYGS, contendo 2g de glicose; 1,5g de Peptona; 2g de extrato de levedura; 0,5g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; para 1L, pH 6,8 depois foram estocados em glicerol 50 % a -80°C.

Caracterização molecular dos isolados

Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando o kit KIAamp (QIAGEN), de acordo com a instrução do fabricante. O DNA extraído foi visualizado através de gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídeo e quantificado utilizando Nanodrop 3000 (Thermo Scientific, USA).

PCR do gene 16 rDNA e precipitação dos produtos amplificados

O DNA genômico de cada isolado bacteriano foi utilizado como molde para amplificação da região do gene 16S rDNA através de PCR. Esta região foi

amplificada utilizado oligonucleotídeos iniciadores 27 (5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3') e 1492R (5'-ACGG(CT)TACCTTGTTACGAC TT-3'). As reações tiveram 2 µL de dNTP (20 mM de cada), 2,5 µL de 10 x tampão de enzima, 0,75 µL de 50 mM de MgCl₂, 2,5 µL de cada iniciador (5 mM), 0,3 µL de *Taq* Polimerase (5 U/ µL) e 50 ng de DNA, o volume final foi completado para 25 µL com água ultra-pura estéril. A reação de amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti-96 well (Applied Biosystems), utilizando o programa: 94°C por 3 min, 30 ciclos de amplificação (94°C por 1 min, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s) 72°C por 10 min. Após a amplificação, foram retirados 5 µL do produto de PCR para avaliação por eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídeo. O tamanho do fragmento esperado foi de, aproximadamente, 1.500 pares de base. Para tanto, foi utilizado um padrão de peso molecular de 1 Kb. O restante dos produtos amplificados (20 µL) foram precipitados pela adição de 60 µL de isopropanol 100% (MERCK) e 20 µL de água ultra-pura estéril. Os tubos foram homogenizados e incubados por 2 horas a -20°C. Em seguida, o material foi centrifugado a (1.400 rpm) por 25 min e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento, foram adicionados 200 µL de etanol 70% (MERCK) e centrifugados a (14.000 rpm) por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco a 40°C, por 10min, e, posteriormente, ressuspensão em 25 µL de água ultra-pura estéril.

Sequenciamento do gene 16S rDNA

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism versão 3 (Life Technologies, USA), seguindo as recomendações do fabricante do equipamento termociclador. Cada reação de sequenciamento teve um volume final de 10 µL, utilizando 20 ng dos fragmentos de interesse; 3,2 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores rD1 ou

fD1; 2,0 mL de tampão 2,5x e 0,5 mL dos terminadores Big Dye. As condições de reação foram: 94°C por 4 min, 25 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 30 s, 60°C por 4 min). Em seguida, as amostras foram analisadas em sequenciador automático Beckman Coulter (Seq 2000). Foi utilizado o programa BLAST contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal W 1.8 (Thompson et al., 1994). Posteriormente, as extremidades das sequências de DNA foram ajustadas com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 2001), de forma que todas apresentassem o mesmo número de bases, completamente alinhadas.

Fixação de Nitrogênio

Para avaliação da fixação de nitrogênio pelas estirpes, foi realizado um ensaio de atividade da nitrogenase baseado na formação de película aerotóxica em meio JNFB (Döbereiner et al. 1995) semi-sólido (isento de N). Para tanto, inicialmente as bactérias foram cultivadas em meio DYGS líquido. Posteriormente, as estirpes foram lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) (Döbereiner et al., 1995). Em seguida, 20 µL da cultura foi inoculada em triplicatas em frascos de 10 mL contendo 5 mL de meio NFb semi-sólido e mantidos por 7 dias a 30 °C. Após este período, foi observada a presença de uma película característica de bactérias diazotróficas no meio de cultura. Como controle positivo, foi utilizada uma bactéria selvagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 cedida gentilmente pelo professor Fábio Lopes Olivares da Universidade Federal Norte Fluminense (UENF).

Avaliação da resistência a antibióticos pelos isolados bacterianos

Para o teste de resistência a antibióticos foram utilizados seis antibióticos, a saber: clorofenicol, ampicilina, metaciclina, eritromicina, canamicina e tetraciclina na concentração de 1000 µg/mL. Os isolados foram inoculados em meio Agar Nutriente (AN) a 28°C por 24 h. Após crescimento, com auxílio de um swab, esses isolados foram transferidos para uma nova placa contendo AN e foram adicionados discos com 7 µL de cada antibiótico. Essas placas foram incubadas a 28°C por 24 horas, depois desse período os isolados foram classificados como resistentes ou susceptíveis de acordo com halo formado ao redor do disco (Tawiah et al. 2012).

Produção de Sideróforos

O ensaio para avaliação da produção de sideróforos pelos isolados bacterianos foram realizados pelo método de cromo azurol S (CAS), descrito por Schwyn and Neilands (1987), com algumas modificações. A produção de sideróforos foi realizada através do meio líquido de tripticaseína de soja (TSL) diluído 1/10, em 1 litro de água destilada. A solução indicadora de cromo azurol S (CAS) foi feita da seguinte forma: em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 6 mL de HDTMA 10mM em um pouco de água destilada. Adicionou-se, lentamente, sob agitação, 1,5 mL de solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1M e HCL 0,01N) e 7,5 mL de uma solução aquosa de cromo azurol S 2mM. Dissolveu-se, separadamente, 4,307g de piperazina anidra em, aproximadamente, 20 mL de água destilada e adicionou-se 6,25 mL de HCl concentrado. Essa solução tampão (pH 6,5) foi transferida para o balão volumétrico e o volume completado para 100 mL com água destilada. As bactérias foram cultivadas em erlenmayer de 50 mL contendo 10 ml 1/10 de meio TSL. Posteriormente, foram incubadas a 28°C, a 160 rpm por 24 h. Em seguida foi retirado, assepticamente, 2 mL do inóculo e centrifugado a 12.000g por 10 min. Após a centrifugação, transferiu-se 1 mL para tubos de ensaios e adicionou-se 1mL da solução CAS. Os isolados bacterianos que converteram a cor azul do regente CAS

para amarelo em 15 minutos foram considerados produtores de sideróforos (Louden et al., 2011). Esta avaliação foi realizada através de método qualitativo, ou seja, detectou-se apenas a presença ou ausência da produção.

Produção de ácido indol acético (AIA)

A avaliação da produção de AIA foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Gordon & Weber (1951), com algumas modificações. As bactérias foram crescidas em 10 ml de caldo nutritivo, a 28°C por 24 h, em agitação constante (160) rpm. Em seguida, esse pré inóculo foi transferido para 50 mL do mesmo meio suplementado com 2 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano, mantido nas mesmas condições. Após intervalos de mais ou menos 2 horas por um período de 96 horas, foram retiradas assepticamente 3 mL de meio de cultura, sendo 1 mL para determinar a Densidade Óptica (DO) (600 nm) e 2 mL para se determinar a produção de AIA. Para a determinação de AIA, as amostras recolhidas foram centrifugadas por 10 min, a 10.000 xg. Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubo de ensaio de 10 mL, sendo adicionados 2 mL do reagente de Salkowisk ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2% e HCl_3 37%). Em seguida, os tubos foram mantidos no escuro por 30 min a 28°C. A presença da produção do hormônio foi visualizada pela cor rosada e a quantificação foi realizada através da leitura a 530 nm em espectrofotômetro. Para cada estirpe avaliada, foram utilizadas 3 réplicas. Como controle, foi utilizado apenas o meio de cultura. Foi utilizado uma reta padrão com ácido indol acético (Sigma) para a estimativa de produção deste hormônio. As concentrações utilizadas na curva padrão foram: 0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Avaliação da capacidade de solubilização de diferentes fontes de fosfato

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto a sua habilidade de solubilizar diferentes fontes de fosfato em meio NBRIP sólido, suplementado com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g L⁻¹; ácido fítico 1,6 g L⁻¹; FePO_4 e 5 g L⁻¹ AlPO_4 .

As placas contendo as diferentes fontes de fosfato foram inoculadas com cada isolado bacteriano, por meio de quatro picadas equidistantes na superfície do meio. E, posteriormente, incubadas a 28°C por 15 dias. Após 15 dias de incubação, foi determinada a capacidade dos isolados de solubilizar cada uma das fontes de fósforo testadas, observando-se a presença de halos de solubilização em torno das colônias. O índice de solubilização (IS) foi calculado por meio da razão entre diâmetro do halo e diâmetro da colônia (Berraqueiro et al., 1976): $\text{IS} = \text{Diâmetro do halo} / \text{Diâmetro da colônia}$.

