

Thaís Luft da Silva¹; Anderson José Scherer²; Deisi Navroski³; Kamila Kock⁴; Marco Antônio Bacellar Barreiros⁵; Luciana Grange⁵

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE
BACILLUS SPP. OBTIDAS DE SOLOS DO
OESTE DO PARANÁ SOB DIFERENTES
SISTEMAS DE CULTIVO E NATURAL**

RESUMO: O solo é o habitat de diversos microrganismos, entre eles as bactérias benéficas consideradas promotoras do crescimento de plantas (BPCPs). Elas podem atuar de forma direta pela produção de fitormônios, solubilização de minerais e fixação biológica de nitrogênio, ou indireta, como agentes de biocontrole. Dentre os antagonistas mais estudados, o *Bacillus* destaca-se no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar morfológica e geneticamente bactérias do gênero *Bacillus* spp., nativas de solo de diferentes manejos de cultivo e sistema natural da região oeste do Paraná, visando o reconhecimento de estirpes com potencial para agente de biocontrole. As bactérias foram obtidas a partir do solo, utilizando-se meio específico e choque térmico. Foram obtidos um total de 208 isolados, destacando-se com o maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) o manejo de horticultura (69 isolados). O sistema agropastoril (M4) apresentou maior diversidade morfológica, destacando a importância dos exsudatos para a seleção das estirpes de interesse.

Data de submissão: 18/07/2016

Data de aceite: 26/09/2016

¹ Tecnóloga em Biotecnologia, mestranda em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, campus de Cascavel, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, (45) 9935-2593, CEP 85819-110, email: luft.thais@gmail.com.

² Acadêmico de Biotecnologia, Campus Palotina, Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná, e-mail: ander.j.scherer@gmail.com

³ Engenheira Agrônoma mestranda em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, e-mail: deisinavroski@gmail.com

⁴ Tecnóloga em Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, e-mail: kamilakock@gmail.com

⁵ Professor Doutor, Campus Palotina, Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná, e-mail: marcob_07@yahoo.com.br

⁶ Professora Doutora, Campus Palotina, Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná, e-mail: ucianagrange@gmail.com

PALAVRAS CHAVE: biocontrole, microrganismos, crescimento.

MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF *Bacillus* spp. OBTAINED OF GROUNDS UNDER DIFFERENT SYSTEMS OF CULTIVATION AND NATIVE

SUMMARY: The soil is habitat of different organisms, including beneficial bacteria seen as promoting plant growth (PGPR). They can act directly, as promoter of phytohormones, in the solubilization of minerals, and biological nitrogen fixation, or indirectly, as biocontrol agents. Among the most studied antagonists, *Bacillus* stands out in the control phytoplan diseases and post-harvest. In this context, this study aims to isolate and characterize morphologically and genetically bacteria of the genus *Bacillus* spp., native soil of different managements of cultivation and natural system of the western region of Paraná, aiming at the recognition of strains with potential for biocontrol agente. Bacteria were obtained from soil, using a through specific and thermal shock. They were obtained a total of 208 isolates, with the highest number of colony forming units (CFU) the horticultural management (69 isolates). The agropastoral system (M4) showed greater morphological diversity, highlighting the importance of exudates to the selection of strains of interest.

KEYWORDS: biocontrol microorganisms, growth.

INTRODUÇÃO

O crescimento da agricultura brasileira teve início na década de 60 e 70, com o desenvolvimento do setor por meio da implementação de programas governamentais orientados pelos princípios modernizantes da Revolução Verde, rompendo com práticas ultrapassadas e adotando novas formas de produção (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003; FERREIRA et al., 2009). Esse programa surgiu com o propósito de aumentar a produção agrícola por meio do desenvolvimento de pesquisas em sementes, fertilização do solo e utilização de máquinas no campo que aumentassem a produtividade. Entre os principais mecanismos utilizados pelo Estado para a modernização da agricultura estão o investimento público em infraestrutura; estabelecimento de projetos especiais e programas regionais; desenvolvimento da agroindústria; reestruturação da pesquisa agropecuária e da extensão rural; incremento do crédito rural e subsídios para a aquisição de insumos modernos (ALENCAR, 2000).

