



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO DE AGRONOMIA**

VANEIDE MARIA WEYH

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ISOLADOS BACTERIANOS DE SOLO
RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO NA CULTURA DO GIRASSOL**

CERRO LARGO

2018

VANEIDE MARIA WEYH

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ISOLADOS BACTERIANOS DE SOLO
RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO NA CULTURA DO GIRASSOL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da
Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Coorientadora: Profa. Dra. Juliane Ludwig

CERRO LARGO

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Weyh, Vaneide Maria

Caracterização funcional de isolados bacterianos de solo rizosférico e não rizosférico na cultura do girassol / Vaneide Maria Weyh. -- 2018.
51 f.:il.

Orientador: Dr. Daniel Joner Daroit.

Co-orientadora: Dra. Juliane Ludwig.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Agronomia, Cerro Largo, RS , 2018.

1. Helianthus annuus. 2. Bactérias. 3. Potencial hidrolítico. 4. Solubilização de fosfato. 5. Antibiose.
I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Ludwig, Juliane, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

VANEIDE MARIA WEYH

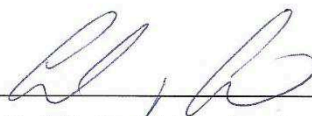
**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ISOLADOS BACTERIANOS DE SOLO
RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO NA CULTURA DO GIRASSOL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da
Fronteira Sul.

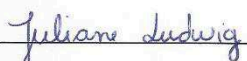
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

03 / 12 / 2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit
Orientador



Profa. Dra. Juliane Ludwig
Coorientadora



Jaderson dos Anjos Toledo

RESUMO

O solo é um ambiente heterogêneo composto de diferentes habitats, onde diversos tipos e grupos de microrganismos se estabelecem. Os compartimentos rizosférico e não rizosférico são exemplos da heterogeneidade dos solos, que comumente resulta em diferenças na diversidade e atividade microbianas. Independentemente destes fatores, a microbiota atua, direta ou indiretamente, sobre aspectos da qualidade e fertilidade dos solos, bem como sobre o desenvolvimento e sanidade das plantas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi isolar microrganismos de solo de ambiente rizosférico e não rizosférico na cultura do girassol (*Helianthus annuus*), para então avaliar, *in vitro*, a capacidade de produção de enzimas extracelulares, solubilização de fosfato inorgânico, e antagonismo contra um fungo fitopatogênico. O resultado da contagem de microrganismos em solo rizosférico foi de $1,5 \pm 0,23 \times 10^6$ UFC g⁻¹ solo seco, sendo superior à contagem realizada em solo não rizosférico ($8,9 \pm 0,28 \times 10^5$ UFC g⁻¹ solo seco). Foram obtidos, no total, 24 isolados bacterianos, sendo 12 isolados de solo rizosférico e 12 de solo não rizosférico. O teste de coloração de Gram realizado indicou que 75% dos isolados rizosféricos corresponderam a bastonetes Gram-positivos; para o solo não rizosférico, 50% dos isolados foram caracterizados como bastonetes Gram-positivos. Dentre as atividades enzimáticas avaliadas para os 24 isolados bacterianos, 37,5%, 54,17%, 66,67%, 66,67% apresentaram capacidade de produção de celulase, amilase, lipase e protease, respectivamente. Apenas um isolado de solo rizosférico demonstrou habilidade em solubilizar fosfato inorgânico. Ainda, dos 24 isolados bacterianos, 29,17% apresentaram capacidade de inibição, *in vitro*, do crescimento do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*. Um dos isolados rizosféricos, denominado R19, apresentou todas as atividades investigadas nas condições experimentais empregadas neste estudo. Mesmo considerando o limitado número de bactérias avaliadas, os resultados indicam o potencial participação dos isolados bacterianos na ciclagem da matéria orgânica, transformação de elementos, e controle de fitopatógenos, processos associados à fertilidade e produtividade de solos agrícolas.

Palavras-chave: Microbiota. Bioprospecção. Atividade enzimática. Solubilização de fosfato. Antagonismo.

ABSTRACT

Soil is a heterogeneous environment, composed of different habitats, where different types and groups of microorganisms are established. The rhizosphere and non-rhizosphere compartments are examples of soils heterogeneity, commonly resulting in differences on microbial diversity and activity. Irrespective of these factors, microbiota acts, directly or indirectly, on aspects of soil quality and fertility, as well as on plant development and health. In this context, this study aimed to isolate soil microorganisms from the rhizosphere and non-rhizospheric environments from sunflower (*Helianthus annuus*) cropping, in order to evaluate, *in vitro*, their ability of producing extracellular enzymes, solubilizing inorganic phosphate, and of displaying antagonistic activity against a phytopathogenic fungus. The results of the microorganisms count in rhizospheric soil was $1.5 \pm 0.23 \times 10^6$ CFU g⁻¹ dry soil, being higher than the counts in non-rhizospheric soil ($8.9 \pm 0.28 \times 10^5$ CFU g⁻¹ dry soil). A total of 24 bacterial isolates were obtained, 12 isolates from rhizospheric and 12 from non-rhizospheric soil. The Gram stain test indicated that 75% of the rhizosphere isolates were Gram-positive rods; for non-rhizosphere soil, 50% of the isolates were characterized as Gram-positive rods. Among the enzymatic activities evaluated for the 24 bacterial isolates, 37.5%, 54.17%, 66.67%, and 66.67% presented the capacity to produce cellulase, amylase, lipase and protease, respectively. Only one isolate of rhizospheric soil demonstrated the ability to solubilize inorganic phosphate. Also, from the 24 bacterial isolates, 29.17% inhibited, *in vitro*, the growth of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. One of the rhizospheric isolates, named R19, presented all the activities investigated, in the experimental conditions employed in this study. Even considering the limited number of evaluated bacteria, results indicate the potential participation of bacterial isolates in the cycling of organic matter, elements transformation, and control of phytopathogens, which are processes associated with fertility and productivity of agricultural soils.

Keywords: Microbiota. Bioprospecting. Enzyme activity. Phosphate solubilization. Antagonism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das fases de desenvolvimento do girassol.	15
Tabela 2 Estimativa da abundância de microrganismos do solo no ambiente.	18
Tabela 3. Morfologia celular e perfil de coloração de Gram para 12 bactérias isoladas de solo rizosférico na cultura do girassol.	30
Tabela 4. Morfologia celular e perfil de coloração de Gram para 12 bactérias isoladas de solo não rizosférico na cultura do girassol.	30
Tabela 5. Atividade celulolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.	32
Tabela 6. Atividade celulolítica de bactérias isoladas de solo não rizosférico.	32
Tabela 7. Atividade de solubilização de fosfato inorgânico por bactérias isoladas de solo rizosférico.	33
Tabela 8. Atividade amilolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.	34
Tabela 9. Atividade amilolítica de bactérias isoladas de solo não rizosférico.	35
Tabela 10. Atividade lipolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.	36
Tabela 11. Atividade lipolítica por bactérias isoladas de solo não rizosférico.	36
Tabela 12. Atividade proteolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.	37
Tabela 13. Atividade proteolítica de bactérias isoladas de solo não rizosférico.	38

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1. Desenvolvimento de halo de inibição do fungo.	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ágar Amido

AL – Ágar Leite

BDA- Ágar Batata Dextrose

CMC - Carboximetil Celulose

DMC – Diâmetro médio da colônia

DMH – Diâmetro médio do halo de hidrólise

IE – Índice Enzimático

IS – Índice de Solubilização

PCA – Ágar Padrão Contagem

PVK - Ágar Pikovskaya

TBA – Ágar Tributirina

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo geral	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 MORFOLOGIA, DESCRIÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS GERAIS DO GIRASSOL 14	
2.1.1 Aspectos econômicos	16
2.2 DIVERSIDADE MICROBIANA E SUAS FUNÇÕES	17
2.2.1 Atividades microbianas e de suas enzimas no solo	19
2.3 FUNCIONALIDADES MICROBIANAS E BIOTECNOLOGIA.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 IMPLANTAÇÃO E MANEJO DA CULTURA DO GIRASSOL.....	23
3.2 COLETA DE SOLO RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO NA CULTURA DE GIRASSOL E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	23
3.3 CONTAGEM DE BACTÉRIAS	24
3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS	25
3.5 COLORAÇÃO DE GRAM E MORFOLOGIA CELULAR.....	25
3.6 AVALIAÇÕES QUALITATIVAS DA FUNCIONALIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS	25
3.6.1 Produção de celulasas	25
3.6.2 Produção de amilases	26
3.6.3 Produção de proteases	26
3.6.4 Capacidade lipolítica	26
3.6.5 Solubilização de fosfato inorgânico	27
3.6.6 Inibição de fungo fitopatogênico <i>in vitro</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS.....	29

4.2 FUNCIONALIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS	31
4.2.1 Atividade celulítica	31
4.2.2 Atividade de solubilização de fosfato inorgânico	33
4.2.3 Atividade amilolítica	34
4.2.4 Atividade lipolítica	35
4.2.5 Atividade proteolítica	37
4.2.6 Inibição de fungo fitopatogênico <i>in vitro</i>	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus*) é uma dicotiledônea anual, pertencente à família Asteraceae. Apresenta movimento das folhas e do capítulo de acordo com o movimento solar, fenômeno denominado heliotropismo. Possui grande adaptabilidade edafoclimática e grande contribuição na ciclagem de nutrientes do solo. Seu sistema radicular é pivotante, dando assim maior condição para suprir suas necessidades hídricas e nutricionais (VERSLYPE et al., 2015).

Diversos produtos podem ser obtidos a partir do processamento do girassol, como o óleo bruto, torta desengordurada, grãos e plantas integrais, suprimindo assim a indústria de alimentos tanto para humanos como para animais, e, também sendo utilizados para outros fins como a preparação de fármacos e cosméticos (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005).

Microrganismos presentes no solo estão ligados a diversos processos de transformação que ocorrem, como por exemplo, a degradação da matéria orgânica, o intemperismo rochoso, gênese do solo e regulação de nutrientes. Os microrganismos presentes decompõem compostos orgânicos, os quais são transformados em compostos inorgânicos, assimiláveis pelas plantas. Este processo, denominado mineralização, sofre influência de intervenções que ocorrem no solo e de condições climáticas, que podem alterar a comunidade microbiana. O processo oposto, denominado imobilização, está associado às formas pelas quais os microrganismos obtêm seus nutrientes a partir do solo e restos vegetais, deixando-os temporariamente indisponíveis para as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As enzimas têm alto grau de importância no solo, devido às transformações que promovem, como a decomposição da matéria orgânica. Os microrganismos, principais fontes de enzimas no solo (EVANGELISTA et al., 2012), são usualmente mais abundantes na região rizosférica. A solubilização de fosfatos também é mediada por microrganismos, que modificam o fósforo (P) do solo fazendo-o passar por processos biogeoquímicos para que ele possa melhorar sua forma de disponibilidade para as plantas. Esta atividade possui importância por diminuir ou até mesmo substituir o uso de fertilizantes comerciais. São de grande relevância na agricultura por estimularem o crescimento e desenvolvimento de plantas, diminuindo assim custos de produção (CHAGAS JUNIOR, 2010).

A partir do reconhecimento dos microrganismos do solo e suas funções dentro do ecossistema, pesquisas sobre a biodiversidade e a funcionalidade desses microrganismos em culturas de relevância econômica tornam-se alvo de investigações. Neste contexto enquadra-se a cultura do girassol (*Helianthus annuus*).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Isolar bactérias heterotróficas de solo rizosférico e não rizosférico na cultura do girassol (*Helianthus annuus*) e investigá-las quanto à produção de enzimas extracelulares, solubilização de fosfato inorgânico e antibiose.