Efeito antifúngico

Para a avaliação do efeito antifúngico realizou-se testes de interação entre as culturas bacterianas e diferentes espécies de fungos fitopatogênicos. Foram utilizados seis fungos fitopatogênicos: *Botrytis cinerea*, *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Fusarium culmorum*, *Geotrichum candidum*.

Uma vez que as bactérias e os fungos têm taxas de crescimento distintas, esse teste iniciou-se pelo cálculo da taxa de crescimento dos fungos em meio YEPGA (10g peptona, 10g extrato de levedura, 50 g glucose; 15 g ágar) e, em função dessa taxa, foi determinado o tempo de incubação das bactérias. O meio de cultura (YEPGA) foi escolhido por permitir o crescimento tanto de bactérias quanto de fungos. Ao longo de quatro dias, foram feitas medições do diâmetro da colônia de cada fungo, com duas medições perpendiculares (Broadbent et al. 1971). A partir das medições, calculou-se a expansão do micélio baseado na equação linear da reta (diâmetro = expansão do micélio x tempo + ordenada na origem), visto que os fungos filamentosos têm crescimento linear quando crescem à superfície de uma

placa de petri em condições nutritivas saturantes. Após dois dias de crescimento dos fungos, foi feita a inoculação das bactérias, com exceção de *B. cinerea* que apresentou uma expansão mais lenta, por essa razão as bactérias foram inoculadas ao fim de sete dias. As placas de petri foram divididas em 6, cada um dos fungos foram inoculados no centro da caixa e cada uma das divisões foi inoculada com diferentes estirpes bacterianas. Assumiu-se como controle um setor sem inoculação de bactéria, para cada isolado foram utilizadas três réplicas. Após incubação, mediu-se o crescimento dos fungos, fotografou-se e fez-se análise de imagem utilizando o programa *imagej 1.47*. Esta análise permitiu medir a inibição, ou seja, o efeito da presença das bactérias na diminuição da expansão de cada micélio em comparação com o controle. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da interação entre bactérias – fungos relativo ao crescimento do fungo na ausência de bactérias: $(\text{Crescimento Radial do fungo em interação com a bactéria} / \text{Crescimento Radial do controle} \times 100)$.

Análise estatística dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram realizadas análises de variância e, quando cabível, o teste de médias. Para testar a normalidade, foi utilizado o teste de kolmogorov - smirnov ($p < 0,05$). Os dados coletados foram comparados por ANOVA ($p < 0,05$) seguido de Tukey ($p < 0,05$) para análise de significância, quando comparado mais de duas médias, e para comparativo de duas médias foi utilizado teste *t Student*.

3. RESULTADOS

Isolamento de bactérias totais e Bactérias solubilizadoras de fosfato

O isolamento de bactérias totais cultiváveis isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L. não foi influenciado pelos sistemas de cultivo, tanto o sistema de cultivo convencional quanto o orgânico apresentaram CFU's g soil⁻¹ semelhantes (p= 0,83) (Figura 1A). Por outro lado, a população de BSP da rizosfera de *Carica papaya* L do sistema orgânico foi significativamente superior ao do sistema convencional (p=0,02) (Figura 1B).

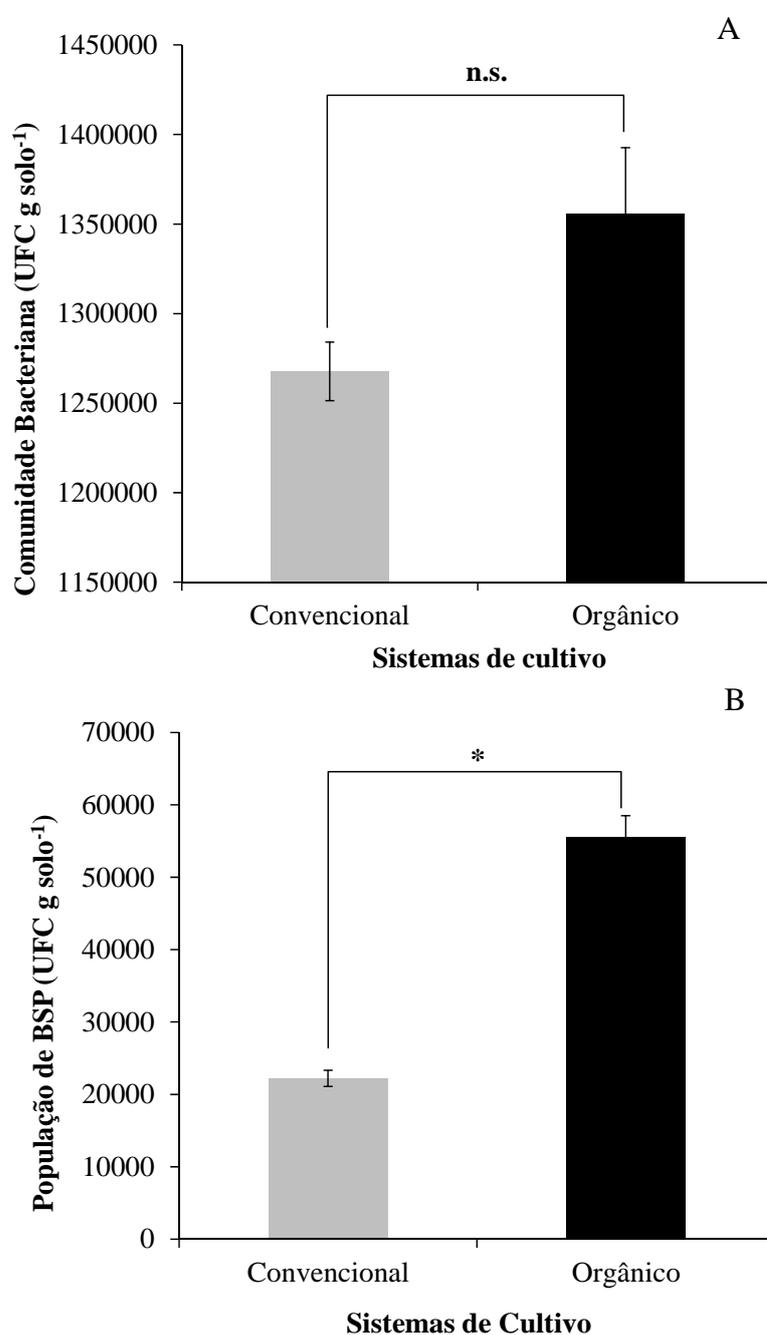


FIGURA 1. Densidade bacteriana total (A). (B) Densidade de bactérias solubilizadoras de fosfato tricálcio na rizosfera de raízes de plantas de *Carica papaya* L. cultivadas no sistema convencional ou orgânico (n=3). *médias estatisticamente diferentes pelo Teste *t* de Student ($P < 0.05$). n.s. diferença não-significativa.

Identificação bacteriana utilizando o sequenciamento de gene 16S rRNA

A partir do isolamento prévio da população de PSB em meio NBRIP e com base na sequência de 16S rRNA, posteriormente foi possível identificar as 12 bactérias com capacidade de solubilizar fosfato orgânico nos dois sistemas de cultivo (convencional e orgânico). No sistema de cultivo convencional, foi possível identificar cinco bactérias pertencentes a dois gêneros (*Burkholderia* e *Enterobacter*) e três espécies (*Enterobacter aerogeneses*, *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter asburiae*). No sistema de cultivo orgânico, foi possível identificar sete bactérias pertencentes a três gêneros (*Burkholderia*, *Enterobacter* e *Leclercia*) e três espécies (*Burkholderia cepacia*, *Enterobacter asburiae* e *Leclercia adecarboxylata*) (Figura 2 A -B).