Apesar dos benefícios trazidos pela modernização agrícola, muitos problemas foram observados devido à falta de conhecimento sobre os

impactos ambientais causados aos ecossistemas, como a contaminação do solo e da água, e o surgimento de resistência de doenças e pragas, devido ao uso exagerado de defensivos agrícolas e fertilizantes químicos. Esses problemas contribuem para o desequilíbrio biológico, como a perda da biodiversidade de micro-organismos benéficos, principalmente nos ciclos biogeoquímicos e na promoção de crescimento vegetal (MORANDI & BETTIOL, 2009). Portanto, para garantir a viabilidade da comunidade biótica é essencial conservar a qualidade do solo.

Diversos métodos vêm sendo utilizados a fim de manter a qualidade dos solos cultivados e naturais, entre eles está o uso de micro-organismos em bioprodutos, mas a sua utilização exige a identificação e caracterização das estirpes. Vários métodos moleculares foram desenvolvidos a partir da década de 90, possibilitando a identificação de um número cada vez maior de micro-organismos (WIDMER et al., 1998), contribuindo para o avanço da caracterização da diversidade presente no solo e em outros substratos (SILVA et al., 2003; JONES & THIES, 2007; MILETTO et al., 2007; ZHANG et al., 2007).

O solo é um habitat com enorme variabilidade de micro-organismos, vegetais (microflora) e animais das mais variadas dimensões. Dentre os principais micro-organismos presentes neste habitat de extrema importância estão as rizobactérias, indivíduos que habitam a região do solo que sofre influência das raízes, chamada rizosfera, podendo ser classificados como patógenos, neutros e benéficos, de acordo com os efeitos causados nas plantas (DOBBELAERE et al., 2003). As bactérias benéficas, conhecidas como promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) são residentes epifíticas ou endofíticas, não patogênicas, que atuam na promoção de crescimento de forma direta, pela produção de fitormônios, solubilização de minerais e fixação biológica de nitrogênio, ou indireta, principalmente como agentes de controle biológico de doenças de plantas (MARIANO et al., 2004). Dentre as principais bactérias consideradas benéficas destacam-se as *Pseudomonas* spp. fluorescentes, *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp (COELHO, 2006).

Dentre os antagonistas mais estudados, o *Bacillus* destaca-se no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita (PUSEY et al., 1986; FERREIRA et al., 1991; BETTIOL et al., 1994; MONTEIRO et al., 2012). O gênero *Bacillus* spp é um dos mais importantes encontrados no solo, principalmente os entomopatogênicos, que possuem a capacidade de produzir endósporos e toxinas, importantes no controle de pragas agrícolas (HABIB & ANDRADE, 1998; DIAS et al., 1999; FRITZ et al., 2010).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar morfológicamente bactérias do tipo *Bacillus* spp, nativas de solo de diferentes manejos de cultivo e sistema natural da região oeste do Estado do Paraná, visando o reconhecimento de novas estirpes com potencial para agente de biocontrole.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos Isolados

Para a coleta dos solos, foram selecionadas seis diferentes áreas, localizadas na região Oeste do Paraná, e cada uma representando diferentes manejos de cultivo do solo. As regiões de coleta foram: Parque Estadual São Camilo - Palotina, com mata nativa; Toledo, com manejo de cultivo de horticultura; Marechal Cândido Rondon, que continha pastagens; Margarida-MCR, que correspondia a plantio convencional e Francisco Alves com manejo em sistema agropastoril de soja e gado (Tabela 1).

Os solos foram coletados em quatro repetições com auxílio de um trado holandês, em uma profundidade aproximada entre 10 e 20 cm, local do solo que concentra a maior parte do sistema radicular ativo e maior atividade microbiana (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994). Cada área de coleta foi dividida em cinco transeptos paralelos traçados diagonalmente de acordo com o declive e direção do curso de água, homogeneidade do terreno, fertilidade do solo, derivação de agroquímicos, entre outros. Levou-se em consideração o efeito bordadura, desconsiderando-se, portanto, uma borda de aproximadamente 50 metros na transição entre lavoura-mata ciliar e mata ciliar-rio. O transepto mais distante do leito de água foi desconsiderado, a fim de manter maior homogeneidade dentro da área (NEIVERTH, 2012).

