



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**BIOFERTILIZANTE HORTBIO®: CARACTERÍSTICAS
MICROBIOLÓGICAS E EFEITO NA QUALIDADE DA ALFACE.**

Catharine Abreu Bomfim

Brasília – DF
2016

Catharine Abreu Bomfim

**BIOFERTILIZANTE HORTBIO®: CARACTERÍSTICAS
MICROBIOLÓGICAS E EFEITO NA QUALIDADE DA ALFACE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Helson Mario Martins do Vale

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL - BRASIL

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

BOMFIM, Catharine Abreu

Biofertilizante Hortbio®: características microbiológicas e efeito na qualidade da alface/

Catharine Abreu Bomfim – Brasília, DF, 2016.

Número de páginas p 136

Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília/
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana.

Orientador: Helson Mario Martins do Vale.

Bibliografia.

1. Caracterização Molecular. 2. Agricultura Orgânica. 3. Micro-organismos Eficazes
I. Título. II. Instituto de Ciências Biológicas

Nome: Catharine Abreu Bomfim

Título: Biofertilizante Hortbio®: Características microbiológicas e efeito na qualidade da alface

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Dissertação Aprovada em: 24/ 06/ 2016

Banca Examinadora

Maria Lucrecia Gerosa Ramos
(Universidade de Brasília - FAV)

Fabio Bueno dos Reis Junior
(Embrapa Cerrados – CPAC)

Helson Mario Martins do Vale - Orientador (Presidente)
(Universidade de Brasília - FIT)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL - 2016

*Aos meus pais e minha irmã
Ao meu esposo
Ao meu filho*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter sido o meu suporte, Aquele que me deu o dom da vida e o qual me propiciou o conforto nos momentos no quais mais precisei.

Minha eterna gratidão ao meu esposo/companheiro/amigo Eduardo que nunca me deixou desistir, sempre me apoiou em todos os momentos, que me dá forças e me faz rir quando mais nada tem graça. Agradeço por sempre me fazer ver uma luz no fim do túnel. Obrigada ao meu filho Enzo, que chegou de forma inesperada fazendo a vida ter um novo sentido.

Obrigada aos meus pais, Zilmar e Nereida, que sempre me deram incentivo e apoio. À minha irmã Mara que sempre foi tão compreensiva e possui um coração enorme. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu orientador Helson, pela oportunidade de realizar este trabalho, por ter me recebido no seu grupo e sempre acreditar em mim. Gostaria muito de agradecer por toda a orientação, apoio e confiança! Muito obrigada, Helson!

Ao departamento de Fitopatologia da UnB que me concedeu o espaço para pesquisa e sempre me recebeu muito bem. Obrigada a todos os professores e técnicos que sempre foram muito prestativos e receptivos.

A toda equipe da Embrapa Hortaliças, um muitíssimo obrigada! Vocês me receberam com os braços abertos e sempre muito prestativos! Um obrigada especial à Mariana Fontenelle, Carlos Eduardo Pacheco e Daniel Zandonadi que tiveram muita paciência e em muito me incentivaram.

Lucas, Karla e Cristina, vocês foram muito importantes na construção desse trabalho. Obrigada!

Agradeço também às amigas construídas ao longo desse tempo de trabalho, especialmente a Geisi, Flávia, Érica e Carol. Vocês foram fundamentais para mim. Obrigada de verdade! Fico muito feliz por ter conhecido e me tornado amiga de cada uma de vocês. Vocês conseguem tornar o dia-a-dia da pós mais tranquilos e menos estressantes.

A banca examinadora por compartilharem comigo o seu tempo e conhecimento e contribuírem com esse trabalho. Muito obrigada!

A Regina Sartori, que em muito me ajudou e me apoiou, sempre dedicando um tempinho para conversar comigo.

Ao Marcos que foi sempre um bom amigo.

A Luciana Medeiros, secretária da pós-graduação, que sempre me atendeu com tanta simpatia e com um sorriso no rosto.

E a todos que, de alguma forma, estiveram comigo neste momento da minha vida, que me apoiaram e me ajudaram.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de referência utilizados como limites máximos de contaminação microbiológica em compostos orgânicos (Fonte: BRASIL, 2011).	8
Tabela 2. Avaliação dos componentes químicos no Hortbio® após 10 dias de fermentação (LÜDKE, 2009).	12
Tabela 3. Detalhamento da composição de reagentes e condições de termociclagem utilizadas para amplificação do DNA ribossômico para os diferentes grupos microbianos (bactérias, fungos e leveduras) avaliados.	43
Tabela 4. Quantificação dos micro-organismos presentes no biofertilizante Hortbio® 0 e Hortbio® 40 após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 do seu preparo para diferentes grupos microbianos.	46
Tabela 5. Distribuição dos gêneros bacterianos ao longo dos diferentes tempos amostrais avaliados.	53
Tabela 6. Distribuição dos isolados de bactérias entre os gêneros e filo de maior similaridade de acordo com o sequenciamento do 16S rDNA com sequencias depositadas no GenBank (NCBI).	54
Tabela 7. Distribuição dos isolados de levedura nos diferentes tempos de produção do biofertilizante	64
Tabela 8. Distribuição dos isolados de leveduras entre os gêneros e filo de maior similaridade de acordo com o sequenciamento do domínio D1/D2 do 26S rDNA com sequencias depositadas no GenBank (NCBI).	67
Tabela 9. Distribuição dos isolados de fungos filamentosos entre os gêneros e filo de maior similaridade de acordo com o sequenciamento da região ITS com sequencias depositadas no GenBank (NCBI).	73
Tabela 10. Análise de agentes e contaminantes biológicos em diferentes preparados do biofertilizante Hortbio®.	99
Tabela 11. Análise química do solo da região de coleta do EM.	109
Tabela 12. Atributos agronômicos da alface que apresentaram correlação estatística entre as doses e os tipos de alface analisados.	112
Tabela 13. Largura da planta apresentou significância estatística com as diferentes doses do Hortbio avaliadas.	115
Tabela 14. Relação entre as médias dos dados de fertilidade nas diferentes doses do Hortbio aplicadas.	116

Tabela 15. Correlação entre os atributos agronômicos da alface e os dados de fertilidade do solo	120
Tabela 16. Dados obtidos da comparação das sequências dos isolados bacterianos com sequencias depositadas no GenBank (NCBI).....	127
Tabela 17. Dados obtidos da comparação das sequências dos isolados dos fungos filamentosos com sequências depositadas no GenBank (NCBI).....	130
Tabela 18. Dados obtidos da comparação das sequências dos isolados de leveduras com sequências depositadas no GenBank (NCBI).....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção do Hortbio®. (A) Produção do Hortbio® em bombonas de 200 litros. O cano branco fornecia aeração por 15 minutos a cada hora ao sistema. (B) Formação de bolhas devido ao processo fermentativo. (C) Hortbio® com 10 dias, pronto para ser utilizado.	37
Figura 2. Nomeclatura dos diferentes preparados do Hortbio. Foi utilizado como inóculo o EM em diferentes tempos de produção.	37
Figura 3. Imagem representando a área de coleta do EM. Localizada em área de Cerrado, na Embrapa Hortaliças – DF. O ponto vermelho indica a sede da Embrapa Hortaliças. O ponto amarelo representa a área de coleta do EM.	38
Figura 4. Coleta do EM e seleção das partes viáveis para ativação da microbiota (A) 500g de arroz cozido sem tempero, colocado em bandejas de plásticos e tampadas com sombrites (B) Arroz sendo colocado na mata e coberto com serrapilheira (C) Arroz retirado da mata após 7 dias. (D) Arroz pronto para ativação.....	39
Figura 5. Distribuição dos micro-organismos isolados do EM e ao longo dos 30 dias de produção do Hortbio®.....	49
Figura 6. Distribuição dos Filos bacterianos dos isolados do Hortbio nos diferentes tempos amostrais.	50
Figura 7. Distribuição dos gêneros de leveduras isolados do Hortbio® nos diferentes tempos amostrais.	65
Figura 8. Distribuição dos isolados de fungos filamentosos nos diferentes tempos de produção do Hortbio®	71
Figura 9. Curva de calibração de AIA em concentrações que variam de 0 a 100µg.mL ⁻¹	95

Figura 10. Concentração de AIA quantificada após 10, 20 e 30 dias de fermentação do Hortbio®.	96
Figura 11. Curva dose-resposta do AIA. Concentrações intermediárias entre 10^{-4} e 10^{-6} mol.L ⁻¹ mostram-se mais eficazes no crescimento apical do que doses mais elevadas. Doses inferiores não apresentam efeitos significativos. Imagem adaptada de Zeiger (2004).	97
Figura 12. Formas evolutivas dos parasitas encontrados nos preparados 10 e 20 do Hortbio®: A e B. ovo de nematodae; C. Cisto de <i>Endolimax nana</i> ; D. Cisto de <i>Entamoeba coli</i> . Coloração por lugol, microscopia óptica 40x. Fotos cedidas pela Profa. Eleuza Rodrigues Machado, da Universidade de Brasília.	100
Figura 13. Análise de Componentes Principais (ACP) entre as doses do biofertilizante e entre os tipos de alface em função dos dados de fertilidade do solo. D; Alface Romana. V; Alface Crespa. L; Alface Laurel.	118
Figura 14. Necrose foliar das alfaces tratadas com dose 200kg.ha ⁻¹ de N do Hortbio®. Alface após três semanas de transplântio. (A) Americana; (B) Romana; (C) Crespa.	121

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO GERAL.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	3

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.0 Fertilização mineral.....	4
2.0 Biofertilizantes.....	5
2.1 Controle de qualidade dos biofertilizantes.....	7
2.2 Tipos de biofertilizantes.....	8
2.3 Hortbio®: produção e composição.....	10
3.0 Microbiota associada.....	13
4.0 Produção de auxina por micro-organismos.....	17
5.0 A Alfaca.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO BIOFERTILIZANTE HORTBIO®.....	34
1.0 INTRODUÇÃO.....	35
2.0 METODOLOGIA.....	36
2.1 Produção do biofertilizante.....	36
2.2 Amostragem.....	40
2.3 Diluição seriada e plaqueamento.....	40
2.4 Contagem de colônias e quantificação da comunidade microbiana do biofertilizante Hortbio®.....	40
2.5 Isolamento das colônias e armazenamento.....	41
2.6 Caracterização molecular dos micro-organismos isolados do EM e do Hortbio®..	41
2.6.1 Extração do material genético.....	41
2.6.2 Amplificação do DNA.....	42
2.6.3 Sequenciamento das amostras.....	44
2.6.4 Análises filogenéticas.....	44
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.1 Contagem de unidades formadoras colônias.....	45
3.2 Micro-organismos isolados.....	49
3.3 Caracterização molecular.....	49
3.3.1 Caracterização molecular das bactérias.....	49
3.3.2 Caracterização molecular das leveduras isoladas.....	64
3.3.3 Caracterização molecular dos fungos filamentosos.....	70
CONCLUSÃO.....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO FITOSSANITÁRIA E HORMONAL DO BIOFERTILIZANTE HORTBIO® EM DIFERENTES TEMPOS DE PRODUÇÃO.....	89
1.0 INTRODUÇÃO.....	90
2.0 METODOLOGIA.....	91
2.1 Produção do biofertilizante.....	91
2.2 Quantificação da produção de AIA presente no Hortbio® 0.....	92
2.3 Avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica do Hortbio®.....	93
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
3.1 Quantificação de AIA em diferentes tempos de produção do Hortbio®.....	94
3.2 Avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica do Hortbio®.....	98
CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

CAPÍTULO 4

RESPOSTA DE TIPOS DE ALFACE A DIFERENTES DOSES DO BIOFERTILIZANTE HORTBIO® E ANÁLISE DA FERTILIDADE DO SOLO.....	105
RESUMO.....	105
ABSTRACT.....	105
KEYWORDS.....	105
1.0 INTRODUÇÃO.....	106
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.1 Caracterização da área experimental.....	107
2.2 Delineamento experimental.....	107
2.3 Elaboração do Hortbio®.....	108
2.4 Plantio da alface e aplicação do Hortbio®.....	109
2.5 Avaliação das diferentes dosagens de Hortbio® nas características agrônomicas de alface.....	110
2.6 Análise de fertilidade do solo.....	110
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
4.0 CONCLUSÕES.....	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
ANEXOS.....	127

BOMFIM, Catharine Abreu. Biofertilizante Hortbio®: Características microbiológicas e efeito na qualidade da alface. Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana. Data da defesa: 24/06/2016. Orientador: Helson Mario Martins do Vale. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2016.

RESUMO GERAL

Os biofertilizantes são alternativas sustentáveis ao produtor, a fim de reduzir ou substituir o uso de fertilizantes químicos. Atuam direta ou indiretamente sobre o todo ou partes das plantas cultivadas fornecendo nutrientes e elevando sua produtividade. Essas formulações são compostas por materiais de fácil acesso ao produtor, como restos de colheita e utilizam micro-organismos que atuam de forma benéfica aumentando a disponibilidade de nutrientes às plantas, por meio de processos biológicos. O Hortbio® é um biofertilizante aeróbico enriquecido, desenvolvido pela Embrapa Hortaliças – DF. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o Hortbio® no que tange a respeito à sua microbiota cultivável, concentração de ácido indol-acético (AIA) e contaminantes biológicos, assim como avaliar o efeito de doses do biofertilizante em diferentes variedades de alface. Foi utilizado, para avaliação da microbiota, o biofertilizante em diferentes tempos de produção, sendo esses 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de dois preparados, sendo eles o Hortbio® 0 e o Hortbio® 40 e o inóculo EM (micro-organismos eficazes). Foi utilizado diferentes meios de cultura para o isolamento dos micro-organismos, sendo eles o meio R2A, Martin, AC, THSM e MYGP para o isolamento de bactérias totais, fungos totais, actinomicetos, *Trichoderma* spp. e leveduras, respectivamente. Os micro-organismos foram identificados por meio do sequenciamento do DNA. Para a determinação da concentração de AIA foi utilizado o Hortbio® 0 nos tempos de produção 10, 20 e 30 utilizando a técnica de HPLC. Para a avaliação de contaminantes biológicos, foi avaliada a presença de *Salmonella* spp. e coliformes fecais no produto, assim como de helmintos e nematodas em cinco diferentes preparados do biofertilizante, todos esses com 10 dias de preparo. Foi avaliado o efeito de diferentes doses do biofertilizante (0, 50, 100, 150, 200, 250 kg.ha⁻¹ de N) em três tipos da alface (Crespa, Romana e Americana) em um experimento randomizado conduzido em vasos. Foram avaliados diferentes atributos agrônômicos da alface, sendo eles: a altura (AP) e largura da planta (LP) das plantas, a massa fresca (MF), o número médio de folhas (NMF), bem como o comprimento (CC) e diâmetro do caule (DC). A fertilidade do solo foi avaliada pela determinação do Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, P, H+Al, capacidade de troca de cátions (CTC), pH e matéria orgânica do solo (MOS). Foram recuperados 217 isolados microbianos, sendo 120 bactérias, 61 leveduras e 36 fungos. Entre os gêneros encontrados, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Lactococcus*, *Kurthia*, *Sporosarcina*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Stenotrophomonas*, *Corynebacterium*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* já foram

relatados na literatura como importantes promotores do crescimento vegetal e agentes de biocontrole. Quanto a avaliação de AIA, houve a redução da concentração do hormônio ao longo do tempo de produção do biofertilizante, contudo, a concentração dosada nos tempos 10, 20 e 30 atua estimulando o crescimento de pêlos radiculares e raízes secundárias. Quanto a avaliação dos contaminantes biológicos, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, contudo, em dois preparados do biofertilizante foi identificado formas evolutivas de protozoários *Entamoeba coli* e *Endolimax nana* e ovos de Nematodas. Quanto a avaliação do efeito das doses na alface, as doses 50 e 100 kg.ha⁻¹ de N apresentaram melhor rendimento quando observado os atributos agronômicos, e as doses mais elevadas (200 e 250 kg.ha⁻¹ de N) foram deletérias ao desenvolvimento da alface. A análise da fertilidade do solo mostrou que o Hortbio[®] aportou uma elevada concentração de K, Ca e Na, especialmente nas doses 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N.

Palavras-chaves: Promoção do crescimento vegetal; Micro-organismos Eficazes; Hormônios Vegetais; Efeito de doses.

ABSTRACT

Biofertilizers are sustainable alternatives to producers in order to reduce or replace the use of chemical fertilizers. Act directly or indirectly on all or parts of plants grown by providing nutrients and increasing its productivity. These formulations are comprised of easily accessible to the producer materials such as crop residues and use micro-organisms that act beneficially increasing the availability of nutrients to plants through biological processes. The Hortbio® is enriched aerobic bio-fertilizer developed by Embrapa Vegetables - DF. The aim of this study was to characterize the Hortbio® with regard to respect for their cultivable microbiota, indole acetic acid (IAA) concentration and biological contaminants, and to evaluate the effect of biofertilizer doses in different varieties of lettuce. Was used, for evaluation of microbiota, different biofertilizer production times, these being 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days of either preparation, they being Hortbio® 0 and 40 Hortbio® and inoculum EM (effective microorganisms). Was used culture media for the isolation of micro-organisms, these being R2A, Martin AC, and THSM MYGP for the isolation of total bacteria, total fungi, actinomycetes, *Trichoderma* spp. and yeast, respectively. The microorganisms were identified by DNA sequencing. For the determination of IAA concentration was used Hortbio® 0 in production times 10, 20 and 30 using the HPLC technique. For the valuation of biological contaminants, we evaluated the presence of *Salmonella* spp. and fecal coliforms in the product, as well as helminths and nematodes in five different biofertilizer. All those with 10 days of preparation. The effect of different doses of biofertilizer (0, 50, 100, 150, 200, 250 kg ha⁻¹ N) of three types of lettuce (leaf, crisp head and cos lettuce) in a randomized trial conducted in pots. They evaluated different agronomic traits of lettuce, which are: the height (HP) and width of the plant (WP) of plants, fresh mass (FM), the average number of leaves (ANL) and the length (SL) and stem diameter (SD). Soil fertility was assessed by determining the Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, P, H+Al, cation exchange capacity (CEC), pH and soil organic matter (SOM). 217 microbial isolates were recovered, with 120 bacteria, 61 yeasts and 36 fungi. Among the found genera, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Lactococcus*, *Kurthia*, *Sporosarcina*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Stenotrophomonas*, *Corynebacterium*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* have been reported in the literature as important growth promoters and biocontrol agents. There was a reduction of the concentration of IAA over time of the biofertilizer production, however, the concentration measured at the times 10, 20 and 30 acts stimulating the growth of secondary roots and root hairs. It was not detected the presence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*, however, in two preparations of the biofertilizer was identified developmental forms protozoan *Entamoeba coli* and *Endolimax nana* and nematode eggs. The evaluation of the effect of doses in lettuce showed that the doses 50 and 100 kg ha⁻¹ N presented better performance when observing the agronomic traits and the higher doses

(200 and 250 kg ha⁻¹ N) were deleterious the development of lettuce. The soil fertility analysis showed that Hortbio® contributed a high concentration of K, Na and Ca, especially at doses 200 and 250 kg ha⁻¹ of N.

Keywords: Plant Growth Promotion; Effective Microorganisms; Plant hormones

INTRODUÇÃO GERAL

Os fertilizantes químicos fornecem para as plantas nutrientes prontamente assimiláveis para o seu metabolismo. O emprego de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas tem sido amplamente utilizado, pois confere resultados satisfatórios quanto a produtividade, porém o uso extensivo desses produtos pode ser prejudicial à saúde do consumidor e ao meio ambiente, bem como, onera os custos de produção. Nesse contexto, as práticas agrícolas sustentáveis têm ganhado maior atenção nas últimas décadas.

Os biofertilizantes são formulações que utilizam micro-organismos capazes de promoverem o crescimento vegetal pelo suprimento de nutrientes, por meio da capacidade de tornar disponível formas não assimiláveis de elementos por meio de processos biológicos. Possuem em sua composição materiais de fácil acesso ao produtor, como farinha de ossos, farinha de rocha, resto de produtos agrícolas, esterco bovino, sendo economicamente viáveis e fornecem os nutrientes requeridos às culturas.

A microbiota presente nas formulações de biofertilizantes atuam em importantes processos do solo como na fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de hormônios vegetais (fitoestimuladores), de forma indireta na supressão de patógenos ou na proteção às condições de estresse abiótico.

Entre os hormônios vegetais, é possível destacar a ação da auxina que atua diretamente na arquitetura radicular, permitindo que as plantas aumentem a superfície de contato com o solo, aumentando a captação de nutrientes e água desse ambiente. A microbiota se beneficia desse processo por meio da maior absorção de nutrientes e exsudatos radiculares.

Muito embora os biofertilizantes possuam importantes micro-organismos, que auxiliam as plantas em diversos processos biológicos, podem possuir em sua formulação micro-organismos patogênicos. Dessa forma, o uso dos biofertilizantes deve ser feito atendendo valores de referência proposto pela Instrução Normativa nº46/2011 que estipula os limites máximos de contaminação biológica que pode estar presente em compostos orgânicos.

As hortaliças são dependentes de insumos químicos, pois possuem ciclo curto e alta produtividade. A alface, por exemplo, possui elevada dependência

de nitrogênio, cálcio, fósforo e potássio para garantir tanto quantidade, quanto a qualidade do produto para o consumidor final. Dessa forma se faz necessário o atendimento às exigências nutricionais da cultura a partir de fontes sustentáveis.

O Hortbio[®] é um biofertilizante líquido desenvolvido pela Embrapa Hortaliças que possui na sua composição materiais de fácil acesso ao produtor e micro-organismos do solo. Esse biofertilizante já se mostrou eficaz quando utilizado em mudas de pepino e pimentão favorecendo o crescimento, aumentando a área foliar, bem como elevando a produção de matéria seca.

Tendo em vista a importância que os biofertilizantes possuem, tanto no que diz respeito a sustentabilidade, redução dos impactos ambientais gerados e redução do custo, torna-se essencial o estudo desses quanto a sua real contribuição para a produtividade de hortaliças, avaliação dos micro-organismos presentes e produtos gerados por esses, como os hormônios vegetais.

OBJETIVO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Diante do exposto, o objetivo geral dessa dissertação foi caracterizar as propriedades microbiológicas e bioquímicas do Hortbio® e analisar os efeitos de diferentes doses do biofertilizante no crescimento e na qualidade de diferentes variedades de alface. Dessa forma, os resultados foram organizados em quatro capítulos, estruturados da seguinte forma:

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Capítulo 2 – Caracterização fitossanitária e hormonal do biofertilizante Hortbio® em diferentes tempos de produção.

Capítulo 3 – Resposta de tipos de alface a diferentes doses do biofertilizante Hortbio® e análise da fertilidade do solo.

Capítulo 4 – Caracterização microbiológica do biofertilizante Hortbio®

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.0 Fertilização mineral

O Brasil possui um grande potencial como produtor de alimentos. Segundo dados da FAO (2015), até 2024 o uso da terra para as principais safras (oleaginosas, grãos, cana de açúcar e algodão) deve alcançar 69,4 milhões de hectares, 20% a mais do que a área ocupada em 2014. Entretanto, a fim de atender a elevada demanda produtiva, existe uma crescente dependência de fertilizantes químicos (BHARDWAJ et al., 2014).

Os fertilizantes químicos são substâncias manipuladas industrialmente que têm sido extensivamente utilizadas para se obter melhores rendimentos das culturas, uma vez que, fornecem nutrientes prontamente assimiláveis às plantas, como nitrogênio, fósforo e potássio (SAHOO, 2013). O uso intensivo desses produtos levanta uma preocupação em torno da poluição gerada e os impactos ambientais, como a eutrofização e acidificação dos solos e contaminação dos lençóis freáticos (VESSEY, 2003). No mais, o uso de produtos químicos, alteram a microbiota do solo, reduzindo a diversidade microbiana o que compromete importantes processos biológicos (NAGANANDA et al., 2010; VASSILEV et al., 2015; ZHEN et al., 2014).

Adicionalmente, os fertilizantes químicos nitrogenados estão associados com riscos ambientais como a emissão de gases poluentes, contaminação do solo e água pela liberação de nitratos (GUPTA et al., 2012). Esses fertilizantes são produzidos industrialmente utilizando-se combustíveis fósseis que são submetidos à elevadas temperaturas e pressão. O aumento do custo do petróleo ocasiona um aumento no custo do produto, tornando a prática agrícola onerosa, além de poluente (PINDI, 2012). Os fertilizantes fosfatados, por sua vez, são produzidos quase que majoritariamente utilizando-se fósforo depositado em rochas, tratado com ácidos a elevadas temperaturas. Além disso, as reservas de fósforo nesses ambientes é limitada, o que futuramente será um problema para sua exploração (OWEN et al., 2015).

O uso de fertilizantes alternativos com o objetivo de aumentar a produtividade de colheitas sem futuros impactos negativos para o ambiente é

necessário (XIANG, 2012). A produção orgânica é uma alternativa ao cultivo convencional e se baseia na incorporação de matéria orgânica e resíduos vegetais no solo, como fonte de macro e micronutrientes (MACHADO et al., 2006).

2.0 Biofertilizantes

Nesse contexto, as práticas agrícolas sustentáveis tem ganhado maior atenção nas últimas décadas (ANANDHAM et al., 2015). Segundo a FAO (2013) em 2011, o cultivo orgânico ocupava uma área de 37,2 milhões de hectares, sendo três vezes maior do que em 1999. No Brasil, entre os anos 2014 e 2015 houve um aumento de 51,7% de agricultores que optaram pela produção orgânica (BRASIL, 2015b). No Distrito Federal, o crescimento médio do mercado de produtos orgânicos é de 20% anualmente (EMATER-DF, 2015).

A visão inovadora de produção sustentável atrai a crescente demanda de fertilizantes orgânicos como uma alternativa aos agroquímicos (BHARDWAJ et al., 2014). Dessa forma, existe a necessidade de criar alternativas que auxiliem o produtor a obter elevada produtividade utilizando esse tipo de prática agrícola, tornando-a economicamente viável a substituição dos fertilizantes e defensivos químicos.

Os biofertilizantes são formulações que utilizam micro-organismos capazes de promoverem o crescimento vegetal pelo suprimento de nutrientes, por meio da capacidade de tornar disponível formas não assimiláveis de elementos por meio de processos biológicos (ALFA et al., 2014; MINGORANCE, 2015; NAGANANDA et al., 2010). A comunidade microbiana encontrada nos biofertilizantes é variável e irá depender do processo (aeróbico ou anaeróbico) e do substrato utilizado na sua produção (OLIVEIRA et al., 2014).