1.1.1.1 Objetivos específicos

- Isolar bactérias de solo rizosférico e não rizosférico cultivado com girassol (*Helianthus annuus*);
- Avaliar o potencial amilolítico das bactérias;
- Avaliar o potencial celulolítico das bactérias;
- Avaliar o potencial lipolítico das bactérias;
- Avaliar o potencial proteolítico das bactérias;
- Avaliar o potencial de solubilização de fosfato das bactérias.
- Avaliar o potencial de antagonismo das bactérias frente a um fungo fitopatogênico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MORFOLOGIA, DESCRIÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS GERAIS DO GIRASSOL

Originário da América do Norte, o girassol (*Helianthus annuus*), é uma dicotiledônea anual que integra a família das Asteraceae e pertence ao gênero *Helianthus*. O gênero deriva do grego *helios*, que significa sol, e de *anthus*, que significa flor, ou “flor do sol”, ou seja, girando de acordo com o movimento do sol (OLIVEIRA, 2017a). O girassol apresenta heliotropismo, estratégia da planta com a finalidade de maximizar a eficiência de captação de raios solares, no qual o capítulo gira de acordo com a orientação do sol devido ao crescimento diferenciado de células do caule. No lado da planta que recebe menor radiação ocorre acúmulo do hormônio auxina, fazendo com que haja um crescimento acelerado comparado ao lado disposto à luz. Este movimento é cessado com o capítulo direcionado para o lado leste, até a floração. Já nas folhas este movimento é importante para a fotossíntese, para acumulação de nutrientes e compostos orgânicos (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005).

O girassol possui um sistema radicular pivotante, com grande capacidade de exploração do solo (CASTRO et al. 1997). De acordo com Leite, Brighenti, Castro (2005) a principal função da raiz pivotante é de atingir as maiores profundidades do solo, buscar água e nutrientes, como também servir de sustentação, enquanto as raízes secundárias sustentam a planta e também absorvem água e nutrientes devido à presença de pêlos radiculares. De acordo com Castro et al. (1997), o sistema radicular do girassol, em não havendo restrição química e física, chega a grandes profundidades, normalmente onde outras culturas não conseguiriam alcançar.

Castro e Farias (2005) descrevem as flores como sendo de dois tipos. As tubulares são férteis e estão localizadas no meio do capítulo; já as liguladas são improdutivas e encontram-se na parte externa do capítulo, com coloração amarelada. O mesmo autor ressalta que os aquênios (grãos do girassol) são pseudofrutos secos que possuem apenas uma semente em seu interior, a qual possui alta concentração de óleo e proteínas.

A polinização por abelhas e outros insetos é fundamental, devido ao girassol ser uma planta alógama e autocompatível. De acordo com Tomazela et al. (2008), a fecundação cruzada é realizada por abelhas *Apis mellifera*.

As fases de desenvolvimento do girassol seguem uma sequência de transformações tanto morfológicas quanto fisiológicas, sendo assim, diferenciadas por estádios fenológicos (Tabela 1). Elas podem ser divididas em período vegetativo e reprodutivo. No período vegetativo tem-se a emergência (VE), caracterizada pelo período em que hipocótilo se eleva e os cotilédones emergem na superfície do solo até o aparecimento do primeiro par de folhas verdadeiras (menos

de 4,0 cm de comprimento), seguida do aparecimento das folhas verdadeiras (V1, V2, ..., Vn), normalmente definido pelo número de folhas presentes com no mínimo 4 cm de comprimento, ou seja, a cada número de folhas novas é indicado um novo estágio vegetativo. O período reprodutivo inicia com o aparecimento do broto floral, a floração, e finda com a maturação da planta (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005).

Tabela 1. Descrição das fases de desenvolvimento do girassol.

Fase Vegetativa				Fase Reprodutiva								
Emergência	Número de folhas superior a 4 cm			Desenvolvimento da inflorescência		Floração	Enchimento de aquênios	Maturação fisiológica				
VE	V1	V2	VN	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9

Fonte: QUEIROGA (2011). Adaptado.

As exigências nutricionais do girassol estão relacionadas com as fases de desenvolvimento. Usualmente, a absorção de água e nutrientes é intensificada com o crescimento da planta. Especificamente, o período compreendido entre sete a dez dias antes do florescimento e o próprio período de florescimento são os de maior demanda de água e nutrientes (CASTIGLIONI et al., 1997).

Na fase inicial da emergência é que ocorre a maior taxa de crescimento radicular, onde a raiz principal pode atingir de quatro a oito centímetros de profundidade, com seis a dez raízes secundárias. Na fase em que ele atinge de 4 a 5 pares de folhas o sistema radicular pode atingir de 50 a 70 cm (LINHARES, 2013). De acordo com Leite, Brighenti, Castro, (2005), o sistema radicular atinge seu máximo volume na fase final de floração.

Conforme Cadorin et al. (2012), apesar de o girassol ter uma boa adaptabilidade a diferentes solos, o ideal é o cultivo em solo corrigido, ou seja, com pH entre 5,2 e 6,4, para assim proteger a planta de efeitos de toxidez. Para outras características de solo, o autores cita que o ideal são solos profundos, de textura média, férteis, planos e com boa drenagem, beneficiando assim o sistema radicular, e conseqüentemente o desenvolvimento da planta.

Ungaro et al., (2009) descrevem o girassol como sendo uma espécie insensível ao fotoperíodo, porém algumas variedades têm comportamento de plantas de dia curto, outras de dia longo. De acordo com Castro et al., (1997) em relação a temperatura, o girassol inibe sua germinação quando a temperatura do solo está inferior a 4°C, e é considerada adequada acima de 10°C. A temperatura ideal pra o desenvolvimento é encontrada entre 27°C a 28°C. Para que

não haja redução na produção do girassol a temperatura indicada encontra-se no intervalo de 10°C a 34°C. Por apresentar boa adaptabilidade às adversas condições edafoclimáticas, com pouca influência no rendimento devido à latitude, altitude e fotoperíodo, o girassol é uma boa opção para os sistemas de rotação e sucessão de culturas (FERNANDES et al., 2016).

Para Leite, Brighenti, Castro (2005), o principal indício de déficit hídrico que a planta sofre nos primeiros 10 a 20 dias após a emergência, será observado na redução do tamanho e do número de folhas por planta, onde o normal são de 20 a 40 folhas. O estágio mais crítico de deficiência hídrica é de 10 a 15 dias que antecedem e os posteriores a fase de floração. Este fator é primordial e limita a produção do girassol (DOURADO, 2015). Em casos de déficit hídrico após o florescimento, ocorre a senescência das folhas, a diminuição da atividade fotossintética e, conseqüentemente, a diminuição da translocação de assimilados para os grãos, afetando assim a produtividade, o peso dos mesmos, e ainda dependendo da variedade ocorre também a diminuição do teor de óleo (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005).

2.1.1 Aspectos econômicos

O agronegócio possui papel fundamental na economia, sendo responsável por mais de 30% do produto interno bruto do país. Dentre os complexos agroindustriais com grandes potencialidades de crescimento, está inserido o girassol. Porém, apesar de haver condições favoráveis para o cultivo, a cultura do girassol é bastante limitada por outros fatores, como os econômicos, sociais e tecnológicos (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005).

Do ponto de vista comercial, o girassol é a espécie mais importante desse gênero pois apresenta características agrônômicas essenciais, como maior resistência à seca, ao frio e ao calor do que a maioria das espécies comumente cultivadas no país. Também apresenta ciclo curto, elevada qualidade e rendimento de óleo, fator este que faz com que a cultura do girassol seja uma opção mais próspera para a produção de biocombustível (SILVA et al., 2007).

Inicialmente podem ser obtidos alguns produtos principais processados como o óleo bruto, torta desengordurada, grãos e plantas integrais, os quais são suporte para produção de seus derivados. A maioria do óleo bruto que é produzido é utilizado para subprodutos na alimentação humana, como o óleo de cozinha e para saladas, margarina, gordura vegetal hidrogenada e bases para alguns temperos. Já o óleo refinado é mais utilizado na preparação de fármacos e cosméticos. Também é extraída a torta desengordurada, que possui valor biológico considerável, devido ao teor de proteína, podendo ser produzido farelo para alimentar animais. Em menor escala há os subprodutos para alimentação humana, como o grão, mais conhecido

como “amêndoa”. Para alimentação de bovinos, uma das opções é a silagem, que possui mais fibras e maior teor de proteína que a silagem de milho (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005).

De acordo com dados publicados em setembro de 2018 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2017/18, o estado maior produtor de girassol do Brasil foi o Mato Grosso, com 60,5 mil hectares, e uma produção total de 101,9 mil toneladas de grãos colhidos. Com base nesses mesmos dados é possível verificar que a área plantada teve aumento significativo, em grande parte devido ao baixo preço pago a outras culturas em comparação com a oleaginosa. Isto impulsionou os produtores a investirem no girassol.

A maior média de produtividade registrada na safra 2016/17 foi na região Centro Oeste, com 1.702 kg.ha⁻¹, enquanto que a maior produtividade foi em torno de 2.300 kg.ha⁻¹ no Distrito Federal. A região Centro-Oeste cultiva, em média, 84,5% de toda área planta, concentrando 84,4% de toda produção do país. Para a safra de 2018/19 estima-se que em Mato Grosso mantenha a área cultivada. Enquanto que para o Rio Grande do Sul a expectativa apontada pela CONAB (novembro/2018) é de que se mantenham os mesmos dados da safra 2017/18, que foi de 3,3 mil ha, podendo talvez variar para mais ou para menos 0,2 mil hectares, ou seja, mínimo de 3,1 mil ha e máximo de 3,5 mil ha. A estimativa para a safra 2018/19 é de que a produtividade.ha⁻¹ e produção total do Brasil tenha um aumento considerável. Ainda de acordo com a Conab (2018) o preço mínimo pago ao produtor na safra 2017/18 variou de R\$ 54,00 a R\$ 64,00 a saca de 60 kg, de acordo com o estado.

2.2 DIVERSIDADE MICROBIANA E SUAS FUNÇÕES

O solo é um sistema heterogêneo, intermitente e organizado, constituído de microhabitats que possuem distintas particularidades, nos quais encontram-se organismos que interagem em equilíbrio dinâmico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Mattos (2015) cita que dentre os cinco fatores que interagem na constituição e formação do solo (o material de origem, o relevo, clima, tempo e organismos) a biota, compreende os microrganismos e a vegetação superficial.

De acordo com Correia e Oliveira (2000) são diversas as espécies de microrganismos, como fungos e bactérias, que habitam o solo, com as mais diversas funções. A diversidade de microrganismos resulta em diversos grupos funcionais, onde na perda de alguma espécie haveria outra que desempenharia a mesma função, dando assim continuidade aos processos. O solo denota uma alta atividade de redundância que resulta em maior capacidade de manter o equilíbrio dos processos ecológicos, mesmo com perturbações (ZILLI et al., 2003).

Os microrganismos são agrupados de acordo com suas atuações funcionais dentro do ecossistema (TORSVIK e OVREÅS, 2002). De acordo com Moreira e Siqueira (2006), os microrganismos são os responsáveis pelas reações bioquímicas que ocorrem no solo, as quais são relacionadas com a transformação da matéria orgânica do solo, com o intemperismo rochoso, na gênese do solo e também como regulador de nutrientes. Assim, representam fonte e dreno de carbono, regulando a troca de nutrientes para o desenvolvimento vegetal.

De acordo com Coelho (2016) o grupo das bactérias e Archaea possuem uma relação primordial nos processos do meio ambiente. Além de serem gerais, elas detêm grandes multifuncionalidades fisiológicas e metabólicas, operando em todos os ciclos biogeoquímicos, sendo maior que a de alguns animais e plantas, onde as interações com outras formas de vida são intensamente abrangentes.