Os transeptos passaram a ser denominados de repetições, sendo cada uma constituída por cinco sub-amostras. Estas foram coletadas a partir de uma linha imaginária em “zigue-zague” traçada sobre o transepto, promovendo uma maior homogeneidade dentro da repetição. Após a coleta das cinco sub-amostras por repetição, estas foram homogeneizadas, separando uma amostra composta deste solo (BUCKLAND et al., 2001).

Tabela 1 Pontos de coleta das sub-amostras por repetição de acordo com cada tipo de manejo, obtidas por Global Positioning System (GPS).

| | Manejo | Local | Repetições | | | |
|----|----------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | | | R1 | R2 | R3 | R4 |
| M1 | Plantio Direto | Palotina | S 24° 15' 6052" | S 24° 15' 24,156" | S 24° 15' 23,5512" | S 24° 15' 23,7312" |
| | | | W 53° 46' 4,974" | W 53° 56' 4,9236" | W 53° 55' 58,3464" | W 53° 55' 57, 4716" |
| M2 | Horticultura | Toledo | S 24° 48' 11,466" | S 24° 48' 11,466" | S 24° 48' 11,466" | S 24° 48' 11,466" |
| | | | W 53° 46' 34,14" | W 53° 46' 34,14" | W 53° 46' 34,14" | W 53° 46' 34,14" |
| M3 | Pastagem | Marechal Candido Rondon | S 24° 31' 23,4804" | S 24° 31' 23,28" | S 24° 32' 3,9912" | S 24° 32' 3,9912" |
| | | | W 54° 4' 2,3268" | W 54° 4' 3,486" | W 54° 3' 5,6772" | W 54° 3' 5,6772" |
| M4 | Sistema Agropastoril (Soja-Gado) | Francisco Alves | S 24° 4' 22,96" | S 24° 3' 56,1492" | S 24° 4' 22,2916" | S 24° 5' 49,0488" |
| | | | W 53° 50' 40,6868" | W 53° 51' 55,9008" | W 53° 50' 37,554" | W 53° 5' 40,2948" |
| M5 | Mata Nativa | Parque São Camilo - Palotina | S 24° 18' 28,944" | S 24° 18' 30,1788" | S 24° 18' 33,0552" | S 24° 18' 29,0304" |
| | | | W 53° 54' 16,6608" | W 53° 54' 18,4032" | W 53° 54' 24,1884" | W 53° 54' 23,814" |
| M6 | Plantio Convencional | Margarida - MCR | S 24° 56' 7,8216" | S 24° 56' 7,8216" | S 24° 56' 7,8216" | S 24° 36' 25,1316" |
| | | | W 54° 17' 50,91" | W 54° 17' 50,91" | W 54° 17' 50,91" | W 54° 10' 3,0612" |

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Bacillus* spp.

Para o isolamento, 10 g de solo de cada repetição dos diferentes manejos de cultivo foi diluída em 90 mL de solução salina 0,85% contendo pérolas de vidro. Os frascos foram mantidos em um agitador mecânico horizontal por 30 minutos. Após o tempo de agitação e a decantação do solo, realizaram-se as diluições seriadas em solução salina 0,85% para obtenção das diluições 10⁻³ e 10⁻⁴ (VINCENT, 1970).

Os frascos contendo as diluições de trabalho foram submetidos a um choque térmico de 70 °C por 10 min, para selecionar os micro-organismos pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. (BUCHANAN & GIBBONS, 1975). Posteriormente, foi efetuado o plaqueamento em triplicata de 100 µL de cada diluição em meio Digs (BALDANI, 2007) e incubado por 48 horas em estufa a 28-30 °C.

Após o crescimento, as colônias bacterianas foram caracterizadas morfológicamente de acordo com o protocolo estabelecido por Fonseca et al. (2000), e os isolados foram armazenados a -20 °C em meio digs líquido contendo 30% glicerol.