Portanto, os biofertilizantes devem conter micro-organismos vivos que atuam melhorando o status nutricional da planta quando aplicado à sementes, superfície de plantas ou no solo, sendo que esses colonizam a região rizosférica ou o interior do vegetal e promovem o crescimento do mesmo, o que conseqüentemente reduz o uso de fertilizantes químicos (VESSEY, 2003). Os biofertilizantes são o resultado final da decomposição de compostos orgânicos e contem células vivas ou latentes de micro-organismos eficientes (ALFA et al.,

2014). Seu preparo é realizado a partir da digestão aeróbia ou anaeróbia de resíduos orgânicos (MARROCOS et al., 2012).

Os biofertilizantes tem sido utilizados em diversas práticas agrícolas, como no cultivo de cebola (ČOLO et al, 2014), soja (SCHMIDT et al, 2015), alface (BONALDI et al., 2015; CHICONATO et al., 2013), pimenta (OLIVEIRA et al., 2014), pimentão (ARAÚJO et al., 2007), milho (IWAISHI, 2001), grão de bico (ANSARI et al., 2015), maracujá (ARAÚJO et al., 2008), morango (DIAS et al., 2015) e melão (PINTO et al., 2008).

Seu preparo não exige uma fórmula padrão, sendo que diversas formulações são testadas utilizando-se componentes minerais para o enriquecimento do meio de cultivo (MEDEIROS; LOPES, 2006). Diferentemente dos fertilizantes químicos, possuem baixo valor agregado, pois utilizam uma ampla gama de materiais de baixo custo na sua formulação, incluindo restos de produtos agrícolas, como: esterco bovino, resíduos da colheita em geral, rochas moídas, melaço de cana, leite, ossos, entre outros (MAGRINI et al., 2009; OGBO, 2010). Nesse contexto, os biofertilizantes podem fornecer um suporte economicamente viável para os pequenos agricultores (BORASTE et al., 2009).

A composição química do biofertilizante varia de acordo com o método de preparo, tempo de decomposição, população microbológica, temperatura, pH do composto e o material que o origina. Porém, a principal característica do produto são os micro-organismos que o compõe, que são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e liberação de metabólitos, enzimas, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres, ácidos e antibióticos, assim como, promover o crescimento vegetal ao se integrar à planta após a sua aplicação (MARROCOS et al., 2012). No mais, os biofertilizantes atuam aumentando a resistência sistêmica das plantas à pragas e doenças, sendo que os agrotóxicos atuam reduzindo a população de fitoparasitas, porém fragilizando o vegetal (MEDEIROS; LOPES, 2006). Adicionalmente, o produto possui potencial para controlar diretamente pragas através de substâncias com ação fungicida, bactericida e inseticida presentes em sua composição (VESSEY, 2003).

Os biofertilizantes apresentam-se como uma boa alternativa para a reposição e como fonte de macro e micronutrientes às plantas. Devido ao aumento do custo dos fertilizantes químicos, depleção de combustíveis fósseis e a crescente preocupação acerca dos riscos ambientais que esses fertilizantes

oferecem (MALUSÁ et al., 2012; PINDI, 2012). Nos solos, o uso dos biofertilizantes pode contribuir para promover a produção de substâncias húmicas que exercem expressiva importância na fertilidade do solo com reflexos positivos na produção (MARROCOS et al., 2012), além de atuarem aumentando a capacidade tampão do solo e na estruturação de partículas minerais. Portanto, os biofertilizantes auxiliam as plantas por atuarem melhorando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (LUDKE, 2009).

Contudo, poucos estudos relatam a composição microbiológica dos biofertilizantes e sua eficiência de aplicação na fertilização da planta e melhoria da qualidade do solo, sendo necessárias maiores investigações acerca da composição efeito desse produto, assim como o controle de qualidade.

2.1 Controle de qualidade dos biofertilizantes

Muito embora os biofertilizantes possuam na sua composição micro-organismos benéficos, que atuam melhorando a fertilidade do solo e, conseqüentemente, a produtividade da colheita, podem apresentar em sua composição micro-organismos patogênicos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Klebsiella* spp. (ALFA et al., 2014a). Dessa forma, a produção de biofertilizantes deve ser realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 46/2011, que regulamenta os sistemas de cultivo orgânico e estabelece como valores de referência de limites máximos de contaminantes admitidos em compostos orgânicos que podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de referência utilizados como limites máximos de contaminação microbiológica em compostos orgânicos (Fonte: BRASIL, 2011).

Organismo	Limite de detecção (mg.kg ⁻¹ de matéria seca)
Coliformes termotolerantes (número mais provável por grama de matéria seca – NMP/g)	1000
Ovos viáveis de helmintos	1
<i>Salmonella</i> spp	Ausência em 10g de matéria seca

O controle de qualidade dos biofertilizantes é muitas vezes negligenciado, contudo é de extrema importância, uma vez que se faz necessário garantir a eficácia do produto, dessa forma obter resultados mais consistentes em campo, assim como, remover do mercado produtos de má qualidade o que, conseqüentemente, irá gerar uma maior aceitação do produto (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Países em desenvolvimento que utilizam biofertilizantes oriundos de restos de vegetais e esterco, mesmo possuindo legislação que regulamenta o limite máximo de contaminação, não cumprem as leis, o que reduz a qualidade e eficácia do produto (HERRMANN; LESUEUR, 2013). Contudo, a presença de contaminantes como *Salmonella*, *Shigella* spp. e *Escherichia coli*, são mais comuns em biofertilizantes oriundos da inoculação de esterco bovino, sendo esse proibido de ser utilizado para o cultivo de hortaliças que, muitas das vezes, são consumidas cruas (MACHADO et al., 2006).

2.2 Tipos de biofertilizantes

Existem diversas formulações de biofertilizantes, sendo que a maioria utiliza como inóculo microbiano o esterco bovino, porém pode-se utilizar a cama aviária, serrapilheira ou micro-organismos do solo. Esses produtos podem ser

apenas adicionados à água, ou serem enriquecidos a fim de romper carências nutricionais. Nesse contexto, adicionam-se resíduos de plantas, soro de leite, cinzas, ossos que atuam como fontes minerais. Também adiciona-se caldo de cana ou rapadura como fonte de carbono para o metabolismo microbiano (GUAZZELLI et al., 2012).

Atualmente no Brasil, diversos biofertilizantes têm sido utilizados em diversos cultivos, destacando-se o Agrobio, Supermagro[®], Vairo e o Bokashi.

O biofertilizante Agrobio, produzido na Estação Experimental de Seropédica da PESAGRO-RIO, é produzido pela transformação microbiana, em sistema aberto, de mistura de água, esterco bovino, melado de cana, leite e sais minerais. Após, aproximadamente, 56 dias o produto pode ser engarrafado e usado em lavouras. Atualmente, esse biofertilizante já tem sido largamente utilizado por produtores orgânicos e convencionais em todo o estado do Rio de Janeiro (DELEITO et al., 2004). Assim como os biofertilizantes em geral, o Agrobio possui uma rica comunidade microbiana, composta por fungos e bactérias, como o *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus* sp., que atuam como fonte suplementar de nutrientes e aumentam a resistência das plantas ao ataque de fitoparasitas, o actinomiceto *Streptomyces* sp., produtor de antibióticos e quitinases; as leveduras *Candida utilis* e *Cryptococcus laurentii*, produtoras de metabólitos com ação antagonista a fitopatógenos (SANTOS, 1992). DELEITO et al. (2004), mostraram que esse biofertilizante possui ação bacteriostática equivalente a formulações comerciais contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Esse biofertilizante ao ser pulverizado a 2% em cultura do maracujazeiro amarelo proporcionou maior altura da planta, diâmetro do caule, número de ramos, número de flores, número de frutos e, conseqüentemente, maior produção, em comparação com as plantas que receberam adubação de cobertura conforme praticado no sistema convencional (COLLARD et al., 2001). Segundo Rocha et al. (2003), a aplicação do Agrobio em cultivares de pimentão ocasionou redução dos teores de N e K nos frutos, porém Deleito et al. (2005) mostraram que o Agrobio favoreceu o desenvolvimento vegetativo das mudas de pimentão e aumento da área foliar.

Outra formulação de biofertilizante que tem destaque no Brasil é o Supermagro[®], que vem sendo utilizado em diversas culturas como maçã, pêssego, uva, tomate, batata e hortaliças em geral (ALVES et al., 2001; ARAÚJO

et al., 2008). O Supermagro foi desenvolvido e patentado por Magro (1994), no Rio Grande do Sul, sendo um biofertilizante foliar, com grandes concentrações de micronutrientes. A aplicação ideal desse biofertilizante para hortaliças e frutíferas em geral é de 2%, e deve ser feita semanalmente (BETTIOL et al., 1998). Esse biofertilizante (com adaptações na formulação) se mostrou eficaz contra o crescimento de diversos fitopatógenos (TRATCH; BETTIOL, 1997). Quanto aos efeitos de aumento de produtividade em mudas de alface, esse biofertilizante não mostrou ação significativa (MEDEIROS et al., 2008), nem em cultivares de tomate quando utilizado isoladamente. Contudo, quando houve a inoculação com *Bacillus thuringiensis* houve superioridade significativa em relação a testemunha (PICANÇO et al., 1997).

No Brasil, também é utilizado o biofertilizante Vairo, que foi formulado por Vairo dos Santos em 1992. Este é produzido a partir da fermentação metanogênica ou anaeróbica do esterco bovino. Em produções de melão, esse se mostrou eficaz no aumento da produtividade do fruto (PINTO et al., 2008). Castro et al (1991), mostrou a eficácia desse biofertilizante no controle biológico de diversos fitopatógenos.

O biofertilizante Bokashi foi desenvolvido por Teruo Higa, da Universidade de Ryukyus (Japão) na década de 70. Atualmente, tem sido amplamente utilizado por agricultores orgânicos no Brasil. Esse biofertilizante é oriundo da mistura de diversos tipos de matérias orgânicas, submetida a fermentação (especialmente do tipo láctica) por micro-organismos retirados do solo por meio de serrapilheira (MAGRINI et al., 2009). Esse produto apresenta uma rica microbiota composta, especialmente, por leveduras, em seguida por bactérias e fungos filamentosos, sendo que os mais comuns são *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e *Penicillium* sp. (MAGRINI et al., 2009).

O uso de biofertilizantes vem crescendo em todo Brasil, devido à busca crescente de produtos menos agressivos ao meio ambiente, bem como ser de fácil alcance e produção, por isso, vem tornando-se uma alternativa economicamente favorável aos produtores (MEDEIROS et al., 2007). Devido a isso, os biofertilizantes emergem como um importante componente no fornecimento de nutrientes às plantas em cultivos orgânicos.

2.3 Hortbio®: produção e composição

O Hortbio® é um fertilizante orgânico aeróbico enriquecido utilizado na forma líquida desenvolvido pela Embrapa Hortaliças, localizada em Brasília – DF. Esse fertilizante é composto por farinha de sangue (1%), farelo de arroz ou algodão (4%), farelo de mamona (1%), farinha de ossos (2%), grãos ou sementes trituradas (1%), cinzas de madeira (1%), rapadura ou açúcar mascavo (0,5%), fubá de milho ou polvilho de mandioca (0,5%) e o inoculante (1%), que é proveniente do solo, por meio da adição de serrapilheira ou micro-organismos do solo por meio de arroz cozido. Sua fórmula conta com a adição e água não clorada, de acordo com SOUZA et al (2012). Após mistura e homogeneização dos materiais, a suspensão é deixada em fermentação aeróbica por 10 dias. A formulação do biofertilizante Hortbio® encontra-se registrada, sendo resultado do projeto intitulado “Fertirrigação com biofertilizantes para o pimentão orgânico protegido cultivado em substrato de fibra de coco verde e em solo”

O Hortbio® pode ser aplicado em pulverizações foliares ou juntamente com a água de irrigação, via gotejamento. Recomenda-se que quando pulverizado, sua concentração deve ser igual a 5% no cultivo de hortaliças. Para aplicar com a água de irrigação, denominada de fertirrigação, as quantidades devem ser calculadas de acordo com a exigência da cultura tomando-se como base o teor de nitrogênio (SOUZA et al., 2012).

A composição química do Hortbio® já foi elucidada e, atualmente, já se conhece os macros e micronutrientes presentes no composto (Tabela 2). Em trabalho realizado por Lüdke (2009) comparando os biofertilizantes Hortbio® e Agrobio, mostrou que o Hortbio® possui maiores teores de nitrogênio, fósforo e potássio, porém para os demais nutrientes, apresentaram valores mais reduzidos. Esses dados mostram que o Hortbio® é uma grande fonte de nitrogênio, sendo isso de extrema importância, uma vez que, esse elemento é o principal responsável pela expansão celular e crescimento vegetativo, portanto, concentrações mais elevadas de nitrogênio disponível levam a produção de plantas maiores.

Quanto aos metais pesados, os elementos dosados estão no limite de tolerância admitido pela IN nº46 de 2011 (BRASIL, 2011).

Tabela 2. Avaliação dos componentes químicos no Hortbio[®] após 10 dias de fermentação (LÜDKE, 2009).

N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
g.L ⁻¹					mg.L ⁻¹					
1,48	170,5	1861,4	98,4	495,6	82,3	89,2	0,6	12,5	9,0	1,4
C orgânico		C/N¹	D²	CE³	Cd	Pb	Cr	Hg	Ni	
%			g.L ⁻¹	mS.cm ⁻¹	mg.L ⁻¹					
0,9		6	988	5,9	<0,01	<0,01	0,3	<0,01	0,2	

¹Relação Carbono/Nitrogênio. ² Densidade. ³ Condutividade Elétrica.

O Hortbio[®] já se mostrou eficaz quando utilizado em mudas de pepino e pimentão favorecendo o crescimento, aumentando a área foliar, bem como elevando a produção de matéria seca (SILVA et al., 2010, 2015). Em trabalhos realizados com alface, o Hortbio[®] apresentou elevados rendimentos quando comparados com outros biofertilizantes comerciais (LÜDKE, 2009).

Atualmente, o Hortbio[®] já é utilizado por diversos produtores orgânicos do DF para o cultivo de hortaliças. Além de ser comprovada a sua eficiência, a produção do Hortbio[®] auxilia no reaproveitamento de resíduos que seriam descartados, o que promove maior sustentabilidade ao sistema produtivo.

Apesar da composição química do Hortbio[®] já ser bem elucidada, assim como os seus efeitos positivos no crescimento de hortaliças, ainda há lacunas no que diz respeito aos aspectos microbiológicos, seus efeitos na qualidade do solo, importância ambiental e quanto às características químicas das hortaliças produzidas utilizando o biofertilizante.

Além disso, é necessário avaliar o Hortbio[®] quanto aos contaminantes biológicos que podem estar inseridos na sua composição. Esses devem ser avaliados, pois caracterizam um aspecto de suma importância para garantir a segurança dos alimentos.

3.0 Microbiota associada

Os micro-organismos são um dos principais componentes dos biofertilizantes (MALUSÁ et al., 2012). Com o intuito de aumentar o crescimento vegetal, os micro-organismos benéficos são inseridos no solo artificialmente (BORASTE et al., 2009), tendo como objetivo; aumentar a disponibilidade de nutrientes às plantas seja de forma direta, pela fixação biológica de nitrogênio ou solubilização de fósforo, atuando na produção de hormônios vegetais (fitoestimuladores), ou de forma indireta na supressão de patógenos ou na proteção às condições de estresse abiótico (BONALDI et al., 2015; FLORES-FÉLIX et al., 2013; ROSE et al., 2014; TRABELSI; MHAMDI, 2013). Muito embora os micro-organismos benéficos encontrem-se no solo, muitas das estirpes são pouco eficazes em promover o crescimento vegetal (VERMA et al., 2011), nesse contexto, os biofertilizantes tem como objetivo elevar a população de cepas microbianas, a fim de potencializar processos biológicos que ocorrem naturalmente no solo.

Os micro-organismos são considerados uma importante ferramenta na agricultura sustentável, auxiliando na redução do uso de pesticidas e fertilizantes químicos (BONALDI et al., 2015; GREPPI et al., 2015; SANTOS; MARQUINA, 2004; VASSILEV et al., 2015). O uso de inoculantes microbianos apresentam diversas vantagens ao compará-los com fertilizantes químicos, fungicidas e pesticidas: o uso de estirpes selecionadas reduz o risco de contaminação ambiental e risco para saúde humana; são eficazes em pequenas quantidades; não há risco para o aplicador; pode se multiplicar se as condições ambientais permitirem e possuem maior tempo de durabilidade no solo (PEREG; MCMILLAN, 2015).

Ao contrário da fertilização química, a inserção de micro-organismos no solo aumenta a disponibilização de macro e micronutrientes às plantas (BHARDWAJ et al., 2014). A fertilização química também possui baixa eficiência. Exemplo disso é o fósforo que rapidamente se precipita em formas insolúveis ao se ligar com cátions como Ca^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Co^{+2} ou Zn^{+2} após ser adicionado ao solo (CHANG & YANG, 2009) e o nitrogênio pode sofrer lixiviação quando na forma de nitrato, podendo causar contaminação dos lençóis freáticos. O uso de inoculantes apresenta uma elevada vantagem, uma vez que os micro-organismos se integram ao solo, disponibilizam nutrientes às plantas, tornando a prática

agrícola sustentável e sem a necessidade de crescente reposição (ADESEMOYE et al., 2009)

A maior parte da atividade microbiana no solo ocorre na região rizosférica da planta, pois nela ocorre intensa liberação de exsudatos e lisados radiculares que estimulam o crescimento de micro-organismos. Os processos que ocorrem nessa região influenciam na nutrição das plantas, na dinâmica de nutrientes e na composição quantitativa e qualitativa da microbiota (ANDRADE; NOGUEIRA, 2005). O uso de micro-organismos do solo, denominados rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR), como inoculantes de biofertilizantes tem sido uma estratégia promissora para garantir a eficiência do produto, uma vez que essas participam em importantes processos biológicos (ROSE et al., 2014; WU et al., 2005). A relação entre o PGPR e o hospedeiro pode ser tanto a nível rizosférico, quanto endofítico, onde os micro-organismos residem dentro do tecido vegetal (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

O uso de estirpes de PGPR podem substituir ou reduzir o uso de fertilizantes químicos (ADESEMOYE et al., 2009). Rose et al. (2014), avaliaram a eficácia de um biofertilizante na fixação de nitrogênio, sendo que sua aplicação reduziu em 52% o uso do fertilizante químico a base de NPK. Singh (2014), avaliou a eficácia de uma estirpe de *Azospirillum* no crescimento e produtividade do arroz, sendo observado aumento do peso, números de grãos e a altura da planta. Portanto, os PGPRs mostram-se cada vez mais promissores na área agrícola sendo utilizados como inoculantes, em biofertilizantes (ČOLO et al., 2014).

Entre os PGPR que promovem o crescimento vegetal destacam-se *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacteria*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Pseudomonas* (BHARDWAJ et al., 2014; WELLER; LINDA, 1994). Esses atuam por diversos mecanismos auxiliando o crescimento vegetal.

O nitrogênio é o nutriente de maior demanda para as plantas, sendo que sua insuficiência é um fator limitante ao crescimento vegetal. A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é a forma como bactérias convertem o nitrogênio atmosférico em formas disponíveis às plantas (MOHAMMADI; SOHRABI, 2012). Esse processo é mediado por organismos procariotos de vida livre, associados ou

simbióticos que estimulam o crescimento vegetal tanto pela FBN (MOREIRA et al., 2010). A FBN e as PGPR contribuem com aproximadamente 12-70% do total de nitrogênio, sendo estimado que 65% do N usado na agricultura é contribuído pela FBN (KUAN et al., 2016).

Diversas estirpes de PGPR como *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Azoarcus* sp., *Beijerinckia* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Azotobacter* e *Rhizobium* sp, já foram relatadas como capazes de fixarem o nitrogênio atmosférico (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; NAGANANDA et al., 2010; PEREG; MCMILLAN, 2015). E entre os solubilizadores de fosfato, é possível destacar bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, e entre os fungos *Aspergillus* e *Penicillium* (RASHID et al., 2004).

Estirpes eficientes de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Phosphobacter* e *Rhizobacter* mostraram aumentar a concentração de nitrogênio quando inoculado em cultura de girassol, ocasionando o aumento da altura e peso da planta, diâmetro do caule e número de folhas (DHANASEKAR & DHANDAPANI, 2012).

A presença de micro-organismos solubilizadores de fosfato se faz tão importante no solo, primeiramente pela importância que esse elemento possui. Após o nitrogênio, o fósforo é o nutriente que mais limita o crescimento vegetal, uma vez que, apesar da sua abundância no solo, uma pequena parcela está disponível para as plantas (cerca de 5%), sendo que grande parte encontra-se na forma insolúvel (BULGARELLI et al., 2013; VESSEY, 2003). Alguns micro-organismos, especialmente os PGPR, conseguem converter o fósforo insolúvel, para formas assimiláveis as plantas ($H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}), por meio da secreção de ácidos orgânicos, enzimas e prótons, quelação e reações de troca iônica (MOHAMMADI; SOHRABI, 2012).

Assim como o fósforo, o ferro também é abundante no solo, porém não se encontra majoritariamente na sua forma solúvel que é assimilável pelas plantas (Fe^{2+}). As plantas possuem estratégias para aumentar a solubilidade do ferro (reduzir o pH do solo e por quelação), porém, assim como as plantas, os micro-organismos também liberam moléculas quelantes, os sideróforos, que possuem maior afinidade com o ferro (BULGARELLI et al., 2013). As plantas absorvem o complexo Fe^{3+} -sideróforos microbiano, porém acredita-se que a contribuição dessa molécula para a nutrição das plantas é baixa, sendo mais importante a

ação no biocontrole contra fitopatógenos (ex. *Fusarium oxysporum*) pela competição ao elemento (VESSEY, 2003).

Diversos micro-organismos têm sido utilizados como inoculantes de formulações de biofertilizantes, como: *Azospirillum* (VERMA et al., 2011), *Rhizobium* e *Azotobacter* (FLORES-FÉLIX et al., 2013; NAGANANDA et al., 2010), *Lactobacillus* (JAVAID, 2009), *Pseudomonas* (JAKAB et al., 2011), *Glomus* (ANTUNES, 2009), *Bacillus* (BETTIOL et al., 1998) e outros.

Os micro-organismos presentes nos biofertilizantes podem ser oriundos da inoculação dos próprios micro-organismos de ação conhecida (PEREG; MCMILLAN, 2015; TRATCH; BETTIOL, 1997); de esterco bovino fresco, pois os animais recebem uma alimentação balanceada o que garante uma elevada variedade de micro-organismos (FERNANDES et al., 2006); inserção de material de serrapilheira (rica em micro-organismos oriundos do solo) (MAGRINI et al., 2009); ou pela coleta de micro-organismos eficientes (EM) do solo (BONFIM et al., 2011).

O estudo dos micro-organismos eficientes, ou também denominados de EM, teve início na década de 80 na Universidade de Ryukyu, Okinawa, Japão, pelo Dr. Teruo Higa na busca de métodos alternativos para uma produção agrícola mais sustentável. O EM é uma mistura de grupos de micro-organismos tanto anaeróbicos como aeróbicos. As muitas espécies de organismos presentes no EM, incluem: Bactérias lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*), bactérias fotossintéticas (*Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter spaeroides*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*), actinomicetos (*Streptomyces albus*, *S. griseus*) e fungos fermentadores (*Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*) (SZYMANSKI & PATTERSON, 2003).

O EM possui a capacidade de decompor a matéria orgânica oriunda de vegetais e animais, e a partir desses, produzem nutrientes, hormônios, vitaminas e outros compostos que são utilizados pelas plantas e animais. Além disso, o EM é capaz de aumentar a resistência das plantas ao ataque de patógenos, aumentar a biodiversidade microbiana no solo, o que melhora sua qualidade e a das plantas (BONFIM et al., 2011; FORMOWITZ et al., 2007). Para tanto, foi observado que a inoculação de micro-organismos de diferentes grupos, como leveduras, bactérias, fungos e actinomicetos auxiliavam a planta em diversos aspectos, como no aumento da resistência das plantas contra patógenos, atuando como bactericida

(reduziu populações de *Xantomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium* e *Pseudomonas*) e fungicida (*Thielaviopsis* e *Verticillium*) (HIGA & WIDIDANA, 1991).

O mecanismo exato de como o EM atua e interage no ecossistema solo-planta ainda não é totalmente elucidado, contudo, existem evidências que comprovam as mais diversas ações do EM, que são: supressão de patógenos de plantas e doenças associadas, solubilização de minerais fazendo com que esses se tornem biodisponíveis para o metabolismo da planta, aumento da eficiência fotossintética, e fixação biológica de nitrogênio (HIGA & WIDIDANA, 1991).

Devido à grande importância que os micro-organismos do solo possuem, quanto à sua relação simbiótica com plantas e os benefícios gerados com isso, esses têm sido isolados do solo, cultivados e inoculados na região rizosférica. Essa prática tem evidenciado efeitos diretos no crescimento de plantas. Porém, a forma como esses micro-organismos atuam associados às plantas, não foram completamente elucidados, mas sabe-se que o aumento da microbiota benéfica ocorre com a inoculação dos micro-organismos do solo (JEON et al., 2003). Os estudos acerca da comunidade microbiana presente nos biofertilizantes ainda são escassos. São necessárias maiores informações sobre a composição microbiológica, a forma com que essa atua na qualidade de plantas, bem como os principais componentes inseridos nos biofertilizantes para se determinar o potencial biotecnológico do mesmo.

4.0 Produção de auxina por micro-organismos

O crescimento e desenvolvimento vegetal são controlados por moléculas sinalizadoras, denominadas de hormônios vegetais. A auxina é um dos principais hormônios vegetais, atuando de diversas formas. A nível celular a auxina está envolvida na regulação da divisão, expansão e diferenciação celular. Esse fitohormônio também está associado ao crescimento radicular, vascularização vegetal e orientação no ambiente (fototropismo e gravitropismo). Doses exógenas de auxina aplicadas no solo mostraram que o aumento da sua concentração aumenta a formação de raízes laterais, pelos radiculares, crescimento e posicionamento da raiz (BIANCO & DEFEZ, 2010; LUDWIG-MÜLLER, 2015). As modificações causadas na estrutura da raiz, devido à produção de auxina, aumenta a captação de nutrientes pela planta e sua tolerância ao estresse abiótico e biótico (SUKUMAR et al., 2013).

O ácido-3-indol acético (AIA) é o tipo de auxina que possui maior atividade, muito embora exista outros tipos de auxina derivados do indol, com estrutura similar ao AIA, como o ácido-3-indol butírico (TSAVKELOVA et al., 2006)

Uma grande diversidade de micro-organismos como cianobactérias, bactérias e fungos está associada com plantas. Grande parte da microbiota do solo está envolvida com a promoção do crescimento vegetal e se beneficiam disso pela maior secreção de nutrientes e exsudatos (SRIVASTAVA, 2002). A presença de hormônios vegetais já foi detectada em meios de cultura de micro-organismos. Muito embora nesses organismos os hormônios não estão associados à efeitos fisiológicos, a produção desses por uma extensa diversidade microbiana está ligada a mudança na arquitetura das raízes de plantas colonizadas e a promoção do crescimento vegetal (SPAEPEN, 2015).