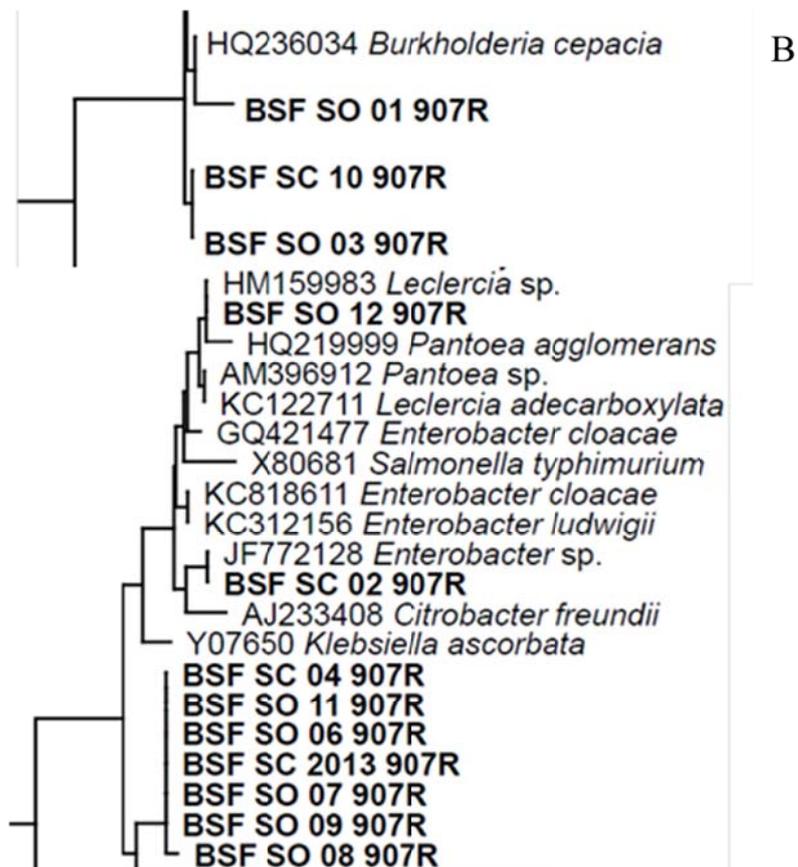
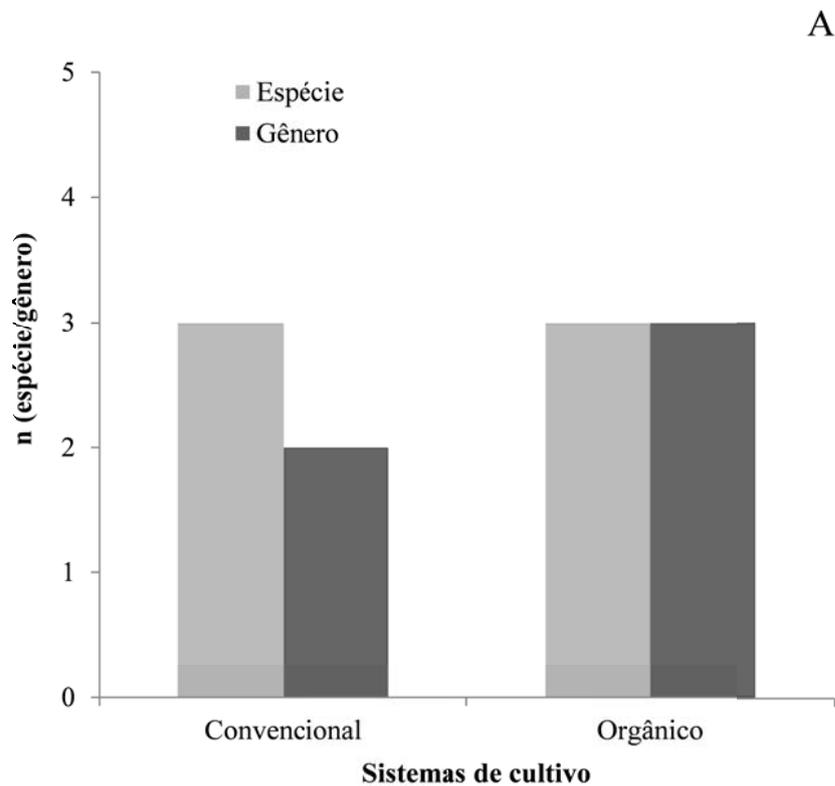


FIGURA 2. (A) Número de espécies e gêneros identificados a partir da sequência 16S rRNA nos sistemas de cultivo convencional e orgânico. (B) Árvore filogenética dos isolados.

Índice de solubilização (IS) de diferentes fontes de fosfato

Foram isoladas da rizosfera do mamoeiro um total de 12 estirpes de bactérias, sendo 5 do sistema convencional e 7 do orgânico. Inicialmente, todos os isolados foram testados quanto à capacidade de solubilização de diferentes fontes de fosfato com $(Ca_3(PO_4)_2)$; ácido fítico; $FePO_4$ e $AlPO_4$. Os doze isolados apresentaram um maior IS tendo o fitato como fonte de P e não houve efeito significativo do sistema de cultivo sobre o IS das bactérias ($p=0,49$). Entretanto, na presença de fosfato tricálcico, os maiores índices de solubilização foram obtidos em bactérias do sistema de cultivo orgânico ($p=0,04$) (Figura 3). No entanto, nenhum dos isolados apresentou qualquer atividade de solubilização de fosfato em meio contendo $AlPO_4$ e $FePO_4$ (dados não mostrados).

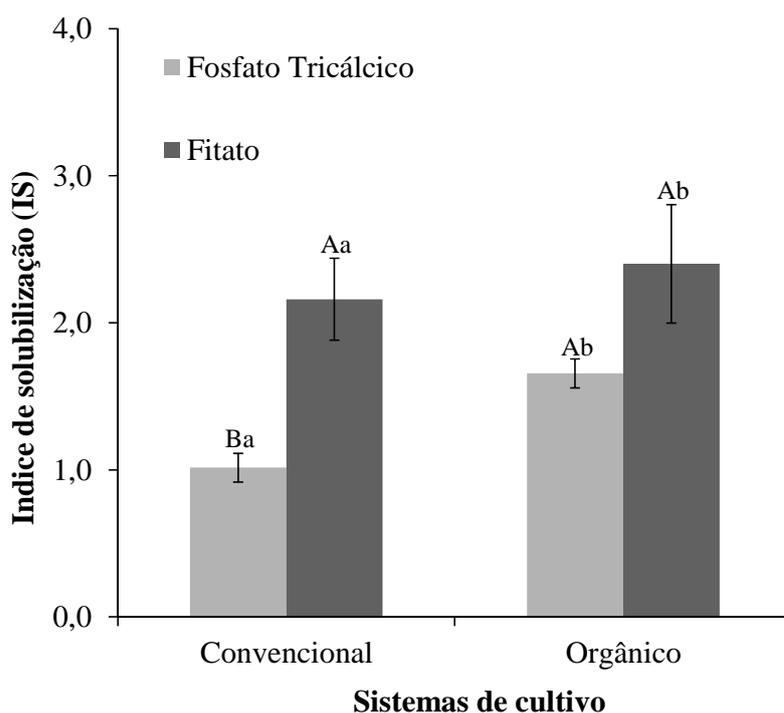


FIGURA 3. Índice de Solubilização de fosfato em meio sólido NBRIP suplementado com fosfato tricálcico e fitato por bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas dos sistemas de cultivo convencional e orgânico ($n=3$). Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula, no mesmo sistema de cultivo, não diferem entre si pelo Teste t de Student ($P < 0.05$). Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre sistemas de cultivo, não diferem entre si pelo Teste t de Student ($P < 0.05$).

Seleção dos isolados com características potenciais para funcionarem como PGPR

Na tabela 2, pode-se observar as características fisiológicas e bioquímicas analisadas dos doze isolados bacterianos. Destes, cinco foram isolados do sistema de cultivo convencional (*Enterobacter aerogenes* S18, *Enterobacter asburiae* OS-1 C1, *Enterobacter asburiae* OS-1 C2, *Burkholdeira cepacia* Je39-7 C e *Enterobacter asburiae* OS-1 C3) e sete do sistema de cultivo orgânico (*Burkholdeira cepacia* SAT1-2, *Burkholdeira cepacia* Je39-7 O, *Enterobacter asburiae* OS-1 O1, *Enterobacter asburiae* OS-1 O2, *Enterobacter asburiae* OS-1 O3, e *Leclercia adecarboxylata* NS87 *Enterobacter asburiae* OS-1 O4).

Dos doze isolados, apenas quatro apresentaram a capacidade de fixação de nitrogênio, sendo a *Burkholdeira cepacia* Je39-7 C isolada do sistema convencional, e *Burkholdeira cepacia* Je39-7O, *Burkholdeira cepacia* SAT1-2 O e *Leclercia adecarboxylata* NS87 O, isoladas do sistema orgânico.

A produção de sideróforos foi observada em todos os isolados bacterianos. Com exceção do isolado *Leclercia adecarboxylata*, todos os isolados apresentaram resistência à metaciclina e ampicilina, e susceptibilidade a clorofenicol, canamicina, eritromicina e tetraciclina.

TABELA 2. Características fisiológicas e antibiograma das bactérias isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L. nos sistemas de cultivo convencional e orgânico (N=3).