Análise dos dados

A análise das características morfológicas foram realizadas no programa BioNumerics (Applied Maths, Versão 7.1). De acordo com a

similaridade dos perfis morfológicos, para a análise de agrupamento e obtenção dos clusters foi utilizado o coeficiente de similaridade de Pearson e para a construção do dendograma foi escolhido o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram obtidos 208 isolados bacterianos, sendo que o destaque foi para o manejo M2 (horticultura) com 69 isolados e o M4 (agropastoril) com 61 representantes. O terceiro maior número refere-se ao solo do M3 (pastagem) com 29, seguido do M5 (mata nativa) com 24 isolados. Já os solos dos manejos M1 (plantio direto) e M6 (plantio convencional) foram os que ficaram com menor número de isolados, com 14 e 11 respectivamente (Gráfico 1).

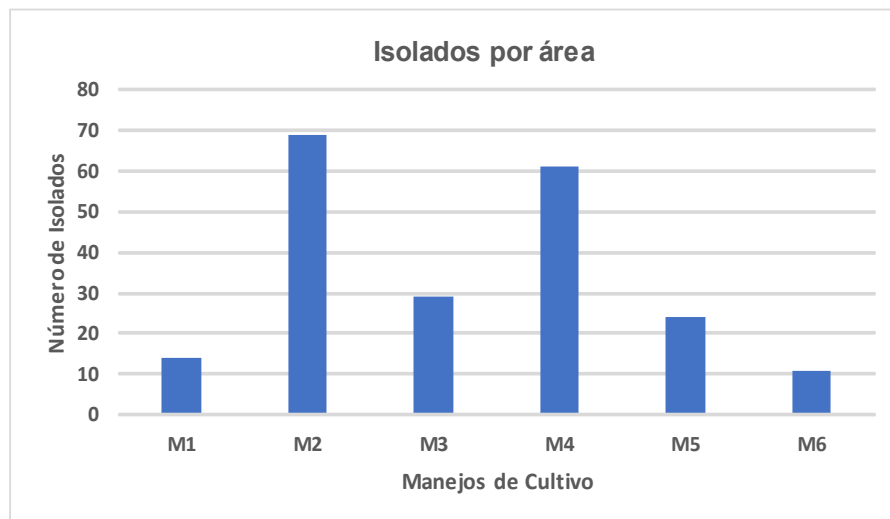


Gráfico 1 Quantificação do número de isolados obtidos em cada manejo de cultivo (área).

Em agroecossistemas, a abundância microbiana sofre variações ao longo das estações do ano, havendo a cada estação a predominância de uma comunidade microbiana acompanhada de outras pouco abundantes (TORSVIK & ØVREAS, 2002). Tais variações estão relacionadas ao índice pluviométrico e ao clima da região, ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais, à estrutura e aos manejos agrícolas adotados em cada agroecossistema (ROGERS & TATE III, 2001; TIEDJE *et al.*, 2001), e a planta hospedeira presente (PICARD & BOSCO, 2008).

Os *Bacillus* são considerados micro-organismos ubíquos, não estando correlacionados com qualquer característica do solo ou rotação de cultura, sendo capazes de se desenvolver bem em vários ambientes (QUADROS, 2013).

O maior número de isolados encontrados nas áreas de horticultura (M2) e agropastoril (M4) se deve, principalmente, ao fato de que nestes manejos, a presença do vegetal de cobertura no momento da coleta das amostras de solo, pode ter proporcionado a liberação, pelas raízes, de diferentes exsudatos possibilitando a seleção de número maior de micro-organismos presentes na região rizosférica do solo, de onde as amostras foram retiradas (COELHO, 2006). Outra questão relevante e que converge com o fator apontado anteriormente, é que nestas áreas, o período de entressafra, ou seja, o tempo em que o solo fica descoberto é muito curto, portanto a presença da planta permite a deposição de resíduos vegetais, constantemente no solo, proporcionando uma maior manutenção da composição da serapilheira, o que estimula a presença de uma série de micro-organismos envolvidos na formação da matéria orgânica e também nas relações associativas com vegetais (TIEDJE et al., 2001).