As auxinas também estão envolvidas na regulação em diferentes processos de crescimento associados a presença de patógenos ou de simbioses. Os micro-organismos benéficos interferem no metabolismo da auxina do hospedeiro, com o objetivo de indução do crescimento para o benefício do próprio vegetal (LUDWIG-MÜLLER, 2015). Entretanto, alguns micro-organismos produzem auxina em elevada concentração causando a formação de tumores e o crescimento desordenado, como espécies do gênero *Agrobacterium* e *Pseudomonas* (SRIVASTAVA, 2002).

A principal ação da auxina produzida por micro-organismos é a modificação radicular de plantas. O cultivo de pepino com *Trichoderma asperellum* mostrou aumentar o crescimento e atividade da raiz da planta (LEI; YA-QING, 2015).

O AIA já foi identificado como produto do metabolismo de diversos PGPR, destacando os gêneros *Azospirillum*, *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, presentes em diversas formulações de biofertilizantes (PEREG; MCMILLAN, 2015; VESSEY, 2003). Estudos relatam a produção de AIA por cianobactérias (*Nostoc*, *Chlorogloeopsis*, *Calothrix*, *Plectonema*, *Gloeotheca*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, e *Anabaenopsis*), em leveduras (especialmente do gênero *Saccharomyces*) e fungos (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Phoma*, *Pythium*, *Trichoderma* e *Actinomucor*), assim como fungos patogênicos (*Phytophthora*, *Ustilago*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Plasmodiophora*, *Colletotrichum*, *Phymatotrichum*, *Lentinus* e *Sclerotium*) e fungos micorrízicos (*Laccaria*,

Pisolithus, *Amanita*, *Rhizopogon*, *Paxillus* e *Hebeloma*) (TSAVKELOVA et al., 2006).

Cerca de 80% das bactérias rizosféricas produzem auxina (SPAEPEN et al., 2007). Entretanto, a produção de auxina é sensível à composição e às condições de cultivo, como a aeração e temperatura. A maior produção de AIA é encontrada na fase estacionária do crescimento bacteriano, sendo que a presença de amônio e glutamina inibem a biossíntese de AIA, contudo, a presença do aminoácido aromático triptofano (percursor do AIA) aumenta a produção de AIA (SPAEPEN, 2015; TSAVKELOVA et al., 2006). Diversos fatores atuam mediando a expressão genética ligada a biossíntese de AIA. A regulação da expressão de AIA é bastante diversa. Entre os fatores abióticos, o pH, estresse osmótico e a limitação de fontes de carbono e nutrientes podem comprometer a produção de auxina (SPAEPEN, 2015).

As bactérias fixadoras de nitrogênio também podem mediar alterações radiculares, via AIA, mesmo estando em simbiose com a planta, fato relatado tanto para *Frankia* quanto para *Sinorhizobium meliloti* (SUKUMAR et al., 2013).

Recentes estudos mostram que o fungo endofítico *Piriformospora indica*, produz auxina na fase biotrófica da interação com plantas. A redução da concentração de auxina produzida por este fungo, induzida pela atenuação genética do gene responsável pela síntese de auxina, reduziu a capacidade de defesa da planta a patógenos. Outra vantagem biológica para as plantas induzida pela produção de auxina por micro-organismos, é a formação de maior número de raízes laterais, bem como, facilitar formação de associações micorrízicas (LUDWIG-MÜLLER, 2015).

Sabe-se que uma grande diversidade de micro-organismos presentes no solo (sendo eles benéficos ou patogênicos) produzem auxina. Esse fato mostra que essa molécula é importante para o estabelecimento do contato dos micro-organismos com o hospedeiro (SUKUMAR et al., 2013).

Os biofertilizantes possuem na sua formulação micro-organismos capazes de aumentar a biodisponibilidade de nutrientes e hormônios para as plantas. Contudo, ainda são necessárias maiores pesquisas sobre como ocorre a produção de AIA, qual a concentração desses, bem como, quais são os organismos envolvidos na produção. Tendo isso esclarecido, o uso dos

biofertilizantes poderá ser feito de forma mais padronizada, e assim, ser mais eficaz na promoção do crescimento das plantas.

5.0 A Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se entre as hortaliças por ser a folhosa mais consumida no Brasil, com maior importância comercial e figura entre as principais hortaliças no que diz respeito à produção, comercialização e ao valor nutricional (OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2001). Existem evidências que essa cultura se originou de espécies silvestres ainda encontradas em regiões de clima temperado no sul da Europa e na Ásia Ocidental, sendo introduzida no Brasil no ano de 1647 com a vinda dos portugueses (FILGUEIRA, 2006).

Tradicionalmente, a cultura é adaptada às temperaturas mais amenas, produzindo melhor nas épocas mais frias do ano (OLIVEIRA et al., 2004). Durante o inverno nas regiões Sul e Sudeste são cultivadas alfaces adaptadas ao clima mais frio, enquanto nas demais regiões predominam as alfaces de verão. As cultivares produzidas no verão tendem a apresentar atributos de qualidade inferiores. Isso ocorre devido a origem dessa cultura, oriunda de regiões de clima temperado, sendo ideal para o cultivo temperaturas em torno de 12 a 22°C. A ocorrência de temperaturas mais elevadas tende a acelerar o ciclo da cultura e, dependendo da cultivar, pode resultar em plantas menores, uma vez que o pendoamento ocorre mais precocemente (HENZ & SUINAGA, 2009).

O ciclo da cultura é anual, encerrando a fase vegetativa quando a planta atinge o maior desenvolvimento das folhas, quando se inicia a fase reprodutiva que consiste na emissão do pendão floral, sendo favorecida pelas épocas de elevadas temperaturas e dias longos (FILGUEIRA, 2006).

Atualmente, existem cultivares adaptadas a diversas condições climáticas, uma vez que, o desenvolvimento de novas variedades mais resistentes ao calor permitiu que essa hortaliça fosse cultivada em todo território nacional. Possui ciclo de vida curto (variando de 45 a 60 dias) e baixa suscetibilidade a pragas e doenças. Devido a essas características é uma das hortaliças de maior importância econômica e social do país, pois é produzida durante todo o ano e garante um rápido retorno de capital (MALDONADE et al., 2014; MEDEIROS et al., 2007).

Está presente na dieta da maioria dos brasileiros, especialmente na forma crua, em saladas e em sanduíches. Possui substâncias com características calmantes como a lactupicrina e lactucina e também apresenta alto conteúdo de vitaminas A, B1, B2 e C, além de cálcio, fósforo e potássio (SILVA, 2011; SOUSA et al., 2014).

A alface pertence à classe Magnoliopsida, ordem Asterales, família Asteraceae, subfamília Cichoriodeae, gênero *Lactuca* e espécie *Lactuca sativa* (SILVA, 2011). Quanto às características botânicas, a alface é uma planta de pequeno porte, com pequeno caule no qual as folhas ficam presas, sendo essas lisas ou crespas, exibindo diversos tons de verde, podendo também, exibir coloração roxa a depender da cultivar. O sistema radicular é pouco profundo, pode atingir até 60cm de profundidade e explorar entre 15 a 20cm do perfil do solo (PAULETTI, 2012).

A alface comercializada atualmente possui uma grande variabilidade fenotípica, apresentando diferenças em relação a cor, formato e ao tamanho (SUINAGA et al., 2013). As variedades de alface são caracterizadas por possuir uma elevada diversidade genética resultado de uma origem polifilética (KŘÍSTKOVÁ et al., 2008). Segundo Křístková et al. (2008), existem sete diferentes cultivares da alface, diferindo-se fenotipicamente. Os sete diferentes tipos de alface são: Lisa (*Butter head lettuce*), Americana (*Crisp head lettuce* ou *Iceberg*), Romana (*Cos lettuce*), Aspargos (*Stalk lettuce*), Crespa (*Leaf lettuce*), Alface de corte (*Cutting lettuce*) e a Semente oleosa (*Oil seed lettuce*). A definição dos tipos de alface é importante porque a diversidade nas características morfológicas e fisiológicas determinam aspectos como a conservação na pós-colheita, manuseio, e características específicas de algumas cultivares, como a resistência ao vírus do mosaico do alface (*Lettuce mosaic virus* – LMV) e a resistência ao pendoamento e florescimento precoce (HENZ & SUINAGA, 2009).

Durante a década de 90, a alface lisa correspondia a mais de 51% do volume de alface comercializado no estado de São Paulo. Contudo, as temperaturas elevadas, associadas com alto nível de pluviosidade tornavam a cultivar mais suscetível ao ataque de patógenos e ao pendoamento precoce. Contudo, cultivares que não formam cabeça, como a Crespa é mais resistente às altas temperaturas e ao clima tropical, essa característica fez com que a alface

lisa reduzisse sua importância comercial, abrindo espaço para a alface crespa (SALA & COSTA, 2012).

Atualmente no Brasil, a alface de maior importância econômica é a crespa, tendo preferência de 70% no mercado brasileiro, seguida pela americana (15%), lisa (10%) e romana (SUINAGA et al., 2013). Entre essas cultivares a variedade Vanda, tipo Crespa e a Laurel, tipo americana são as preferidas para o cultivo entre os alfacicultores brasileiros (SALA & COSTA, 2012). Tem-se aumentado o interesse pela alface tipo “americana”, tanto por ser apreciada na forma crua, onde ela é utilizada em redes de *fast food*, como ingrediente de sanduíches por sua crocância, textura e sabor (HENZ & SUINAGA, 2009).

No Brasil, o plantio da alface ocupa uma área de aproximadamente 35.000 hectares sendo tanto pela produção intensiva, quanto por produtores familiares, gerando em torno de cinco empregos por hectare (RESENDE et al., 2007; SOUSA et al., 2014). Por possuir uma vida curta no período pós-colheita, a alface é cultivada próxima a centros consumidores, o que caracteriza a agricultura urbana ou periurbana, localizada em cinturões verdes próximos a regiões metropolitanas (BRANCO & BLAT, 2014; HENZ & SUINAGA, 2009).

Segundo dados do HORTIBRASIL (2013), a produção brasileira de alface é de 525.602 toneladas, sendo que 30% da produção são realizadas na região Sudeste, 30% na região Sul, 26% na região Nordeste, 7% na região Centro-Oeste e 6% na região Norte. Os estados de São Paulo e Minas Gerais destacam-se como os principais produtores de alface do país (SUINAGA et al., 2013; YURI et al., 2004). Em São Paulo, a principal região produtora é de Sorocaba, que em 2011 dobrou a sua área de plantio, correspondendo a 35% da área plantada de alface no estado, seguida por Mogi das Cruzes com 31%, São Paulo com 4%, Campinas com 3% e as demais regiões com 28% (HORTIBRASIL, 2013). De acordo com dados publicados pela Hortifruti Brasil (BRASIL, 2015a), em 2014 a produção de alface atingiu mínimas históricas, devido à escassez de chuvas somadas as altas temperaturas. A principal região afetada foi a Sudeste, especialmente os estados de São Paulo e Minas Gerais.

Na região Centro-Oeste, os maiores produtores são os municípios de Goiânia e Anápolis e a micro região do entorno de Brasília (RESENDE et al., 2007). O Distrito Federal (DF) já alcançou a autossuficiência na produção de alface e outras hortaliças. Ainda existe um potencial de crescimento agrícola

pouco explorado no DF, sendo esse um incentivo para a exploração de práticas mais sustentáveis, especialmente entre os agricultores familiares (OLIVEIRA et al., 2015).

Atualmente, existem quatro diferentes sistemas de cultivo da alface: o convencional e o orgânico em campo aberto e o protegido no solo e hidropônico. Esses se divergem em vários aspectos que vão desde o manejo da cultura ao manuseio pós-colheita (HENZ & SUINAGA, 2009). No sistema convencional, diversos produtos químicos são utilizados como os adubos e inseticidas. O cultivo convencional em campo aberto é o mais importante em termos de área e de produção. No cultivo orgânico, por sua vez, não é feito o uso desses produtos, porém devem ser seguidos os preceitos básicos de adubação orgânica, como o uso de compostos e adubos verdes, manejo de doenças, insetos, artrópodes e plantas espontâneas de acordo com as normas preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O sistema hidropônico é feito sem a presença do solo, sendo fornecida uma solução nutritiva com água e nutrientes, que pode conter adubos químicos solúveis (HENZ & SUINAGA, 2009; SILVA et al., 2011).

Essa hortaliça apresenta grande importância na alimentação, tanto pelo aspecto nutricional, por ser uma importante fonte de vitaminas e minerais, como por ser de fácil aquisição pelo baixo custo, e por ser cultivada em todas as épocas do ano (LÜDKE, 2009). Para se garantir uma produtividade satisfatória, essa cultura exige uma adequada disponibilidade de nutrientes, principalmente em relação ao nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio. O nitrogênio e o fósforo são nutrientes que normalmente limitam a produção, uma vez que se encontram em baixas concentrações no solo (LIMA et al., 2007a).

Muito embora a alface seja uma olerícola de fácil produção, o seu cultivo é dependente de insumos químicos, devido ao seu ciclo curto e alta produtividade, podendo extrapolar para doses excessivas para garantir resultados satisfatórios (SILVA, 2013).

Por ser extremamente dependente de nutrientes e ter seu crescimento limitado na ausência de nitrogênio, torna indispensável a fertilização do solo para melhora dos seus atributos agronômicos. O fornecimento de nitrogênio de forma adequada favorece o crescimento, expande a área fotossintética e eleva a produtividade, sendo que sua ausência é marcada com sintoma de clorose pela

distribuição do nutriente às folhas mais novas, contudo, o excesso ocasiona queima das folhas, aumenta a suscetibilidade da planta a doenças, causa o acúmulo de nitrato e dificulta a absorção de outros nutrientes (LÜDKE, 2009). O fornecimento de cálcio é fundamental, para promoção de um maior peso da planta e tamanho das folhas, contudo a deficiência em fósforo e potássio são limitantes ao crescimento vegetativo. As exigências nutricionais da alface é um fator fundamental que deve ser atendido, tanto no que se refere à quantidade, quanto a qualidade do produto (SILVA, 2013).

Muito embora o emprego de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas tem sido amplamente utilizado, pois confere às hortaliças resultados satisfatórios quanto a sua produção, o uso extensivo desses produtos pode ser prejudicial à saúde do consumidor e ao meio ambiente, bem como, onera os custos de produção (MEDEIROS et al., 2007).

Em busca de contornar os problemas gerados pelo uso de agentes químicos na produção de hortaliças, a adubação orgânica visa diminuir os impactos gerados e reduzir os custos de produção (SANTOS et al., 2001). Existe um crescente aumento da produção orgânica de alface no Brasil. Juntamente com a couve, tomate, cenoura, agrião e berinjela, a alface configura entre as principais hortaliças produzidas no sistema orgânico no Brasil. O cultivo orgânico tem ganhado maior valorização ao longo dos anos, por ser uma estratégia de alimentação mais saudável e por ser aliada à preservação do meio ambiente. Quanto ao aspecto econômico, além do cultivo orgânico possuir menor custo de produção por área, quando comparado ao cultivo convencional, existe uma valorização do produto em torno de 20% em relação ao produto oriundo do cultivo convencional (RESENDE et al., 2007).

Portanto, um dos maiores desafios para a agricultura na atualidade é desenvolver sistemas agrícolas sustentáveis, que sejam capazes de garantir qualidade e quantidade sem que os recursos do solo e do ambiente sejam afetados (SOUSA et al., 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 921–929, 2009.
- ALFA, M. I. et al. Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestion effluent of cow dung and chicken droppings. **Renewable Energy**, v. 63, p. 681–686, 2014.
- ALVES, S. B. et al. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 21, p. 16–21, 2001.
- ANANDHAM, R. et al. Cultivable bacterial diversity and early plant growth promotion by the traditional organic formulations prepared using organic waste materials. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 4, n. 4, p. 279–289, 2015.
- ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M. A. Risco ambiental: organismos geneticamente modificados e grupos funcionais de microrganismos do solo. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 8, n. 34, p. 13–21, 2005.
- ANSARI, M. F.; TIPRE, D. R.; DAVE, S. R. Efficiency evaluation of commercial liquid biofertilizers for growth of *Cicer arietinum* (chickpea) in pot and field study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 17–24, 2015.
- ANTUNES, P., et al. Influence of commercial inoculation with *Glomus intraradices* on the structure and functioning of an AM fungal community from an agricultural site. **Plant Soil** 317, 257–266, 2009.
- ARAÚJO, D. L. DE et al. Comportamento do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) sob diferentes dosagens de biofertilizante e intervalos de aplicação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 3, n. 4, p. 98–109, 2008.
- ARAÚJO, E. N. DE et al. Produção do pimentão adubado com esterco bovino e biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 81, p. 466–470, 2007.
- BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVÃO, J. A. H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**. 1ª edição ed. Jaguariúna - SP: Embrapa Meio Ambiente - CMPMA, 1998.
- BHARDWAJ, D. et al. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 66, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BIANCO, C.; DEFEZ, R. Improvement of phosphate solubilization and *Medicago* plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium*

meliloti. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4626–32, 2010.

BONALDI, M. et al. Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. February, p. 1–10, 2015.

BONFIM, F. P. G. et al. **Caderno dos microrganismos eficientes (EM): Instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM**. Viçosa - Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa - MG, 2011.

BORASTE, A et al. Biofertilizers: A novel tool for agriculture. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 23–31, 2009.

BRANCO, R. B. F.; BLAT, S. F. Sistema de cultivo na produção de hortaliças. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 11, n. 1, 2014.

BRASIL. Anuário 2014/2015. **Hortifruti Brasil**, v. 141, n. 13, p. 58, 2015a.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Número de produtores orgânicos cresce 51,7% em um ano. Brasília – DF, 2015b.

BRASIL. Legislação dos Orgânicos. Instrução Normativa nº 46, 2011.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 807–38, 2013.

CASTRO C. M et al. **Comprovação in vitro da ação inibidora do biofertilizante “Vairo” produzido a partir da fermentação anaeróbica do esterco bovino, sobre germinação de conídios de diversos gêneros de fungos fitopatogênicos**. In: Reunião brasileira sobre controle biológico de doenças em plantas, Jaguariúna, 1991.

CHANG, C.; YANG, S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1648–1658, 2009.

CHICONATO, D. A. et al. Response of the lettuce to the application of biofertilizer under two levels of irrigation. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 392–399, 2013.

COLLARD, F. H. et al. Efeito do uso de biofertilizante Agrobio na cultura do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg). **Revista de Biociência**, v. 1, n. 7, p. 15–21, 2001.

ČOLO, J.; HAJNAL-JAFARI, T. I.; ĐURIĆ, S. Plant Growth Promotion Rhizobacteria in Onion Production. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 83–88, 2014.

DELEITO, C. S. R. et al. Biofertilizante Agrobio: Uma alternativa no controle da mancha bacteriana em mudas de pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1035–1038, 2004.

DELEITO, C. S. R. et al. Ação do biofertilizante Agrobio sobre a mancha-bacteriana e desenvolvimento de mudas de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 117–122, 2005.

DHANASEKAR, R.; DHANDAPANI, R. Effect of biofertilizers on the growth of *Helianthus annuus*. **Int J plant, Ani Environ Sci**, v.2, pp.143–147, 2012.

DIAS, C. N. et al. Produtividade e qualidade do morangueiro sob dois ambientes e doses de biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 10, p. 961–966, 2015.

EMATER. **Crescimento do mercado de produtos orgânicos atrai pequenos produtores**. Brasília-DF, 2015.

FAO. **Statistical yearbook world food and agriculture**, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, Roma, pp 1–307, 2013.

FAO. **Perspectivas agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024**, 2015.

FERNANDES, M. D. C. D. A.; LEITE, E. C. B.; MOREIRA, V. E. **Defensivos Alternativos: ferramenta para uma agricultura ecológica, não poluente, produtora de alimentos saudáveis**. Niterói. PESAGRO- RIO, 2006.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Universidade Federal de Viçosa: Empresa Júnior de Agronomia, 2006.

FLORES-FÉLIX, J. D. et al. Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 6, p. 876–882, 2013.

FORMOWITZ, B. et al. The role of “effective microorganisms” in the composting of banana (*Musa ssp.*) residues. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 170, p. 649–656, 2007.

GREPPI, A. et al. Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. **International journal of food microbiology**, v. 205, p. 81–89, 2015.

GUAZZELLI, M. J. B. et al. **Biofertilizantes**. Publicação Técnica, 2012.

GUPTA, G. et al. Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria as Biofertilizer. In: **Sustainable Agriculture Reviews**. p. 183–221, 2012

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. - Comunicado Técnico, Embrapa Hortaliças - CNPH, ISSN 1414-9850, p. 1–7, 2009.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–8873, 2013.

HIGA, T.; WIDIDANA, G. N. The Concept and Theories of Effective Microorganisms. In: **Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming**, 1991.

HORTIBRASIL. **Alface em números**, 2013.

IWAISHI, S. Effect of organic fertilizer and effective microorganisms on growth, yield and quality of paddy-rice varieties. **Journal of Crop Production**, v. 3, p. 269–273, 2001.

JAKAB, A., SZABÓ, A., KOVÁCS, Z., KÁTAI, J. The effect of alternative methods of nutrient supply on some microbiological characteristics of a chernozem soil. **Analele Universității din Oradea Fascicula**, v. 17, 85–90, 2011.

JAVOID, A. Growth, nodulation and yield of black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] as influenced by biofertilizers and soil amendments. **Afr. J. Biotechnol.** 8, 5711–5717, 2009

JEON, J. S. et al. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. **Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 271–276, 2003.

KŘÍSTKOVÁ, E. et al. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. **Hort. Sci. (Prague)**, v. 35, n. 3, p. 113–129, 2008.

KUAN, K. B. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0152478, 2016.

LEI, Z.; YA-QING, Z. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588–1597, 2015.

LIMA, R. C. M. et al. Eficiência e efeito residual de biofertilizantes de rochas com PK e enxofre com *Acidithiobacillus* em alface. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 402–407, 2007.

LÓPEZ-BUCIO, J. et al. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 2, pp. 207-217.

LÜDKE, I. **Produção orgânica de alface americana fertirrigada com biofertilizantes em cultivo protegido**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, p. 79, Dissertação de Mestrado, 2009.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 4–12, 2015.

MACHADO, D. C. et al. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. **Brazilian Journal**

- of Microbiology**, v. 37, p. 538–544, 2006.
- MAGRINI, F. E.; CAMATTI-SARTORI, V.; VENTURIN, L. Avaliação Microbiológica , pH e Umidade de Diferentes Fases de Maturação do Biofertilizante Bokashi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 431–435, 2009.
- MAGRO, D. **Supermagro: a receita completa**. Boletim da Associação de Agricultura Orgânica, n. 16, p. 3-4, 1994.
- MALDONADE, I. R. et al. **Manual de boas práticas agrícolas na produção de alface**. Brasília - DF. Embrapa Hortaliças, 2014.
- MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- MARROCOS, S. DE T. P. et al. Composição química e microbiológica de biofertilizantes em diferentes tempos de decomposição. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 4, p. 34–43, 2012.
- MEDEIROS, D. C. DE et al. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 433–436, 2007.
- MEDEIROS, D. C. DE et al. Qualidade de mudas de alface em função de substratos com e sem biofertilizante. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 186–189, 2008.
- MEDEIROS, M. B. DE; LOPES, J. DA S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 24–26, 2006.
- MINGORANCE, M. D. Field approach to mining-dump revegetation by application of sewage sludge co-compost and a commercial biofertilizer. **Journal of Environmental Management**, v. 158, p. 95–102, 2015.
- MOHAMMADI, K.; SOHRABI, Y. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production : a Review. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 7, n. 5, p. 307–316, 2012.
- MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.
- NAGANANDA, G. . et al. In vitro studies on the effects of biofertilizers (*Azotobacter* and *Rhizobium*) on seed germination and development of *Trigonella foenum-graecum* L. using a novel glass marble containing liquid. **International Journal of Botany**, p. 1 –10, 2010.
- OGBO, F. C. Bioresource Technology Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4120–4124, 2010.
- OLIVEIRA, A. C. B. DE et al. Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 2, p. 211–217, 2004.

OLIVEIRA, E. Q. DE et al. Produtividade de alface e rúcula, em sistema consorciado, sob adubação orgânica e mineral. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 36–40, 2010.

OLIVEIRA, J. R. DE et al. Estado nutricional e produção da pimenteira com uso de biofertilizantes líquidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1241–1246, 2014.

OLIVEIRA, M. N. DA S et al. Agricultura familiar no Distrito Federal : a busca por uma produção sustentável. **Sustentabilidade em Debate**, v. 6, n. 1, p. 53–69, 2015.

OWEN, D. et al. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41–54, 2015.

PAULETTI, D. R. **Influência das plantas de cobertura nas características produtivas da alface e nos atributos físicos e químicos do solo**. Marechal Candido Rondon - PR. Dissertação de Mestrado, 2012.

PEREG, L.; MCMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 349–358, 2015.

PICANÇO, M. et al. Perdas na produtividade do tomateiro em sistemas alternativos de controle fitossanitário. **Horticultura Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 88–91, 1997.

PINDI, P. K. Liquid microbial consortium for soil health. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 03, n. 3, p. 1 – 2, 2012.

PINTO, J. M. et al. Cultivo orgânico de meloeiro com aplicação de biofertilizantes e doses de substância húmica via fertirrigação. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 280–286, 2008.

RASHID, M. et al. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 187 – 196, 2004.

RESENDE, F. V. et al. **Cultivo de Alface em Sistema Orgânico de Produção**. Comunicado Técnico, Embrapa Hortaliças - CNPH, ISSN 1415-3033, p. 1–16, 2007.

ROCHA, M. C. et al. Produtividade e exportação de N e de K na cultura do pimentão (*Capsicum annuum* L.) influenciada pela aplicação foliar de biofertilizantes bactericidas. **Agronomia**, v. 37, n. 1, p. 42–45, 2003.

ROSE, M. T. et al. Up to 52% N fertilizer replaced by biofertilizer in lowland rice via farmer participatory research. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 4, p. 857–868, 2014.

SAHOO, R. K.; BHARDWAJ, D.; TUTEJA, N. A sustainable eco-friendly agricultural approach to crop improvement. In: **Plant Acclimation to Environmental Stress**. p. 403–432, 2013.