Tabela 2 Estimativa da abundância de microrganismos do solo no ambiente.

Microrganismos	Número/g.solo ⁻¹	Biomassa dentro da zona de raízes/Kg.ha ⁻¹
Bactérias	10 ⁸	500
Actinomicetos	10 ⁷	500
Fungos	10 ⁶	1500

Fonte: Pepper e Josephson (1996); Pepper et al. (1996).

A região rizosférica é considerada um paraíso de microrganismos, onde há alta estabilidade e uma maior disponibilidade de substratos orgânicos e fontes para o crescimento vegetal, e favorecendo a atividade microbiana (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Silva et al. (2011) cita que a atividade microbiana na região rizosférica propicia o desenvolvimento de plantas por meio de interações e de condições favoráveis. O efeito rizosférico ocorre pela produção de compostos que aumentam a atividade e participam de modificações da comunidade microbiana presente, através da liberação de células, mucilagens, exsudatos e lisados, pelas plantas para o solo (CORDEIRO et al., 2012).

Por outro lado, o solo não rizosférico é considerado por Moreira e Siqueira (2006) como “um deserto nutricional”, onde a maioria dos microrganismos está morta ou em dormência, devido à baixa disponibilidade de nutrientes fundamentais ao metabolismo microbiano, sendo eles carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P). De fato, a riqueza de microrganismos no solo é definida e dependente de fatores como a disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, umidade, textura do solo (MATTOS, 2015). Variações de precipitação, temperatura e umidade do solo, são importantes quanto às alterações metabólica dos microrganismos (MOURA et al., 2015).

A microbiota pode ser empregada para estudo dos atributos edáficos, afinal os microrganismos são fontes e depósitos de nutrientes nos ecossistemas (SANTOS e MAIA, 2013). Dentre as propriedades microbianas que podem ser empregadas para o monitoramento e possíveis transformações ambientais devido ao uso agrícola, estão a diversidade de microrganismos existentes, as atividades enzimáticas, a taxa de respiração e também a biomassa microbiana. São alguns dos indicadores que podem também ser úteis para a devida orientação do planejamento e a verificação do manejo das práticas agrícolas (FERREIRA, STONE e MARTIN-DIDONET, 2017).

Tanto a rotação de culturas quanto a manutenção de cobertura vegetal no solo melhoram as propriedades físicas, químicas e biológicas (LOURENTE et al., 2010). Dentre as biológicas tem-se o microrganismos que aumentam e diversificam sua população dentro do sistema de conservação do solo, onde os mesmos participam de diversos processos que ocorrem no solo, desde a transformação de compostos como na participação em ciclos biogeoquímicos. Isto se deve pois essa diversidade de plantas no sistema de rotação de culturas influencia diretamente as populações microbianas, devidos aos restos culturais como pela influência dos diferentes sistemas radiculares (CORDEIRO, 2011).

As imposições da agricultura atreladas à integridade do ecossistema, foram os estímulos para a identificação dos parâmetros de avaliação das alterações ambientais, sinalizando quanto ao nível de qualidade e sustentabilidade na produção rural (COELHO, 2016). Mesmo pela compreensão da importância das atividades exercidas pelos microrganismos nos solos, desde funcionais, sua diversidade, até as relações entre eles e ecossistema, há um reduzido número de estudos ligados. Muito se deve pelo fato de terem uma ampla diversidade, pelas condições e adaptações ao solo, como também aos diversos métodos de manejo que são realizados no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.2.1 Atividades microbianas e de suas enzimas no solo

As enzimas estão diretamente ligadas ao metabolismo das células ativas, sendo as fontes de enzimas os microrganismo, as plantas e a fauna, onde a preservação ambiental tem grande impacto para manter a manutenção e equilíbrio do sistema. A biota auxilia na elaboração de enzimas que podem ser excretadas ou ligadas à membrana externa, procedendo assim a hidrólise das biomoléculas com alto peso molecular em moléculas mais simples que podem ser absorvidas (PEIXOTO, 2010).

Os microrganismos são responsáveis por diversas transformações que ocorrem no solo, através de processos usualmente mediados por suas enzimas. Inserem uma grande

quantidade de enzimas no solo, onde parte encontra-se ativa, sendo importantes na constituição de moléculas orgânicas para manter a estabilidade química do ecossistema (PEIXOTO, 2010). Produzem diversas enzimas, que são responsáveis pela biocatálise e decomposição de moléculas orgânicas (BASTOS, 2015). A atividade enzimática no solo é resultante da ação de enzimas extracelulares, podendo ou não estar livres no solo, adsorvidas nos coloides ou ainda imobilizadas nos complexos húmicos, enquanto as enzimas intracelulares podem operar como extracelulares após o rompimento das células (KNOB, 2005).

O amido é um homopolissacarídeo formado de dois tipos de biomoléculas, a amilose e a amilopectina, constituídas por unidades de glicose (AMARAL et al., 2007). Enquanto a amilose é constituída por unidade de glicose ligadas por ligações glicosídicas α -1,4, dando origem a uma cadeia linear, a amilopectina é constituída de unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6, dando origem a uma estrutura ramificada (DENARDIM; SILVA, 2009). Ainda segundo os autores, o amido atua como carboidrato de reserva e é encontrado em raízes, tubérculos e outras estruturas de plantas. Assim, as amilases são enzimas responsáveis pela hidrólise de moléculas de amido (FERNANDES, 2009).

Materiais celulósicos, ou lignocelulósicos, são os principais constituintes da biomassa vegetal, formados majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina (OGEDA; PETRI, 2010). A celulose é formada por unidades de glicose associadas através de ligações glicosídicas β -1,4 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise da celulose, liberando polímeros de glicose, celobiose e glicose são denominadas de celulases. A degradação da celulose é usualmente lenta nos solos, dependendo de diversos fatores ligados à concentração, localização e mobilidade das celulases (KNOB, 2005).

As enzimas amilolíticas e celulolíticas são de grande interesse devido a participarem da ciclagem de nutrientes, ou seja, são enzimas que catalisam a hidrólise dos componentes da matéria orgânica e biomassa vegetal (GRÉGGIO; NAHAS, 2007).

As enzimas proteolíticas degradam proteínas (MARTINS et al., 2016), catalisando reações de hidrólise de diversas ligações peptídicas em proteínas e em peptídeos (SILVA-LOPEZ, 2009). No caso de proteases extracelulares produzidas por microrganismos, sua atuação é fundamental na ciclagem no nitrogênio, como etapa inicial para a disponibilização de nitrogênio mineral nos solos. Neste sentido, o nitrogênio é o principal nutriente limitante ao crescimento vegetal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As lipases e esterases são enzimas responsáveis pela hidrólise de lipídios e gorduras, como os triacilgliceróis (VIEIRA, 2016). Carvalho et al. (2005) indicam estas enzimas como biocatalisadores versáteis que conseguem catalisar diversas reações, tanto em meio aquoso

quanto em meio com restrita quantidade de água. Tavares (2013) classifica as enzimas como sendo carboxilesterases e as lipases verdadeiras, onde a única diferença entre elas está relacionado a capacidade de catalisar a hidrólise de ligações ésteres de ácidos graxos.

Nos solos, o fósforo (P) é o nutriente que se encontra em menor disponibilidade devido à sua baixa mobilidade (CASTRO, 2015). Essa baixa disponibilidade resulta da presença do P em formas orgânicas e inorgânicas, limitando o desenvolvimento dos vegetais (JUNIOR et al., 2010). A forma orgânica está associada aos complexos de matéria orgânica, enquanto as inorgânicas podem estar precipitadas com íons Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , ou ainda adsorvidas em partículas minerais presentes do solo (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006; REIS et al., 2008). Junior et al. (2010) destacam que o P no solo pode passar por vários processos biogeoquímicos que podem alterar sua forma e disponibilidade.

A maior parte da solubilização do fosfato inorgânico ocorre na região rizosférica dos vegetais, pela acidificação, que ocorre durante a liberação de prótons pelos vegetais e de ácidos orgânicos produzidos por microrganismos (REIS et al., 2008). Os responsáveis pela solubilização são chamados de microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico. Através da liberação de ácidos orgânicos (como o glucônico, cítrico, glutâmico, oxálico, láctico, fumárico, tartárico e succínico), estes atuam na forma de doadores de prótons e agentes quelantes de íons, contribuindo para a solubilização de P no solo (OLIVEIRA, 2016). Segundo Marra (2012) a capacidade dos microrganismos em solubilizar fosfato está relacionada com a diminuição do pH na região rizosférica. Dentre as bactérias com potencial de realizar a solubilização, Castro (2015) cita alguns dos gêneros, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia*.

A inoculação destes microrganismos solubilizadores vem sendo proposta como uma forma de diminuir ou até mesmo substituir o uso de fertilizantes comerciais, devido ao melhor aproveitamento do nutriente no solo (JUNIOR et al., 2010). Reis et al. (2008) citam que esses microrganismos também podem possuir a habilidade de produzir fitormônios, vitaminas e antibióticos que podem atuar na promoção do crescimento e desenvolvimento dos vegetais.

O controle biológico é uma possibilidade investigada para o combate a moléstias que afetam plantas. Neste caso, os elementos para o biocontrole são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, que são afetados pelo ambiente (NOGUEIRA, 2012). A antibiose, termo empregado para descrever alguns dos efeitos do biocontrolador sobre seu alvo, pode resultar da síntese de substâncias antimicrobianas, competição por espaço e nutrientes, mudança no pH ou ainda a síntese de compostos voláteis, onde este último possui grande eficiência no impedimento do desenvolvimento fúngico (SOUZA et al., 2015).

Na aplicação de microrganismos como agentes biocontroladores é possível que ocorra o antagonismo direto do microrganismo sobre o patógeno, mas também a indução de resistência no vegetal e o antagonismo direto de forma concomitante (TUZUN; KLOEPPER, 1995). As substâncias antimicrobianas produzidas são um mecanismo de antagonismo, onde os agentes de biocontrole o exibem com muita frequência, porém podem não ser os únicos (ROMEIRO, 2007).

2.3 FUNCIONALIDADES MICROBIANAS E BIOTECNOLOGIA

As enzimas são catalisadores biológicos que possuem como finalidade acelerar a velocidade das reações bioquímicas, minimizando a energia de ativação. Essas enzimas são sintetizadas nas células atuantes, não sendo consumidas e não modificando o equilíbrio químico da reação (FURINI, 2017). Para além das atuações biológicas, as enzimas são empregadas na biotecnologia há muitos anos, com crescente demanda por novas enzimas e moléculas bioativas para utilização em áreas industriais (STABACH, 2013).

De fato, a maior parte das enzimas significativas para a área industrial tem sua origem nos microrganismos (STABACH, 2013). Essas enzimas propiciam grandes utilidades para as indústrias pelas conversões biocatalíticas que realizam, trazendo assim vantagens eficientes e econômicas (OLIVEIRA, 2006). A principal vantagem que essas enzimas possuem está ligada à alta especificidade das reações que catalisam, sendo possível a obtenção de produtos. Outras vantagens citadas são a diminuição de problemas tanto ambientais como toxicológicos (ARRUDA, 2017).

Neste contexto, a bioprospecção compreende a identificação, avaliação e exploração sistemática da diversidade de vida existente em determinado local com o propósito de novas demandas para a área industrial (ALMEIDA; COLLARES; BARBOSA, 2015). Considerando a elevada diversidade microbiana dos solos, pesquisas podem revelar microrganismos produtores de enzimas com características desejáveis para aplicação comercial (FURINI, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 IMPLANTAÇÃO E MANEJO DA CULTURA DO GIRASSOL

O cultivo foi implantado e conduzido no município de Salvador das Missões, localizado na região noroeste do Rio Grande do Sul (latitude 28° 06' 00.56" S e longitude 54° 51' 02.02" O), e altitude de 252 metros em relação ao nível médio do mar. O solo pertence à Unidade de Mapeamento Santo Ângelo, sendo classificado como Latossolo Vermelho Distroférico Típico e clima Cfa (subtropical de verão quente).