A colonização da rizosfera depende muito da habilidade da bactéria em utilizar os diferentes exsudatos radiculares. Os compostos secretados pelas raízes das plantas servem como importantes atrativos químicos e repelentes na rizosfera (ESTABROOK & YODER, 1998; BAIS et al., 2001). Pela exsudação de uma vasta variedade de compostos, as raízes podem regular a comunidade microbiana do solo na sua vizinhança imediata, lidar com herbívoros, incentivar simbioses benéficas, mudar as propriedades físicas e químicas do solo, e inibir o crescimento de espécies de plantas concorrentes (NARDI et al., 2000).

Coelho (2006) avaliando interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. em diferentes rizosferas observou uma maior quantidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de alface crespa em relação às outras plantas analisadas; isso não ocorreu com *Bacillus* spp., cujo os números foram semelhantes entre as várias rizosferas. Val-Moraes et al. (2009) comparando a diversidade em áreas de horticultura e vegetação natural, constataram uma maior frequência de bactérias do filo *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobactérias* no solo com cultivo de hortaliças. A área analisada no estudo possui uma alta concentração de fósforo, o que favorece a presença do filo *Firmicutes*, principalmente o gênero *Bacillus*, que são descritas como bactérias com grande potencial de solubilização de fósforo nos solos (RODRIGUES & FRAGA, 1999).

Os manejos agropastoris (M4) representam uma alternativa para intensificação do uso da terra, pois garantem a sustentabilidade dos sistemas de produção (RUSSELLE et al., 2007). A inserção de animais pode alterar algumas propriedades do sistema, como reciclagem de nutrientes e agregação do solo e melhorar a sua qualidade (INGRAM et al., 2008; CARVALHO et al., 2010). Kaschuk et al. (2010) observaram que pastagens bem manejadas, em rotação com culturas anuais resultam em benefícios significativos ao carbono da biomassa microbiana (CBM), enquanto pastagens contínuas e degradadas resultam em decréscimos do CBM. Araujo & Pedroso (2013) avaliaram a colonização de *Bacillus* na rizosfera de *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* e *Panicum maximum*, verificaram um baixo número de colônias isoladas. Estudos recentes relatam que estas gramíneas produzem substâncias no sistema radicular que inibem o desenvolvimento de diversos grupos de bactérias (SUBBARAO et al., 2009).

Áreas naturais (M5) possuem comunidades microbianas estáveis que levaram milhões de anos para se formar, desempenhando um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos. Perturbações antrópicas no solo abalam o equilíbrio do ecossistema, forçando os micro-organismos a se adaptarem ao novo habitat. Diversos processos fisiológicos estão envolvidos nesta adaptação, estimulando e/ou suprimindo as ocorrências de comunidades microbianas específicas (QUADROS, 2013).

Em solos de mata, as perdas de nutrientes do ecossistema são menores em relação a aquelas sob campo, em consequência da maior diversidade da flora e melhor cobertura do solo, a vegetação do ecossistema induz maiores modificações no solo, principalmente o aumento do teor de matéria orgânica, gerando, conseqüentemente, aumento do número de micro-organismos (FONSECA, 1984). Entretanto, solos com mata nativa, sem trato cultural, apresentam comunidades bacterianas mais adaptadas ao meio ambiente, ou seja, um sinergismo maior e diversidade menor quando comparada com área sob cultivo de hortaliças, que devido ao plantio sofreu uma alteração, aumentando a sua dinâmica populacional e conseqüentemente houve um aumento da diversidade bacteriana (VALMORAES et al., 2009).

O plantio direto (M1) é uma técnica agrícola de cultivo sem preparo prévio do solo, onde a semeadura é feita sobre os resíduos da cultura anterior. No cultivo convencional (M6), os resíduos pós-colheita são incorporados no solo com aração e gradagem após cada colheita. Historicamente é sabido que nas condições de plantio direto a preservação da biota do solo se dá de maneira significativa em relação

ao plantio convencional uma vez que, neste tipo de manejo, a incorporação de resíduos vegetais permitem a sustentação da serapilheira, o que contribui para a manutenção das comunidades microbianas (CARVALHO, 1997; PEREIRA et al., 2007).