- SALA, F. C.; COSTA, C. P. DA. Retrospectiva e tendência da alfacecultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187–194, 2012.
- SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, v. 150, p. 2527–2534, 2004.
- SANTOS, A.C.V. dos. **Biofertilizante líquido: o defensivo agrícola da natureza**. Niterói : EMATER-RIO, 16p, 1992
- SANTOS, R. H. S. et al. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1395–1398, 2001.
- SCHMIDT, J.; MESSMER, M.; WILBOIS, K.-P. Beneficial microorganisms for soybean (*Glycine max* (L.) Merr), with a focus on low root-zone temperatures. **Plant and Soil**, 2015.
- SILVA, E. M. DA et al. Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 242–245, 2011.
- SILVA, P. S. DA et al. **Produção de mudas de pimentão em substrato de coco verde fertirrigadas com biofertilizante em sistema orgânico**. Horticultura Brasileira, 28: S2714-S2720, 2010.
- SILVA, P. S. DA et al. **Produção de mudas orgânicas de pepino em substratos a base de fibra de coco verde com aplicação de biofertilizante**. Horticultura Brasileira. 28: S2707- S2713, 2015.
- SILVA, A. S. N. **Doses de fósforo e de potássio na produção da alface**. Universidade Estadual Paulista - Unesp, Tese de Doutorado, 2013.
- SILVA, J. DOS S. **Crescimento de alface em solos sob influência de *Chibui bari* (Annelida: Oligochaeta)**. Rio Branco - Acre, Dissertação de Mestrado, 2011.
- SINGH, M. K. Evaluation of *Azospirillum* strains as biofertilizers for rice. **International Journal of Farm Sciences**, v. 4, n. 3, p. 15–18, 2014.
- SOUSA, T. P. DE et al. Produção de alface (*Lactuca sativa* L.), em função de diferentes concentrações e tipos de biofertilizantes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 4, p. 168–172, 2014.
- SOUZA, R. B. DE et al. **Composição do Hortbio**. Brasília - DF. EMBRAPA Hortaliças- CNPH, 2012.
- SPAEPEN, S. Plant Hormones Produced by Microbes. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions - Microbes for Sustainable Agriculture**. p. 247–256, 2015.
- SPAEPEN, S. et al. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.

- SRIVASTAVA, L. M. Auxins. In: **Plant Growth and Development**. [s.l: s.n.]. p. 756. p. 155-170, 2002.
- SUINAGA, F. A. et al. **Desempenho produtivo de cultivares de alface crespa**. Comunicado Técnico, Embrapa Hortaliças - CNPH, ISSN 1677-2229, p. 1–15, 2013.
- SUKUMAR, P. et al. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 5, p. 909–919, 2013.
- SZYMANSKI, N.; PATTERSON, R. A. **Effective Microorganisms (EM) and Wastewater Systems**. Best Management Practice Conference. Australia: Lanfax Laboratories Armidale, 2003
- TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: A review. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 12, 2013.
- TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1131–1139, 1997.
- TSAVKELOVA, E. A et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 42, n. 2, p. 133–143, 2006.
- VASSILEV, N. et al. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 4983–4996, 2015.
- VERMA, R. et al. Population dynamics and identification of efficient strains of *Azospirillum* in maize ecosystems of Bihar (India). **3 Biotech**, v. 1, p. 247–253, 2011.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, p. 571–586, 2003.
- WELLER, D. M.; LINDA, S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: **Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganism**. p. 18, 1994.
- WU et al. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. **Geoderma**, v. 125, p. 155-166, 2005.
- XIANG, W. Mutual information flow between beneficial microorganisms and the roots of host plants determined the bio-functions of biofertilizers. **American Journal of Plant Sciences**, v. 03, p. 1115–1120, 2012.
- YURI, J. E. et al. Desempenho de cultivares de alface tipo americana em cultivo de outono no sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 2, p. 282–286, 2004.
- ZHEN, Z. et al. Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China. **PLoS**

ONE, v. 9, n. 10, p. e108555, 2014.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO BIOFERTILIZANTE HORTBIO®

RESUMO

Os biofertilizantes possui um promissor uso na agricultura sustentável e se caracterizam por possuírem uma rica microbiota que desempenha importantes processos no solo. O Hortbio® é um biofertilizante que possui como inóculo micro-organismos do solo. Esse trabalho objetivou avaliar a microbiota cultivável presente na formulação do biofertilizante Hortbio®. Para tanto, foi utilizado diferentes meios de cultura para o isolamento, sendo eles o meio R2A, Martin, AC, THSM e MYGP específicos para o isolamento de bactérias totais, fungos totais, actinomicetos, *Trichoderma* e leveduras, respectivamente. Após a diluição seriada e plaqueamento, os micro-organismos foram isolados e depois identificados por meio do sequenciamento do DNA. Foram isolados e identificados 120 isolados bacterianos, 61 isolados de leveduras e 36 de fungos, em um total de 217 isolados microbianos. Entre os gêneros encontrados, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arrobacter*, *Lactococcus*, *Kurthia*, *Sporosarcina*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Stenotrophomonas*, *Corynebacterium*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* já foram relatados na literatura como importantes promotores do crescimento vegetal e agentes de biocontrole. O tempo de produção do biofertilizante atuou como uma importante variável na diversidade da comunidade de fungos filamentosos e leveduriformes, sendo que nos tempos finais de produção (20, 25 e 30 dias), havia a presença apenas de *Galactomyces candidum* e *Pichia kudriavzevii*. Não foi observado diferenças na diversidade bacteriana. Os resultados obtidos apontam que importantes gêneros microbianos estão inseridos na formulação do biofertilizante, o que indica um possível potencial do produto na agricultura sustentável, assim como o tempo de produção interfere na diversidade microbiana, especialmente de fungos.

PALAVRAS-CHAVES: PGPR, micro-organismos eficazes, agricultura orgânica, sequenciamento de DNA.

1.0 INTRODUÇÃO

A agricultura convencional possui um importante papel em preencher a demanda alimentar da crescente população humana, o que tem levado a dependência de fertilizantes minerais e agroquímicos (BHARDWAJ et al., 2014). A adubação mineral é uma importante ferramenta na agricultura como fonte de nutrientes prontamente assimiláveis às plantas. Contudo, o uso indiscriminado desses produtos gera grandes impactos ambientais, como contaminação da água, acidificação e eutrofização do solo (ADESEMOYE et al., 2009).

Devido aos impactos gerados, a biotecnologia agrícola procura encontrar formas alternativas em que o produtor mantenha a produtividade em um sistema sustentável (ROSE et al., 2014). O uso de micro-organismos benéficos, que atuam disponibilizando nutrientes às plantas, tem sido realizado para superar os problemas associados com o uso excessivo de fertilizantes químicos e pesticidas (VASSILEV et al., 2015).

Nesse contexto, os biofertilizantes apontam como uma importante estratégia, pois são substâncias que contêm micro-organismos vivos que, quando aplicados à sementes, superfícies de plantas ou solo, colonizam a rizosfera ou o interior das plantas e promovem o crescimento por aumentarem o suprimento ou tornarem disponíveis nutrientes primários ao hospedeiro (VESSEY, 2003). A comunidade microbiana encontrada nos biofertilizantes é variável e irá depender do processo (aeróbico ou anaeróbico) e do substrato utilizado na sua produção (OLIVEIRA et al., 2014). Seu preparo não exige uma fórmula padrão, sendo que diversas receitas são testadas utilizando-se componentes minerais para o enriquecimento do meio de cultivo (MEDEIROS & LOPES, 2006). Diferentemente dos fertilizantes químicos, possuem baixo valor agregado, pois utilizam uma ampla gama de materiais de baixo custo na sua formulação, incluindo restos de produtos agrícolas, como: esterco bovino, resíduos da colheita em geral, rochas moídas, melão de cana, leite, ossos, entre outros (MAGRINI et al., 2009; OGBO, 2010).

O Hortbio® é um fertilizante biológico aeróbico desenvolvido pela Embrapa Hortaliças, localizada em Brasília – DF. Esse fertilizante utiliza como inóculo micro-organismos oriundos do solo (SOUZA et al., 2012).

Os micro-organismos presentes em formulações de biofertilizantes atuam de forma sinérgica com a planta promovendo o seu crescimento, aumentando a disponibilidade de nutrientes e promovendo o uso eficientes desses (ADESEMOYE et al., 2009; BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Os micro-organismos atuam em processos biológicos importantes, como fixação biológica do nitrogênio atmosférico, solubilização do fosfato, produção de hormônios vegetais (ex, auxina, giberelina), como agentes de controle biológico e produtores de sideróforos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; HERRMANN; LESUEUR, 2013; PEREG; MCMILLAN, 2015).

Diversos grupos microbianos estão envolvidos são comumente relatados na literatura como importantes promotores do crescimento vegetal como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterobacter* entre outros (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; HOPPE-SEYLER et al., 2003; HUANG et al., 2015), fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (BENÍTEZ et al., 2004; GÜNEŞ et al., 2009; RADHAKRISHNAN et al., 2014) e leveduras como *Pichia kudriavzevii* (HELLSTRÖM et al., 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou realizar a caracterização microbiológica do biofertilizante Hortbio® em diferentes tempos do processo de produção.

2.0 METODOLOGIA

2.1 Produção do biofertilizante

Foi utilizada para a realização do experimento uma bombona plástica com capacidade de 200 litros. Para produção de 100 litros do biofertilizante foi utilizado: Farinha de sangue (1,1kg); Farelo de arroz (4,4kg); Farelo de mamona (1,1kg); Farinha de ossos (2,2kg); Sementes trituradas (1,1kg); Cinza de madeira (1,1kg); Rapadura triturada (0,55kg); Fubá (0,55kg) e 1 litro do inoculante EM (Figura 1). Ao final foi adicionada água não clorada para obter o volume final de 100 litros. Esses materiais foram misturados com auxílio de uma espátula de madeira na medida em que se adicionava a água.

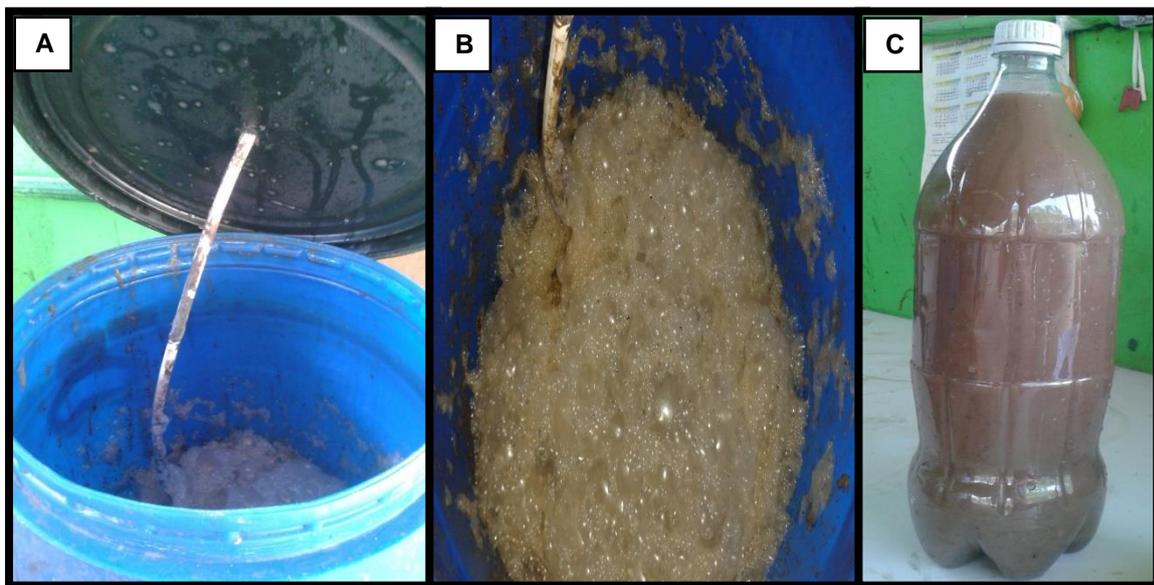


Figura 1. Produção do Hortbio®. (A) Produção do Hortbio® em bombonas de 200 litros. O cano branco fornecia aeração por 15 minutos a cada hora ao sistema. (B) Formação de bolhas devido ao processo fermentativo. (C) Hortbio® com 10 dias, pronto para ser utilizado.

De acordo com Souza et al (2012), o Hortbio® pode ser utilizado a partir do seu décimo dia de preparo (Figura 1C), tendo validade de 30 dias. Foram produzidas cinco preparações de Hortbio® utilizando o mesmo EM (microorganismos eficazes) e os ingredientes do mesmo lote. Os preparados foram nomeados de acordo com o tempo de preparo do EM. O primeiro Hortbio® produzido, utilizou como inóculo o EM 0, sendo assim denominado Hortbio 0®; o segundo utilizou o EM com 10 dias de produzido, denominado assim Hortbio® 10, assim por diante, sendo o último Hortbio® 40, utilizando o EM com 40 dias de preparado, como mostrado na Figura 2.

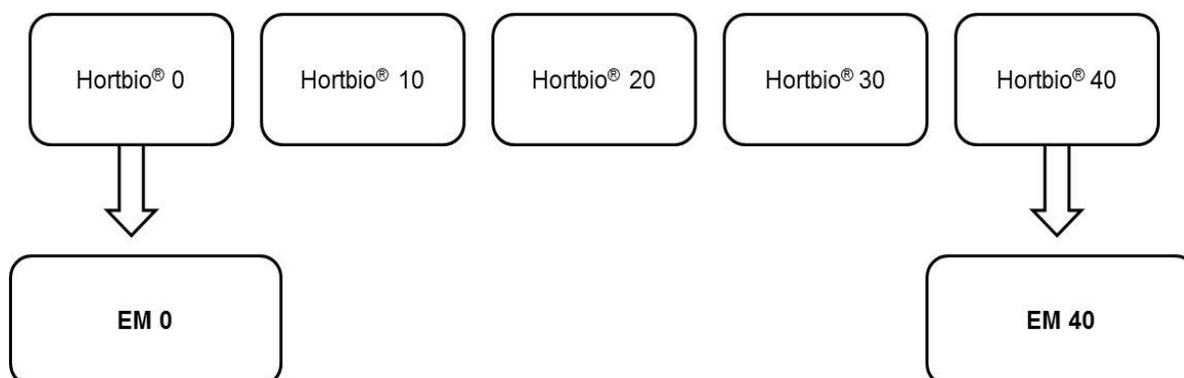


Figura 2. Nomeclatura dos diferentes preparados do Hortbio. Foi utilizado como inóculo o EM em diferentes tempos de produção.

Os preparados foram armazenados em uma bombona plástica, com capacidade de 200 litros e mantido em local sombreado e fresco. A aeração foi realizada por 15 minutos a cada hora, com o auxílio de um compressor de ar e um temporizador. Antes da sua utilização o Hortbio® foi coado utilizando uma peneira.

O inoculante EM foi coletado em solo de área de cerradão localizada na Embrapa Hortaliças (15°56'61.8S/48°08'42.7O) que pode ser observada na Figura 3.



Figura 3. Imagem representando a área de coleta do EM. Localizada em área de Cerrado, na Embrapa Hortaliças – DF. O ponto vermelho indica a sede da Embrapa Hortaliças. O ponto amarelo representa a área de coleta do EM.

Para a coleta dos micro-organismos do solo, 700gr de arroz cozido foi colocado em duas bandejas de plástico e uma de papelão, protegidos com sombrites, e então, foi exposto por um período de sete dias no solo, de acordo com as recomendações do Caderno de Micro-organismos Eficazes (BONFIM et al., 2011) (Figura 4).

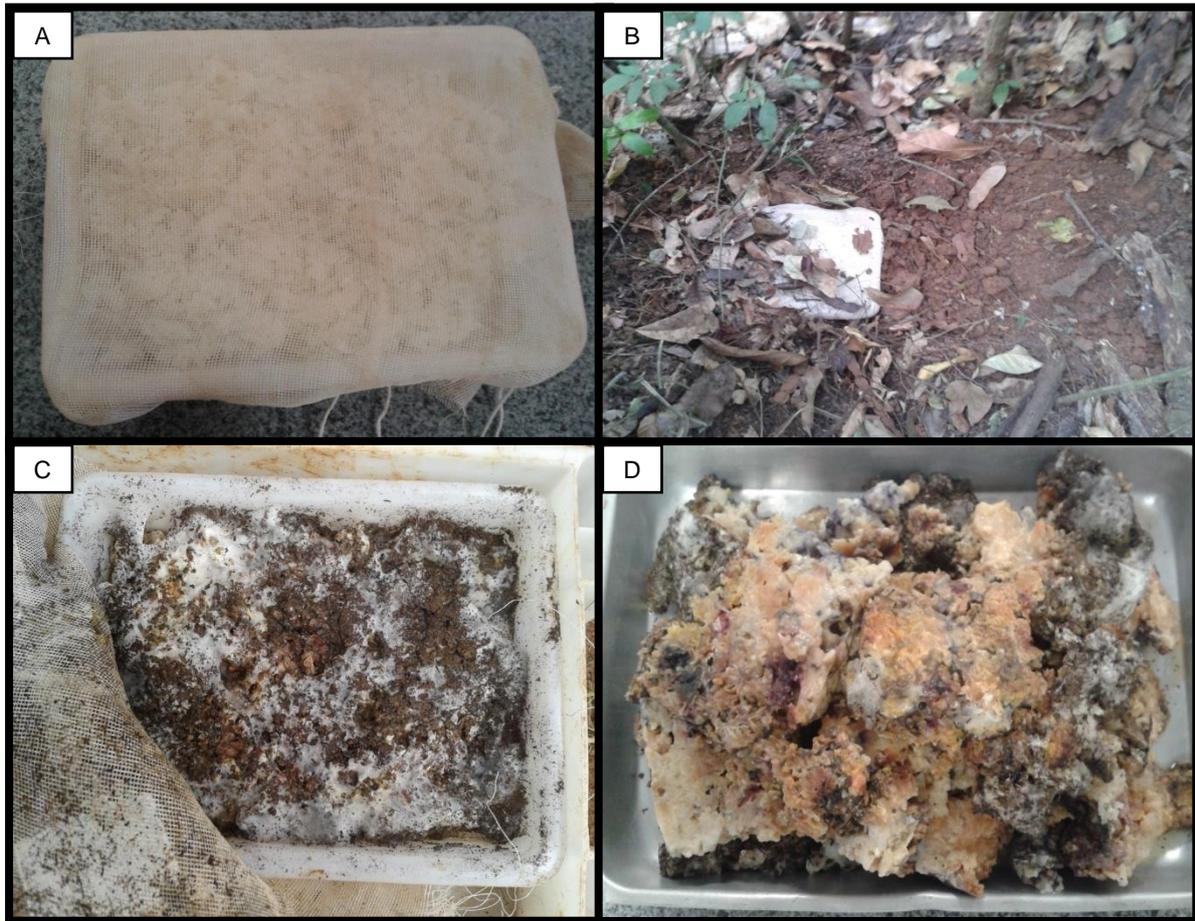


Figura 4. Coleta do EM e seleção das partes viáveis para ativação da microbiota (A) 500g de arroz cozido sem tempero, colocado em bandejas de plásticos e tampadas com sombrites (B) Arroz sendo colocado na mata e coberto com serrapilheira (C) Arroz retirado da mata após 7 dias. (D) Arroz pronto para ativação.

Após a coleta do EM do solo, esse foi ativado para viabilizar o seu uso no biofertilizante. Para tanto foi adicionada a massa microbiana coletada do solo, 10% de fonte de sacarose na forma de melaço de cana e caldo de cana. Foi adicionado água não clorada até que fosse alcançado volume final de 10 litros. Para aeração, o sistema foi oxigenado durante 15 minutos a cada hora. Após sete dias o inoculante estava pronto para ser utilizado.

O EM foi denominado de acordo com o tempo em que era utilizado, após a sua ativação, como inoculante do Hortbio®. Sendo que, quando utilizado no tempo 0 após a sua ativação, foi denominado EM 0; após 10 dias da sua ativação, foi denominado EM 10 e assim por diante, até ser utilizado após 40 dias da sua

ativação, sendo assim denominado de EM 40. O EM foi armazenado em geladeira, a 4°C.

2.2 Amostragem

A caracterização microbiológica do Hortbio[®] foi realizada no laboratório de Nutrição de Plantas localizado na Embrapa Hortaliças, Brasília - DF. Foi realizada a coleta de alíquotas do Hortbio[®] de 15mL de cada tempo amostral. Cada coleta ocorreu em diferentes tempos do processo de produção do biofertilizante sendo esses após 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a produção do Hortbio[®]. Foi realizado o plaqueamento do Hortbio[®] 0 e do Hortbio[®] 40, do EM no tempo 0, ou seja, após a sua ativação, e do EM após 40 dias de produção, estando esse armazenado a 4°C.

2.3 Diluição seriada e plaqueamento

O biofertilizante foi, primeiramente, peneirado para retirada de partículas mais densas e o filtrado foi utilizado para análise da comunidade microbiana. Para cada tempo amostral, 1mL do Hortbio[®] foi homogeneizado com 9mL de solução salina 0,85%. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁶ e 100µL foram utilizados para o plaqueamento em diferentes meios de cultura em triplicata. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 25° C por 5 dias em BOD.

Foi usado o meio Martin (MARTIN, 1949) com estreptomicina (100µg/mL), o meio MYGP (MASOUD et al., 2004) com cloranfenicol (100µg/mL), meio R2A (REASONER & GELDREICH, 1985) com ciclohexamida (100µg/mL), o meio THSM (WILLIAMS et al., 2003) com cloranfenicol (250µg/mL) e estreptomicina (100µg/mL) e o meio Amido Caseína (KUSTER & WILLIAMS, 1964) com ciclohexamida (100mg/L), para contagem das populações de fungos totais, leveduras, bactérias totais, Trichoderma e Actinomicetos, respectivamente.

2.4 Contagem de colônias e quantificação da comunidade microbiana do biofertilizante Hortbio[®]

Foi considerado para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) as diluições que apresentavam entre 30 a 300 colônias. A contagem das colônias foi feita utilizando o aparelho *CP600 Plus (Phoenix*

Luferco). Para contagem de colônias foi utilizado o Hortbio® 0, o Hortbio® 40, o EM 0 e o EM 40.

Os resultados obtidos foram multiplicados pela recíproca da diluição utilizada e expressos como UFC.mL⁻¹. Para análise dos resultados, as contagens foram transformadas em *log* UFC.mL⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado tendo o tempo como efeito fixo com três repetições (replicatas). As equações de regressão foram obtidas pelos PROC REG do programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS, 1998). Consideraram-se equações de regressão e coeficientes significativos ($p < 0,05$) com $r^2 \geq 0,6$.

2.5 Isolamento das colônias e armazenamento

O isolamento foi feito, a partir do plaqueamento dos micro-organismos do Hortbio® 0 e do EM 0. Esses foram isolados até a obtenção de culturas puras e cultivados em meio líquido e então foi retirado uma alíquota para armazenamento em solução de glicerol 15% para bactérias e leveduras e 10% para actinomicetos. O armazenamento foi feito em temperatura igual à -80°C. Os fungos filamentosos foram armazenados em água destilada autoclavada e mantidos a 4°C em câmara fria.

Os isolados foram identificados de acordo com o meio no qual foram crescidos. Os isolados do meio R2A (para bactérias totais), receberam a inicial B; do meio AC (para actinomicetos), receberam a inicial A; do MYGP (para leveduras), receberam a inicial L; do Martin (para fungos totais), receberam a inicial F e do meio THSM (para Trichoderma), receberam a inicial T. Foi atribuído, após a letra inicial, um número indicativo ao tempo em que este foi isolado, ou "EM" aos isolados do EM e, em seguida, um número indicando a ordem do micro-organismo isolado. Sendo assim, o isolado **B5.08**, por exemplo, foi o oitavo micro-organismo isolado no meio R2A no tempo 5 de produção do biofertilizante. O isolado **LEM 10** foi o décimo micro-organismo isolado do EM no meio MYGP.

2.6 Caracterização molecular dos micro-organismos isolados do EM e do Hortbio®

2.6.1 Extração do material genético

A caracterização molecular dos isolados de micro-organismos foi realizada do Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da

UnB. Após o isolamento de colônias puras, foi feito o crescimento em meio líquido de bactérias, leveduras e actinomicetos, nos meios R2A, MYGP e AC, respectivamente. Os isolados foram inoculados em 10mL de meio em erlemeyers com capacidade de 200mL. Esses foram deixados durante, aproximadamente, cinco e dois dias sob agitação, para bactéria e leveduras, respectivamente.

Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 1,5mL em duplicata para a extração de DNA. Essa alíquota foi centrifugada a 10.000rpm durante 2 minutos para obtenção do *pellet*, que foi utilizado para extração do material genômico.

O DNA bacteriano foi extraído, utilizando o protocolo de Zhu et al. (2014), onde utiliza-se SDS, Proteinase K, em conjunto com fenol/clorofórmio.

O DNA de leveduras foi extraído utilizando o protocolo modificado de Kurtzman & Fell (1998), onde usa-se um tampão de extração (200mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 25mM EDTA pH 8, 0,5% SDS).

O DNA dos fungos filamentosos, por sua vez, foi extraído a partir de culturas crescidas diretamente em placa com meio de cultivo. A extração será feita pela maceração do micélio utilizando nitrogênio líquido e foi utilizado CTAB e fenol clorofórmio, conforme proposto por MICHIELS et al (2003).

2.6.2 Amplificação do DNA

O DNA microbiano foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o termociclador *SimpliAmp™ ThermalCycler (Applied Biosystems)*, a partir das amostras de DNA previamente extraídas. Diferentes oligonucleotídeos e condições de PCR foram utilizadas para cada grupo microbiano a ser estudado, como mostrado na Tabela 3.

Foi realizada a amplificação do DNA ribossômico dos diferentes grupos estudos. Sendo que para bactérias foi amplificado a região 16S rDNA, para leveduras foi amplificado o domínio D1/D2 do 26S rDNA e para fungos a região ITS.

Tabela 3. Detalhamento da composição de reagentes e condições de termociclagem utilizadas para amplificação do DNA ribossômico para os diferentes grupos microbianos (bactérias, fungos e leveduras) avaliados.

Grupo microbiano	Par de primers	Reagentes	Programa de termociclagem	Referência
Bactéria	27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 1492R (5'-TACGGYTACCTGTACGACTT-3')	1µM - dNTPs 0,5 µM - primer 1,5 µM - MgCl ₂ 2,5 U - <i>DNA polimerase</i>	Desnaturação inicial: 95° por 3 minutos Desnaturação: 95°C – 1 minuto Anelamento: 55°C – 1 minuto Extensão: 72°C – 1 minuto 30 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	WEISBURG et al., 1991
Fungos filamentosos	ITS 5 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS 4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	0,2µM - dNTPs 0,4µM - primer 1,5 µM - MgCl ₂ 0,2 U - <i>DNA polimerase</i>	Desnaturação inicial: 95° por 5 minutos Desnaturação: 95°C – 30 seg Anelamento: 62°C – 1 minuto Extensão: 72°C – 2 minutos 30 ciclos. Extensão final: 72°C – 5 minutos	WHITE et al, 1990
Leveduras	NL1 (5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') NL4 (5' - GGTCCGTGTTTCAAGAGGG 3')	0,2µM - dNTPs 20 pmol - primer 1,5 µM - MgCl ₂ 2,5 U - <i>DNA polimerase</i>	Desnaturação inicial: 94° por 3 minutos Desnaturação: 94°C – 1 minuto Anelamento: 56°C – 30 seg Extensão: 72°C – 1 minuto 33 ciclos Extensão final: 72°C – 6 minutos	KURTZMAN & ROBNETT, 1998

Para todas as reações, dos diferentes grupos microbianos, foi utilizado um controle negativo, para verificação de contaminação nas amostras.