Antes da implantação do experimento foi realizada análise química do solo, coletado de 0 a 20 cm de profundidade, de acordo com indicação de amostragem para o sistema plantio direto consolidado. A correção do solo e posterior adubação foram realizadas a partir do Manual de Calagem e Adubação (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO, 2016). A partir dos cálculos de recomendação realizados, verificou-se que não era necessária a calagem. A adubação recomendada foi de 1,1 Kg da formulação NPK comercial de 05-20-20, aplicados na linha de semeadura, e a aplicação de 146 g de uréia (46%) aplicados à lanço, 30 dias após a emergência.

O cultivo à campo foi conduzido de Novembro/2017 a Fevereiro/2018 em sistema de plantio direto, com manejo de plantas espontâneas realizado por capina manual antes do plantio. A parcela única foi constituída por 13 linhas de 6 m de comprimento, utilizando espaçamento de 90 cm entre linhas e de 25 cm entre plantas.

A cultivar de girassol utilizada foi a ADV 5504 (Advanta sementes). A cultivar possui um ciclo precoce de 120 dias. É um material utilizado devido a sua alta capacidade de produção de óleo, possuindo uma ampla adaptabilidade climática. A semeadura foi realizada no dia 26 de novembro de 2017, seguindo as recomendações do Zoneamento Agrícola para a cultivar, adotando-se o método de semeadura mecanizada. Foram semeadas 4 sementes por metro linear.

Durante o período de condução do experimento (do plantio até a coleta) não foram realizados nenhum tipo de manejo (controle de plantas espontâneas, pragas, doenças) da cultura implantada.

3.2 COLETA DE SOLO RIZOSFÉRICO E NÃO RIZOSFÉRICO NA CULTURA DE GIRASSOL E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a coleta do solo, foram utilizadas as 5 linhas internas, descartando as bordaduras. A coleta do solo foi realizada o dia 09 de fevereiro de 2018, quando o girassol estava no estágio reprodutivo R4, com média de 1,9 metros de altura das plantas.

A amostragem de solo rizosférico foi realizada a partir da coleta aleatória de plantas ($n = 5$), cuidadosamente removidas do solo para evitar danos ao sistema radicular. O solo frouxamente aderido às raízes foi removido por vigorosa agitação manual, sendo considerado como solo rizosférico a fração que permaneceu firmemente aderida às raízes. O solo da região rizosférica foi coletado com o auxílio de espátulas estéreis, acondicionado a frascos de vidro estéreis e, posteriormente encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Cerro Largo, RS, para o processamento das amostras.

Para a coleta das amostras de solo não rizosférico foi amostrado solo do espaço médio entre as linhas de cultivo do girassol. Com o auxílio de pá de corte desinfetada, foram abertas trincheiras na profundidade de 0-10 cm, de onde foram retirados cinco blocos de solo que, após remoção das bordas, foram acondicionados em recipientes estéreis. Cada uma destas amostras simples foi levada ao laboratório para homogeneização e, após, utilizadas para constituir amostra composta de solo não rizosférico.

As amostras compostas de 10 g de solo rizosférico ou não rizosférico foram transferidas, de forma asséptica, a frasco Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (0,85% NaCl, m v⁻¹) estéril. Após, o Erlenmeyer passou por agitação mecânica de 120 rpm por 20 minutos, em temperatura ambiente, para homogeneização da amostra. A partir da suspensão resultante foram realizadas diluições decimais em série (de 10^{-1} a 10^{-8}) utilizando solução salina estéril. Estas diluições foram utilizadas (100 μ L) para inocular, através da técnica de espalhamento com alças de Drigalski, a superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura sólido Agar Padrão para Contagem (PCA). Estas placas foram então incubadas a 30 °C por um período de 96 h.

Amostras de solo rizosférico e não rizosférico também foram submetidas a secagem em estufa (60 °C). Após as amostras atingirem massa constante, foi calculada a massa de solo seco.

3.3 CONTAGEM DE BACTÉRIAS

Placas com meio de cultura PCA contendo 20 a 200 colônias bacterianas, após a incubação (30 °C por 96 h), foram utilizadas para a enumeração de bactérias, utilizando contador de colônias. O número de bactérias cultiváveis presentes nas amostras de solo foi calculado considerando o volume de inóculo aplicado, os fatores de diluição empregados e a massa de solo em base seca. Os resultados foram apresentados em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo seco (UFC g⁻¹ solo seco).

3.4 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

Todas as placas do procedimento anterior foram observadas quanto à morfologia das colônias bacterianas que foram capazes de se desenvolver nas condições de incubação. A seleção de bactérias para isolamento foi baseada em diferenças quanto a aspectos morfológicos coloniais. Colônias distintas foram isoladas em culturas puras através da técnica de esgotamento, utilizando alças de inoculação, em placas contendo meio PCA. Os isolados foram conservados à temperatura de 4 °C, e reinoculados em novas placas contendo PCA a cada 45 dias.

As placas cultivadas foram identificadas como “R”, para bactérias isoladas de solo rizosférico, e “NR”, para bactérias isoladas em solo não rizosférico.

3.5 COLORAÇÃO DE GRAM E MORFOLOGIA CELULAR

Os isolados bacterianos foram utilizados para produzir esfregaços em lâminas de vidro para microscopia, que foram submetidos ao protocolo de coloração de Gram, conforme descrito por Moreira, Carvalho e Frota (2015). A morfologia celular e o perfil de coloração foram observados com o auxílio de microscópio óptico de campo claro e aumento total de 1.000 vezes.

3.6 AVALIAÇÕES QUALITATIVAS DA FUNCIONALIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS

3.6.1 Produção de celulases

A habilidade celulolítica dos isolados bacterianos foi averiguada em triplicata ($n = 3$), através de cultivos em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido Ágar Carboximetil Celulose (Ágar CMC). Este meio possui a seguinte composição (g L^{-1}): CMC, 5,0; NaNO_3 , 2,0; K_2HPO_4 , 1,0; KCl, 0,5; MgSO_4 , 0,5; peptona, 0,5; ágar, 15,0; e água destilada, 1000 mL. A inoculação das placas contendo Ágar CMC foi realizada utilizando agulhas de inoculação, através de picadas com a biomassa bacteriana obtida de placas de PCA cultivadas com os isolados bacterianos a 30 °C por 24 h.

Seguindo-se a incubação das placas com Ágar CMC a 30 °C por 96 h, foi adicionada solução de lugol de Gram (2,0 g KI, 1,0 g I_2 , 300 mL de água destilada) e, após 3-5 min, as placas foram observadas quanto ao desenvolvimento de halos transparentes ao redor das colônias, indicador da produção de enzimas celulolíticas (KASANA et al., 2008).

3.6.2 Produção de amilases

A investigação da capacidade dos isolados bacterianos em hidrolisar amido foi realizada em triplicatas ($n = 3$), utilizando meio de cultura Ágar Amido (AA). Este meio de cultura possui a seguinte composição (g L^{-1}): amido solúvel, 10,0; extrato de levedura, 2,0; peptona, 5,0; MgSO_4 , 0,5; NaCl , 0,5; CaCl_2 , 0,15; ágar, 20; e água destilada, 1000 mL (SANTOS e MARTINS, 2003).

Placas de Petri contendo AA foram inoculadas utilizando agulhas de inoculação, através de picadas com a biomassa bacteriana obtida de placas de PCA cultivadas com as bactérias a 30 °C por 24 h. Seguindo-se a incubação das placas de Ágar Amido a 30 °C por 96 h, foi adicionada solução de lugol de Gram e as placas observadas quanto ao desenvolvimento de halos transparentes ao redor das colônias, indicadores da produção de enzimas amilolíticas.

3.6.3 Produção de proteases

A produção de enzimas proteolíticas pelos isolados bacterianos foi avaliada em triplicata ($n = 3$), através de cultivos em placas de Petri contendo Ágar Leite (AL). Este meio de cultura possui a seguinte composição (g L^{-1}): peptona, 5,0; extrato de levedura, 3,0; ágar, 15,0; água destilada, 900 mL; e leite UHT desnatado, 100 mL.

Placas de AL foram inoculadas utilizando agulhas de inoculação, através de picadas com a biomassa bacteriana obtida de placas de PCA cultivadas com as bactérias a 30 °C por 24 h. Seguindo-se incubação a 30 °C por 72 h, as placas foram observadas quanto ao desenvolvimento de halos transparentes ao redor das colônias, indicadores da produção de enzimas proteolíticas (RIFFEL e BRANDELLI, 2006).

3.6.4 Capacidade lipolítica

A capacidade de produção de esterases/lipases foi investigada em triplicata ($n = 3$), através de cultivos em Ágar Tributirina (TBA), composto por (g L^{-1}): peptona 5,0; extrato de levedura, 3,0; ágar 15,0; e tributirina, 10 mL (ERTUGRUL; DONMEZ; TAKAÇ, 2007). Os isolados foram inoculados em picada nestas placas e, após incubação a 30 °C por 48 h, as placas foram visualizadas quanto à presença de halos transparentes ao redor das colônias bacterianas, que indicaram a produção de esterases/lipases. Os isolados bacterianos que apresentaram atividade positiva em TBA foram classificados como lipolíticos (OLIVEIRA et al., 2017b).

3.6.5 Solubilização de fosfato inorgânico

A capacidade dos isolados bacterianos em solubilizar fosfato inorgânico insolúvel foi investigada em triplicada ($n = 3$), utilizando Ágar Pikovskaya (PVK), que possui a seguinte composição (g L^{-1}): glicose, 10,0; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5; NaCl, 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1; KCl, 0,2 g; extrato de levedura, 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,002; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,002 g (NAUTIYAL, 1999).

Placas de PVK foram inoculadas utilizando agulhas de inoculação, através de picadas com a biomassa bacteriana obtida de placas de PCA cultivadas com as bactérias a 30°C por 24 h. Seguindo-se incubação a 30°C por 7 dias, as placas foram observadas quanto ao desenvolvimento de halos transparentes ao redor das colônias, indicadores da capacidade bacteriana em solubilizar fosfatos.

3.6.6 Inibição de fungo fitopatogênico *in vitro*

A avaliação dos isolados bacterianos quanto ao potencial de antagonismo a *Rhizoctonia solani* foi adaptado do método de pareamento de culturas qualitativo descrito por Romeiro (2007). Para tanto, foram preparadas placas de Petri contendo meio de crescimento para o fungo fitopatogênico e do possível antagonista procarioto. Então, foi depositado, de forma asséptica, um disco (0,5 cm de diâmetro) de micélio e esporos do fungo sobre a superfície do meio Ágar Batata Dextrose (BDA), no centro da placa de Petri.

Com o auxílio de uma alça de repicagem, foi transferido, em quatro pontos equidistantes na borda da placa, o isolado bacteriano, possível antagonista. Durante a incubação (30°C), as placas foram examinadas periodicamente para observar a ocorrência de formação de halo de inibição do crescimento micelial.

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

As atividades enzimáticas das bactérias isoladas foram estimadas de forma semi-quantitativa através do Índice Enzimático (IE) (OLIVEIRA et al., 2006), calculado através da seguinte equação:

$$\text{IE} = \text{DMH}/\text{DMC}$$

onde:

DMH = diâmetro total da zona de hidrólise (halo de hidrólise + diâmetro da colônia bacteriana, mensurado em mm);

DMC = diâmetro da colônia bacteriana (mensurado em mm).