No entanto, o baixo número de isolados obtidos nesses dois tipos de manejo, pode ter se dado pelo fato da coleta dos solos ter sido realizada em período de entressafra, não havendo nenhuma cultura instalada, portanto, a amostragem microbiológica obtida dos dois manejos (M1 e M6), provavelmente limitou-se a selecionar microorganismos com capacidade de sobrevivência sem a presença dos exsudatos e outros compostos específicos da rizosfera, uma vez que a composição das raízes interfere na ecologia microbiana do solo (QUADROS, 2013).

Quadros (2013) avaliando a diversidade microbiana do solo cultivado com diferentes composições de gramíneas e leguminosas sob plantio direto, observou o gênero *Bacillus* como o segundo mais abundante nos tratamentos em geral, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. Neste estudo, foram detectadas 110 espécies diferentes de *Bacillus*, sendo que a espécie mais abundante não foi classificada, seguido de *B. niacini*, *B. cereus*, *B. fumarioli*, *B. drentensis*, *B. senegalensis*, *B. soli*, *B. arbitinivorans*, e *B. thuringiensis*.

Além dos resultados de diversidade microbiana, os 208 isolados apresentaram resultados quanto ao agrupamento por tipagem morfológica. Essa análise forneceu um total de 24 grupos, com perfis diferentes. De acordo com o número de perfis e agrupamentos morfológicos obtidos, verificou-se que o manejo M4 com 61 isolados, foi o que obteve um maior número de isolados distribuídos entre os grupos, estando presente em 18 deles, o que pressupõe a presença de maior diversidade morfológica de isolados neste manejo, seguido do M2 com 69 isolados distribuídos entre 17 grupos. Ainda em consideração a distribuição dos perfis nos diferentes grupos, destacou-se em seguida as áreas M3 e M5, ambos distribuídos em 9 grupos, M1 e M6, com 8 grupos.

O grupo 16 foi o que apresentou maior número de representantes (32), com isolados advindos de todos os manejos, exceto o M6 (plantio convencional). Neste grupo destaca-se ainda o manejo M3 (pastagem), por contribuir com o maior número de isolados, 15 no total, seguido pelo manejo M2 (horticultura) com 11 representantes. O segundo maior grupo é o grupo 12, com 24 representantes. O maior número de isolados foi obtido a partir do M2 (horticultura), com um total de 12. O terceiro grande grupo em número é o grupo 2 apresentando um total de 20

isolados. Destes, 14 pertencem ao manejo M4 (sistema agropastoril) e os demais distribuídos entre os manejos M1 (plantio direto), M2 (horticultura) e M5 (mata nativa). Neste contexto, o grupo 4 e G11 também foram considerados um bom agrupamento, pois apresentaram um total de 16 e 14, respectivamente, sendo o que os isolados do manejo M4 foram predominantes no primeiro grupo (10 representantes), e que os isolados de manejo M2 no segundo (11 representantes) (TABELA 4).

O sistema agropastoril (M4) com 61 isolados foi o que apresentou maior diversidade morfológica, este resultado pode ser devido a presença de cobertura morta neste sistema, proveniente das pastagens e dos restos culturais de lavouras comerciais que proporcionam um ambiente favorável à recuperação ou à manutenção das propriedades biológicas do solo (MENEZES & LEANDRO, 2004) estimulando a fauna edáfica, as raízes e a microflora do solo, o que permite manter o solo em equilíbrio e permanentemente protegido contra a degradação (FERREIRA *et al.*, 2010).

A segunda maior diversidade foi observada no M2 (horticultura) com 69 isolados, isto pode estar relacionado com a presença da rizosfera, onde a atividade microbiana é muito alta, tanto as populações de microorganismos, quanto a sua diversidade, podem responder drasticamente às mudanças ambientais (SAITO, 2004).