O produto amplificado pela PCR dos diferentes grupos microbianos foi analisado por eletroforese com 1,0% de agarose, utilizando como referência de peso e concentração molecular o marcador *DNA Low Mass Ladder (Invitrogen®)*. As bandas foram visualizadas em Transiluminador U.V. (*Alpha Innotech*) com posterior fotografia do gel. O programa usado para visualização dos géis foi o *Alphaview*.

2.6.3 Sequenciamento das amostras

Os amplicons gerados de cada grupo microbiano foram tratados com *Exo-Sap® (Affymetrix)* para remoção de reagentes da PCR restantes que podem interferir no sequenciamento.

Posteriormente, os *amplicons* foram enviados para sequenciamento na Universidade Católica de Brasília (UCB). Para reação de sequenciamento foi utilizado o método de Sanger.

2.6.4 Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram avaliadas quanto a sua qualidade utilizando o software *BioEdit Sequence Alignment Editor (7.1.3.0)* e posteriormente, foram comparadas com outras sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento e as relações filogenéticas foram realizadas no software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis- MEGA 6.0* (TAMURA et al., 2013). Para o alinhamento das sequencias foi utilizado o método Clustal X.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem de unidades formadoras colônias

A avaliação da contagem de colônias apresentou significância e correlação estatística entre as UFC dos dois diferentes Hortbio[®] analisados e nos diferentes tempos amostrais. Tal resultado mostra que ambas variáveis influenciaram na quantidade de micro-organismos presentes e atuaram de forma conjunta. O padrão de crescimento foi variado entre os isolados do Hortbio[®] 0 e do Hortbio[®] 40 para todos os grupos microbianos, como pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4. Quantificação dos micro-organismos presentes no biofertilizante Hortbio® 0 e Hortbio® 40 após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 do seu preparo para diferentes grupos microbianos.

Tempo após o preparo (dias)						
Bactérias totais						
Hortbio/Tempo	0	5	10	15	20	25
Hortbio 0	7,45 aD	9,08 aA	8,32 aB	8,10 aC	7,33 aD	7,33 aD
Hortbio 40	6,09 bD	7,94 aAB	8,13 aA	7,78 bB	7,19 aC	7,09 bC
Actinomicetos						
Hortbio/Tempo	0	5	10	15	20	25
Hortbio 0	6,81 aC	8,03 aA	7,20 bB	5,84 bE	6,81 aC	6,40 aD
Hortbio 40	5,98 bD	7,16 bB	7,57 aA	6,90aBC	6,69 aC	6,18 aD
Fungos totais						
Hortbio/Tempo	0	5	10	15	20	25
Hortbio 0	6,03 aA	5,74 aB	5,45 bC	5,64 bBC	6,06 aA	6,14 bA
Hortbio 40	5,25 bD	4,91 bE	6,39 aB	6,01 aC	6,10 aC	6,61 aA
Leveduras						
Hortbio/Tempo	0	5	10	15	20	25
Hortbio 0	6,05 aB	5,05 bE	5,76 bDE	5,83 aCD	5,99 aBC	6,17 bA
Hortbio 40	5,24 bD	5,62 aE	6,43 aB	6,01 aC	6,06 aC	7,14aA
Trichoderma						
Hortbio/Tempo	0	5	10	15	20	25
Hortbio 0	5,85 aA	5,81 aAB	5,30 bC	6,11 aB	6,02 aA	6,01 bA
Hortbio 40	5,16 bC	4,82 bD	6,32 aB	5,61 bB	6,13 aB	6,65 aA

Letras minúsculas (colunas) e maiúsculas (linhas) iguais não são diferentes pelo teste de Tukey a 5%. Unidade usada Unidade Formadora de Colônias por mL (UFC/mL) transformada em Log 10.

A comunidade microbiana pode ser alterada por diversos fatores químicos e físicos (fonte de carbono e nitrogênio, nutrientes minerais, pH, concentração de água disponível, temperatura), assim como por fatores biológicos, como a interação entre os grupos microbianos. Esses fatores podem atuar alterando a atividade metabólica e a dinâmica das comunidades microbianas (PEZZOLLA et al., 2015).

Comparando a análise realizada tanto para os grupos de fungos, tanto os leveduriformes quanto filamentosos, e as bactérias encontradas é possível perceber que houve um maior crescimento da população bacteriana. Esse fato é justificado pelo pH do meio, sendo que o pH do biofertilizante variou de 7,5 a 8,0 durante todo o tempo de fermentação; o pH do EM e EM 40 apresentou os valores 7,26 a 7,4, respectivamente. A diversidade bacteriana é reduzida em solos ácidos, sendo que solos mais próximos da neutralidade e alcalinos a diversidade e

abundância bacteriana tendem a aumentar (CONNELL et al., 2008; FIERER; JACKSON, 2006).

Em trabalho realizado com o biofertilizante Bokashi, apresentou maior contagem de colônias de leveduras, seguida de bactérias e fungos (MAGRINI et al., 2011).

Alfa et al. (2014) avaliando um biofertilizante oriundo da fermentação anaeróbica de esterco bovino e outro com excrementos de galinha mostrou resultados semelhantes. Para primeira formulação o pH variou entre 6,6 e 7,8 e para segunda 6,4 e 8,0, sendo que a contagem de colônias para aeróbicos totais foi de 3.4×10^{10} e 1.7×10^{10} e para contagem de fungos esse valor foi de 3.2×10^6 e 1.6×10^6 para o biofertilizante oriundo de esterco bovino e de excrementos de galinha, respectivamente.

A população microbiana presente no Hortbio® 0 foi superior ao Hortbio® 40, especialmente no tempo 0, tal fato não pode ser justificado pelas diferenças nutricionais dos preparados do Hortbio®, uma vez que, foram utilizados os mesmos ingredientes para o preparo dos mesmos. Entretanto, a diferença no tempo de maturação do EM, pode ter sido crucial para modificações na comunidade microbiana. Segundo Magrini et al. (2011), à medida que o processo de maturação progride, as condições físicas e a composição química do meio tendem a estabilizar. Dessa forma, diante das mudanças ocorridas pelo tempo de preparo do composto é de se esperar que a comunidade microbiana se estruture e tenha maior estabilidade.

A comunidade bacteriana no Hortbio® 0 apresentou maior UFC.ml⁻¹ do que no Hortbio® 40, entretanto, em ambos preparados a comunidade bacteriana apresentou-se reduzida no tempo 0 de produção, com posterior crescimento durante o tempo 5 e 10, para o Hortbio® 0 e o Hortbio® 40, respectivamente. Após o tempo 15 de produção do biofertilizante houve queda no crescimento, sendo essa constante até o tempo 25.

O crescimento bacteriano durante esse período apresentou similaridade com a curva de crescimento em cultivo descontínuo. O tempo 0 pode ser considerado como a fase “lag” do crescimento, onde não há reprodução celular e os micro-organismos estão se adaptando ao novo ambiente em que foram inoculados. Os tempos 5 e 10 de produção do biofertilizante do Hortbio® 0 e o Hortbio® 40, respectivamente, que apresentaram maior crescimento. Esses tempos podem ser

considerados a fase log ou exponencial do crescimento, onde os nutrientes disponíveis estão sendo consumidos para o metabolismo e crescimento microbiano. E a partir do tempo 15 o crescimento microbiano apresenta-se reduzido, devido ao acúmulo de metabólitos secundários e redução na disponibilidade de nutrientes (ROCHA; ANDRADE, 2011). Alfa et al. (2014), também observaram resultados similares ao observarem a comunidade microbiana de biofertilizantes preparados com esterco bovino e excrementos de galinha. Houve redução da quantidade de UFC.ml⁻¹ ao longo do tempo de produção quando avaliada a comunidade bacteriana e de fungos. Para o Hortbio[®] não foi possível determinar um padrão no crescimento dos fungos.

Os actinomicetos apresentaram crescimento diferenciado nas diferentes preparações do biofertilizante. No Hortbio[®] 0 houve crescimento das UFC após 5 dias, seguida de uma queda acentuada após 15 dias e aumento após 20 de preparo. No Hortbio[®] 40, houve crescente elevação de UFC e queda gradativa após 15 dias. Após 10 dias de preparo, a quantidade de UFC presentes no Hortbio[®] 40 ultrapassou a quantidade de UFC do Hortbio[®] 0.

O crescimento de fungos totais e do grupo Trichoderma não apresentou uma curva de crescimento bem definida ao longo dos tempos de preparo do biofertilizante. As leveduras apresentaram redução do crescimento no tempo 5 do Hortbio[®] 0, contudo apresentaram aumento do crescimento a partir do tempo 10. No Hortbio[®] 40, houve maior quantidade de UFC.mL⁻¹ no tempo 10, com queda até o tempo 20, havendo aumento no tempo 25.

A contagem de colônias mostrou que o crescimento de micro-organismos do Hortbio[®] 0 iniciava-se em maior quantidade, porém, no tempo 10 havia o aumento dos micro-organismos do Hortbio[®] 40, ultrapassando ou igualando a quantidade em UFC/mL dos micro-organismos do Hortbio[®] 0.

A presença de correlações positivas e negativas entres as comunidades fúngicas e bacterianas sugere a presença de interações ecológicas e metabólicas entre esses grupos. Isso já é esperado, já que grande parte da comunidade microbiana apresenta relações como sinergismo, antagonismo, comensalismo e competição (PEZZOLLA et al., 2015). Contudo, para a comunidade avaliada, não há como distinguir as vias ecológicas que ocorreram durante o tempo de preparo do biofertilizante. Dessa forma, é apenas possível especular que as flutuações

decorrentes da comunidade bacteriana e fúngica foram decorrentes das interações metabólicas entre os grupos.

3.2 Micro-organismos isolados

Um total de 217 micro-organismos foram isolados e identificados dos diferentes tempos de preparo do Hortbio® e do EM. Desses, 100 foram isolados do meio R2A, 20 do meio AC, 61 do meio MYGP, 19 do meio Martin e 17 do meio THSM. A Figura 5 mostra a distribuição dos isolamentos de fungos, bactérias e leveduras isolados ao longo dos 30 dias de preparo do Hortbio® e do EM

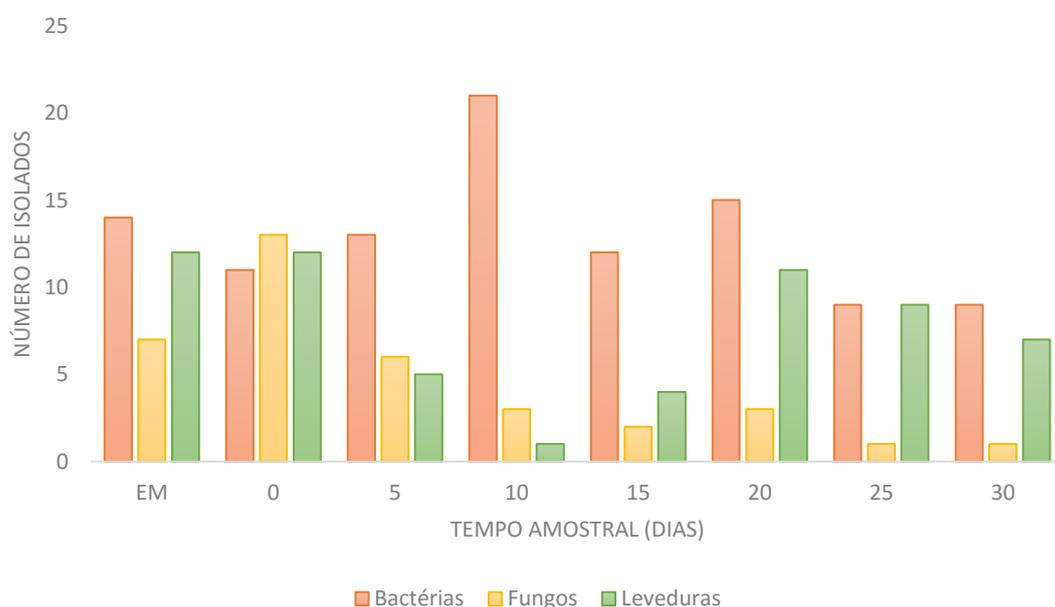


Figura 5. Distribuição dos micro-organismos isolados do EM e ao longo dos 30 dias de produção do Hortbio®.

3.3 Caracterização molecular

3.3.1 Caracterização molecular das bactérias

A análise molecular do gene 16S rDNA foi realizada para 120 isolados bacterianos isolados do meio R2A e AC. As sequências foram comparadas com outras previamente depositadas no GenBank e mostrou a prevalência de 4 filos sendo o mais abundante o Firmicute (53 isolados) seguida pelo filo Proteobacteria (49 isolados), Actinomycetos (16 isolados) e Bacteroides (2 isolados). A Figura 6 mostra a distribuição dos diferentes filos bacterianos nos tempos amostrais avaliados.

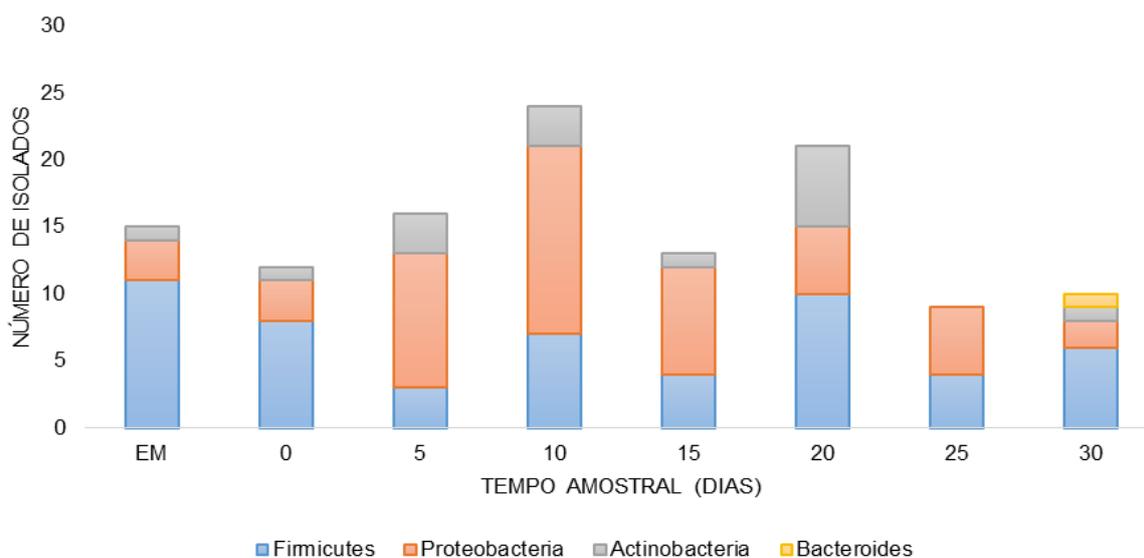


Figura 6. Distribuição dos Filos bacterianos dos isolados do Hortbio nos diferentes tempos amostrais.

O filo predominante, Firmicutes, é caracterizado por possuir bactérias em gram-positivas, com baixo conteúdo G+C. Apresentam células esféricas, ou retas, havendo a presença de bacilos e cocos. O filo é fenotipicamente diverso. Os representantes podem ser capazes de formar endósporos como mecanismos de resistência ou não (VOS et al., 2011). Os organismos pertencentes a este filo, como *Clostridium* e *Bacillus*, são frequentemente encontrados em solos. São caracterizados por possuírem um rápido crescimento quando há nutrientes disponíveis ao metabolismo, sendo que condições de restrição nutricional ou altamente competitivo limitam o crescimento dessas bactérias (CANNAVAN, 2007). O EM foi o tempo amostral em que houve maior crescimento das bactérias do filo, sendo que esse tempo é o que apresenta maior fornecimento de nutrientes aos micro-organismos, o que pode ter favorecido especialmente o gênero *Bacillus*. Muito embora a presença de *Bacillus* tenha sido predominante no EM, bactérias do Filo se mostraram presentes em todos os tempos amostrais.

O filo Proteobacteria constitui o maior grupo de bactérias cultiváveis. As Proteobacteria constituem a maioria das bactérias cultivadas de importância médica, industrial e agrícola. Esse grupo inclui todas as bactérias gram-negativas, exibindo uma diversidade metabólica e morfológica. Possui cinco subdivisões:

Alphaproteobacteria, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Um dos importantes papéis desempenhados por este grupo está ligado ao processo de nitrificação (MADIGAN et al., 2010). Sendo que importantes bactérias estão ligadas a oxidação da amônia por *Betaproteobacteria* (AVRAHAM et al., 2007), assim como *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* participam na oxidação de nitrito (BERLANGA, 2010). Por serem bactérias importantes no ciclo do nitrogênio, a presença dessas em formulações de biofertilizantes se faz importante, uma vez que contribuem para disponibilidade de N para as plantas.

Essas bactérias apresentaram elevada abundância nas amostras analisadas nesse estudo. Entre as divisões do filo, foram encontradas *Alphaproteobacteria* (*Gluconobacter*, *Alcaligenes*), *Betaproteobacteria* (*Massila*), *Gammaproteobacteria* (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*) e *Deltaproteobacteria* (*Acinetobacter*)

As Actinobactérias são predominantemente bactérias gram-positivas com alto conteúdo G+C. Esse grupo possui morfologia variável e podem ser encontrados na forma bacilar, como a *Corynebacterium* e a *Arthrobacter*, ou na forma filamentosa como *Streptomyces*. São comuns em solos e materiais vegetais (MADINGAN et al., 2010). Essas bactérias são resistentes a dessecação e carência nutricional e estão associadas a produção de antibióticos (RAMPELOTTO et al., 2013). Devido às características das bactérias desse filo, é possível supor que o fato de serem resistentes a carências nutricionais apresentaram maior crescimento nos tempos amostrais intermediários e finais da produção do biofertilizante. Esse filo possui grande importância na decomposição da matéria orgânica do solo (RAMPELOTTO et al., 2013). A presença de bactérias desse filo é importante em formulações de biofertilizantes, pois contribui para produção de antimicrobianos que são importantes defensivos contra fitopatógenos.

O filo Bacterioidetes foi obtido o menor número de isolados, com apenas dois representantes. Representantes desse filo, comumente estão associados ao trato intestinal de humanos e animais (MADINGAN et al., 2010).

Resultados semelhantes foram encontrados por Rampelotto et al. (2013) onde foi avaliada a comunidade bacteriana de amostras do solo Cerrado utilizando pirosequenciamento. Foi encontrada a predominância de seis filios, sendo elas: Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobactéria, Firmicutes e Bacteriodes

Gemmatimonadetes, sendo que as duas últimas foram em menores proporções. Colombo et al. (2015) mostrou resultados parecidos ao avaliar solos sob diferentes manejos, obtendo maior abundância dos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Gemmatimonadetes.

Quanto a distribuição dos gêneros (Tabela 5), observa-se que a distribuição do isolamento nos diferentes tempos amostrais foi variável

Tabela 5. Distribuição dos gêneros bacterianos ao longo dos diferentes tempos amostrais avaliados.

	EM	0	5	10	15	20	25	30	Total (gêneros)
<i>Bacillus</i>	11		2					2	15
<i>Enterococcus</i>				1	1	1	1	2	6
<i>Staphylococcus</i>		6							6
<i>Lactococcus</i>			1	5	1	2			9
<i>Kurthia</i>				1	2	6	3	1	13
<i>Sporosarcina</i>		2				1		1	4
<i>Enterobacter</i>			5		1				6
<i>Citrobacter</i>				4	2	1			7
<i>Alcaligenes</i>					1	1	2		4
<i>Acinetobacter</i>		1				1	1		3
<i>Acetobacter</i>						1			1
<i>Gluconobacter</i>	1								1
<i>Escherichia</i>			2		1				3
<i>Klebsiella</i>			3	10	3	1			17
<i>Massila</i>	2								2
<i>Stenotrophomonas</i>							1	2	3
<i>Pseudomonas</i>		2							2
<i>Shingobacterium</i>							1	1	2
<i>Microbacterium</i>		1							1
<i>Arthrobacter</i>			3	2		3			8
<i>Corynebacterium</i>								1	1
<i>Streptomyces</i>	1				1	3			5
<i>Kitasatospora</i>				1					1
Total (tempos de coleta)	14	11	13	21	12	15	9	9	120

Diferentes gêneros foram isolados nos diferentes tempos amostrais como mostrado na Tabela 6. Não foi possível classificar os isolados bacterianos encontrados a nível de espécie. O marcador filogenético rDNA 16S, possui pouca divergência entre os micro-organismos, dessa forma, oferece uma boa resolução quanto ao gênero, entretanto, limita a informação no que diz respeito à espécie. O uso de marcadores como o *gyrB* (subunidade B da DNA girase) são menos restritos funcionalmente, havendo maior alteração do que o rDNA 16S, e se utilizados de forma concatenada com o rDNA 16S permite a resolução a nível de espécie, e já tem sido utilizado para bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Aeromonas* e

Bacillus (WANG et al., 2007). Para o gênero *Klebsiella*, apenas o uso do marcador rDNA 16S não é suficiente para resolução a nível de espécie, sendo sugerido o uso do *rpoB* (codifica a β -subunidade da RNA polimerase) (MARTÍNEZ et al., 2004).

Tabela 6. Distribuição dos isolados de bactérias entre os gêneros e filo de maior similaridade de acordo com o sequenciamento do 16S rDNA com sequencias depositadas no GenBank (NCBI).

Isolados	Gêneros	Filos
BEM 01, BEM 02, BEM 03, BEM 04, BEM 05, BEM 06, BEM 08, BEM 10, BEM 11, BEM 12, BEM 26, B5.13, B5.16, B30.09, B30.11	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
B10.15, B20.14, B25.05, B30.06, B30.07, A15.05	<i>Enterococcus</i>	
B0.04, B0.05, B0.07, B0.10, B0.13, B0.14	<i>Staphylococcus</i>	
B5.08, B10.01, B10.03, B10.06, B10.21, B10.22, B15.10, B20.10, B20.18,	<i>Lactococcus</i>	
B10.13, B15.09, B15.12, B20.05, B20.09, B20.11, B20.16, B20.17, B20.22, B25.01, B25.02, B25.07, B30.05	<i>Kurthia</i>	
B0.03, B0.09, B20.01, B30.10	<i>Sporosarcina</i>	
B5.03, B5.14, B5.18, B5.19, B5.22, B15.03	<i>Enterobacter</i>	Proteobacteria
B10.07, B10.08, B10.20, B15.05, B15.08, B20.06, A10.01	<i>Citrobacter</i>	
B20.12, A15.10, A25.07, A25.11	<i>Alcaligenes</i>	
B0.02, B20.07, A25.13	<i>Acinetobacter</i>	
A20.09	<i>Acetobacter</i>	
BEM 25	<i>Gluconobacter</i>	
B5.20, B5.21, B15.13	<i>Escherichia</i>	
B5.04, B5.11, B5.15, B10.02, B10.05, B10.09, B10.10, B10.11, B10.14, B15.04, B15.07, B15.11, B20.04, A10.06, A10.14,	<i>Klebsiella</i>	

A10.18, A10.19		
BEM 19, BEM 20	<i>Massila</i>	
B30.02, B30.03, A25.02	<i>Stenotrophomonas</i>	
A0.08, A0.11	<i>Pseudomonas</i>	
B25.06, B30.08	<i>Shingobacterium</i>	Bacteroides
B0.16	<i>Microbacterium</i>	
B5.02, B5.07, B5.09, B10.17, B10.19, B20.03, B20.15, B20.19	<i>Arthrobacter</i>	
B30.01	<i>Corynebacterium</i>	Actinobacteria
ACEM.01, A15.09, A20.07, A20.09	<i>Streptomyces</i>	
A10.13	<i>Kitasatospora</i>	

Nesse estudo, a microbiota cultivável do Hortbio® foi avaliada em busca de micro-organismos capazes de aumentar os nutrientes disponíveis às plantas, por meio da fixação biológica de nitrogênio e pela solubilização de fosfato; atuarem como promotores de crescimento vegetal (por meio da produção de hormônios vegetais e ACC deaminase); produção de sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. Foram isolados 23 gêneros bacterianos, e entre esses, 14 gêneros já foram reportados na literatura por possuírem espécies promotoras de crescimento vegetal, como *Bacillus* (HUANG et al., 2015; WILSON et al., 2006) , *Lactococcus* (GHOSH et al., 2015a), *Kurthia* (SHARMA et al., 2012), *Sporosarcina* (JANARTHINE; EGANATHAN, 2012), *Enterobacter* (AMBROSINI et al., 2012), *Alcaligenes* (SAYYED; CHINCHOLKAR, 2006), *Acinetobacter* (HUDDERDAR et al., 2002), *Stenotrophomonas* (MAJEED et al., 2015), *Gluconobacter* (VACHERON et al., 2013), *Klebsiella* (AHEMAD; KHAN, 2011; SACHDEV et al., 2009) , *Pseudomonas* (AVIS et al., 2008; SIVASAKTHI et al., 2013), *Arthrobacter* (WEN et al., 2014) *Corynebacterium* (TRABELSI; MHAMDI, 2013) , *Streptomyces* (SHIVLATA; SATYANARAYANA, 2015). Muitos dos isolados apresentam mais do que um mecanismo de ação, sendo comum que PGPRs atuem de várias formas estimulando o crescimento das plantas (VESSEY, 2003).

3.4.1.2 Firmicutes

O maior número de isolados representantes do filo Firmicutes são os pertencentes ao gênero *Bacillus*. *Bacillus* é o gênero mais abundante na rizosfera, (SIVASAKTHI et al., 2013), possivelmente este fato está associado com a capacidade de formação de endósporos (DONG; REDDY, 2010). A presença de isolados do gênero, especialmente no EM, possivelmente está pertinente com a abundância desse no solo. Esse micro-organismo também já foi isolado do biofertilizante Agrobio (SILVA et al., 2006).

Bactérias pertencentes a este gênero são utilizadas em formulações de biofertilizantes por serem importantes PGPRs (WU et al., 2005). Estão envolvidos em importantes processos do solo, como a solubilização de fosfato pela ação da bactéria *Bacillus megaterium* (DONG; REDDY, 2010), solubilização de potássio pela *B. mucilaginosus* (WU et al., 2005) e *B. subtilis* (LEAUNGVUTIVIROJ et al., 2010b), assim como *B. cereus*, *B. thuringienses* e *B. anthracis* produzem moléculas de aquisição de ferro, denominadas sideróforos (WILSON et al., 2006). Bactérias desse gênero também são associadas a promoção do crescimento vegetal pela produção de AIA, assim como no controle do crescimento de fitopatógenos (SHODA, 2000), como o *B. subtilis* (HUANG et al., 2015), pela produção de antibióticos (PEREG; MCMILLAN, 2015) e são também utilizadas para FBN em plantas não leguminosas (SAXENA., 2015).