	Bactérias isoladas de diferentes sistemas de cultivo											
	Convencional					Orgânico						
	<i>E. aerogenes</i> S18 C	<i>E. asburiae</i> OS-1 C1	<i>E. asburiae</i> OS-1 C2	<i>B. cepacia</i> Je39-7 C	<i>E. asburiae</i> OS-1 C3	<i>B. cepacia</i> SAT1-2 O	<i>B. cepacia</i> Je39-7 O	<i>E. asburiae</i> OS-1 O1	<i>E. asburiae</i> OS-1 O2	<i>E. asburiae</i> OS-1 O3	<i>L. adecarboxylata</i> NS87 O	<i>E. asburiae</i> OS-1 O4
Fisiologia												
Fixação de N	*	*	*	++	*	++	++	*	*	*	++	*
Produção de Sideróforos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Resistência a Antibióticos												
Metaciclina	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	nd	r
Ampicilina	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	nd	r
Chloranfencol	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	nd	s
Eritromicina	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	nd	s
Canamicina	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	nd	s
Tetraciclina	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	nd	s

(*) não fixadores de nitrogênio (++) fixadores de nitrogênio

(+) produtores de Sideróforos

(r) resistentes a antibióticos (s) susceptíveis a antibióticos (nd) não detectável

1

Cinética temporal da produção de AIA

Em todas as bactérias isoladas, independente do sistema de cultivo, a maior produção de AIA ocorreu no início da fase estacionária do crescimento bacteriano. (Figura 5 e 6)

Os isolados avaliados neste estudo apresentaram a maior produção de AIA a uma densidade óptica (DO) de 1,3 depois de 96 horas (Figuras 4 e 5). No sistema de cultivo convencional a produção de AIA pelos isolados bacterianos variou entre 15 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4). Dentre os cinco isolados deste sistema de cultivo, a menor produção de AIA foi observada no isolado *E aerogenes* C (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a uma DO 1,3 (Figura 4A). A maior produção, 60 $\mu\text{g/mL}$, foi observada no isolado *E. asburiae* OS-1 C2 também a uma DO de 1,3 após 96 horas (Figura 4C). Os demais isolados deste sistema de cultivo a *E. asburiae* OS-1 C1, *B. cepacia* Je39-7 C e *E. asburiae* OS-1 C3 apresentaram produção de AIA de 30, 35 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 96 horas também a uma DO de 1,3 (Figura 4B, D e E).

No sistema de cultivo orgânico, a produção de AIA também foi realizada após 96 horas a uma DO de 1,3. A variação de AIA entre os sete isolados bacterianos deste sistema de cultivo foi de 8 a 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 5). A menor produção foi observada no isolado *B. cepacia* SAT1-2 (8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 5A). A maior produção de AIA foi observada no isolado *Leclercia adecarboxylata* NS87(180 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5G). Os demais isolados, *B. cepacia* Je39-7 O, *E. asburiae* OS-1 O1 *E. asburiae* OS-1 O2, *E. asburiae* OS-1 O3 *E. asburiae* OS-1 O4, apresentaram produção de 14, 20, 12, 27 e 14 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, respectivamente, após 96 horas a uma DO de 1,3 (Figura 5A, B, C, D, E, F e G).

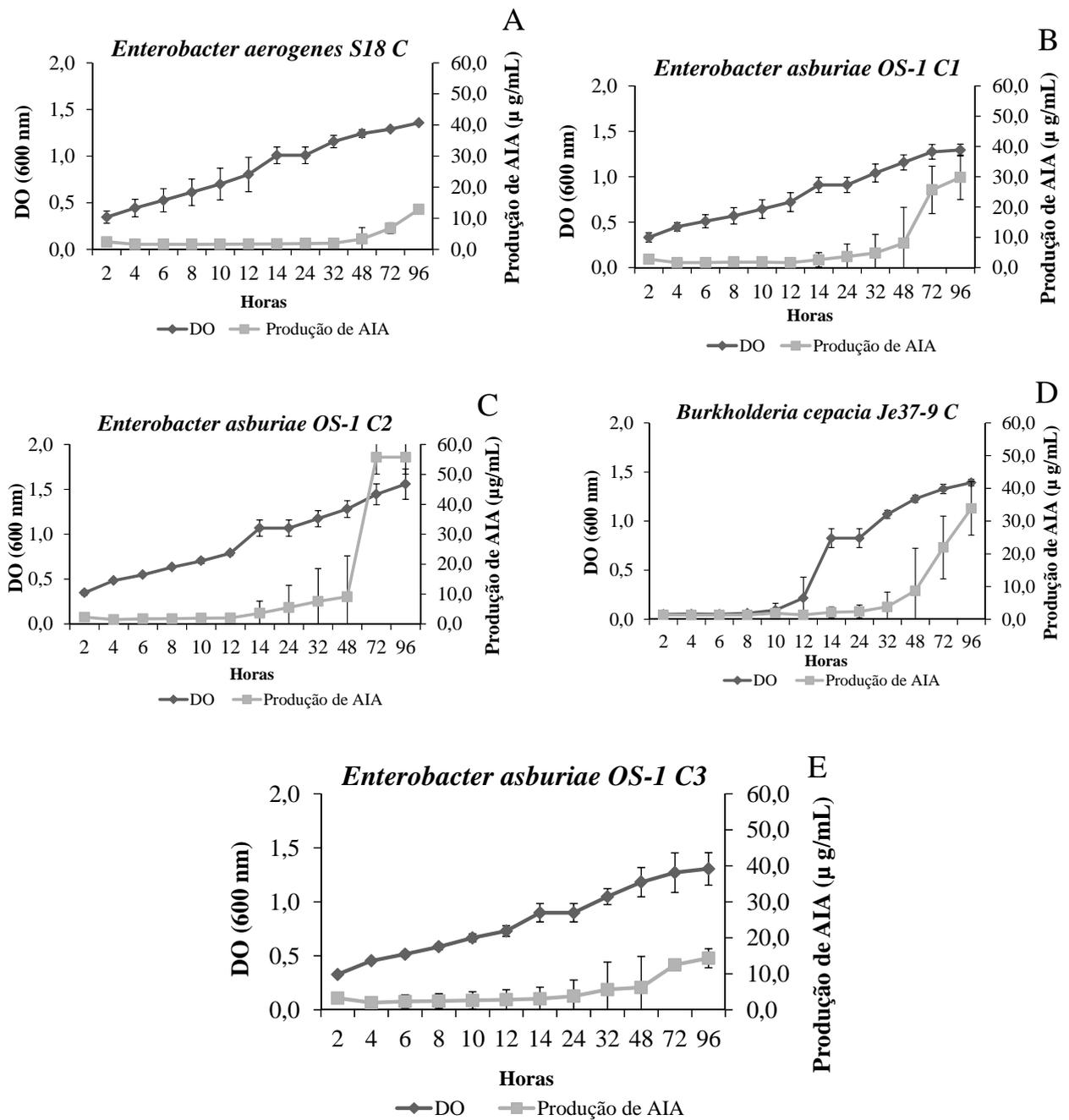


FIGURA 4. Cinética da produção de AIA e do crescimento em culturas bacterianas isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L. no sistema de cultivo convencional.