A capacidade solubilizadora de fosfato inorgânico dos isolados bacterianos foi avaliada através do Índice de Solubilização (IS), calculado pela seguinte equação:

$$IS = DMS/DMC$$

onde:

DMS = diâmetro total da zona de solubilização (halo de hidrólise + diâmetro da colônia bacteriana, mensurado em mm);

DMC = diâmetro da colônia bacteriana (mensurado em mm).

Todas as referidas mensurações serão realizadas utilizando paquímetro digital.

Os valores médios para as unidades formadoras de colônia foram comparados entre si pelo teste t ($p < 0,05$) (FERREIRA, 2011). Os resultados das triplicatas foram utilizados para calcular média e erro padrão, com auxílio de planilha eletrônica. Para o Índice Enzimático e o Índice de Solubilização, os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, empregando o Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas (SASM-Agri, versão 8.2 demo) (CANTERI et al., 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

No presente estudo, o solo rizosférico apresentou $1,5 \pm 0,23 \times 10^6$ A UFC g⁻¹ solo seco, sendo esse resultado significativamente superior ($P < 0,05$) àquele obtido para o solo não rizosférico, que resultou em $8,9 \pm 0,28 \times 10^5$ UFC g⁻¹ solo seco. Esses resultados são semelhantes aos observados em outros estudos, que reportaram maior contagem de bactérias em solo rizosférico, como observado para a cultura do milho (RAMOS et al., 2018).

A rizosfera pode ser definida como a região do solo que é influenciada pela raiz da planta, ambiente esse rico em nutrientes. O processo de rizodeposição de exsudatos pelas raízes, por exemplo, torna a região rizosférica um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos (ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016). Ainda, o ambiente a partir do qual os microrganismos são isolados (ambiente rizosférico ou ambiente não rizosférico) pode definir, as características que esses microrganismos apresentam, como suas funcionalidades fisiológicas e metabólicas.

Doze colônias bacterianas distintas foram isoladas a partir de cada amostra de solo, totalizando 24 isolados bacterianos (Tabelas 2 e 3). Estes isolados foram então submetidos à coloração de Gram. Esta técnica é um dos métodos relevantes e mais empregados na bacteriologia, tendo como objetivo a classificação das bactérias através de suas características tintoriais, de tamanho, morfologia e arranjo das células (FREITAS; PICOLI, 2007).

Dentre os 12 isolados de solo rizosférico avaliados para a morfologia celular, 83,33% (10) dos isolados apresentaram morfologia de bastonete, enquanto que 16,67% (2) apresentaram-se como cocos. Já para a coloração de Gram, 91,67% (11) dos isolados foram classificados como Gram-positivos, e 8,33% (1) Gram-negativos. Dos isolados que foram classificados como bastonetes 90% (9) demonstraram perfil Gram-positivo e 10% (1) de bastonete Gram-negativo. Todos os 2 isolados classificados como cocos apresentaram perfil Gram-positivo (Tabela 2).

Para os 12 isolados de solo não rizosférico avaliados pela morfologia celular, 11 dos isolados (91,67%) apresentaram-se como bastonetes e 1 isolado (8,33%) com forma de cocos. Para coloração de Gram foram 50% (6) de Gram-positivos e 50% (6) de Gram-negativos. Entre os isolados classificados como bastonetes, 54,55% foram Gram-positivos, enquanto que 45,45% foram Gram-negativos. O isolado classificado como coco demonstrou perfil tintorial Gram-negativo (Tabela 3).

Tabela 3. Morfologia celular e perfil de coloração de Gram para 12 bactérias isoladas de solo rizosférico na cultura do girassol.

ISOLADO	MORFOLOGIA	GRAM
R1	Bastonete	+
R3	Coco	+
R5	Bastonete	+
R10	Bastonete	-
R12	Bastonete	+
R19	Bastonete	+
R20	Bastonete	+
R21	Coco	+
R22	Bastonete	+
R23	Bastonete	+
R29	Bastonete	+
R32	Bastonete	+

Tabela 4. Morfologia celular e perfil de coloração de Gram para 12 bactérias isoladas de solo não rizosférico na cultura do girassol.

ISOLADO	MORFOLOGIA	GRAM
NR1	Bastonete	-
NR2	Coco	-
NR7	Bastonete	+
NR8	Bastonete	-
NR9	Bastonete	-
NR10	Bastonete	+
NR11	Bastonete	+
NR12	Bastonete	-
NR15	Bastonete	+
NR16	Bastonete	+
NR22	Bastonete	-
NR25	Bastonete	+

A análise quantitativa dos dados obtidos, mostra que, do total de isolados bacterianos avaliados para a coloração de Gram, 62,5% foram bastonetes-Gram positivos. Resultado este

que corrobora com o estudo de Santos et al. (2012), que indicaram 51,6% de bastonetes Gram-positivos, e com o trabalho de Santos e Batista (2015) onde houve predominância de bastonetes Gram-positivos em solo sem contaminação. Estes últimos autores ainda investigaram isolados de solo contaminado com resíduo sólido, obtendo assim maior percentual de bactérias do tipo cocos Gram-positivos.

Em estudo realizado sobre a diversidade microbiológica em solo de Terra Preta, Amarante et al. (2010) verificaram a maior ocorrência de cocos Gram-negativos (81,25%). Alchieri, Gelinski, Minotto (2016), analisando 21 isolados coletados em solos de diferentes cultivares de videira, obtiveram 60,86% de isolados Gram-negativos, sendo o restante de bactérias Gram-positivas.

Moreira; Siqueira (2006) demonstram que em solo rizosférico das culturas de soja e trigo, bactérias Gram-negativas podem ser mais favorecidas devido às suas altas taxas de crescimento e por responderem mais rapidamente a aminoácidos e açúcares. Assim sendo, Ramos et al. (2012) remetem essas alterações de densidade e de grupos funcionais da microbiota aos diferentes manejos que ocorrem nos solos e pelas diferentes coberturas vegetais que são cultivadas.

4.2 FUNCIONALIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS

4.2.1 Atividade celulolítica

A atividade celulolítica dos isolados bacterianos foi testada em meio de cultura contendo carboximetilcelulose (CMC). A CMC não é suscetível de absorção direta pelos microrganismos, sendo assim necessário sua hidrólise. De acordo com Menezes e Barreto (2015) é necessário que ocorra a biodegradação da carboximetilcelulose pelas enzimas hidrolíticas extracelulares (celulases), para posterior absorção e processamento pelo metabolismo celular microbiano.

Para os isolados bacterianos do solo rizosférico, observou-se que, dos 12 isolados, 50% (6) produziram halo de hidrólise em Ágar CMC (Tabela 4). Destes, pode-se dividir em dois grupos distintos de atividade enzimática. Em um primeiro grupo, os isolados bacterianos R19 e R20 resultaram em índice enzimático de $5,4 \pm 0,57$ e $5,4 \pm 1,40$, respectivamente, ambos com valores médios de IE estatisticamente superiores aos dos demais isolados. No segundo grupo, em ordem decrescente de atividade, os isolados R22, R12, R29 e R23 variaram seus índices enzimáticos entre 2,7 e 2,2, para o maior e menor IE, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 5. Atividade celulolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
R12	15,8 ± 0,91	39,0 ± 0,61	2,5 ± 0,16 B
R19	5,7 ± 0,49	30,5 ± 0,74	5,4 ± 0,57 A
R20	5,4 ± 0,93	26,7 ± 1,60	5,4 ± 1,40 A
R22	16,4 ± 0,68	44,5 ± 0,58	2,7 ± 0,15 B
R23	20,7 ± 1,80	45,3 ± 0,50	2,2 ± 0,21 B
R29	21,3 ± 0,85	49,5 ± 1,10	2,3 ± 0,12 B

Diâmetro médio do halo de hidrólise (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE). As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições (n = 3) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Para os isolados bacterianos de solo não rizosférico verificou-se hidrólise de celulose em apenas 3 (25%), do total de 12 isolados (Tabela 5). Quanto aos IE, dois grupos foram formados. No primeiro está o isolado NR25 que obteve o maior índice enzimático de $5,5 \pm 0,52$, sendo este valor considerado estatisticamente superior do que os demais. No segundo grupo foram alocados os isolados NR9 e NR15, com IE menores, sendo $2,1 \pm 0,08$ e $1,9 \pm 0,11$, respectivamente. Os isolados do segundo grupo não tiveram diferença estatisticamente significativa entre si.

Tabela 6. Atividade celulolítica de bactérias isoladas de solo não rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
NR 9	19,0 ± 0,66	40,1 ± 0,28	2,1 ± 0,08 B
NR 15	21,9 ± 0,87	40,6 ± 0,78	1,9 ± 0,11 B
NR 25	5,6 ± 0,28	30,6 ± 1,53	5,5 ± 0,52 A

Diâmetro médio do halo de hidrólise (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE). As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições (n = 3) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Do total de isolados avaliados para a atividade celulolítica, 37,5% apresentaram desenvolvimento de halo, ou seja, resultaram em hidrólise positiva da CMC nas condições de cultivo empregadas.

Em estudo similar, Ramos et al. (2018) verificaram que 65,5% dos isolados bacterianos de solo rizosférico de milho produziram halo, enquanto que 57,9% dos isolados de solo não rizosférico secretaram celulases. Silva et al. (2015), em estudo realizado com actinobactérias,

observaram que 21 linhagens (75%) desenvolveram halo de degradação. Oliveira et al. (2006) trabalhando com rizóbios isolados da Amazônia Central, observaram que apenas 9% desenvolveram atividade celulolítica. Já Sacco (2013) isolou 16 bactérias oriundas de consórcios bacterianos degradadores de material celulósico já formados, tendo verificado que nenhuma bactéria secretou enzimas celulolíticas.

4.2.2 Atividade de solubilização de fosfato inorgânico

Dentre os 12 isolados bacterianos rizosféricos avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato, verificou-se que apenas 1 (8,33%) apresentou halo de solubilização. O isolado R19 apresentou um índice de solubilização de $2,4 \pm 0,08$ (Tabela 6). Em contrapartida, dos 12 isolados de solo não rizosférico, nenhum demonstrou capacidade de solubilização. Assim, comparando os 24 isolados cultivados em meio de cultivo contendo fosfato tricálcico, o percentual de isolados que desenvolveu halo pela solubilização deste componente foi de 4,17%.

Tabela 7. Atividade de solubilização de fosfato inorgânico por bactérias isoladas de solo rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IS
R19	$9,3 \pm 0,14$	$23,0 \pm 0,64$	$2,4 \pm 0,08$

Diâmetro médio do halo (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice de Solubilização (IS) para 12 isolados bacterianos celulolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para o isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Como salientam Fernández et al. (2005), a diversidade de microrganismos capazes de solubilizar fosfato inorgânico é variada para cada tipo de solo. Os mesmos autores verificaram em seu estudo que apenas 0,06% do total de bactérias teve potencial solubilizador de fosfato inorgânico. Chagas Júnior et al. (2010) observaram que 33,2% dos isolados de rizóbio coletados em solo da Amazônia produziram halo de hidrólise, enquanto que Pedrinho et al. (2010), obteve 46,55% isolados bacterianos solubilizadores. Em solo sob diferentes tipos de manejo e diferentes cultivos, Cerezini et al. (2009) isolaram 35 bactérias, sendo que todas produziram halo de solubilização de fosfato, enquanto que de 68 linhagens de bactérias coletadas em solo cultivado com cana-de-açúcar, 75% apresentaram capacidade de solubilizar fosfato (LIRA-CADETE, et al., 2012), e de 30 isolados de bactérias diazotróficas, 90% apresentaram desenvolvimento de halo de solubilização de fosfato inorgânico.