Atualmente, diferentes inoculantes estão disponíveis no mercado utilizando diferentes espécies de *Bacillus* tanto para práticas de biocontrole, quanto para biofertilização (PEREG; MCMILLAN, 2015). Huang et al. (2015), avaliaram a capacidade de promoção do crescimento de milho, *Arabidopsis* e tomate por diferentes espécies de *Bacillus*, havendo o crescimento especialmente pela produção de AIA. Portanto, a presença de estirpes eficazes de *Bacillus* em formulações de biofertilizantes, são desejáveis, pois esses atuam favorecendo os vegetais, de forma direta por aumentar a disponibilidade de nutrientes, assim como produzir hormônios vegetais e reduzindo o ataque de fitopatógenos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). No mais, possuem rápido crescimento, não são exigentes nutricionalmente e utilizam diversos substratos como fonte de energia (SIVASAKTHI et al., 2013)

A presença de bactérias do gênero *Lactococcus* estão associadas com a produção de ácidos lácticos e substâncias antimicrobianas criando um ambiente

inviável para o crescimento de patógenos (DIAS et al., 2014). Diversos estudos já reportaram a capacidade de bactérias ácido lácticas em produzir antifúngicos (MANDAL et al., 2013, SJÖGREN et al., 2003). Ghosh et al. (2015a), avaliaram a diferentes estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *latis* contra o crescimento do fungo *Rhizopus stolonifer*, patógeno de frutas. Os três isolados reduziram o crescimento do fungo em meio de cultura. Essas bactérias também estão envolvidas na produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogênio que são substâncias antimicrobianas (BENKERROUM et al., 2002).

Bactérias do gênero *Kurthia* foram apontadas como PGPR (MALIK et al., 1999). Espécies desse gênero já apresentaram capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e produção de AIA. Esse gênero é considerado um novo membro dos solubilizadores de fosfato, podendo ser utilizado em formulações de biofertilizantes (SHARMA et al., 2012). Quando utilizada em consórcio microbiano, auxiliou o desenvolvimento de lentilha, sendo que a inoculação de *Kurthia* e *Rhizobium* foi melhor para o desenvolvimento da planta do que a inoculação do *Rhizobium* apenas (KUMAR; CHANDRA, 2008).

Bactérias do gênero *Sporosarcina* são encontradas em solos e podem também ser epifíticas. Estão associadas com a fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato (JANARTHINE; EGANATHAN, 2012).

3.4.1.3 Proteobactérias

Dos 120 isolados identificados, 49 foram identificadas como pertencentes ao Filo Proteobacteria, sendo que os gêneros encontrados foram: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Gluconobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Massila* e *Stenotrophomonas*.

Dentro do Filo Proteobacteria, o gênero *Klebsiella* foi o mais abundante. Esse é pertencente à família Enterobacteriaceae, assim como *Enterobacter*, *Escherichia* e *Citrobacter* que também foram isolados nesse estudo. Os isolados dessa família representam 30 dos 49 pertencentes à Filo Proteobacteria. O solo apresenta elevada abundância de bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo essas, bem adaptadas a esse habitat (MOREIRA et al., 2010), o que justifica a sua elevada ocorrência no biofertilizante, uma vez que esse recebeu como inóculo micro-organismos do solo.

Klebsiella é encontrada comumente associadas a plantas, não causando doenças, sendo habitualmente encontrada na região rizosférica (SACHDEV et al., 2009). Grande parte do estudo de *Klebsiella* em ambientes naturais é em decorrência da grande capacidade que algumas estirpes possuem em fixar nitrogênio atmosférico (MARTÍNEZ et al., 2004). Iniguez et al., (2004) avaliaram uma estirpe de *K. pneumoniae* quanto a sua capacidade de fixar N atmosférico. Essa estirpe demonstrou reduzir a deficiência de N nas plantas com bastante eficiência, aumentando o peso seco da planta e das raízes, enquanto a planta controle apresentou claros sinais de clorose. Diversos trabalhos relatam a importância da *K. pneumoniae* como PGPR pela eficiência que possui em fixar nitrogênio atmosférico (ALFA et al., 2014; BHATTACHARYYA; JHA, 2012; VESSEY, 2003). Bactérias desse gênero tem sido utilizadas como modelo de estudo na fixação de N (SACHDEV et al., 2009). Entre as 12 espécies pertencentes a este gênero 5 já foram apontadas como fixadoras de N, sendo elas: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola* e *K. planticola*, *K. terrigena* (MOREIRA et al., 2010). Além da fixação de nitrogênio, também já foi verificado que espécies de *Klebsiella* também apresentam capacidade de produção de AIA (EL-KHAWAS; ADACHI, 1999; MOREIRA et al., 2010; SACHDEV et al., 2009), atividade ACC deaminase (SINGH; JHA; JHA, 2015) e de solubilização de fosfato (AHEMAD; KHAN, 2011). Embora bactérias desse gênero apresentem grande interesse agrícola devido ao elevado potencial como promotora de crescimento, essas também são de interesse na área médica, pois são patogênicas aos humanos (ALFA et al., 2014; MOREIRA et al., 2010).

O gênero *Enterobacter* tem sido isolado de uma grande variedade de culturas e assim como *Klebsiella* também possui representantes com capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (MOREIRA et al., 2010). Juntamente com bactérias dos gêneros *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azoarcus* são os diazotróficos mais estudados e que apontam ser os gêneros mais promissores na fixação de nitrogênio. Fernandes et al. (2001), isolaram e identificaram 20 bactérias diazotróficas existentes nas raízes e folhas de coqueiro, dessas, 13 foram identificadas como *Enterobacter*, e em sua maioria, foram da espécie *E. cloacae*.

Além de atuarem como importantes fixadores de nitrogênio, bactérias do gênero *Enterobacter* tem sido apontadas como importantes PGPRs. Ghosh et al. (2015b) avaliaram a produção de AIA por *Enterobacter* spp. isolada da rizosfera, a estirpe mostrou capacidade de produção de AIA na presença de triptofano. Bose et al. (2016) avaliaram *E. cloacae* quanto a produção de AIA tendo como produção 382,23µg.ml⁻¹.

Bactérias do gênero *Enterobacter* são apontadas como importantes solubilizadores de fosfato no solo (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). O uso de *Enterobacter* como biofertilizantes possui um elevado potencial em aumentar as concentrações de fosfato solúvel no solo (KHAN et al., 2009).

Alcaligenes é um gênero bacteriano comumente encontrado no solo e possui capacidade de colonizar a região rizosférica (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Estudos com PGPR apontam como um promissor gênero a ser utilizado (MOHAMMADI; SOHRABI, 2012; WELLER; LINDA, 1994). Já vem sendo comumente utilizado em formulações de biofertilizantes por possuir características desejáveis à promoção do crescimento vegetal (BASHAN et al., 2014; VESSEY, 2003). Está relacionada com a fixação de nitrogênio (MOHAMMADI; SOHRABI, 2012; MOREIRA et al., 2010), produção de ACC deaminase (SINGH et al., 2011) assim como com o controle biológico tanto pela produção HCN (PEREG; MCMILLAN, 2015), como pela produção de sideróforos (SAYYED; CHINCHOLKAR, 2006). Sayyed e Chincholkar (2006) avaliaram a produção de sideróforos por *Alcaligenes* contra o crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Cercospora arachichola*, e mostrou resultados semelhantes ao fungicida químico.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* são encontradas em solo e na rizosfera (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Huddedar et al. (2002), avaliou oito diferentes estirpes de *Acinetobacter* isoladas da rizosfera de milho, sendo que cinco produziram AIA. Algumas estirpes são reportadas na literatura como importantes solubilizadores de fosfato e fixadores de nitrogênio (GIRIJA et al., 2013). Chaiharn e Lumyong (2009) avaliaram a estirpe *Acinetobacter* CR1.8 quanto a solubilização de fosfato em condições de estresse abiótico, a bactéria obteve resultados satisfatórios a concentração de NaCl a 25% e tolerou temperaturas até 55°C. Bhushan et al (2009), mostraram que a produção de sideróforos na fase exponencial do crescimento de *Acinetobacter calcoaceticus* reduziu a concentração

de ferro no meio de cultura, assim como inibiu o crescimento de fitopatógenos como *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum capsicum* e *Fusarium oxysporum*. Kuan et al. (2016) avaliaram o potencial de promoção de crescimento de *Acinetobacter* em milho, sendo que a inoculação com bactérias do gênero estimulou a colonização da rizosfera, aumentou a concentração total de N e o peso seco nas plantas.

Majeed et al. (2015) isolaram *Stenotrophomonas* da região rizosférica e endosférica de trigo, o isolado apresentou produção de 77,98 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA, assim como apresentou atividade da nitrogenase e solubilização de fosfato. Contudo, essa bactéria é utilizada como agente de biocontrole, sendo que sua ação contra fitopatógenos é bem elucidada, sendo já testada contra *Fusarium graminearum* (DAL BELLO et al., 2002), *Pythium ultimum* (DUNNE et al., 1997), *Ralstonia solanacearum* (YANG et al., 2012). Possivelmente, a competição por ferro e a habilidade em produzir sideróforos são características que tornam essas bactérias agentes de biocontrole (YANG et al., 2012). Atualmente, o uso de bactérias desse gênero tem levantado interesse quanto a capacidade que essa possui em degradar xenobióticos podendo ser utilizada para biorremediação (SUCKSTORFF; BERG, 2003)

Existem poucos estudos quanto a capacidade de promoção do crescimento vegetal acerca de bactérias do gênero *Gluconobacter*. Contudo, recentemente tem sido reportada a produção de giberelinas por bactérias desse gênero (PEREG; MCMILLAN, 2015; VACHERON et al., 2013). A aplicação de giberelina promove alongação da raiz primária e extensão das raízes laterais (VACHERON et al., 2013). Entretanto, a presença dessa bactéria já foi relatada como supressora do crescimento de raiz de alface, devido a elevada concentração de auxina produzida por bactérias do gênero (BARAZANI; FRIEDMAN, 1999), uma vez que a curva de dose resposta da auxina tende a reduzir em elevadas concentrações (CASTELLANOS SUAREZ et al., 2014; ZEIGER, 2004).

Entres os PGPRs estudados e identificados até o momento pela literatura, estirpes de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis* tem emergido como o grupo mais promissor por serem importantes agentes de biocontrole e promotores do crescimento vegetal (SIVASAKTHI et al., 2013). Porém, além dessas características, esse gênero apresenta especialidades que lhe confere vantagens competitivas como o rápido crescimento, pouco requerimento nutricional, habilidade de utilizar diversos substratos orgânicos, multiplica-se na região

rizosférica e endosfera, compete agressivamente com outros micro-organismos e é adaptada a condições de estresse abiótico (SIVASAKTHI et al., 2013; WELLER, 2007).

É uma bactéria comumente encontrada em solos e já vem sendo utilizada em formulações de biofertilizantes sendo possível obter resultados diretos e indiretos no crescimento de plantas (SIVASAKTHI et al., 2013). A habilidade de promover o crescimento de vegetais por *Pseudomonas* está associada a mais de um modo de ação. Solubilização de fosfato inorgânico (KHAN et al., 2009; VESSEY, 2003), aumento da formação de micorrizas (JEON et al., 2003), e produção de ACC deaminase (BHARDWAJ et al., 2014; VESSEY, 2003).

Tsavkelova et al. (2007), avaliaram a produção de AIA por *Pseudomonas* isoladas na rizosfera e epifíticas de orquídeas, sendo que a maior concentração de AIA produzida foi de $54\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Ortiz-Castro et al. (2011), mostraram que *Pseudomonas* isolada da rizosfera, quando inoculada com *Arabidopsis* modificou a arquitetura da raiz, pelo aumento da raiz principal, do número de raízes adventícias e peso fresco. Sivasakthi et al. (2013) avaliaram 10 estirpes de *Pseudomonas* e todas produziram AIA, sendo a concentração máxima avaliada igual a $18,8\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, as estirpes avaliadas também produziram ácido giberélico, sideróforos e solubilizaram fosfato.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. fluorescens*) são apontadas como importantes agentes de biocontrole liberando substâncias antimicrobianas, induzindo a resistência sistêmica de plantas e pela produção de sideróforos (AVIS et al., 2008; HUANG et al., 2015; KUPPER et al., 2009; SHODA, 2000). A redução do crescimento de fitopatógenos por *Pseudomonas* já foi avaliada para diversos isolados como *Rhizoctonia solani* (SRIVASTAVA et al., 2010) e *Pythium ultimum* (DELANY et al., 2001). Entretanto, existem linhagens que são fitopatogênicas e patogênicas ao homem como *P. syringae* pv. *tomato* e *P. aeruginosa*, respectivamente (BUELL et al., 2003).

3.4.1.4 Actinobactéria

Cinco gêneros do Filo Actinobactéria foram isolados do biofertilizante. Sendo eles: *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* e *Kitasatospora*.

Os actinomicetos são amplamente distribuídos no solo, especialmente na região rizosférica, onde atuam degradando moléculas recalcitrantes, por meio da produção de complexos enzimáticos capazes de degradar macromoléculas. Por possuírem uma grande versatilidade metabólica esses se tornam poderosos candidatos a aplicação como biorremediadores de solos contaminados (AMOROSO et al.; 2013). Essas bactérias secretam diversos metabolitos secundários que possuem importante papel na supressão de patógenos e auxiliam reduzindo o estresse abiótico (SHIVLATA; SATYANARAYANA, 2015)

O gênero *Arthrobacter* foi o mais abundante do Filo, com oito isolados. São comumente encontrados em solos (BURBANK et al., 2012). Diversos estudos reportam esse gênero como um uma importante PGPR, especialmente como um importante solubilizador de fosfato inorgânico (AMBROSINI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009; PEREG; MCMILLAN, 2015; WELLER; LINDA, 1994). São altamente resistentes a dessecação e carência nutricional, e já foram isoladas linhagens capazes de degradarem herbicidas, cafeína, nicotina, fenóis (MADIGAN et al., 2010). Seu potencial como agente de biorremediação foi avaliado por Wen et al. (2014) que avaliou uma estirpe de *Arthrobacter* quanto a capacidade de degradação de ftalatos que são resíduos da indústria altamente contaminantes, a bactéria utilizou o composto como fonte de carbono e energia.

O gênero *Streptomyces* é um actinomiceto filamentosos, comumente isolados de solos. Actinobactérias filamentosas formam uma importante comunidade na rizosfera, e são capazes de influenciar o crescimento das plantas, assim como protegem-as de fitopatógenos (DUBEY, 2014). É um importante agente de biocontrole e está relacionado a formulações de biofertilizantes por produzir metabolitos secundários como vitaminas, fatores de promoção do crescimento vegetal e enzimas (DOOLOTKELDIEVA et al., 2015). São caracterizadas por produzirem importantes substâncias antifúngicas, dessa forma protegem as plantas da ação de fungos fitopatogênicos (COUILLEROT et al., 2013). Possuem promissora habilidade de degradar herbicidas como atrazina (AMOROSO et al.; 2013). Estirpes desse gênero já demonstraram produzir AIA e sideróforos (KHAMNA et al., 2009).

O uso de *Streptomyces* mostrou inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* (BONALDI et al., 2015). A liberação de complexos

enzimáticos de *S. thermodiastaticus* envolvidos com a lise celular, mostraram reduzir o crescimento de *Candida albicans* (SHIVLATA; SATYANARAYANA, 2015)

A bactéria *S. albus* faz parte do biofertilizante BACTOFIL-A e BACTOFIL-B (MICKAN; MÜLLER, 2009). Bactérias desse gênero também já foram apontadas como importantes produtoras de AIA ($144\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). A presença de *Streptomyces* em inoculantes microbianos se faz necessário, pois juntamente com fungos do gênero *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* são os agentes de biocontrole mais promissores contra fungos, como *Fusarium* (HIGA; PARR, 1994)

Assim como os demais gêneros do Filo, *Corynebacterium* também é apontado como sendo agente de biocontrole (TRABELSI; MHAMDI, 2013). Esse gênero também está associado com processo de FBN não simbiótico (MIRANSARI, 2013; MOHAMMADI; SOHRABI, 2012). Contudo, poucos estudos são realizados com esse gênero em relação a capacidade de promoção do crescimento vegetal.

Entre os gêneros bacterianos encontrados nesse trabalho *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* já foram isolados de um biofertilizante de esterco bovino e aviário (ALFA et al., 2014), *Streptomyces* e *Bacillus* do Agrobio (DELEITO, 2002)

Muito embora, diversos representantes dos gêneros identificados nesse trabalho possuem, de acordo com a literatura, características biotecnológicas requeridas para biofertilizantes, se faz necessário avaliar a nível de espécie e estirpe a eficácia desses em atuarem como biofertilizadores e promotores do crescimento vegetal. A avaliação dos isolados também deve ser realizada em testes dentro de casas de vegetação e no campo, pois podem reduzir a expressão genética quando inoculadas em solo e não serem competitivas na rizosfera ou dentro dos tecidos vegetais o que impede que esses atuem (BONALDI et al., 2015)

A presença de bactérias do gênero *Escherichia* e *Enterococcus* aponta para possível contaminação fecal do biofertilizante, uma vez que esses são utilizados como indicadores. A fonte da contaminação possivelmente foi o solo, onde essas bactérias são capazes de sobreviver e multiplicar se tornando parte da microbiota, ou pela ação de moscas que podem ter sido um veículo para contaminação do produto. Embora o Hortbio® não tenha apresentado presença de coliformes fecais capazes de inviabilizarem o produto esses podem ter sido identificados, contudo em quantidades inferiores ao limite de rejeição (Capítulo 2).

A subdivisão *Gammaproteobacteria* inclui bactérias entéricas conhecidas por causar doenças em humanos, animais e plantas como membros dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* etc (GAO et al., 2009). Diversos gêneros são apontados como diazotróficos entéricos, pois acredita-se que o longo uso de resíduos animais na agricultura, algumas espécies se adaptaram para o ciclo nutricional animal-solo-planta e tenham adquirido capacidade de fixar nitrogênio (MOREIRA et al., 2010). Embora essas bactérias sejam de interesse agrícola, é necessário que seja considerada a capacidade de patogenicidade a humanos e animais antes do seu uso em formulações de biofertilizantes, principalmente para cultivo de hortaliças.

3.3.2 Caracterização molecular das leveduras isoladas

A análise molecular do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA foi realizada para um total de 61 leveduras do meio de cultura MYGP. Foram identificados 7 diferentes gêneros nos diferentes tempos de produção, sendo o mais prevalente *Pichia* (27 isolados), *Candida* (21 isolados), *Barnettozyma* (3 isolados), *Hanseniaspora* (3 isolados), *Meyerozyma* (2 isolados), *Wickerhamomyces* (2 isolados), *Rhodotorula* (2 isolados) e *Saturnispora* (1 isolado) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos isolados de levedura nos diferentes tempos de produção do biofertilizante

Gênero/Tempo amostral	EM	0	5	10	15	20	25	30	Total (gêneros)
<i>Candida</i>	8	6	3	1	3				21
<i>Meyerozyma</i>		1	1						2
<i>Wickerhamomyces</i>	1					1			2
<i>Barnettozyma</i>	1	2							3
<i>Hanseniaspora</i>	1	1			1				3
<i>Saturnispora silvae</i>	0	1							1
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1	0				5	6	7	19
<i>Pichia occidentalis</i>						3	3		6
<i>Pichia manshurica</i>						2			2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		1	1						2
Total (tempos de coleta)	12	12	5	1	4	11	9	7	61

Grande parte dos gêneros isolados pertencem a filo Ascomycota, com predominância dos gêneros *Candida* e *Pichia*, com apenas dois isolados do filo Basidiomycota, sendo eles pertencentes ao gênero *Rhodotorula*. A predominância de leveduras ascomicéticas pode ser explicada por essas apresentarem maior crescimento em ambientes ricos em nutrientes, ao contrário das leveduras do Filo Basidiomycota que possui a capacidade de assimilar nutrientes em ambientes oligotróficos (CONNELL et al., 2008). Em trabalho realizado por Pezzolla et al. (2015), utilizando um biofertilizante oriundo do tratamento anaeróbico da lama de porco, avaliou a comunidade de leveduras do solo após a aplicação, sendo o filo Ascomycota predominante.

Dentre os gêneros recuperados, *Candida* e *Pichia* foram os mais abundantes, sendo que o gênero *Candida* foi encontrado no EM e nos tempos de produção 0, 5 e 10 do biofertilizante. Contudo, o gênero *Pichia* apresentou predominância apenas nos últimos tempos de produção, sendo esses o tempo 20, 25 e 30 (Figura 7).

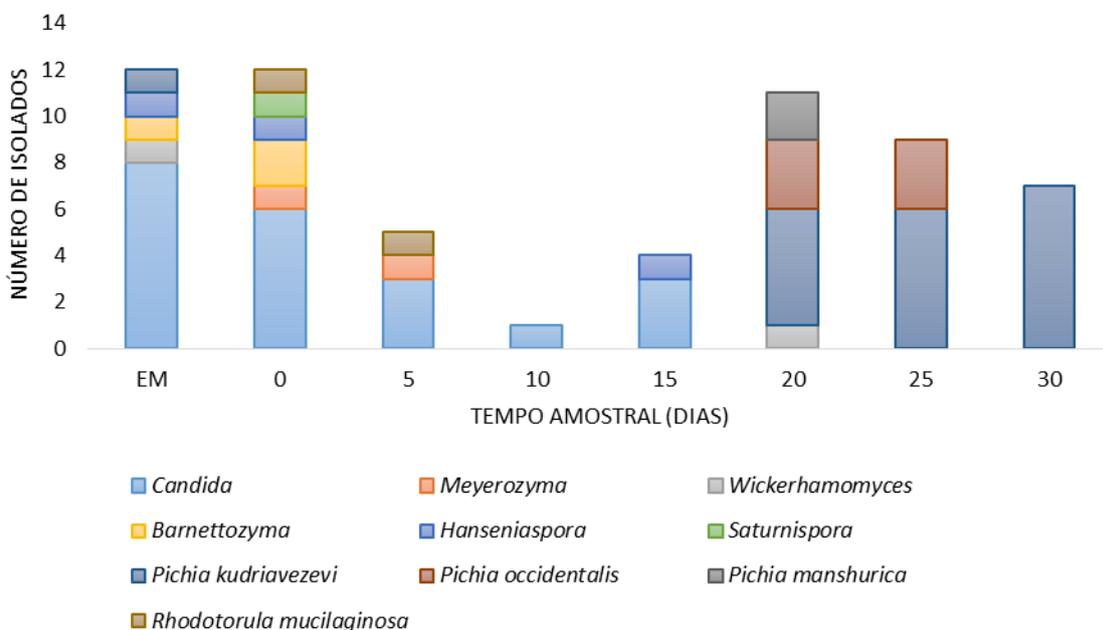


Figura 7. Distribuição dos gêneros de leveduras isolados do Hortbio® nos diferentes tempos amostrais.

A diferença da estrutura da população de leveduras pode ser decorrente da disponibilidade de nutrientes presentes entre os diferentes tempos de produção do Hortbio®. Isso ocorre, uma vez que, a competição por nutrientes pode afetar a estrutura da comunidade microbiana. A composição nutricional do meio pode favorecer o crescimento, e portanto, maior competitividade de um grupo do que de outro (BOTHA, 2011). Os tempos EM e 0 foram os que tiveram a maior diversidade de gêneros isolados, sendo esses tempos amostrais os que receberam o maior fornecimento de nutrientes. A redução da diversidade denota a maior capacidade que leveduras do gênero *Pichia* possuem em habitar ambientes com maior restrição nutricional.

Outro fator que pode explicar o aumento da população de *Pichia* apenas após 20 dias de produção do Hortbio®, além do EM, é o fato de alguns micro-organismos apresentarem crescimento lento, enquanto outros conseguem se proliferar de forma rápida. Isso é ditado pelas condições abióticas do meio e pela competição por nutrientes (PRAKASH et al., 2013). Esse dado sugere que, esse gênero pode ser um k-estrategista, que são micro-organismos de crescimento lento que possuem a capacidade de metabolizar moléculas orgânicas recalcitrantes. Pezzolla et al. (2015), avaliando a microbiota do solo após a inserção da lama de porco como fertilizante, observou que alguns gêneros do Filo Ascomycota apresentaram maior crescimento após 90 dias da aplicação do biofertilizante, esse fato é justificado por esse filo apresentar representantes que possuem o crescimento lento, denominados de k-estrategistas.

Diferentes gêneros foram isolados nos diferentes tempos amostrais como mostrado na Tabela 8. Não foi possível classificar todos os isolados de leveduras encontrados a nível de espécie. O domínio D1/D2 do 26S rDNA gerou caracteres suficientes para separar os isolados a nível de gênero. Contudo, isolados do gênero *Candida*, *Hanseniaspora* e *Meyerozyma* possuem espécies muito próximas filogeneticamente que necessitam do uso de um outro marcador, como ITS, para distinção entre elas

Tabela 8. Distribuição dos isolados de leveduras entre os gêneros e filo de maior similaridade de acordo com o sequenciamento do domínio D1/D2 do 26S rDNA com sequencias depositadas no GenBank (NCBI).

Isolado	Gênero	Filo
LEM 04, LEM 06, LEM 09, LEM 10, LEM 11, LEM 12, LEM 13, LEM 15, L0.01, L0.03, L0.05, L0.06, L0.09, L0.11, L5.02, L5.04, L5.06, L10.01, L10.02, L10.03	<i>Candida</i>	
LEM 01, L0.13, L0.08	<i>Barnettozyma californica</i>	
LEM 02, L0.07, L15.01	<i>Hanseniaspora</i>	
LEM 08, L20.12	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
LEM 05, L20.02, L20.07, L20.08, L20.09, L20.10, L25.03, L25.04, L25.05, L25.07, L25.08, L25.09, L30.01, L30.02, L30.03, L30.04, L30.05, L30.06, L30.07	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Ascomycota
LEM 14, L20.03, L20.04, L20.11, L25.01, L25.02, L25.06	<i>Pichia occidentalis</i>	
L20.06, L20.01	<i>Pichia manchurica</i>	
L0.04	<i>Saturnispora silvae</i>	
LEM 16, L0.12	<i>Meyerozyma</i>	
L0.10, L5.01	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Basidiomycota

Entre os gêneros encontrados, *Pichia* apresentou elevada abundância, sendo entre os 61 isolados recuperados, 28 são pertencentes a este gênero. Dentre esses, os isolados LEM 14, L25.02, L25.06, L25.01, L20.11, L20.03 e L20.04 mostraram elevada similaridade com a espécie *Pichia occidentalis*. Os isolados L20.06 e L20.01 também apresentaram alta similaridade com a espécie

Pichia manshurica (syn *Pichia galeiformis* e *Pichia membranifaciens*). Santos e Marquina (2004) relataram a produção de proteínas inibitórias capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno *Botrytis cinerea* por essa levedura. Essas proteínas, denominadas *killer toxins*, atuam rompendo o gradiente eletroquímico da membrana plasmática. Devido a produção dessa toxina, essa levedura tem sido estudada quanto ao seu potencial de agente de controle biológico. Essa toxina também apresentou efeitos deletérios ao crescimento da levedura *Brettanomyces bruxellensis* agente de deterioração do vinho (SANTOS et al., 2009).