CONCLUSÕES

Os cultivos com horticultura (M2) e com plantio direto (M1) foram os manejos que apresentaram, respectivamente, o maior número de isolados e o menor número de isolados obtidos. O sistema agropastoril (M4) destacou-se por apresentar maior diversidade morfológica, seguido sem diferença significativa pelo manejo de horticultura apontando para a importância do pouco revolvimento do solo na preservação da microbiota da rizosfera. Os manejos de plantio direto (M1) e plantio convencional (M6) foram os que apresentaram menor diversidade morfológica. O que aponta para a necessidade de uma nova amostragem com a presença das raízes e seus exsudatos na rizosfera, a fim de comparar as duas coletas e verificar se o perfil da diversidade das comunidades microbianas obtido anteriormente se confirma.

AGRADECIMENTO

Gratos à Dra. Diva de Souza Andrade, do laboratório de Microbiologia do Solo – IAPAR, Londrina.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, E. *Complexos agroindustriais*. 2.ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 90p., 2000.

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds). *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: EMBRAPA- SPI, p.63-94, 1994.

ARAUJO, F. F.; PEDROSO, R. A. B. Interação de *Bacillus sp.* com a rizosfera de três espécies de plantas forrageiras. *Biosci. J.*, v.29, n.1, p.152-158, 2013.

BAIS, H. P.; LOYOLA, V. M. V.; FLORES, H. E, VIVANCO, J. M. Root specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, v.37, p.730-741, 2001.

BALDANI, V. Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas. In. XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, RELARE. Anais. Londrina: Embrapa Soja. Documentos 290, p 124-142, 2007.

BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica*, v.20, p.119-122, 1994.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8.ed. Baltimore: *The Willians & Wilkens*, 1268p.,1975

BUCKLAND, S. T.; ANDERSON, D. R.; BURNHAM, K. P.; LAAKE, J. L.; BORCHERS, D. L; THOMAS, L. *Introduction to distance sampling-estimating abundance of biological populations*. *Oxford University Press*. Oxford: 432 p., 2001.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (ed.). *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente, p.13-

51, 2003.

CARVALHO, P. C. de F.; ANGHINONI, I.; MORAES, A. de; SOUZA, E. D. de; SULC, R. M.; LANG, C. R.; FLORES, J. P. C.; LOPES, M. L. T.; SILVA, J. L. S. da; CONTE, O.; WESP, C. de L.; LEVIEN, R.; FONTANELI, R. S.; BAYER, C. Managing grazing animals to achieve nutrient cycling and soil improvement in no-till integrated systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.88, p.259-273, 2010.

CARVALHO, Y. *Densidade e atividade dos microrganismos do solo em plantio direto e convencional, na região de Carambeí – PR*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 108p., 1997.

COELHO, L. F. *Interação de Pseudomonas spp. e de Bacillus spp. com diferentes rizosferas*. IAC – Instituto Agrônômico. Campinas – SP. 2006.

DIAS, S. C.; SAGARDOY, M. A.; SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* isolates from Argentina soils. *Biocontrol Journal*, v.44, p.59-71, 1999.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.22, n.2, p.107 -149, 2003.

ESTABROOK, E. M.; YODER, J. I. Plant-plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. *Plant Physiol*, v.116, p.1–7, 1998.

FERREIRA, J. H. S.; MATTHEE, F. N.; THOMAS, A. C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, v.81, p.283-287, 1991.

FERREIRA, P. A.; PEREIRA, J. R.; ALENCAR, E.; SANTANA, A. C. Estado e agricultores familiares: uma análise interpretativa sobre o desenvolvimento rural no Sul de Minas Gerais. *RESR*, v.47, n.3, p.767-792, 2009.

FERREIRA, R. R. M.; TAVARES FILHO, J.; FERREIRA, V. M. Efeitos de sistemas de manejo de pastagens nas propriedades físicas do solo. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n.4, p.913-932, 2010.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. B.; CÂMARA, A. F. S.; RUMJANEK, N. G. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. *Comunicado Técnico*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agrobiologia. Seropédica, Rio de Janeiro: n.43, p.1-4, 2000.

FONSECA, S. da. *Propriedades físicas, químicas e microbiológicas de um Latossolo Vermelho-Amarelo sob eucalipto, mata natural e pastagem*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 78p. 1984.