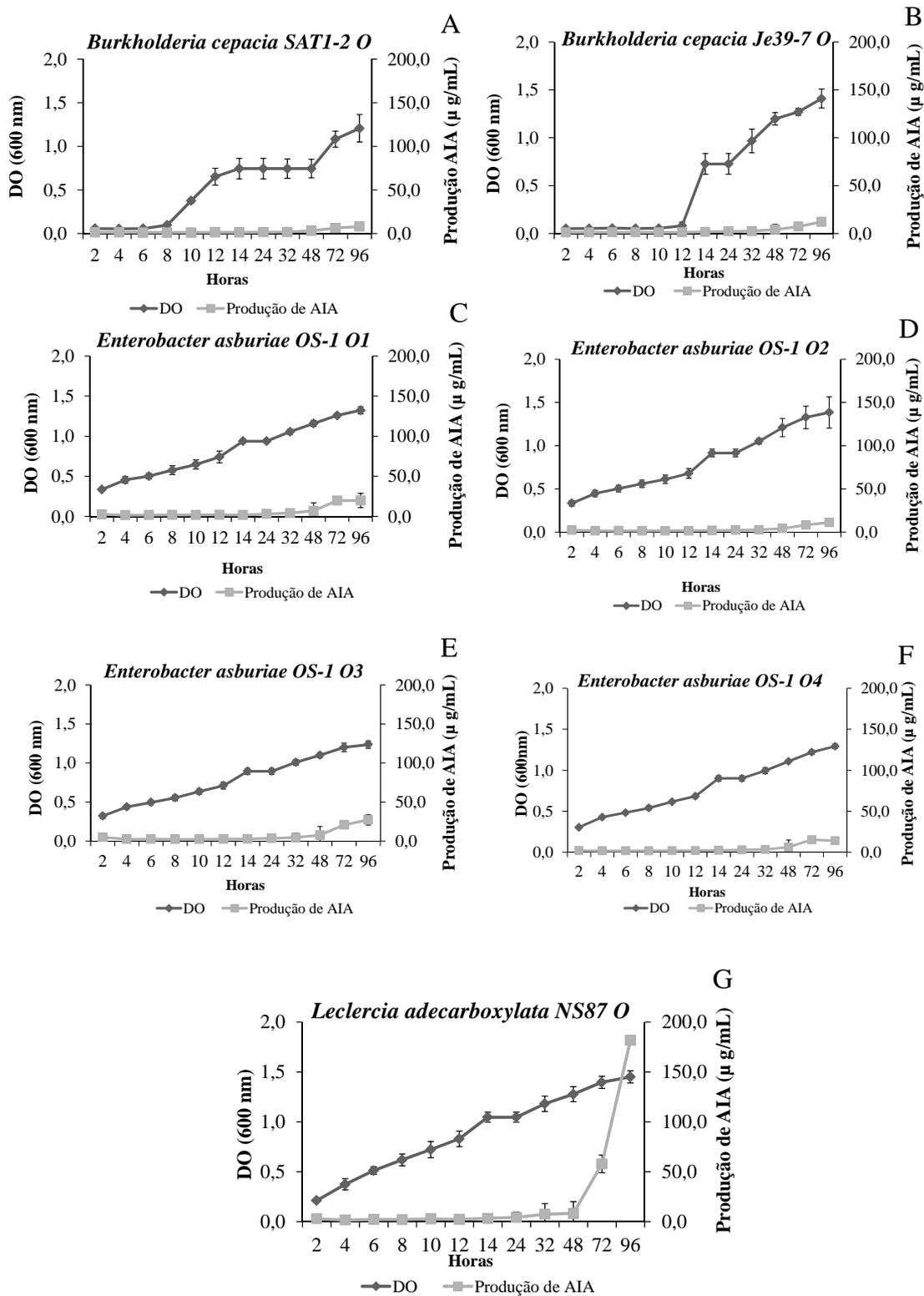


FIGURA 5. Cinética da produção de AIA e do crescimento em culturas bacterianas isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L. no sistema de cultivo orgânico.

A maioria das estirpes isoladas da rizosfera de *C. papaya* neste estudo apresentou maior estimulação na produção de AIA na presença do precursor triptofano. Com exceção dos isolados *E. asburiae* OS-1 C1, *B. cepacia* Je39-7 C do sistema de cultivo convencional e *E. asburiae* OS-1 O2, *B. cepacia* Je39-7 O e *B. cepacia* SAT1-2 O do sistema de cultivo orgânico, todas as demais estirpes apresentaram uma estimulação na produção de AIA em presença de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano quando comparado com o controle com 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano (Figura 6)

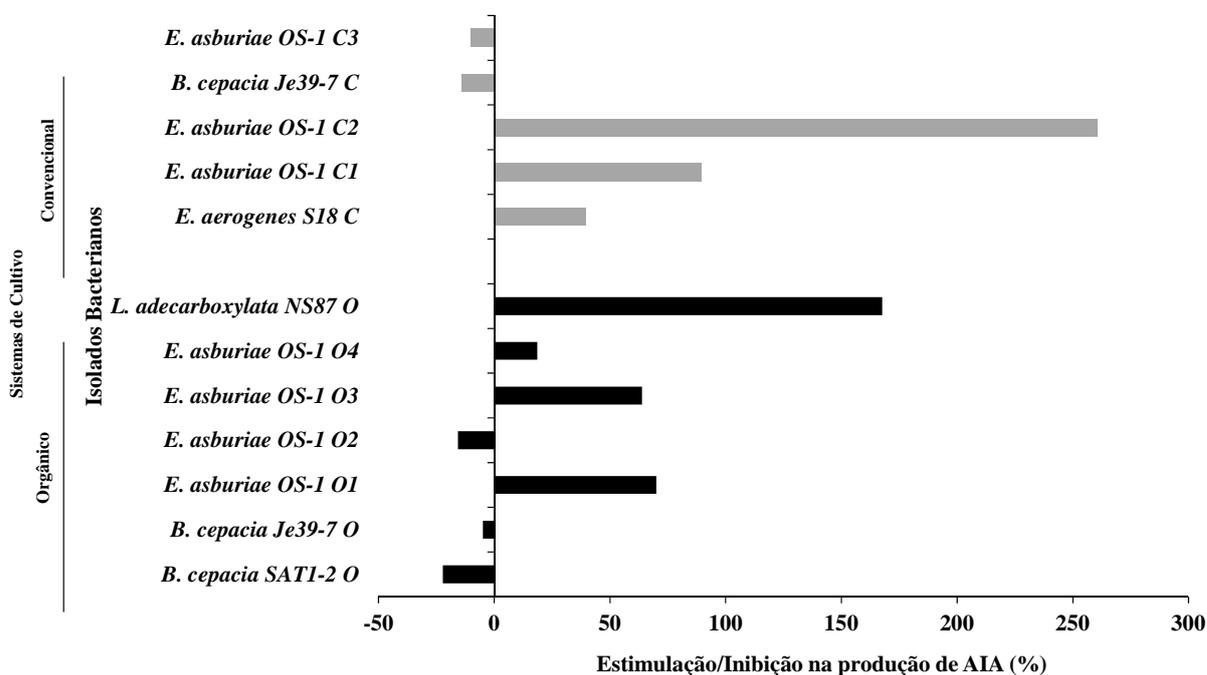


FIGURA 6. Inibição e estimulação na produção de AIA em meio suplementado com 2 (controle) e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano por bactérias isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L. nos sistemas de cultivo convencional e orgânico.

Atividade antifúngica

Os resultados mostraram que os isolados do sistema de cultivo convencional (*E. aerogenes* S18 C, *E. asburiae* OS-1 C1, *E. asburiae* OS-1 C2, *B. cepacia* Je39-7 C e *E. asburiae* OS-1 C3) e do sistema de cultivo orgânico (*B. cepacia* SAT1-2, *B. cepacia* Je39-7 O, *E. asburiae* OS-1 O1, *E. asburiae* OS-1 O2, *E. asburiae* OS-1

O3*E. asburiae* OS-1 O4) exercem efeito antagônico contra fungos fitopatogênicos. Ao estabelecer a interação entre os isolados bacterianos antagonistas e *Fusarium Culmorum*, *Geotrichum candidum*, *Pestalotia sp.*, *Alternaria sp.*, *Phoma sp.* e *Botrytis cinérea*, foi possível observar diferentes níveis inibição do crescimento micelial, apresentados nas figuras 7 e 8. Sendo considerados bons inibidores, os isolados que apresentaram inibição superior a 50%.

Entre os cinco isolados do sistema de cultivo convencional, dois (*Enterobacter asburiae* OS-1 C1 e *Burkholdeira cepacia* Je39-7 C) apresentaram inibição micelial de 78 e 76%, respectivamente, para *Geotrichum candidum*. Dos sete isolados do sistema de cultivo orgânico, o isolado *Burkholdeira cepacia* Je39-7 O apresentou inibição micelial de 81% para *Geotrichum candidum* (Figura 7A).

Ao *Fusarium Culmorum*, a porcentagem de inibição micelial entre os isolados foi acima de 30%. As maiores porcentagens de inibição micelial para o *Fusarium Culmorum* foram observadas pelo isolado *Burkholdeira cepacia* Je39-7 C do sistema convencional 67% de inibição e pelos isolados *Enterobacter asburiae* OS-1 O1, *Burkholdeira cepacia* Je39-7 O e *Enterobacter asburiae* OS-1 O3 do sistema de cultivo orgânico com 68, 66 e 63 % de inibição, respectivamente (Figura 7B).

Os maiores efeitos antagonicos a *Pestalotia sp.* foram observados nos isolados do sistema de cultivo convencional *Burkholdeira cepacia* Je39-7 C e *Enterobacter asburiae* OS-1 C1, apresentando inibição micelial a *Pestalotia sp* de 68 e 62%, e no isolado *Burkholdeira cepacia* Je39-7 O do sistema de cultivo orgânico, com 64% de inibição do crescimento micelial (Figura 7C).