Pichia kudriavzevii foi a espécie mais abundante entre os isolados de *Pichia* recuperados. Entre os 28 isolados que apresentaram similaridade com o gênero *Pichia*, 19 desses apresentaram similaridade com a espécie *P. kudriavzevii*.

Essa levedura já foi isolada de comidas, frutas, compostos fermentados e uma cultura de micro-organismos eficientes (EM) (CHAN et al., 2012). O estudo do seu genoma, mostrou a presença de três diferentes genes responsáveis pela expressão de proteínas do tipo fitases, revelando um importante potencial biotecnológico da levedura na produção de biofertilizantes (CHAN et al., 2012). Enzimas fosfatases, especialmente as fitases, atuam hidrolisando o fitato tornando o fosfato biodisponível para o metabolismo vegetal (GYANESHWAR et al., 2002).

O primeiro relato da produção de fitases pela *P. kudriavzevii* foi feito por Quan et al. (2001), que a isolou de amostras do solo. A atividade da fitase foi elevada (201 U.mg⁻¹células ou 14,070 U.ml⁻¹ em cultura), em comparação com fitases bacteriana (200-388 U.ml⁻¹), fitases de leveduras (20-1070 U.ml⁻¹), fitases fúngicas (600 U.ml⁻¹) e fitases recombinantes (6700-7600 U.ml⁻¹). Resultados semelhantes são relatados por Hellström et al. (2012) e Greppi et al. (2015).

A presença da levedura *P. kudriavzevii* no Hortbio[®] revela o grande potencial que o produto possui em promover o crescimento vegetal. Por estar associada ao produto a partir do 20º dia de produção, o uso do produto nesse estágio pode apresentar efeitos positivos ao crescimento das plantas.

Além da produção de fitases, a *P. kudriavzevii* pode ser utilizada para produção de biocombustíveis. Por possuir a capacidade de fermentação de xilose, essa levedura pode ser utilizada para produção de etanol (CHAN et al., 2012), bem como, pode ser utilizada na produção de biodiesel pela capacidade de armazenar óleo no interior da célula (SANKH et al., 2013).

O gênero *Candida* também apresentou elevada dominância entre os isolados recuperados. Dentre os 61 isolados identificados, 21 são pertencentes a este gênero. Leveduras desse gênero já foram isoladas de biofertilizantes (DELEITO, 2002).

A levedura *Candida oleophila* foi primeiramente isolada da superfície de maçãs e foi avaliada por ser um importante agente de biocontrole contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* por meio da atividade antagonista que possui contra esse fitopatógenos (LAHLALI & JIJAKLI, 2009). A competição por nutrientes e espaço são as principais formas de ação contra os fitopatógenos (LAHLALI & JIJAKLI, 2009). Essa levedura tem sido utilizada para biocontrole de fitopatógenos que infectam frutas na pós-colheita, como maçã, nectarina, pêsego e banana (BASTIAANSE et al., 2010; LIU et al., 2012).

Os demais gêneros isolados foram encontrados em menor abundância. Os isolados LEM 08 e L20.12 apresentaram maior identidade com a espécie *Wickerhamomyces anomalus*. O gênero *Wickerhamomyces* foi criado a fim de acomodar espécies dos gêneros *Candida* e *Pichia* que se distinguem geneticamente das demais espécies desses gêneros, ocorrendo isso inclusive com a espécie *P. anomala* que atualmente é *W. anomalus* (KURTZMAN, 2011).

W. anomalus já foi isolada de amostras ambientais como vegetais, frutas e solo (KAMOSHITA et al., 2015). Essa espécie tem sido extensivamente estudada pelo seu elevado potencial biotecnológico como agente de controle biológico, associado a atividade antimicrobiana pela produção de *killer toxins*, produção de biocombustíveis, e uso na indústria alimentícia e na medicina (CAPPELLI et al., 2014).

O uso da levedura *W. anomalus* como agente de biocontrole tem sido utilizado por produzir *killer toxins* altamente estáveis e com elevada atividade. Essa levedura tem sido utilizada principalmente no biocontrole de fungos fitopatogênicos da pós-colheita, como *Colletotrichum gloeosporioides* (ALOUJ et al., 2015). Sun et al. (2012) avaliou a produção de *killer toxins* por *W. anomalus* e concluiu que essa toxina foi eficiente em reduzir a população de uma ampla gama de leveduras como produto da competição por nutrientes.

Os isolados LEM 16 e L0.12 apresentaram similaridade com as espécies *Meyerozyma guilliermondii* e *Meyerozyma caribbica*. O gênero *Meyerozyma* foi proposto a fim de realocar espécies pertencentes ao gênero *Pichia*, que

apresentam elevada similaridade entre elas, porém se distinguem do gênero. Atualmente apenas as espécies *M. guilliermondii* e *M. caribbica* são pertencentes a este gênero (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). A distinção dessas espécies é difícil de se fazer utilizando métodos fenotípicos, e o sequenciamento do domínio D1/D2 rDNA é inconclusivo para diferenciar *M. guilliermondii* e *M. caribbica*. O uso das sequências geradas pelo domínio D1/D2 juntamente com ITS aumenta a resolução da identificação sendo apontado como método mais preciso para se fazer inferências filogenéticas (ROMI et al., 2014).

M. guilliermondii já foi isolada de diversos ambientes como de água residual do tratamento de plantas, superfície de insetos, frutas como o abacaxi, maçã, pêra e uva, como também de vinho e solos. Essa levedura já foi estudada pela sua utilidade no controle de frutos na pós-colheita, por meio da produção de toxinas que atuam contra fitopatógenos possuindo potencial como agente de biocontrole (CORTE et al., 2015). A espécie *M. caribbica* também está relacionada como agente de biocontrole. Bautista-Rosales et al. (2013) avaliaram a ação dessa levedura contra *Colletotrichum gloeosporioides*, e foi visto que *M. caribbica* apresentou elevado potencial de antagonismo ao crescimento do fitopatógeno por meio da competição por nutrientes, por espaço e por parasitismo.

Nakayan et al. (2013), isolaram *M. guilliermondii* e *M. caribbica* e avaliaram a capacidade de promoção de crescimento vegetal por essas leveduras. Ao serem inoculadas no solo, *M. guilliermondii* promoveu maior crescimento vegetal de milho e alface. O uso da levedura aumentou o peso seco e aumentou a captação de nutrientes devido a capacidade de solubilização de fosfato. Devido isso, o autor sugere que a inoculação de *M. guilliermondii* pode reduzir até metade do uso de fertilizantes químicos, reduzindo o impacto ambiental e custo de produção.

3.3.3 Caracterização molecular dos fungos filamentosos

A análise molecular da região ITS do rDNA foi realizada para 36 isolados de fungos filamentosos isolados do meio THSM e Martin. As sequências foram comparadas com outras previamente depositadas no *GenBank* e mostrou a prevalência de 6 gêneros, sendo o mais abundante *Galactomyces* (17 isolados), seguido por *Penicillium* (8 isolados), *Mucor* (5 isolados), *Aspergillus* (3 isolados), *Cladosporium* (2 isolados) e *Trichoderma* (1 isolado).

A Figura 8 mostra a distribuição dos diferentes gêneros e espécies nos tempos amostrais avaliados. Entre os isolados investigados, foi possível obter informação a nível de espécie de *Trichoderma harzianum* e *Galactomyces candidum*.

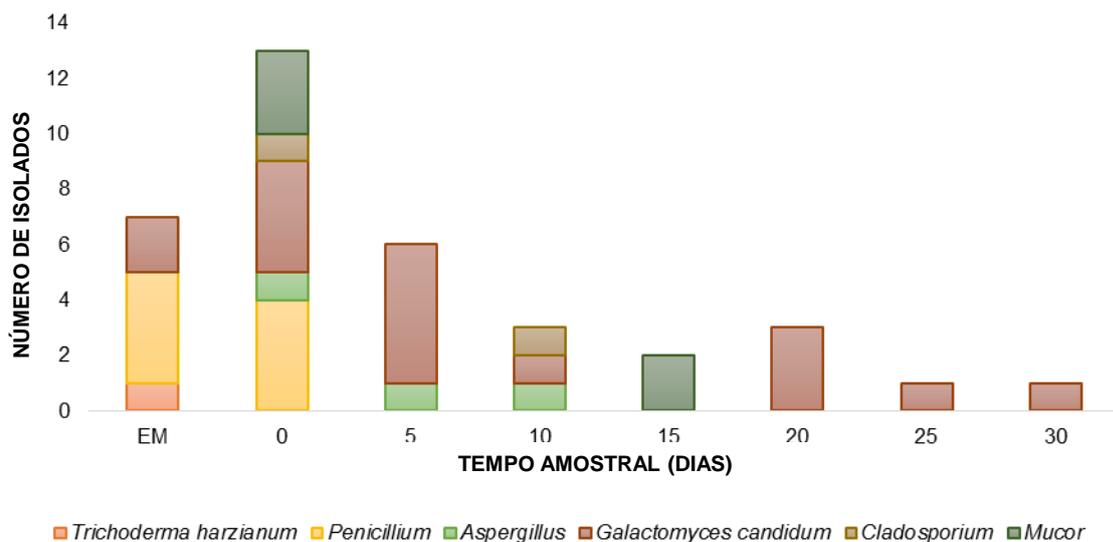


Figura 8. Distribuição dos isolados de fungos filamentosos nos diferentes tempos de produção do Hortbio®

O tempo de produção 0 e o EM são apresentados como os tempos com maior número de isolados e mais diversos. O fungo *Galactomyces candidum* foi o mais prevalente e o único isolado nos últimos tempos de produção (20, 25 e 30 dias) do Hortbio®.

G. candidum (anamorfo: *Geotrichum candidum*) é um fungo filamentoso *yeast-like*, possuindo variedade fenotípica, podendo assumir a forma leveduriforme ou filamentosa. Esse já foi isolado de uma ampla gama de habitats como solo, tecidos vegetais, leite, ar, água e do trato intestinal de animais (POTTIER et al., 2008). Sua morfologia variável pode ter beneficiado o seu crescimento nos últimos tempos de produção. Circunstâncias como elevada densidade populacional e condições desfavoráveis ao crescimento como estresse nutricional ou provocado por pH e temperatura, tendem a priorizar o crescimento na forma de levedura como

uma forma de adaptação e proteção ao estresse abiótico (HARRIS, 2011). Portanto, como nos últimos tempos de produção pode ter havido escassez nutricional, esse fungo pode ter assumido a forma leveduriforme como estratégia para seu crescimento e, então, assumido forma filamentosa quando exposto ao meio nutritivo quando isolado.

O sequenciamento da região ITS é difícil para as espécies do gênero *Galactomyces*, pois apresentam trechos curtos e baixos picos que dificultam a leitura da sequência (DE HOOG; SMITH, 2004). Devido a essa limitação para espécies desse gênero, os fragmentos gerados pelo sequenciamento da região ITS foram curtos e com picos baixos, contudo, foi possível a distinção dos mesmos a nível de espécie.

Os demais fungos foram isolados especialmente nos tempos iniciais de produção do biofertilizante. Entre esses *Penicillium* e *Cladosporium* já foram isolados no biofertilizante Agrobio (SILVA et al., 2006), e *Penicillium* e *Aspergillus* de um biofertilizante oriundo de esterco bovino (ALFA et al., 2014).

Diferentes gêneros foram isolados nos diferentes tempos amostrais como mostrado na Tabela 9. Não foi possível classificar todos os isolados encontrados a nível de espécie. A região ITS gerou caracteres suficientes para separar os isolados a nível de gênero.

Tabela 9. Distribuição dos isolados de fungos filamentosos entre os gêneros e filo de maior similaridade de acordo com o sequenciamento da região ITS com sequencias depositadas no GenBank (NCBI).

Isolado	Gênero	Filo
FEM 07	<i>Trichoderma harzianum</i>	
FEM 08, FEM 09, F0.03, F0.05, F0.09, TEM 02, TEM 05, T0.04	<i>Penicillium</i>	
F0.04, F10.04, T5.04	<i>Aspergillus</i>	
FEM 04, FEM 05, F0.01, F0.02, F0.06, F0.07, F5.03, F5.05, F5.06, F10.01, F20.01, T5.01, T5.07, T20.01, T20.02, T25.01, T30.01	<i>Galactomyces candidum</i>	Ascomycota
T0.07, T10.01	<i>Cladosporium</i>	
T0.01, T0.05, T0.06, T15.02, T15.04	<i>Mucor</i>	Zigomycota

Entre os fungos isolados, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium* e *Aspergillus* são apontados como importantes agentes de biocontrole assim como na promoção do crescimento vegetal (ALTOMARE et al., 1999; DAL BELLO et al., 2002; JEERAPONG et al., 2015).

Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são cosmopolitas e tipicamente encontrados em solos ou atuam como decompositores de madeira. São importantes economicamente por produzirem enzimas e metabólitos de uso industrial (celulases, hemicelulases, antibióticos) e também pelo seu papel como agentes de biocontrole (KULLNIG-GRADINGER et al, 2002).

Trichoderma harzianum destaca-se como sendo o fungo agente de biocontrole mais estudado (AVIS et al., 2008). A capacidade de atuar contra o crescimento de fitopatógenos é decorrente da capacidade de sobreviverem em condições desfavoráveis, utilização eficiente de nutrientes, capacidade de modificarem a rizosfera e promovem diferentes mecanismos de defesa da planta contra fitopatógenos (BENÍTEZ et al., 2004). No mais, atuam como competidores

de nutrientes e espaço, bem como, produzem e/ou resistem a substâncias que impedem a germinação dos esporos (fungiestáticos), matam as células (antibiose) ou modificam a rizosfera deixando-a ácida, o que reduz o crescimento de patógenos (BENÍTEZ et al., 2004), o micoparasitismo, que tem sido a principal forma de biocontrole (WILLIAMS et al., 2003), e induzem a defesa das plantas (HOWELL, 2003). Além desses mecanismos, produzem metabólitos secundários com atividade antibiótica (JEERAPONG et al., 2015).

T. harzianum mostrou reduzir o crescimento de *Fusarium graminearum* *in vitro* e no campo (DAL BELLO et al., 2002), *Colletotrichum gloeosporioides* (JEERAPONG et al., 2015), *Rhizoctonia solani* (CHENG et al., 2011)

Os fungos desse gênero também se destacam por agirem como agentes promotores de crescimento em plantas e na germinação de sementes. Respostas à aplicação de *Trichoderma* spp. são caracterizadas por aumentos significativos na porcentagem de germinação, no peso seco e na altura de plantas (MENEZES et al., 2010). Mecanismos relacionados a promoção do crescimento vegetal estão ligados a solubilização de minerais do solo e da matéria orgânica, sendo que Altomare et al (1999) mostraram que *T. harzianum* atua solubilizando óxidos metálicos como Zn, Cu, Mn e Fe com elevada eficiência, mecanismo esse que pode estar ligado com a sua capacidade de biocontrole, por tornar indisponível nutrientes à fitopatógenos.

A grande competência que esses fungos possuem em atuar melhorando o status nutricional das plantas e reduzindo o crescimento de micro-organismos indesejáveis é por meio da competição e capacidade de colonizar a região rizosférica (HOWELL, 2003). Seu rápido crescimento o permite colonizar grande parte da rizosfera e competir por espaço e nutrientes com fitopatógenos (BEAULIEU et al., 2011). A presença de *T. harzianum* no biofertilizante se faz importante por ser um eficaz agente de biocontrole.

Aspergillus e *Penicillium* são fungos não micorrízicos que tem sido extensivamente estudados acerca da capacidade de solubilização de fosfato (KHAN et al., 2009). A solubilização fosfato por meio da liberação de ácidos orgânicos, como glucônico, cítrico, fórmico, acético, propiônico, láctico e succínico no meio (KANSE et al., 2014). Sane e Mehta (2015), avaliaram estirpes de *Aspergillus* e *Penicillium* na solubilização de fosfato de rocha, sendo que houve redução do pH ao longo do processo indicando que a solubilização do fosfato está

sendo realizada por meio da liberação de ácidos orgânicos, a estirpe de *Aspergillus* liberou ácidos oxálico e cítrico, sendo que *Penicillium* liberou ácido glucônico, glicólico e málico. A co-cultura de *Penicillium* e *Aspergillus* como componentes de um consórcio fúngico tem sido reportada como importante associação que atua sinergicamente para decomposição de polissacarídeos (VASSILEV et al., 2015). Juntamente com *Trichoderma*, apresentam importante atividade antagonista a fitopatógenos (HIGA; PARR, 1994; RADHAKRISHNAN et al., 2014)

Espécies de *Penicillium* são comumente encontrados em solos e estudos já mostraram a sua capacidade de interagir com raízes de plantas para melhorar o crescimento, pela produção de AIA, giberelina e especialmente pela solubilização de fosfato (RADHAKRISHNAN et al., 2014)

P. bilaii já vem sendo utilizado na agricultura por tornar disponível às plantas grande quantidade de P e aumentar o peso seco, e concentração de P em sementes (RICE et al., 1995). O uso de *P. bilaii* em formulação comercial já foi registrada no Canadá e tem sido apresentada como potenciador biológico para nutrição de plantas (ALTOMARE et al., 1999). Vessey e Heisinger (2001), mostraram o uso de *P. bilaii* como inóculo de ervilha aumentou peso seco e comprimento da raiz, concentração de P na planta na ausência de fertilização. Radhakrishnan et al. (2014), avaliou três diferentes estirpes de *Penicillium* no crescimento de gergilim, o uso dessas aumentou o comprimento da raiz e o peso seco e peso fresco das plântulas, e *in vitro* mostrou reduzir o crescimento de *Fusarium* spp.

Espécies de *Penicillium* também estão relacionadas com a degradação de xenobióticos do solo, o que possivelmente pode aumentar o seu uso como agente biorremediador (JAIN; KHICHI, 2014).

Aspergillus também é um importante gênero de fungo associado com a solubilização de fosfato. Güneş et al. (2009), avaliou uma estirpe de *Aspergillus* no cultivo de morango, e obteve como resultado que o uso dessa estirpe reduziu em, aproximadamente, 100kg.ha⁻¹ no uso de fertilizantes fosfatados. Ogbo (2010) utilizou duas espécies de *Aspergillus*, sendo elas *A. fumigatus* e *A. niger* para a biotransformação de resíduos do processamento da mandioca em um biofertilizante fosfatado, sendo que esse quando inoculado com *A. niger* aumentou significativamente o crescimento de ervilha.

Entretanto, algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estão ligadas a fitopatologias como *P. digitatum* causador de doenças na pós-colheita, como o bolor verde (ALOUÍ et al., 2015), *A. niger* e *A. carbonarium* produtores de micotoxinas (WELKE et al., 2009).

CONCLUSÃO

O biofertilizante Hortbio® mostrou possuir na sua formulação, micro-organismos já reportados na literatura como importantes agentes na promoção do crescimento vegetal, assim como no biocontrole de fitopatógenos e fitoestimuladores. O uso do produto pode ainda melhorar a microbiota do solo e atuar em processos importantes como a degradação da matéria orgânica, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato.

Os diferentes tempos de produção do biofertilizante apresentaram uma microbiota extremamente variável mostrando que esse fator influenciou na composição dos micro-organismos presentes. Para fungos e leveduras, o tempo amostral 0 e o EM apresentaram uma maior diversidade, havendo redução ao longo do preparo do produto. Esse fato não foi observado para bactérias. Para esse grupo, os tempos 10 a 20 apresentaram maior quantidade de isolamentos sendo que posteriormente houve redução. Dessa forma, é possível observar que nos tempos finais de produção (25 e 30 dias) houve redução no crescimento microbiano de todos os grupos avaliados.

O grupo das bactérias foi o que apresentou maior predominância em quase todos os tempos de preparo do biofertilizante, seguido por leveduras e fungos. Esse fato pode estar ligado às condições do meio, como o pH, que favoreceram o crescimento de micro-organismos desse grupo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 921–929, 2009.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Effects of insecticides on plant-growth-promoting activities of phosphate solubilizing rhizobacterium *Klebsiella* sp. strain PS19. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, p. 51–56, 2011.
- ALFA, M. I. et al. Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestion effluent of cow dung and chicken droppings. **Renewable Energy**, v. 63, p. 681–686, 2014.
- ALLOUI, H. et al. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International journal of food microbiology**, v. 200, p. 22–30, 2015.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; HARMAN, G. E. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926–2933, 1999.
- AMBROSINI, A. et al. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 245–264, 2012.
- AMOROSO. et al. **Actinobacteria: application in bioremediation and production of industrial enzymes**. CRC Press, 2013.
- AVIS, T. J. et al. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1733–1740, 2008.
- AVRAHAMI, S.; BOHANNAN, B. J. M.; RIDGE, J. Response of *Nitrosospira* sp. strain af-like ammonia oxidizers to changes in temperature, soil moisture content, and fertilizer concentration. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 4, p. 1166–1173, 2007.
- BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2397–2406, 1999.
- BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1–33, 2014.
- BASTIAANSE, H. et al. Integrated control of crown rot of banana with *Candida oleophila* strain O, calcium chloride and modified atmosphere packaging.

Biological Control, v. 53, n. 1, p. 100–107, 2010.

BAUTISTA-ROSALES, P. U. et al. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, v. 65, n. 3, p. 293–301, 2013.

BEAULIEU, R. et al. qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum* in peat and compost-based growing media. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2793–2798, 2011.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.

BENKERROUM, N. et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in model cultured milk by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 145–151, 2002.

BERLANGA, M. Molecular phylogeny of microorganisms. **International Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 219, 2011.

BHARDWAJ, D. et al. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 66, 2014.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BHUSHAN, C. et al. Siderophoregenic *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 6-12, 2009.

BONALDI, M. et al. Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. February, p. 1–10, 2015.

BOSE, A. et al. Phytostimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L. f.) Spreng rhizosphere. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 128–137, 2016.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1–8, 2011.

BUELL, C. R. et al. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. **PNAS**, v. 100, n. 18, p 181-186, 2003.

BURBANK, M. B. et al. Urease Activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria. **Geomicrobiology Journal**, v. 29, n. 4, p. 389–395, 2012.

- CANNAVAN, F. D. S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - USP, 2007.
- CAPPELLI, A. et al. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2014.
- CASTELLANOS SUAREZ, D. E. et al. Combined effects of earthworms and IAA-producing rhizobacteria on plant growth and development. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 80: 100–107, 2014.
- CHAIHARN, M.; LUMYONG, S. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 305–314, 2009.
- CHAN, G. F. et al. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 10, p. 1300–1, 2012.
- CHENG, C. et al. Cloning of a novel l-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 and bioactivity analysis of overexpressed l-amino acid oxidase. p. 9142–9149, 2011.
- COLOMBO, F. et al. Impact of forest management practices on soil bacterial diversity and consequences for soil processes. **Soil Biology and Biochemistry**, p. 1–11, 2015.
- CONNELL, L. et al. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 3, p. 448–459, 2008.
- CORTE, L. et al. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains. **Food Microbiology**, v. 48, p. 206–215, 2015.
- COUILLEROT, O. et al. Biocontrol and biofertilizer activities of the *Streptomyces anulatus* S37: an endophytic actinomycete with biocontrol and plant-growth promoting activities. **Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens**, v. 86, p. 271–276, 2013.
- DAL BELLO, G. M. et al. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 627–636, 2002.
- DE HOOG, G. S.; SMITH, M. T. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 2, p. 489–515, 2004.
- SJÖGREN, J. et al. Antifungal 3-Hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, pp. 7554–7557, 2003.
- DELANY, I. R. et al. Enhancing the biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113 by altering the regulation and production of 2,4-diacetylphloroglucinol: Improved *Pseudomonas* biocontrol inoculants. **Plant and Soil**, v. 232, n. 1-2, p. 195–205, 2001.

- DIAS, A. C. F. et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305–1311, 2009.
- DIAS, M. et al. Epiphytic bacteria biodiversity in Brazilian Cerrado fruit and their cellulolytic activity potential. **Annals of Microbiology**, p. 851–864, 2014.
- DONG, X.; REDDY, G. B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1175–1182, 2010.
- DOOLOTKELDIEVA, T. et al. Effects of *Streptomyces* biofertilizer to soil fertility and rhizosphere's functional biodiversity of agricultural plants. **Advances in Microbiology**, v. 5, p. 555–571, 2015.
- DUBEY, N.K. **Plants as a Source of Natural Antioxidants**. CABI, 2014.
- DUNNE, C. et al. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. **Microbiology**, v. 143, n. 12, p. 3921–3931, 1997.
- EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, n. 4, p. 377–381, 1999.
- FERNANDES, M.F. et al. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1509-1517, 2001.
- FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006.
- GAO, B.; MOHAN, R.; GUPTA, R. S. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 234–247, 2009.
- GHOSH, R. et al. Biological control of fruit-rot of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria. **Biological Control**, v. 83, p. 29–36, 2015a.
- GHOSH, P. et al. Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 296–303, 2015b.
- GIRIJA, D. et al. Analysis of cow dung microbiota-A metagenomic approach. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 372–378, 2013.
- GREPPI, A. et al. Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. **International journal of food microbiology**, v. 205, p. 81–89, 2015.