Em estudo realizado com microrganismos solubilizadores de fosfato, Barea et al. (2005) verificaram que em solo rizosférico a concentração desses microrganismo é geralmente maior. Taurian et al. (2010) justificam tal fato pela região rizosférica conter mais exsudatos, os quais são liberados pelo sistema radicular da planta, que atuam como fontes de carbono disponível para os organismos que ali habitam. Modificações quantitativas de bactérias solubilizadoras no solo se devem, entre outros, pelas variações da liberação dos exsudatos das plantas através de suas raízes (SOUCHIE; ABBOUD, 2007).

4.2.3 Atividade amilolítica

Para a atividade amilolítica rizosférica, houve desenvolvimento de halo de hidrólise para 7 dos isolados bacterianos (58,33%) cultivados em Ágar Amido (Tabela 7). Os isolados R1, R19 e R20, variaram seus índices enzimáticos entre 1,0 e 1,1, sendo considerados estatisticamente iguais entre si. Já os isolados bacterianos R22, R23, R29 e R32 tiveram crescimento positivo para a atividade, porém devido ao seu rápido crescimento não foi possível mensurar o diâmetro médio da colônia (DMC) e do halo (DMH).

Tabela 8. Atividade amilolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
R1	18,3 ± 1,85	20,1 ± 1,44	1,1 ± 0,05 A
R19	28,9 ± 2,14	29,9 ± 1,84	1,0 ± 0,01 A
R20	26,6 ± 0,55	29,6 ± 0,74	1,1 ± 0,01 A
R22	POS*	POS	POS
R23	POS	POS	POS
R29	POS	POS	POS
R32	POS	POS	POS

Diâmetro médio do halo (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE) para 7 isolados bacterianos amilolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições (n = 3) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. POS: Atividade enzimática positiva (colônias e halos não mensurados devido ao crescimento do isolado).

Dos 12 isolados de solo não rizosférico 50% (6) produziram halo de degradação de amido (Tabela 8), sendo possível dividi-los em dois grupos a partir dos índices enzimáticos calculados. No primeiro grupo encontra-se o isolado NR2, que obteve índice enzimático de 1,4 ± 0,07, sendo seu IE estatisticamente maior que os demais isolados com atividade positiva. No segundo grupo obteve-se os isolados NR16 e NR25, ambos com índices de 1,0.

Tabela 9. Atividade amilolítica de bactérias isoladas de solo não rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
NR2	13,8 ± 2,09	18,3 ± 2,34	1,4 ± 0,07 A
NR8	POS*	POS	POS
NR9	POS	POS	POS
NR15	POS	POS	POS
NR16	28,0 ± 0,85	28,9 ± 0,53	1,0 ± 0,01 B
NR25	31,9 ± 2,44	32,9 ± 2,66	1,0 ± 0,01 B

Diâmetro médio do halo (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE) para 6 isolados bacterianos amilolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. POS: Atividade enzimática positiva (colônias e halos de hidrólise não mensurados devido ao crescimento do isolado).

Da soma dos isolados amilolíticos, tanto de solo rizosférico como de não rizosférico, obteve-se um percentual de 54,17% de bactérias capazes de hidrolisar amido. Enquanto que Silva et al. (2009) observaram, de isolados de feijão caupi, que 29% das linhagens secretavam amilase; em cana-de-açúcar, os mesmos autores verificaram que 7% dos isolados apresentaram atividade amilolítica. Percentual similar ao feijão caupi, resultou o estudo de Oliveira et al. (2006) com isolado de rizóbia na Amazônia Central. Já Silva et al. (2015) verificaram que 82% dos isolados de actinobactérias houve desenvolvimento de uma zona mais clara ao redor colônias, indicando a degradação do amido. Cordeiro e Nahas (2012) observaram, em sistema de rotação de culturas com girassol, maior atividade de amilase em solo rizosférico do que em solo não rizosférico.

Junqueira, Cervelatti (2013) concluíram que, para haver abundância de microrganismos que hidrolisam amido, é necessário que os solos estejam preservados com o máximo de biodiversidade na região, obtendo assim altas taxas de atividades enzimáticas. Oliveira et al. (2006) verificaram que a decomposição do amido tem influência positiva durante o processo de nodulação por rizóbios amilolíticos em plantas. Marchiori Júnior, Melo (1999) verificaram que em solo com cultivo anual, a atividade enzimática amilolítica foi menor, em comparação com a mata nativa, possivelmente pelo fato de que o manejo do solo influencia na quantidade de carbono na forma de amido, disponível para a hidrólise pelos microrganismos.

4.2.4 Atividade lipolítica

Observou-se que 58,33% (7) dos isolados de solo rizosférico tiveram resultado positivo para a atividade lipolítica (Tabela 9). Pertencente ao primeiro grupo podemos citar o isolado bacteriano R3 que obteve o maior índice enzimático de $1,8 \pm 0,05$, sendo o valor médio

estatisticamente superior aos demais isolados. Em um segundo grupo está o isolado R21, com índice de $1,6 \pm 0,15$, sendo assim sua média enzimática é estatisticamente inferior ao isolado anterior, porém maior que dos demais. No terceiro grupo há os isolados bacterianos R19, R20, R23 e R22 com variação de seus IE entre 1,3 e 1,0.

Tabela 10. Atividade lipolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
R1	7,9± 0,83	10,3 ± 0,53	1,3 ± 0,07 C
R3	5,6± 0,31	9,6 ± 0,28	1,8 ± 0,05 A
R19	10,8± 0,48	14,0 ± 0,93	1,3 ± 0,05 C
R20	14,5± 0,37	16,8 ± 0,30	1,2 ± 0,01 C
R21	7,5± 0,05	11,1 ± 1,11	1,6 ± 0,15 B
R22	19,2 ± 0,35	20,3 ± 0,62	1,0 ± 0,02 C
R23	17,0 ± 0,67	18,6 ± 0,66	1,1 ± 0,00 C

Diâmetro médio do halo (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE) para 7 isolados bacterianos lipolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Para bactérias rizosféricas, a atividade lipolítica foi verificada em 9 isolados (75%) (Tabela 10). Considerando os isolados onde houve a possibilidade de mensurar colônias e halos, foi possível separá-los em três grupos. O primeiro grupo é composto pelo isolado NR7, com índice enzimático de $1,5 \pm 0,07$, estatisticamente superior que os demais isolados. No segundo grupo está o isolado NR2, com índice de $1,3 \pm 0,60$. No terceiro grupo estão os isolados NR16, NR9, NR15 e NR25, com variação de 1,2 e 1,1, entre o maior e o menor, respectivamente.

Tabela 11. Atividade lipolítica por bactérias isoladas de solo não rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
NR1	POS	POS	POS
NR2	6,0± 0,24	7,8 ± 0,10	1,3 ± 0,60 B
NR7	10,2± 0,62	15,5 ± 0,52	1,5 ± 0,07 A
NR9	18,4± 0,83	19,9 ± 0,34	1,1 ± 0,03 C
NR11	POS*	POS	POS
NR12	POS	POS	POS
NR15	14,2 ± 0,64	16,1 ± 0,84	1,1 ± 0,01 C
NR16	13,5 ± 0,27	15,6 ± 0,01	1,2 ± 0,02 C
NR25	14,4 ± 0,26	16,3 ± 0,37	1,1 ± 0,01 C

Diâmetro médio do halo (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE) para 9 isolados bacterianos lipolíticos. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. POS: Atividade enzimática positiva (colônias e halos de hidrólise não mensurados devido à crescimento do isolado).

Sendo assim, dos 24 isolados de solo da cultura do girassol, verificou-se que 66,67% dos isolados teve desenvolvimento de halo, sendo positiva a atividade hidrolítica de lipases. Investigando isolados de rizóbia da Amazônia Central, Oliveira et al. (2006) verificaram que 4,5% dos isolados produziu halo de hidrólise para a atividade lipolítica. De coletas de solo realizadas no Manguezal do Alemão (São Paulo), Vieira et al. (2016) observaram que 16 das 17 bactérias isoladas, tiveram atividade positiva com desenvolvimento de halo. Oliveira et al. (2017) isolou 18 bactérias de solo de área urbana, sendo que todas (100%) produziram halo de hidrólise em Ágar tributirina. O mesmo percentual de Oliveira et al. (2017b) foi observado por Carvalho (2012) para bactérias isoladas de solo contaminado com resíduo de óleo vegetal.

De acordo com Moreira, Siqueira (2006) os lipídios são compostos orgânicos presentes na biomassa vegetal/animal, onde sua quebra pelas enzimas lipases é, portanto, necessária para a degradação desses lipídios.

4.2.5 Atividade proteolítica

Dos 12 isolados bacterianos de ambiente rizosférico (Tabela 11), verificou-se presença de halo em 8 (66,67%) dos isolados cultivados em meio Ágar Leite (AL), sendo que para 7 isolados não foi possível mensurar o halo de hidrólise, pelo seu rápido crescimento. Para o isolado R19 foi possível observar e mensurar o diâmetro do halo e da colônia, atingindo índice enzimático de $2,5 \pm 0,18$.

Tabela 12. Atividade proteolítica de bactérias isoladas de solo rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
R5	POS	POS	POS
R12	POS	POS	POS
R19	$13,5 \pm 1,46$	$34,5 \pm 1,15$	$2,5 \pm 0,18$ A
R20	POS*	POS	POS
R22	POS	POS	POS
R23	POS	POS	POS
R29	POS	POS	POS
R32	POS	POS	POS

Diâmetro médio do halo (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE) para 8 isolados bacterianos proteolítica. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. POS: Atividade enzimática positiva (colônias e halos de hidrólise não mensurados devido à crescimento do isolado).

Para os isolados do ambiente não rizosférico, oito (66,67%) dos isolados desenvolveram halo de hidrólise, sendo que quatro (33,33%) dos isolados avaliados obtiveram crescimento, porém não mensurável, devido ao seu rápido crescimento no meio de cultivo (Tabela 12). Dos isolados que desenvolveram halo mensurável, temos o grupo de isolados NR16, NR9 e NR25, com IE que variaram de 2,7 a 2,3, entre maior e menor, respectivamente, sendo assim, estatisticamente seus índices são maiores que dos demais isolados. No segundo grupo tem-se o isolado NR2 com índice de $1,4 \pm 0,10$, estatisticamente menor que os demais isolados mensuráveis.

Assim, os isolados que foram capazes de desenvolver halo de hidrólise totalizaram 16, ou seja, 66,67% do total de isolados apresentaram atividade proteolítica. Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2006) com isolamento de rizóbio da região da Amazônia Central, 28,4% das bactérias exibiram capacidade de produzir proteases. Ramos et al. (2018), em teste realizado com isolamento de bactérias na cultura do milho, obtiveram 68,9% de isolados com produção de halo de hidrólise, enquanto que Oliveira et al. (2017b) reportaram que 78% dos isolados de solo demonstraram atividade proteolítica no mesmo meio de cultivo (Ágar Leite).

Tabela 13. Atividade proteolítica de bactérias isoladas de solo não rizosférico.

ISOLADO	DMC	DMH	IE
NR1	POS	POS	POS
NR2	$11,3 \pm 6,40$	$17,3 \pm 10,75$	$1,4 \pm 0,10$ B
NR8	POS	POS	POS
NR9	$15,6 \pm 0,21$	$39,0 \pm 0,08$	$2,5 \pm 0,03$ A
NR12	POS	POS	POS
NR15	POS	POS	POS
NR16	$12,5 \pm 1,03$	$31,6 \pm 0,63$	$2,7 \pm 0,17$ A
NR25	$11,0 \pm 0,56$	$28,3 \pm 2,15$	$2,3 \pm 0,31$ A

Diâmetro médio do halo (DMH), Diâmetro médio das colônias (DMC) e Índice Enzimático (IE) para 8 isolados bacterianos proteolítica. As médias e desvios foram calculados a partir de três repetições ($n = 3$) para cada isolado bacteriano. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. POS: Atividade enzimática positiva (colônias e halos de hidrólise não mensurados devido à crescimento do isolado).