FRITZ, L. L.; BERLITZ, D. L.; MACEDO, V. R. M.; MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Frequência de *Bacillus spp.* em solos de diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado em Cachoeirinha, RS. *Bragantia*, Campinas, v.69, n.2, p.405-412, 2010.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, p.383-446, 1998.

INGRAM, L. J.; STAHL, P. D.; SCHUMAN, G. E.; BUYER, J. S.; VANCE, G. F.; GANJEGUNTE, G. K.; WELKER, J. M.; DERNER, J. D. Grazing impacts on soil carbon and microbial communities in a mixed-grass ecosystem. *Soil Science Society of America Journal*, v.72, p.939-948, 2008.

JONES, C. M.; THIES, J. E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. *Journal of Microbiological Methods*, v.69, n.2, p.256- 267, 2007.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems:Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biology & Biochemistry*, v.42, p.1-13, 2010.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v.1, p.89-111, 2004.

MENEZES, L. A. S.; LEANDRO, W. M. Avaliação de espécies de coberturas do solo com potencial de uso em sistema de plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiás, v.34, n.3, p.173-180, 2004.

MILETTO, M.; BODELIER, P. L. E.; LAANBROEK, H. J. Improved PCRDGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods*, v.70, n.1, p.103-111, 2007.

MONTEIRO, A. L. R.; CAMPOS NETO, J. R. M.; BITU, P. I. M.; ROZARIO, W. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; RODRIGUES, A. A. C. Potencial antagonista de *Bacillus ssp.* sob diferentes métodos de avaliação in vitro no controle de *Fusarium oxysporum sp. Lycopersici*. *Tropical Plant Pathology*, v.38,

2012.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds) *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, pp 7-15, 2009.

NEIVERTH, W. *Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 105 p., 2012.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. de O.; CAMPO, R. J.; TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. *R. Bras. Ci. Solo*, v.31, p.1397-1412, 2007.

PICARD, C.; BOSCO, M. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften*, v.95, n.1, p.1-16, 2008.

PUSEY, P. L.; WILSON, C. L.; HOTCHKISS, M. W.; FRANKLIN, J. D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with comercial fruit waxes, dicloran, and cold storage conditions. *Plant Disease*, v.70, p.587-590, 1986.

QUADROS, P. D. *Diversidade e composição de comunidades microbianas de solos construídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas*. Tese Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 127 p., 2013.

RODRIGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v.17, n.04-05, p.319-339, 1999.

ROGERS, B. F.; TATE III, R. L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.33, n.10, p.1389-1401, 2001.

RUSSELLE, M. P.; ENTZ, M. H.; FRANZLUEBBERS, A. J. Reconsidering integrated crop-livestock systems in North America. *Agronomy Journal*, v.99, p.325-334, 2007.

SAITO, M. Can Soil Biodiversity be used for na indicator of soil health? Case studies in Japan. In: *Agricultural Impacts on Soil Erosion and Soil Biodiversity*. 9p., 2004.

SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; ELSAS, J. D. van. Application

of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus spp.* in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, v.54, n.2, p.213-231, 2003.

SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA K.; HURTADO M. P.; ONO, H.; MORETA D. E.; SALCEDO A. F.; YOSHIHASHI A. T.; ISHIKAWA T.; ISHITANI M.; OHNISHI-KAMEYAMA M.; YOSHIDA M.; RONDON M.; RAO I. M.; LASCANO C. E.; BERRY W. L.; ITO O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Science*, New York, v.106, p.17302-17307, 2009.

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHO, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPEBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Org.). *Sustainable management of soil organic matter*. Wallingford: CAB International, p.393-412, 2001.

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.

VAL-MORAES S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS E. G. M.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. *Rev. Ciênc. Agron.*, vol.40, n.1, p.7-16, 2009.

VINCENT, J. M. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell, 164p, 1970.

WIDMER, F.; SEIDLER, R. J.; GILLEVET, P. M.; WATRUD, L. S.; DI GIOVANNI, G. D. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.7, p.2545-2553, 1998.

ZHANG, P.; ZHENG, J.; PAN, G.; ZHANG, X.; LI, L.; ROLF, T. Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.58, n.2, p.264-270, 2007.