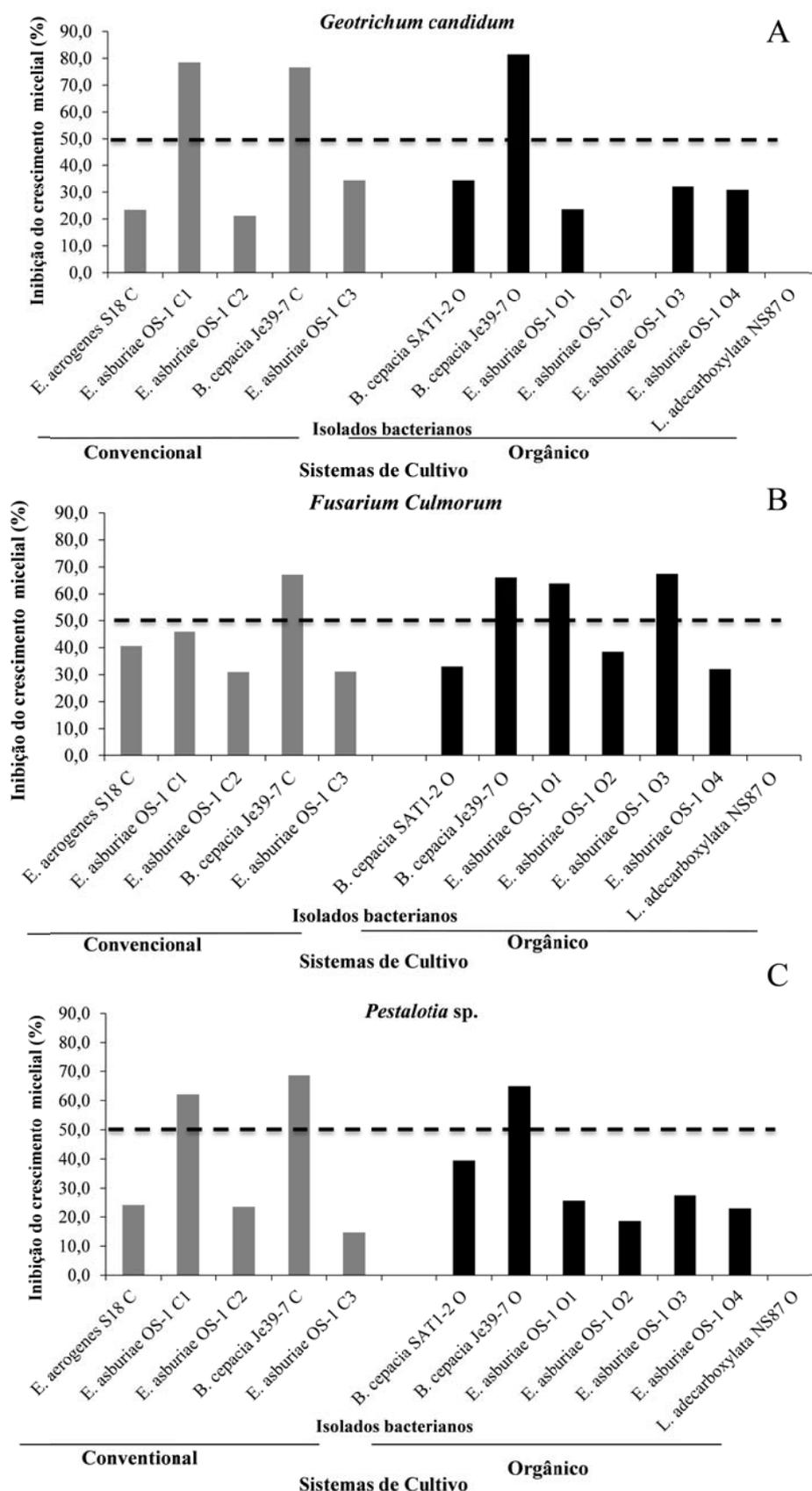


FIGURA 7. Taxa de inibição do crescimento micelial do *Geotrichum candidum* (A), *Fusarium Culmorum* (B) e *Pestalotia sp.* (C) por bactérias isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L. cultivadas em sistema de cultivo convencional e orgânico (n=3).

Para o fungo fitopatogênico *Alternaria* sp., os isolados apresentaram taxas de inibição micelial acima de 30 %. As maiores inibições foram observadas pelos isolados *Enterobacter asburiae* OS-1 C1, do sistema de cultivo convencional com inibição de 45%, e pelos isolados do sistema de cultivo orgânico *Burkholdeira cepacia* Je39-7 O e *Enterobacter asburiae* OS-1 O2, com inibição micelial de 58 e 44 % respectivamente (Figura 8A). A maior taxa de inibição micelial do *Phoma* sp. pelos isolados foi de 40%. Destacando-se como melhores inibidores dois isolados, *Enterobacter asburiae* OS-1 C3 do sistema de cultivo convencional com 40 e 34 % de inibição e o isolado *Burkholdeira cepacia* SAT1-2 O que apresentou capacidade de inibição de 37% para o *Phoma* sp. (Figura 8B)

Para o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, nenhum dos isolados apresentou taxa de inibição micelial superior a 44 %. A maior taxa de inibição foi obtida pelos isolados *Burkholdeira cepacia* Je39-7 C do sistema convencional, com inibição de 42%, e pelos isolados *Burkholdeira cepacia* SAT1-2 O e *Burkholdeira cepacia* Je39-7 O do sistema de cultivo orgânico que apresentaram inibição micelial de 43% para *Botrytis cinérea* (Figura 8C).

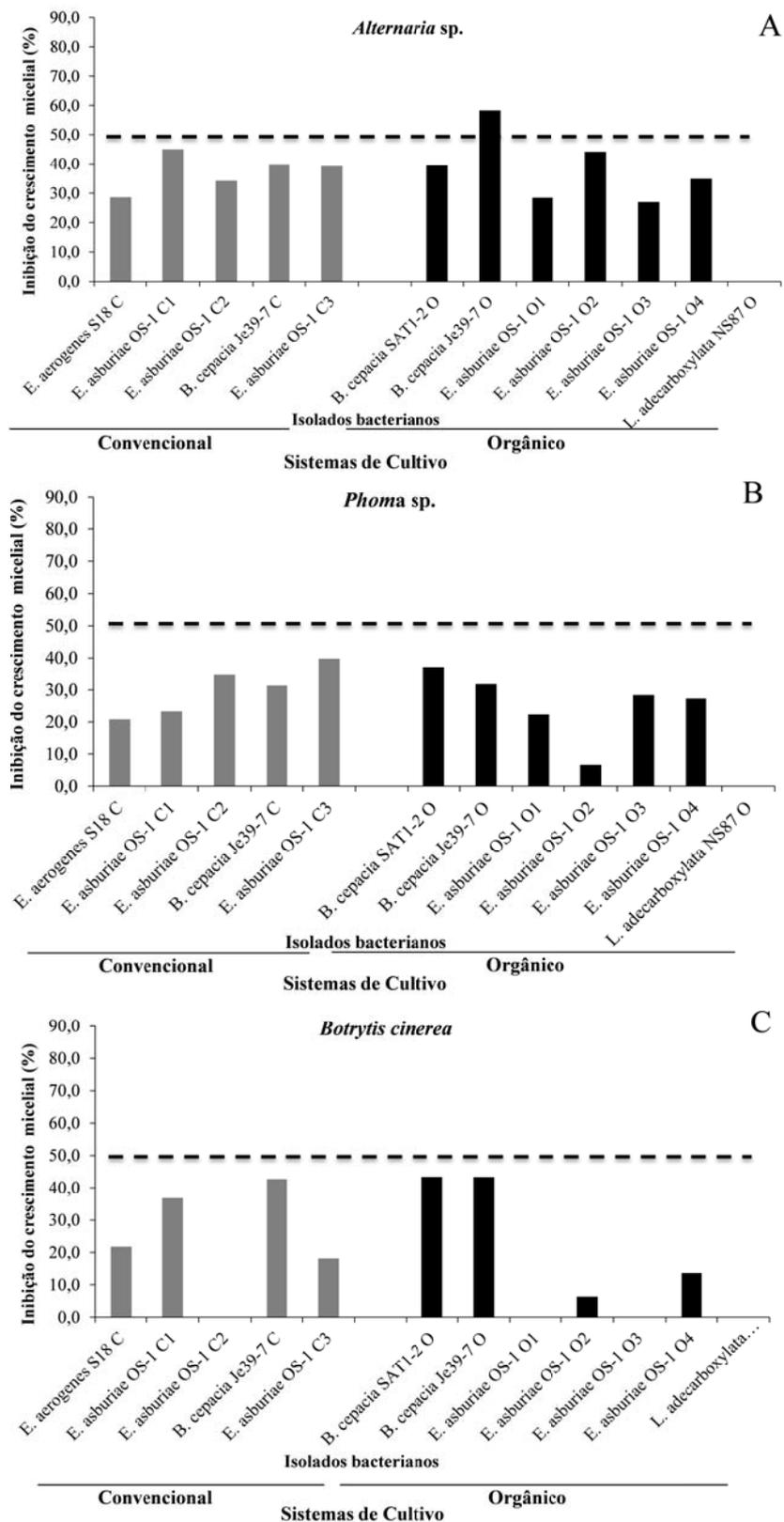


FIGURA 8. Taxa de inibição do crescimento micelial do *Alternaria* sp (A), *Phoma* sp.(B) e *Botrytis cinerea* (C) por bactérias isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L. cultivadas em sistema de cultivo convencional e orgânico (n=3).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo tem como objetivo a caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato e com potencial para funcionarem como PGPRs de uso comercial. Neste contexto, o trabalho focou-se em organismos culturáveis.