Essas enzimas são vitais para o metabolismo do nitrogênio (RODARTE, 2005). Moreira, Siqueira (2006) caracterizam as diferenças entre atividades de microrganismos

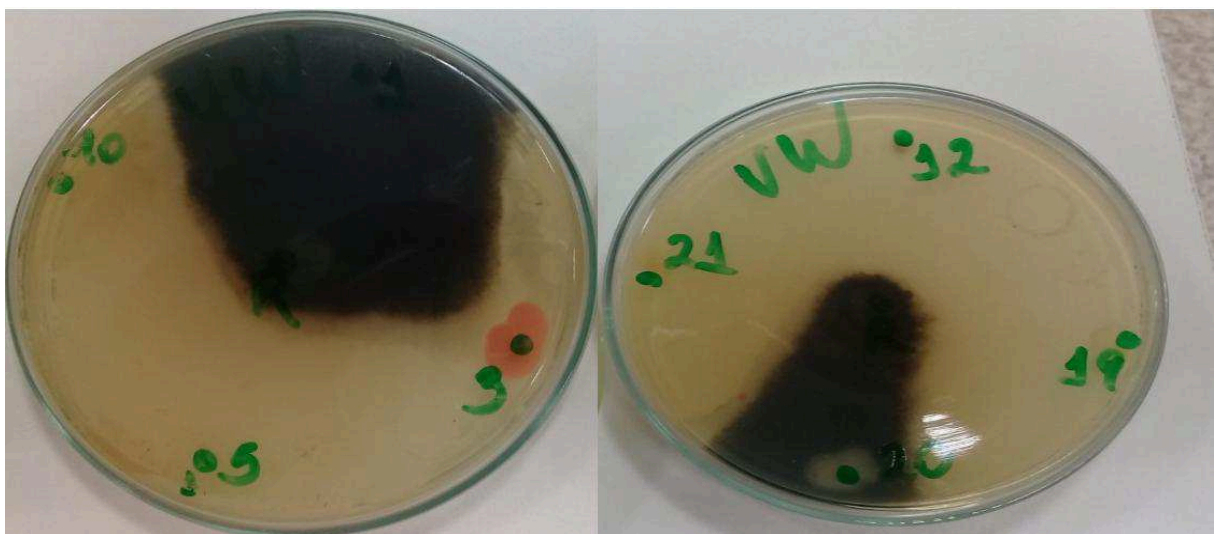
proteolíticos, visto que recebem influência das características ligadas ao solo, como a umidade, aeração, pH, textura e também de condições como o clima e o tipo de vegetação presente no local. A ausência de cobertura vegetal sobre o solo, além de reduzir a quantidade de matéria orgânica e nutrientes para os microrganismos, também afeta a temperatura e umidade (MELO, 2009). Quando tem-se uma ausência de cobertura vegetal ocorre uma menor decomposição da matéria orgânica, sendo um fator provável pela limitação da quantidade de bactérias produtoras de proteases (CORREIA et al., 2015).

4.2.6 Inibição de fungo fitopatogênico *in vitro*

Silva et al. (2008) descrevem a importância da realização de experimentos *in vitro* para se conhecer tanto o comportamento, como também os mecanismos de ação dos microrganismos biocontroladores em relação aos patógenos. Sendo assim, testou-se, *in vitro*, a capacidade dos 24 isolados bacterianos de solo rizosférico e não rizosférico em inibir o crescimento do fungo *Rhizoctonia solani*.

Dos 24 isolados submetidos ao teste de antibiose, 29,17% foram positivos para a formação de halo de inibição, em meio de cultivo, do fungo *Rhizoctonia solani*. Dentre os 12 isolados de solo rizosférico, 50% (6) inibiram o crescimento do fungo, quais sejam, R5, R12, R19, R21, R29 e R32. Por outro lado, dos 12 isolados de solo não rizosférico, apenas o isolado NR22 demonstrou potencial para inibição.

Fotografia 1. Desenvolvimento de halo de inibição do fungo.



Fonte: Weyh, 2018.

As rizobactérias, ou seja, aquelas que vivem na rizosfera, além de serem organismos que auxiliam no crescimento das plantas, por meio de simbiose, também podem atuar na

produção e liberação de metabólitos antimicrobianos (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015), podendo inibir o desenvolvimento de patógenos indesejáveis. Essas rizobactérias colonizam a região radicular da planta, pois de acordo com SILVA (2011) nessa região ocorre a liberação de exsudatos, ou seja, compostos orgânicos produzidos pela planta, onde a quantidade liberada varia de acordo com a fase desenvolvimento da planta, as condições climáticas, entre outros. Assim também é possível justificar o teste realizado para inibição de *Rhizoctonia solani*, sendo que a maioria das bactérias que inibiram o crescimento do referido fungo são advindos de solo rizosférico.

O controle biológico realizado por microrganismos, principalmente da região rizosférica, ocorre por mecanismos antagônicos como antibiose, competição, predação, parasitismo, dentre outros, como também pode ser um mecanismo indutor de resistência para a planta (BETTIOL, MORANDI, 2009). A maioria dos microrganismos que atuam como controladores biológicos agem por meio da antibiose, onde essa ocorre por meio de interação entre organismos, sendo que um desses pode produzir metabólitos nocivos para outros (NOGUEIRA, 2012). Isso impede ou inibe o desenvolvimento de organismos nocivos, de forma a minimizar futuros danos à cultura. Vários são os grupos de bactérias com capacidade inibir o desenvolvimento de fungos, garantindo também sua sobrevivência no solo, o qual é um ambiente de elevada competição (MIYAUCHI, 2012).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se maior densidade de bactérias cultiváveis em solo rizosférico na cultura do girassol, quando comparada àquela observada em solo não rizosférico. Observou-se o predomínio de isolados bacterianos com morfologia celular de bastonetes e de perfil tintorial Gram-positivo, tanto para rizobactérias como para os isolados de ambiente não rizosférico.

Para as atividades enzimáticas, considerando todos os isolados bacterianos (24) submetidos aos testes, observou-se um maior número de isolados com atividade positiva para protease ~ lipase > amilase > celulase. Para o teste de solubilização de fosfato inorgânico apenas um isolado de solo rizosférico apresentou a capacidade de solubilizar fosfato tricálcico. A inibição do crescimento fúngico de *Rhizoctonia solani* foi observado em 29,17% dos do total de isolados bacterianos avaliados, com destaque os isolados de solo rizosférico.

Pode-se também constatar que o isolado rizosférico R19 foi o único a apresentar resultados positivos em todas as seis atividades avaliadas. Cabe ressaltar que 4 isolados rizosféricos (R20, R22, R23 e R29) e 3 isolados não rizosféricos (NR9, NR15 e NR25) demonstraram 4 das 6 atividades investigadas.

A caracterização realizada indica que, no contexto da redundância funcional, diversos isolados bacterianos realizam funções similares no solo. Ao mesmo tempo, pelas múltiplas atividades detectadas, um mesmo isolado bacteriano pode participar de diversos processos associados à ciclagem, transformação de elementos, e controle de patógenos em solos agrícolas.

Tais atividades são fundamentais para a dinâmica biológica, da matéria orgânica e dos nutrientes, que estão diretamente relacionadas à fertilidade e produtividade nos (agro)ecossistemas. De forma complementar, as atividades apresentadas pelos isolados bacterianos merecem ser investigadas também na perspectiva de recursos para a biotecnologia.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M. de; COLLARES, D. G.; BARBOSA, P. F. D. **Bioprospecção microbiana**. Brasília. DF: Embrapa Agroenergia. 2015. 1 folder. Il. color.

ARRUDA, H. J.; Produção industrial de enzimas e aplicações no processo cervejeiro: uma revisão da literatura. In: **VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**. 2017. Ponta Grossa, Paraná.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C.; Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**. Spain. Vol. 56, No. 417, p. 1761–1778. July 2005.

BASTOS, A.; **Enzimas: a chave da biotecnologia**. Embrapa Agroindústria de Alimentos. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8504625/enzimas-a-chave-da-biotecnologia> Acessado em: 26 de abril de 2018, às 21 horas.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.(Ed); **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2009.

BOMBONATTO, A. K. G.; **Uso de enzimas como indicadores biológicos da qualidade de solos do Cerrado com cultivo de cana-de-açúcar**. 2014. 51 p. Tese (Graduação em Licenciatura) – Curso de Química Licenciatura, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2014.

CADORIN, A. M. R.; SOUZA, V. Q.; MANDRON, P. A.; CARON, B. O.; MEDEIROS, S. L. P.; Características de plantas de girassol, em função da época de semeadura, na Região Noroeste do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. Santa Maria. v.42, n.10. out. 2012.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**. v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CARVALHO, L. C. T.; DIAS, P. V. S.; GORLACH-LIRA, K. **Produção de lipases por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual**. 2012. 137 f. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2012.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, M. M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 4, p. 614-621. 2005.

CARVALHO, R. M. M.; SILVA, M. R. da; CARVALHO, F. C. T. de; REBOUÇAS, R. H.; SOUZA, O. V. de. Bactérias solubilizadoras de fosfato em solo rizosférico da caatinga. **Revista Geonorte**, v. 7, n. 26, p. 48-60, 2016.

CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; CASTRO, C. de; SILVEIRA, J. M.; **Fases de desenvolvimento da planta de girassol**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 1997. 24p. (EMBRAPA-CNPSO. DOCUMENTOS, 59).

CASTRO, C. de; CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; LEITE, R. M.V. B. de C.; KARAM, D.; MELLO, H. C.; GUEDES, L. C. A.; FARIAS, J. R. B. **A cultura do girassol**. Londrina, EMBRAPA- 1997. 36p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 13).

CASTRO, C. DE; FARIAS, J.R.B.; Ecofisiologia do girassol. In: Leite, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. de (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja. 2005. p. 163-218.

CASTRO, R. B. R.; **Potencial de solubilização de fosfato e identificação molecular de bactérias isoladas de solos sob cultivo de cana-de-açúcar**. 2015. 46 p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agropecuária), Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2015.

CEREZINI, P.; MILANI, K. M. L.; BALOTA, E. L.; Seleção de microrganismos solubilizadores de fosfato. **Synergismus scyentifica**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 04 (1). 2009.

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

COELHO, E. O.; MARTINS, S. C. S.; Atividade lipolítica de actinobactérias de uma região do semiárido brasileiro. In: **XXXVI Encontro de Iniciação Científica**. Fortaleza. v. 2. 2017.

COELHO, M. A.; **Bioindicadores e diversidade de bactérias em ensaios com biochar e composto orgânico combinados com nitrogênio e inibidores de urease**. 2016. 170 f. Tese

(Mestrado em Processos Ambientais), Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2016.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de Calagem e adubação para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 11. ed. Núcleo Regional Sul: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016. 376 p.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO); Preços médios mensais. 2018. Disponível em: <http://sisdep.conab.gov.br/precosiagroweb/>. Acessado em: 11 de Novembro de 2018.

CONAB; Acompanhamento da safra brasileira de grãos. 2018. v. 12, p. 1-148. Safra 2017/18. Décimo segundo levantamento. Brasília. Setembro, 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acessado em: 11 de Novembro de 2018.

CONAB; Acompanhamento da safra brasileira de grãos. 2018. v. 6, p. 1-142. Safra 2018/19. Segundo levantamento. Brasília. Novembro, 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acessado em: 11 de Novembro de 2018.

CORDEIRO, M. A. S.; CORÁ, J. E.; NAHAS, E. Atributos bioquímicos e químicos do solo rizosférico e não rizosférico de culturas em rotação no sistema de semeadura direta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 36, 1794-1803, 2012.