A avaliação da densidade total de bactérias na rizosfera das plantas de *C. papaya* sob cultivo orgânico e convencional revelou que o sistema de cultivo em si não interferiu na comunidade bacteriana total, mas está diretamente relacionado à atividade ou funcionalidade de bactérias específicas. Shannon (2002) realizou um estudo comparativo da microbiota de solos sob cultivo convencional e orgânico e também não observou diferenças significativas, enquanto que Grantina et al. (2011) encontraram um aumento na comunidade total de bactérias em solo sob sistema orgânico. O presente estudo foi realizado em solo rizosférico por ser a região de maior importância ecológica e fisiológica para as plantas.

A população de BSFs na rizosfera das plantas de *C. Papaya* foi superior no sistema orgânico quando comparado ao convencional. Tal como proposto por Naher et al. (2013), acreditamos que este resultado é explicado pelo tipo de fertilizante utilizado no manejo da cultura e também pelo pH do solo que apresentou valores mais elevados e próximos ao ideal para crescimento das BSFs.

A partir das 12 bactérias isoladas com capacidade de solbulizar fosfato, sendo 7 oriundas da rizosfera de plantas do cultivo orgânico e 5 do convencional, foi realizada a análise molecular. Esses doze isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Leclercia*, sendo predominante bactérias do gênero *Enterobacter*. Os dois primeiros gêneros estão incluídos no grupo das rizobactérias promotoras de crescimento (Rodriguez e Fraga, 1999; Dawwam et al., 2013).

No solo, a maioria do fosfato encontra-se na forma orgânica de Fitato, que não é assimilável pelas plantas (Singh et al., 2014). No presente estudo, todos os isolados bacterianos apresentaram índice de solubilização (IS) de fitato elevado, independente do sistema de cultivo. Resultados similares foram obtidos por Jorqueira et al. (2008), estudando a rizosfera de *Lolium perenne* L., *Trifolium repens* L., *Triticum aestivum* L., *Avena sativa* L. e *Lupinus luteus* L., e Unno et al. (2005) com rizosfera de *Lupinus albus*. Nesses trabalhos, bactérias do gênero *Enterobacter* e *Burkholderia* apresentaram elevada capacidade de mineralizar fitato em meio sólido corroborando com os resultados obtidos no presente estudo (Unno et al, 2005; Jorqueira et al. 2008). Deste modo, a atividade de solubilizar fitato pode ser reflexo da estimulação na atividade de fitases extracelulares das bactérias analisadas. De fato, Idriss et al. (2002) detectaram uma atividade de fitase extracelular em *B. Amyloliquefaciens*, a qual correlacionou com a promoção do crescimento de plântulas de milho em condições *in vitro*. Assim, microrganismos capazes de mineralizar fitato na rizosfera têm sido considerados potenciais para aplicação em programas de produção de bioinoculantes para a agricultura (Unno et al, 2005; Jorqueira et al. 2008; Singh et al., 2014).

Diferente do comportamento encontrado com fitato, o IS de fosfato tricálcico médio das BSFs do sistema orgânico foi superior ao do sistema convencional. Segundo Madhaiyan et al. (2006), BSFs isoladas de solos com cultivo convencional tem sua eficiência de solubilização afetada pelo tipo de manejo utilizado.

Todos os isolados bacterianos foram caracterizados como Gram-negativos, resistentes a ampicilina e meticiclina. O sistema de cultivo afetou significativamente a população de bactérias diazotróficas. Quatro estirpes com capacidade de fixação de nitrogênio foram encontradas em solo rizosférico de *C. papaya*, sendo três oriundas do sistema orgânico (*Burkholdeira cepacia* SAT1-2, *Burkholdeira cepacia*

Je39-7 O e *Leclercia adecarboxylata* NS87 O) e apenas uma do sistema convencional (*Burkholdeira cepacia* Je39-7 C). Como era esperado e relatado por outros autores, todas as bactérias do gênero *Enterobacter* são consideradas como não diazotróficas (Asis and Adachi 2003; Martínez-Aguilar et al. 2008; Rogers et al. 2011). Ogbo and Okonkwo (2012), trabalhando com *E. asburiae*, relataram que esta espécie não possui genes *nif* existentes nas bactérias diazotróficas. Os autores acreditam que *E. asburiae* possa contribuir na acumulação de N na planta hospedeira, mas pelo incremento na absorção do nutriente. Por outro lado, no gênero *Burkholdeira*, diversas espécies foram descritas como diazotróficas em banana (Weber et al. 2000) e em plantios de cana-de-açúcar, no Brasil, e milho, no México (Perin et al. 2006).

Em relação a produção de sideróforo, todas as estirpes estudadas apresentaram capacidade de produzir esta proteína. Resultados semelhantes foram encontrados por Bevivino et al. (1994), Loaces et al. (2011) e Gupta et al. (2012). Os sideróforos são peptídeos de baixo peso molecular, quelantes de ferro, e sintetizados por microrganismos específicos (Vassilev et al. 2006; Babalola 2010; Singh et al. 2014). A maioria dos microrganismos (bactérias e fungos) é capaz de produzir sideróforos que diferem de acordo com seus grupos funcionais (Lugtenberg and Kamilova 2009). Microrganismos com capacidade de produzir sideróforos são benéficos para as plantas, pois tem a capacidade de solubilização do ferro, anteriormente indisponível para a planta (Prabhu et al. 1996; Lugtenberg and Kamilova 2009). Além de suprir as necessidades das plantas em relação ao ferro, a produção de sideróforos pode aumentar a síntese de compostos anti-fúngicos, fornecendo, assim, uma protecção contra fitopatógenos para as plantas (Davidson 1988; Santos-Villalobos et al. 2012).

A maior concentração deste AIA foi encontrada anteriormente a fase estacionária, ou seja, um metabólito secundário das PGPRs. Isto foi também observado por Tsavkelova et al. (2005), Ahemad and Khan (2011), Ogbo and Okonkwo (2012), Bevivino et al. (1994) e Loaces et al. (2011). A produção deste fitormônio é uma das funcionalidades das PGPRs, que controlam muitos processos fisiológicos importantes nas plantas, como a divisão celular, a diferenciação dos tecidos, iniciação raiz, aumento da taxa de crescimento (Khan et al., 2009).

A maior produção de AIA foi encontrada na presença de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano, também observado por Tsavkelova et al. (2005), confirmando, assim, que o triptofano é o precursor da auxina nestas culturas bacterianas. Sabendo que os exsudatos de plantas superiores são fontes de triptofano na rizosfera, os microrganismos presentes podem transformar este aminoácido em IAA, que pode por sua vez ser absorvido pelas plantas (Tsavkelova et al. 2005; Singh et al. 2013).