CORREIA, J. L. A.; SANTOS, T. R. dos; SILVA Jr., A. A.; MARQUES, O. M. Isolamento, identificação e avaliação do potencial enzimático de bactérias autóctones de sedimento de mangue da lagoa do Araçá-Pe. 2014. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, p. 1-8, 2014.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M.; Fauna de solo: aspectos gerais e metodológicos. Seropédica, RJ: **Embrapa Agrobiologia**, fev. 2000. 46p. Documento 112.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P.; Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**. Santa Maria. v.39, n.3, p. 945-954. mai/ jun. 2009.

DOURADO, L. G. A.; **Irrigação e adubação potássica no crescimento e produção do girassol**. 2015. 78 p. Tese (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Mato Grosso. Rondonópolis. 2015.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing Bacillus sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 720-724, 2007.

FERNANDES, A. P.; **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2009.

FERNANDES, J. C.; GAMERO, C. A.; RODRIGUES, J. G. L.; NASCIMENTO, F. M.; Avaliação de diferentes sistemas de manejo no desenvolvimento da cultura do girassol. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**. Guarapuava. v.9, n.1, p.73-82. 2016.

FERNÁNDEZ, L.A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M.A.; SAGARDOY, M.A.; Bacterias solubilizadoras de fosfato inorganico aisladas de suelos de la region sojera. **Ciencia del Suelo**. Argentina. vol. 23, no. 1, p. 31–37. 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras. v. 35, n. 6, p. 1039-1042. nov./dez. 2011.

FERREIRA, E. P. B.; STONE, L. F.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza. v. 48, n. 1, p. 22-31, jan./mar. 2017.

FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab**, v. 82, p. 124-128, 2007.

FURINI, G.; **Produção de enzimas lipolíticas por bactérias isoladas de sistemas de tratamento biológico de efluentes**. 2017. 81 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2017.

GRÉGGIO, T. C.; NAHAS, E.; Atividade enzimática do solo sob dois fragmentos florestais. **Científica**. Jaboticabal. v.35, n.2, p.179 – 187. 2007.

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

JUNQUEIRA, M.T.; CERVELATTI E.P.; Análise da biodiversidade de microrganismos do solo produtores de amilases na micro-região de Araçatuba/SP. In: **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v. 9, n. 3, p. 85-102. 2013.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.

KNOB, A.; **Atividade enzimática na rizosfera de espécies leguminosas nativas mediadas por rizobactérias e micorrizas arbusculares**. 2005. 91 p. Tese (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2005.

LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C.; **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja. 641 p. 2005.

LINHARES, A. C. M.; **Desempenho do girassol adubado com casca de amendoim e fertilizante químico em regime de sequeiro no semiárido paraibano**. 2013. 33 f. Tese (Graduação de licenciatura em Ciências Agrárias), Universidade Estadual da Paraíba, Catolé do Rocha. 2013.

LIRA-CADETE, L.; DE FARIAS, A. R. B.; DE SOUZA RAMOS, A. P.; DA COSTA, D. P., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAI, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, Uberlândia. v. 28, p. 122-129. 2012.

LOURENTE, E. R. P.; MERCANTE, F. M.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; SOUZA, C. M. A.; GONÇALVES, M. C.; SILVA, M. A. G.; Rotação de culturas e relações com atributos químicos e microbiológicos do solo e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina. v.13, n. 4, p. 829-842. out./dez. 2010.

MARCHIORI JÚNIOR, M.; MELO, W. J.; Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. p. 257-263, 1999.

MARRA, L. M.; **Solubilização de Fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 2012. 141 p. Tese (Doutorado em Microbiologia e Bioquímica do Solo)- Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2012.

MARTINS, S. R. O.; ABREU, J. O.; SANTOS, D. R.; CARVALHO, F. C. T.; VIEIRA, R.H.S.F.; SOUSA, O.V.; REBOUÇAS, R.H.; Atividade proteolítica em bactérias isoladas do solo da caatinga. **Revista de Biotecnologia & Ciência**. Anápolis. v. 5, n. 1, p. 25-35. 2016.

MATTOS, M. L. T.; Microbiologia do solo. In: NUNES, R. R.; REZENDE, M. O. O. (Org.). **Recurso Solo: Propriedades e Usos**. São Carlos: Editora Cubo, 2015. p. 250-272.

MELO, F. M. P.; **Bioprospecção de actinobactérias rizosféricas de milho (*Zea Mays L.*) com atividade antifúngica**. 2009. 105 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de carboximetilcelulose utilizando fungo *Pleurotus*: produção de oligossacarídeos e açúcares fermentescíveis para a indústria de etanol. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**. Santa Maria. v. 19, n. 21, p. 1303-1307. Mai./Ago. 2015.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, J. L. B.; CARVALHO, C. B. M.; FROTA, C. C.; **Visualização bacteriana e colorações**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 68, 2015.

MOURA, Q. L.; RUIVO, M. L. P.; RODRIGUES, H. J. B.; ROCHA, E. J. P.; JUNIOR, J. A. S.; VASCONCELOS, S. S.; ANDRADE, M. C.; MANES, C. L. O.; Variação sazonal da população de bactérias e fungos dos teores de nitrato e amônio do solo nos sítios do LBA e PPBIO, na Amazônia oriental. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 30, n. 3, p. 265-274, 2015.

NAUTIYAL, C. S.; An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology**. p. 265-270, 1999.

NOGUEIRA, T. A.; **Seleção de bactérias antagonicas aos fungos patogênicos do arroz (*Oryza sativa L.*)**. 2012. 41 p. Tese (Graduação em Agronomia). Centro Universitário de Goiás, Uni-ANHANGUERA, Goiânia, junho, 2012.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.; Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**. São Paulo. v. 33, n. 7, p. 1549-1558. 2010.

OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 204-210, janeiro-março, 2006.

OLIVEIRA, C. T. de; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Prospecting soil bacteria from subtropical Brazil for hydrolases production. **Biologia**, v. 72, p. 130-139, 2017.

OLIVEIRA, G.V.B.; **Estudo da qualidade de água produzida tratada por sistema microemulsionado para germinação de sementes de girassol**. 2017a. 65 f. Tese (Bacharel em Química do Petróleo), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017a.

OLIVEIRA, T.B.; **Leveduras promotoras de AIA e solubilizadoras de P visando a promoção de crescimento de tomateiro**. 2016. 65 p. Tese (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados), Universidade Federal de São Carlos, Araras. 2016.

PEDRINHO, E. A. N.; JÚNIOR, R. F. G.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M.; Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PEIXOTO, F.G.T.; **Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos do estado de São Paulo sob vegetação nativa e cultivados**. 2010. 69 f. Tese (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 2010.

QUEIROGA, F.M.; **Resposta da cultura do girassol a doses de potássio, magnésio, boro, zinco, cobre e a fontes de nitrogênio**. 2011. 69 f. Tese (Mestrado em Química e Fertilidade do solo). Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró. 2011.

RAMOS, M. L. G.; MENEGHIN, M. F. S.; PEDROSO, C.; GUIMARÃES, C. M.; KONRAD, M. L. F.; Efeito dos sistemas de manejo e plantio sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, em solo de cerrado. **Bioscience Journal**, Uberlândia. v. 28, n. 1, p. 58-68. Jan./Fev. 2012.

RAMOS, R.F.; SOBUCKI, L.; ROHRIG, B.; LUDWIG, J.; DAROIT, D.J.; Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, 2018.

REIS, M. R.; SILVA, A. A.; GUIMARÃES, A. A.; COSTA, M. D.; MASSENSINI, A. M.; FERREIRA, E. A.; Ação de herbicidas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa. v. 26, n. 2, p. 333-341. 2008.

RIFFEL A.; BRANDELLI A.; Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology** 37: 395-399. 2006.

RODARTE, M.P.; **Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2005. 86 p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2005.

ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D. Rizosfera. 2016. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2 ed. Piracicaba, SP: ESALQ, 2016. 221 p.

ROMEIRO, R.S.; Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos. Viçosa: Ed. UFV, 269 p., 2007.

SANTOS, E. O.; MARTINS, M. L. L. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 129-134, 2003.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, p. 142-149, Mar. 2012.

SANTOS, V. M.; MAIA, L.C.; Bioindicadores de qualidade do solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, vol. 10, p.195-223, 2013.

SILVA, A. C. S. da; JUNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, L. A. de.; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 1, p. 37-42, 2011.

SILVA, E.G. da; MOURA, A.B.; DEUNER, C.C.; FARIAS, D.R.; Estudo de mecanismos de biocontrole do crestamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v. 55, 5, p. 377-383, 2008.

SILVA, M. L. O.; FARIA, M. A.; MORAIS, A. R.; ANDRADE, G. P.; LIMA, E. M. C.; Crescimento e produtividade do girassol cultivado na entressafra com diferentes lâminas de água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.5, p.482–488, 2007.

SILVA, M.D.; KUKLISNKY-SOBRAI, J.; FREIRE, F.J.; SILVA, M.O.; CADETE, L.L.; FARIAS, A.R.B.; **Bioprospecção de bactérias produtoras de amilases em feijão caupi e cana-de-açúcar**. Eventos UFRPE, 2009.

SILVA, V.M.A.; BRITO, F.A.E.; RAMOS, K.A.; SILVA, R.M.; MARTINS, C.M.; MARTINS, S.C.S.; Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.08, p. 560-572, 2015.

SILVA-LOPEZ, R. E.; Inibidores de proteases oriundas de plantas: uma abordagem útil para o desenvolvimento de novos fármacos. **Revista Fitos**, vol. 4, n. 1, março de 2009.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina. v. 28, n. 1, p. 11-18. Jan./mar. 2007.

SOUZA, R.D.; MENDONÇA, E.A.F.; SOARES, M.A.; Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.3, p. 229-232, 2015.

STABACH, C.G.; **Clonagem, expressão e purificação de uma lipase proveniente da biblioteca metagenômica dos solos da floresta atlântica paranaense**. 2013. 55 p. Tese (Curso Superior de Tecnologia em Biotecnologia) Universidade Federal do Paraná, Palotina, Agosto, 2013.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**. v. 329, p. 421–431, Apr. 2010.

TAVARES, P.; **Bioprospecção de lipases a partir de metagenoma do solo e sua aplicação para a produção de biodiesel**. 2013. 111 p. Tese (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, 2013.

TOMAZELA, A. L. et al. Girassol. In: CASTRO, P. R. C. et al. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia dos cultivos**. Piracicaba: Agronômica Ceres. p. 92-112. 2008.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002.

TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W.; Potential application of plant growth-promoting rhizobacteria to induced systemic disease resistance, Chapter 6, p.115-127. In: REUVENI, R.E. (Ed.). **Novel approaches to integrated pest management**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.

UNGARO, M.R.G.; CASTRO, C.; FARIAS, J.R.B.; BARNI, N.A.; RAMOS, N.P.; SENTELHAS, P.C.; Girassol. In: MONTEIRO, J.E.; **Agrometeorologia do Cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola**. 2009

VERSLYPE, N. I.; CALDAS, R. M. S.; COELHO-JÚNIOR, J. M.; ANDRADE, J. S. Potencial para o cultivo do girassol na Microrregião do Pajeú através do modelo digital do terreno. **Revista Geama**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2015.

VIEIRA, M.M.; ANDRADE, V.C.; DOI, S.A.; CHINELLATO, R.M.;VIEIRA, T.M.; OLIVEIRA, A.J.F.C.; Atividade de esterase e lipase de micro-organismos isolados de solo do manguezal do alemão, Santos-SP. **Ciência & Tecnologia:FATEC-JB**, Jaboticabal. v.8. 2016.

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