Com exceção da *Leclercia adecarboxylata* NS87 O, os isolados *B. cepacia* SAT1-2 O, *B. cepacia* Je39-7 C, *B. cepacia* Je39-7 O, *E. asburiae* OS-1 C1, *E. asburiae* OS-1 C2, *E. asburiae* OS-1 C3, *E. asburiae* OS-1 O1, *E. asburiae* OS-1 O2, *E. asburiae* OS-1 O3 e *E. asburiae* OS-1 O4 *E. aeorogene* S18 C, apresentaram inibição do crescimento micelial do *Geotrichum candidum*, *Fusarium Culmorum*, *Pestalotia* sp, *Alternaria* sp., *Phoma* sp e *Botrytis cinerea*. A atividade antifúngica de *B. cepacia* foi observada também por outros autores e foram correlacionadas a capacidade de produzir os peptídeos sideróforos (Trujillo et al. 2007; Azadeh et al. 2010). Laslo et al. (2012), relatou a atividade antifúngica em espécies de PGPRs, porém, atribuíram esse fato à produção de diferentes substâncias bioativas e antifúngicas por esses microrganismos. Chernin et al. (1995) relatou uma supressão do crescimento micelial de diferentes fungos fitopatogênicos por estirpes do gênero *Enterobacter* que apresentaram elevadas atividades de enzimas quitinolítica.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível observar que as estirpes isoladas da rizosfera de *Carica papaya* L., *Burkholdeira cepacia* Je39-7 C, *Burkholdeira cepacia* Je39-7 O, *E.asburiae*, OS-1 O1 *E. aerogenes* S18 C, apresentaram claramente a capacidade de solubilizar fosfato, produzir fitormônios, sideróforos e inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*, podendo ser considerados como estirpes promissoras na composição de um biofertilizante. A influencia do sistema de manejo empregado só foi observado na funcionalidade dos microrganismos em solubilizar fosfato e fixar nitrogênio, as demais funcionalidade não foram afectadas pelo sistema de cultivo. O resultados obtidos no presente trabalho relacionados as funcionalidas desses microrganismos pode ser explorada como uma biotecnologia de baixo custo, podeno reduzir os problemas associados ao uso de produtos químicos sintéticos, melhorando a fertilidade do solo, aumento da produtividade da cultura e conservação do meio ambiente.

No entanto, são necessários mais estudos para compreender como esses isolados se comportam quando inoculados em plantas e avaliar a performance de plantas inoculadas em condições de campo.

6. REFERÊNCIAS

- Ahmad F, Ahmad I, Khan, MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research* 163: 173-181.
- Ahemad M, Khan MS (2010) Plant growth promoting activities of phosphatesolubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by Fungicides. *EurAsian Journal of BioSciences* 4: 88-95
- Ahemad M, Khan MS (2011) Assessment of pesticide-tolerance and functional diversity of bacterial strains isolated from rhizospheres of diferente crops. *Insight Microbiology*1: 8-19.
- Asis CA, Adachi K (2003) Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 38: 19-23.
- Avis TJ, Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2008) Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry*40: 1733–1740.
- Azadeh BF, Sariah M, Wong MY (2010) Characterization of *Burkholderia cepacia* genomovar as a potential biocontrol agent of *Ganoderma boninense* in oil palm. *African Journal of Biotechnology* 9:3542-3548.
- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters* 32: 1559-1570.
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) *Plant Soil* 378:1–33
- Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Carusi MV, Del Gallo M, Visca P (1994) Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology*140: 1069-1 077.
- Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Cantale C, Chiarini L (1998) Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia*

- cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 225-237.
- Broadbent P, Baker KF, Waterworth Y (1971) Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in australian soils. *Aust. J. biol. Sci.* 24: 925 - 944
- Charpentier M, Oldroyd G (2010) How close are we to nitrogen-fixing cereals?. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 556-564.
- Chiarini L, Bevivino A, Tabacchioni S, Dalmastri C (1998) Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biol. Biochem* 30:81-87.
- Chernin L, Ismailov Z, Haran S, Chet I (1995) Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied And Environmental Microbiology* 61: 1720-1726.
- Davidson L (1988) Plant beneficial bacteria. *Biotechnology* 6: 282-286.
- Dawwam GE, Elbeltagy A, Emara HM, Abbas IH, Hassan MM (2013) Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science* 58: 195–201.
- de los Santos-Villalobos S, Barrera-Galicia GC, Miranda-Salcedo MA, Peña-Cabriales JJ (2012) *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal Microbiol Biotechnol* 28:2615–2623
- Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI, pp 60.
- Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Procedimento para coleta de amostra de solos. Ministério de agricultura pecuária e desenvolvimento, EMBRAPA Agrobiologia 2005. Disponível em: http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/analise_solos_coleta.html. Acesso em 15 de Outubro de 2012.

- FAO Food and agriculture organization.FAO. FAOSTAT. Disponível:
<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>. Acesso em: 30 de Junho de 2014.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327, 812-818
- Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26, 192–195.
- Gupta M, Kiran S, Gulatic A, Singh B, Tewari R (2012) Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research* 167: 358– 363.
- Gutierrez CK, Matsui GY, Lincoln DE, Lovell CR (2009) Production of the phytohormone Indole-3-Acetic Acid by estuarine species of the genus *Vibrio*. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2253–2258
- Jackson LE, Burger M, Cavagnaro TR (2008) Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology* 59:341–63.
- Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS, Rasheed M (2009) Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. biol. Sci.* 1:48-58.
- Laslo É, György É, Mara G, Tamás É, Ábrahám B, Lányi, S (2012) Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection* 40:43-48
- Loaces I, Ferrando L, Scavino AF (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. *Microb Ecol* 61:606–618.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne AM (2011) Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*. DOI: 10.1128/jmbe.v12i1.24.
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63:541-556.

- MacFaddin (1980) *Biochemical tests for Identification of Medical bacteria*, pp: 51-54. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Malboobi MA, Behbahani M, Madani H, Owlia P, Deljou A, Yakhchali B, Moradi M, Hassanabadi H (2009) Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere *World J Microbiol Biotechnol* 25:1479– 1484.
- Martínez-Aguilar L, Díaz R, Peña-Cabriales JJ, Estrada-de los Santos P, Dunn MF, Caballero-Mellado J (2008) Plant-associated *Burkholderia* species confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4574–4579
- Martins APL, Reissmann CB (2007) Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químicoanalíticos. *Scientia Agraria* 8: 1-17
- Mendonça V, Pedrosa C, Feldberg NP, Abreu NAA, Brito APF, Ramos JD (2006) Doses of nitrogen and simple superphosphate on papaya Formosa plant growth. *Ciênc.agrotec., Lavras, v. 30:1065-1070.*
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265- 270.
- Nguyen C., Yan W, Le TF (1992) Genetic variability phosphate solubilizing activity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant Soil* 143:193–199.
- Ogbo F, Okonkwo J (2012) Some characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. isolated from the roots of maize. *Advances in Microbiology* 2: 368-374.
- Peix A, Mateos PF, Rivas R, Mateos PF, Martinez-Molina E, Rodriguez-Barrueco CE, Valazquez, E (2003) *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 2067–2072.
- Perin L., Martínez-Aguilar L, Castro-González R, Estrada-de los Santos P, Cabellos-Avelar T, Guedes HV., Reis VM, Caballero-Mellado J (2006) Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3103–3110.

- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339
- Rodríguez H, Fraga, R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319–339.
- Rogers A, McDonald K, Muehlbauer MF, Hoffman A, Koenig K, Newman L, Taghavi S, Lelie D (2012) Inoculation of hybrid Poplar with the Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. 638 increases biomass but does not impact leaf level physiology. *GCB Bioenergy* 4:364-370
- Sarruge JR, Haag HP (1974) *Análise química em plantas*. Piracicaba, ESALQ, p56.
- Schwyn B, NEILANDS JB (1987) Universal Chemical Assay for the Detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56.
- Singh P, Kumar V, Agrawal S (2014) Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International Journal of Microbiology* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/426483>.
- Singh RK, Malik N, Singh S (2013) Improved nutrient use efficiency increases plant growth of rice with the use of IAA-overproducing strains of endophytic *Burkholderia cepacia* strain RRE25. *Microb Ecol* 66:375–384.
- Srinivas T, Sridevi M, Mallaiah KV (2008) Effect of pesticides on *Rhizobium* and nodulation of green gram *Vigna Radita* (L.) Wilczek. *Journal of Life Sciences* 2: 36-44.
- Steel KJ (1961) The oxidase reaction as a toxic tool. *J. Gen. Microbiol* 25: 297-306.
- Tawiah AA, Gbedema SY, Adu F, Boamah VE, Annan K (2012) Antibiotic producing microorganisms from River Wiwi, Lake Bosomtwe and the Gulf of Guinea at Doakor Sea Beach, Ghana. *BMC Microbiology* 12:1-8.
- Trindade AV, Siqueira JO, Stürmer, SL (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi in papaya plantations of espírito santo and bahia, brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:283-289.

- Trujillo I, Díaz A, Hernández A, Heydrich M (2007) Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* Y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Rev. Protección Veg. 22:41-46.
- Tsavkelova, EA, , Cherdyntseva, TA, Netrusov, AI (2005) Auxin Production by Bacteria associated with orchid roots. Microbiology 74:46–53.
- Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I (2006) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Appl Microbiol Biotechnol 71: 137–144
- Vincent, J.M (1970) A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Burgess and Son Ltd, Great Britain.
- Weber OB, Baldani JI, Döbereiner J (2000) Diazotrophic bacteria in banana plants. Pesq. agropec. Bras 35:.2277-2285.