- GÜNEŞ, A. et al. Effects of phosphate-solubilizing microorganisms on strawberry yield and nutrient concentrations. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, n. 3, p. 385–392, 2009.
- GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002.
- HARRIS, S. D. Hyphal morphogenesis: An evolutionary perspective. **Fungal Biology**, v. 115, n. 6, p. 475–484, 2011.
- HELLSTRÖM, A. M. et al. Degradation of phytate by *Pichia kudriavzevii* TY13 and *Hanseniaspora guilliermondii* TY14 in Tanzanian togwa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 73–77, 2012.
- HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–8873, 2013.
- HIGA, T.; PARR, J. F. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. **International Nature Farming Research Center**, n. 808, p. 1–16, 1994.
- HOPPE-SEYLER, T. S. et al. Identification and differentiation of species and strains of *Arthrobacter* and *Microbacterium barkeri* isolated from smear cheeses with Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Systematic and applied microbiology**, v. 26, n. 3, p. 438–44, set. 2003.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* Species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4–10, 2003.
- HUANG, X. F. et al. *Bacillus* spp: From rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 672–684, 2015.
- HUDDER, S. B. et al. Isolation, characterization, and plasmid pUPI126-mediated indole-3-acetic acid production in *Acinetobacter* strains from rhizosphere of wheat. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 102-103, n. 1-6, p. 21–39, 2002.
- INIGUEZ, A L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 17, n. 10, p. 1078–1085, 2004.
- JAIN, P.; KHICHI, D. S. Phosphate solubilizing microorganism (PSM): An eco-friendly biofertilizer and pollution manager. **Journal of Dynamics in Agricultural Research**, v. 1, n. 4, p. 23–28, 2014.
- JANARTHINE, S. R. S.; EGANATHAN, P. Plant growth promoting of endophytic *Sporosarcina aquimarina* SjAM16103 isolated from the pneumatophores of *Avicennia marina* L. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.
- JEERAPONG, C. et al. Trichoharzianol, a New Antifungal from *Trichoderma*

harzianum F031. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 14, p. 3704–3708, 2015.

JEON, J. S. et al. Plant Growth Promotion in Soil by Some Inoculated Microorganisms. **Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 271–276, 2003.

KAMOSHITA, M. et al. *Wickerhamomyces anomalus* fungal keratitis responds to topical treatment with antifungal micafungin. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 2, p. 141–143, 2015.

KANSE, O. S. et al. Phosphate solubilization by stress-tolerant soil fungus *Talaromyces funiculosus* SLS8 isolated from the Neem rhizosphere. **Annals of Microbiology**, p. 1–9, 2014.

KHAMNA, S., et al. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 25, p. 649–655, 2009

KHAN, A. A. et al. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of agriculture and biological sciences**, v. 1, n. 1, p. 48–58, 2009.

KUAN, K. B. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0152478, 2016.

KULLNIG-GRADINGER, C. M. et al. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, v. 106, n. 7, p. 757–767, 2002.

KUMAR, R.; CHANDRA, R. Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* Bv. *viciae* strain competition and symbiotic performance in lentil. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 3, p. 297–301, 2008.

KUPPER, K. C. et al. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum* agente causal da queda prematura de frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004 – 1015, 2009.

KURTZMAN, C. P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 13–23, 2011.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Yeast Systematics and Phylogeny – Implications of Molecular Identification Methods for Studies in. In: **Marine Biology**. Illinois, p. 11–30, 1998.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 2–14, 2010.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of

- ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.
- KUSTER, E.; WILLIAMS, S. Selection of Media for Isolation of Streptomyces. **Nature**, v. 202, p. 928-929, 1964.
- LAHLALI, R.; JIJAKLI, M. H. Enhancement of the biocontrol agent *Candida oleophila* (strain O) survival and control efficiency under extreme conditions of water activity and relative humidity. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 403–408, 2009.
- LEANGVUTIVIROJ, C. et al. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 5, p. 1098–101, 2010.
- LIU, J. et al. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 578–590, 2012.
- MADIGAN ET AL et al. **Microbiologia de Brock**. 12^a Ed. Artmed. 2010
- MAGRINI, F. E. et al. Características químicas e avaliação microbiológica de diferentes fases de maturação do biofertilizante Bokashi. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 146–151, 2011.
- MAGRINI, F. E.; CAMATTI-SARTORI, V.; VENTURIN, L. Avaliação Microbiológica , pH e Umidade de Diferentes Fases de Maturação do Biofertilizante Bokashi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 431–435, 2009.
- MAJEED, A. et al. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–10, 2015.
- MALIK, R. D. S.; KAVIMANDAN, S. K.; TILAK, K. V. B. R. *Kurthia* sp. - A novel ecofriendly inoculant for rapeseed (*Brassica campestris* var toria). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, n. 1, p. 92–93, 1999.
- MANDAL, V. et al. Production and partial characterization of an inducer dependent novel antifungal compound(s) by *Pediococcus acidilactici* LAB5. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 10, p. 2445-2453, 2013
- MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Plate Method for Soil Fungus Studies**, n. 617, p. 215 – 232, 1949.
- MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261–268, 2004.
- MASOUD, W. et al. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East

- Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, v. 21, n. 7, p. 549–56, 2004.
- MEDEIROS, M. B. DE; LOPES, J. DA S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 24–26, 2006.
- MENEZES, J. P. et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 132–139, 2010.
- MICHIELS, A.; ENDE, A. W. VAN DEN.; TUCKER, M.; RIET, L. VAN.; LAERE, A. VAN. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants, **Analytical Biochemistry**, v. 315, n. 1, p. 85–89, 2003.
- MICKAN, M.; MÜLLER, T. Impact of effective microorganisms and other biofertilizers on soil microbial characteristics, organic-matter decomposition, and plant growth. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, p. 704–712, 2009
- MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 11, p. 3075–3084, 2013.
- MOHAMMADI, K.; SOHRABI, Y. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production : a Review. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 7, n. 5, p. 307–316, 2012.
- MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.
- NAKAYAN, P. et al. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant and Soil**, v. 373, p. 301–315, 2013.
- OGBO, F. C. Bioresource Technology Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4120–4124, 2010.
- OLIVEIRA, J. R. DE et al. Estado nutricional e produção da pimenteira com uso de biofertilizantes líquidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1241–1246, 2014.
- OLIVEIRA, C. A. et al. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782–1787, set. 2009.
- ORTIZ-CASTRO R. et al. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 7253– 7258, 2011.
- PEREG, L.; MCMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil**

Biology and Biochemistry, v. 80, p. 349–358, 2015a.

PEZZOLLA, D. et al. Influence of exogenous organic matter on prokaryotic and eukaryotic microbiota in an agricultural soil . A multidisciplinary approach. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 82, p. 9 –20, 2015.

POTTIER, I. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 327–332, 2008.

PRAKASH, O. et al. Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 51–62, jan. 2013.

QUAN, C. et al. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 154–160, 2001.

RADHAKRISHNAN, R. et al. Characterization of plant growth-promoting traits of *Penicillium* species against the effects of high soil salinity and root disease. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 754–762, 2014.

RAMPELOTTO, P. H. et al. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian Savanna under different land use systems. **Microbial ecology**, v. 66, n. 3, p. 593–607, out. 2013.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and environmental microbiology**, v. 49, n. 1, p. 1–7, jan. 1985.

RICE, W. A.; OLSEN, P. E.; LEGGETT, M. E. Co-culture of *Rhizobium meliloti* and a phosphorus-solubilizing fungus (*Penicillium bilaii*) in sterile peat. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4-5, p. 703–705, 1995.

ROCHA, S.; ANDRADE, M. DE. **Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**, 2011.

ROMI, W. et al. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 52, 2014.

ROSE, M. T. et al. Up to 52% N fertilizer replaced by biofertilizer in lowland rice via farmer participatory research. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 4, p. 857–868, 2014.

SACHDEV, D. P. et al. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 12, p. 993–1000, 2009.

SANE, S. A.; MEHTA, S. K. Isolation and evaluation of rock phosphate solubilizing fungi as potential biofertilizer. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 2015, 2015.

- SANKH, S. et al. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. **Fuel**, v. 106, p. 690–696, 2013.
- SANTOS, A et al. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 624–34, 2009.
- SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, v. 150, p. 2527–2534, 2004.
- SAS INSTITUTE, SAS. **User's guide: statistics**. 6^a ed. Cary, p.956,1998.
- SAYYED, R. Z.; CHINCHOLKAR, S. B. Purification of siderophores of *Alcaligenes faecalis* on Amberlite XAD. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 8, p. 1026–1029, 2006.
- SAXENA. **Agricultural Applications of Microbes**. In: Applied Microbiology. Ed. Springer India. 2015
- SHARMA, B. C.; SUBBA, R.; SAHA, A. *Kurthia* sp , a novel member of phosphate solubilising bacteria from rhizospheric tea soil of Darjeeling Hills, India. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 36–39, 2012.
- SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–29, 2015.
- SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515–521, 2000.
- SILVA, D. et al. Efeito de produtos químicos e biológicos sobre a mancha bacteriana, flora microbiana no filoplano e produtividade de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 134–140, 2006.
- SINGH, J. S. et al. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 140, n. 3-4, p. 339–353, 2011.
- SINGH, R. P. et al. The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 184, p. 57–67, 2015.
- SIVASAKTHI, S. et al. Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolates from paddy rhizosphere soil of cuddalore district, Tamil Nadu, India. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 227–233, 2013.
- SOUZA, R. B. DE et al. **Composição do Hortbio**. Brasília - DF. Embrapa Hortaliças - CNPH, 2012.
- SRIVASTAVA, R.; ARAGNO, M.; SHARMA, A. K. Cow dung extract: A medium for the growth of pseudomonads enhancing their efficiency as biofertilizer and

- biocontrol agent in rice. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 349–354, 2010.
- SUCKSTORFF, I.; BERG, G. Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins, **J Appl Microbiol**, v. 95, p. 656-663, 2003.
- SUN, H. Y. et al. Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalus* HN1-2 isolated from mangrove ecosystem. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 251–256, 2012.
- TAMURA, K. et al. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: A review. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 12, 2013.
- TSAVKELOVA, E. A. et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological research**, v. 162, n. 1, p. 69–76, 2007.
- VACHERON, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 1-19, 2013.
- VASSILEV, N. et al. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 4983–4996, 2015.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, p. 571–586, 2003.
- VESSEY, J. K.; HEISINGER, K. G. Inoculation and phosphorus fertilisation on root and shoot parameters of field-grown pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 81, p. 361–366, 2001.
- VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. Springer Science & Business Media, 2011.
- WANG, L. T. et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1846–1850, 2007.
- WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.
- WELKE, J. et al. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2567–2575, 2009.
- WELLER, D. M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. **Phytopathology**, v. 97, n. 2, p. 250–256, 2007.

- WELLER, D. M.; LINDA, S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: **Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganism**. p. 18, 1994.
- WEN, Z. D. et al. Biodegradation and kinetic analysis of phthalates by an *Arthrobacter* strain isolated from constructed wetland soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 10, p. 4683–4690, 2014.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, New York - NY. Pp. 315-322, 1990.
- WILLIAMS, J. et al. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 7, p. 4190–4192, 2003.
- WILSON, M. K. et al. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 348, n. 1, p. 320–5, 2006.
- WU, S. C. et al. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. **Geoderma**, v. 125, n. 1-2, p. 155–166, 2005.
- YANG, W. et al. Evaluation of biological control agents against *Ralstonia* wilt on ginger. **Biological Control**, v. 62, n. 3, p. 144–151, 2012.
- ZEIGER, T. Auxin: The Growth Hormone. In: **Plant Physiology and Development**, v. 13, p. 624, 2004.
- ZHU, L. et al. BOX-PCR and PCR-DGGE analysis for bacterial diversity of a naturally fermented functional food (Enzyme). **Food Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 115–122, 2014.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO FITOSSANITÁRIA E HORMONAL DO BIOFERTILIZANTE HORTBIO® EM DIFERENTES TEMPOS DE PRODUÇÃO.

RESUMO

A agricultura orgânica tem emergido como uma alternativa ao uso da fertilização mineral, a fim de reduzir o uso de compostos químicos no cultivo dos alimentos. Os biofertilizantes atuam como um insumo orgânico que oferece às plantas, hormônios vegetais e nutrientes. Contudo, a caracterização dos biofertilizantes, quanto a sua composição fitohormonal e de possíveis contaminantes biológicos, deve ser realizada, a fim de, avaliar seu potencial fertilizador e preconizar a segurança alimentar. Para tanto, foram avaliadas as concentrações do ácido-indol-acético (AIA), em três diferentes tempos de produção de um preparado do biofertilizante Hortbio® por meio da técnica de HPLC. Foi avaliada a presença de *Salmonella* e coliformes fecais no produto, assim como de helmintos e nematodas em cinco diferentes preparados do biofertilizante. As concentrações avaliadas de AIA nos diferentes tempos de produção mostram que o produto contém em sua formulação concentrações do hormônio capazes de estimular o crescimento de pêlos radiculares e raízes secundárias, entretanto, houve redução do hormônio ao longo dos tempos de produção. Esse fato indica que possivelmente, micro-organismos reduziram a produção desse hormônio, devido a redução do seu crescimento ao longo do tempo de preparo do biofertilizante. O Hortbio® apresentou níveis aceitáveis de contaminantes biológicos de acordo com a IN nº46/2011, contudo a presença de *E. coli*, *E. nana* e Nematodae mostram um possível risco de contaminação que deve ser avaliado, a fim de preconizar a segurança alimentar do produto.

PALAVRAS-CHAVES: Agricultura orgânica; HPLC; ácido-indol-ácético; contaminantes biológicos;

1.0 INTRODUÇÃO

A agricultura orgânica vem ganhando maior notoriedade e tem emergido como uma importante alternativa ao uso de adubos minerais (LEAUNGVUTIVIROJ et al., 2010a). A grande demanda por alimentos livres de compostos químicos, a preocupação com a sustentabilidade e a poluição ambiental tem levado a maiores estudos acerca da produção orgânica de alimentos (AL-ERWY et al., 2016).

O uso de fertilizantes orgânicos aumenta a disponibilidade de matéria orgânica do solo e as concentrações de nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio (LEAUNGVUTIVIROJ et al., 2010a). A incorporação da matéria orgânica no solo melhora os atributos físicos, químicos e biológicos do solo e tem sido utilizada com o objetivo de reduzir o uso de fertilizante minerais (CHICONATO et al., 2014).

Os biofertilizantes são caracterizados por serem o resíduo final da fermentação de compostos orgânicos pela ação microbiana existente e possuem na sua formulação enzimas, antibióticos, vitaminas e hormônios vegetais como produtos do metabolismo microbiano (ALVES et al., 2001). A auxina, em especial o ácido-3-indol acético (AIA), é um dos principais hormônios vegetais e atua como um potencial bioestimulante, agindo especialmente nas raízes regulando sua morfologia e tamanho, assim como no crescimento de raízes secundárias e pêlos radiculares. Os pêlos radiculares podem constituir cerca de 70% do volume total das raízes e ser responsáveis pela absorção de 80% do fósforo consumido pelas plantas não micorrizadas (PEREG; MCMILLAN, 2015a). Diversas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) já demonstraram produzir esse hormônio como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* sendo esses potenciais inoculantes para biofertilizantes (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

Porém, além da presença de PGPR, contaminantes biológicos como a *Salmonella* spp, coliformes fecais como a *Escherichia coli* e *Shigella* spp., e helmintos, que são patógenos humanos, podem estar presentes na formulação do biofertilizante, o que inviabilizaria seu uso, especialmente quando aplicados em vegetais que são consumidos crus (ALFA et al., 2014b). Muito embora a utilização de biofertilizantes aumente a produtividade agrícola e a qualidade do solo, deve-se preconizar a segurança alimentar do consumidor final, sendo assim, deve-se

investigar a qualidade sanitária do produto (OWAMAH et al., 2014). No Brasil, o uso de biofertilizantes produzidos deve seguir uma regulação que estabelece valores de contaminantes biológicos que podem estar contidos nas formulações (BRASIL, 2011).

O Hortbio[®] é um fertilizante biológico aeróbico desenvolvido pela Embrapa Hortaliças, localizada em Brasília – DF. Esse fertilizante utiliza como inóculo micro-organismos oriundos do solo (SOUZA et al., 2012). Atualmente, o Hortbio[®] já é utilizado por diversos produtores orgânicos do DF para o cultivo de hortaliças. Além de ser comprovada a sua eficiência, a produção do Hortbio[®] auxilia no reaproveitamento de resíduos que seriam descartados, o que promove maior sustentabilidade ao sistema produtivo (LÜDKE, 2009a).

Diante do exposto, se faz necessária a caracterização do Hortbio[®] tanto no sentido de avaliar o seu potencial fertilizador e estimulador do crescimento vegetal, quanto no sentido de preconizar a segurança alimentar, avaliando os contaminantes biológicos que podem estar inseridos no produto.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo caracterizar o Hortbio[®] como estimulador do crescimento vegetal e avaliar a presença de contaminantes biológicos.

2.0 METODOLOGIA

2.1 Produção do biofertilizante

Foi utilizada para a realização do experimento uma bombona plástica com capacidade de 200 litros. Para produção de 100 litros do biofertilizante foi utilizado: Farinha de sangue (1,1kg); Farelo de arroz (4,4kg); Farelo de mamona (1,1kg); Farinha de ossos (2,2kg); Sementes trituradas (1,1kg); Cinza de madeira (1,1kg); Rapadura triturada (0,55kg); Fubá (0,55kg) e 1 litro do inoculante EM. Ao final foi adicionada água não clorada para obter o volume final de 100 litros. Os ingredientes foram misturados com auxílio de uma espátula de madeira na medida em que se adicionava a água.

Foram produzidas cinco preparações do Hortbio[®] utilizando o mesmo EM (micro-organismos eficazes) e os ingredientes do mesmo lote. Os preparados foram nomeados de acordo com o tempo de preparo do EM. O primeiro Hortbio[®] produzido utilizou como inóculo o EM com 0 de produzido, sendo assim denominado Hortbio 0[®]; o segundo preparado utilizou o EM com 10 dias de

produzidos, sendo assim denominado Hortbio® 10, assim por diante, sendo que o último preparado utilizou o EM com 40 dias de preparado, sendo dessa forma denominado Hortbio® 40.

Os preparados foram armazenados em uma bombona plástica, com capacidade de 200 litros e mantido em local sombreado e fresco. A aeração foi realizada por 15 minutos a cada hora, com o auxílio de um compressor de ar e um temporizador. Antes da sua utilização o Hortbio® foi coado utilizando uma peneira.

O inoculante EM foi coletado em solo de área de cerradão localizada na Embrapa Hortaliças (15°56'61.8S/48°08'42.7O).

Para a coleta dos micro-organismos do solo, 700gr de arroz cozido foi colocado em duas bandejas de plástico e uma de papelão, protegidos com sombrites, e então, foi exposto por um período de sete dias no solo, de acordo com as recomendações do Caderno de Micro-organismos Eficazes (BONFIM et al., 2011).

Após a coleta do EM do solo, esse foi ativado para viabilizar o seu uso no biofertilizante. Para tanto foi adicionada a massa microbiana coletada do solo, 10% de fonte de sacarose na forma de melaço de cana e caldo de cana. Foi adicionado água não clorada até que fosse alcançado volume final de 10 litros. Para aeração, o sistema foi oxigenado durante 15 minutos a cada hora. Após sete dias o inoculante estava pronto para ser utilizado.

O EM foi denominado de acordo com o tempo em que era utilizado, após a sua ativação, como inoculante do Hortbio®. Sendo que, quando utilizado no tempo 0 após a sua ativação, foi denominado EM 0; após 10 dias da sua ativação, foi denominado EM 10 e assim por diante, até ser utilizado após 40 dias da sua ativação. O EM foi armazenado em geladeira, a 4°C.

2.2 Quantificação da produção de AIA presente no Hortbio® 0

As concentrações de auxina (AIA, ácido 3-indol acético) em diferentes tempos de produção (10, 20 e 30 dias de fermentação) do Hortbio® 0 foram avaliadas. As amostras foram centrifugadas e posteriormente foi realizado o ajuste do pH para 2,50 utilizando HCl 1mM. A separação da fase orgânica da fase aquosa foi feita pelo tratamento da amostra com etilacetato e metanol. O produto gerado foi então purificado pela passagem no cartucho SPE (*Sep-pack Oasis® MAX cartridge*)

para retirada de impurezas presentes na solução, como recomendado por TANSUPO et al (2010).

A análise da concentração de AIA nas amostras de Hortbio® em diferentes tempos foi feita utilizando a técnica *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC), por meio de um cromatógrafo LC-20AT (Shimadzu). A análise cromatográfica foi realizada pelo *software LC Real Time Analyses*. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C₁₈ para detecção fluorimétrica ($\lambda_{EX} = 280 / \lambda_{EM} = 350\text{nm}$). A fase móvel foi composta por uma única solução com dois eluentes. O eluente A consistiu em 1% de ácido acético e o eluente B em acetonitrila. A fase móvel foi montada utilizando 25% de acetonitrila e 75% de ácido acético, com pH final igual a 4,00. O ajuste de pH foi realizado utilizando HCl 1mM (SZKOP; BIELAWSKI, 2013).

A calibração da curva foi realizada utilizando AIA padrão HPLC (Sigma Aldrich) nas concentrações 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, o procedimento foi realizado em cinco repetições.

2.3 Avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica do Hortbio®

Após 10 dias, todos os cinco preparados de Hortbio® foram submetidos a uma análise de contaminantes microbiológicos e parasitológicos. Para tais análises foram coletadas 15ml de Hortbio® em triplicata e, então, foram armazenadas a 4°C.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Higiene de Alimentos da Universidade de Brasília – UnB.

Os ensaios realizados, de acordo com a resolução IN 46/2011, foram os seguintes: contagem de coliformes a 45°C ou termotolerantes e presença/ausência de *Salmonella* spp. A análise de coliformes termotolerantes foi realizada pelo método oficial da *American Public Health Association* (APHA), técnica do “número mais provável” (NMP), descrita no *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (KORNACKI & JOHNSON, 2001). A análise de *Salmonella* sp. foi realizada pelo método oficial da *Food and Drug Administration* – FDA - descrita no “*Bacteriological Analytical Manual Online*” (ANDREWS & HAMMACK, 2006).

As análises parasitológicas foram realizadas no Laboratório de Parasitologia, da Universidade de Brasília, para diagnósticos das formas infectivas, cistos de protozoários e ovos ou larvas de helmintos, parasitas e comensais. As amostras de

Hortbio[®] foram processadas pelo método parasitológico de Sedimentação Espontânea (REY, 2010). A cada 24h as amostras foram lavadas com água destilada, num total de cinco lavagens, com o objetivo de tornar o sedimento limpo e de fácil detecção das formas evolutivas. No quinto dia de lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi coletado, colocado em frasco de 80 g e conservado com formol a 10% até o momento da leitura.

Foram analisados 9 mL de cada preparado do Hortbio[®] por esgotamento, utilizando-se 36 lâminas. Cada lâmina foi corada com lugol e analisada em microscópio óptico (Olympus BX41) com objetivas de 10x e 40x. As amostras foram avaliadas por 3 leitores.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação de AIA em diferentes tempos de produção do Hortbio[®]

Os picos de quantificação de AIA presente no Hortbio[®] 0 avaliados após 10, 20 e 30 dias da produção apresentaram-se bem delineados e simétricos, para todas as análises. O tempo de retenção foi de aproximadamente 9,3 minutos. A curva de calibração foi feita utilizando concentrações padrão do AIA (Gráfico 1). A equação da curva de calibração ($p < 0,0001$) obteve $r^2 = 0,9951$ e o limite de detecção foi inferior a $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em uma curva de regressão linear, é possível calcular o valor do coeficiente de correlação, r . Esse parâmetro caracteriza a qualidade da curva obtida, sendo que, quanto mais próximo de 1,0 menor é a dispersão dos dados e maior a certeza dos coeficientes de regressão (RIBANI et al., 2004).

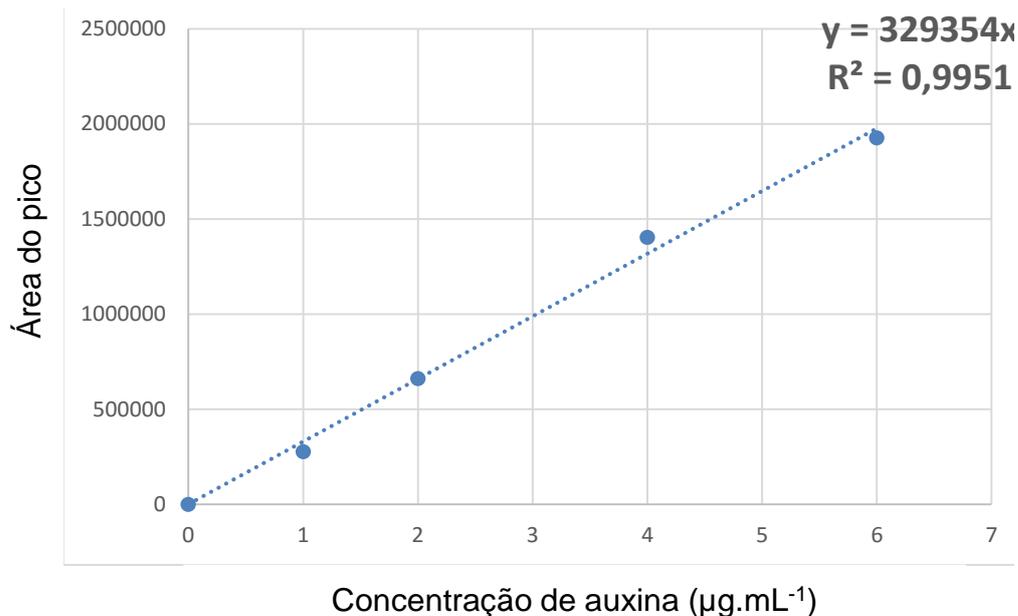


Figura 9. Curva de calibração de AIA em concentrações que variam de 0 a 100µg.mL⁻¹

Szkop e Bielawski (2013), demonstraram que o tempo de retenção para avaliação de AIA para culturas bacterianas é igual a 13,8 minutos, contudo a avaliação de AIA no Hortbio[®] apresentou um efeito de matriz do biofertilizante, que alterou o tempo de retenção da amostra.

A concentração de AIA encontrada após 10, 20 e 30 dias de fermentação do biofertilizante foi de 0,57; 0,32 e 0,15 µg.mL⁻¹, respectivamente (Gráfico 2), valor que também pode ser expresso em 3,3; 1,8; 0,9 µM de AIA para os tempos 10, 20 e 30, respectivamente. Szkop e Bielawski (2013), avaliaram a produção de AIA por *Pseudomonas putida* sendo produzido 0,7 – 10,3 µg.mL⁻¹ pela bactéria. Sarwar e Kremer (1992), avaliaram a produção de AIA por bactérias do gênero *Enterobacter*, *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes faecalis* e *Agrobacterium radiobacter*, sendo a produção desses, igual a 4-71; 3-77; 3-86; 3-52; 4-71 µg.mL⁻¹, respectivamente.

É possível observar a redução na concentração de AIA ao longo do tempo de fermentação do biofertilizante. Entre o tempo 10 e o tempo 20 houve uma redução da concentração de AIA de 44% e entre o tempo 10 e 30 essa redução foi de 74%. Esse fato pode estar ligado a mudanças na diversidade e abundância dos micro-organismos presentes no composto e a mudanças na composição do meio, como a redução de nutrientes disponíveis. Segundo Spaepen (2015), a maior produção de AIA é encontrada na fase estacionária do crescimento bacteriano. No

caso do Hortbio[®], é difícil fazer esse tipo de inferência, uma vez que esse produto é composto por uma diversidade de micro-organismos com taxas de crescimento diferenciadas.

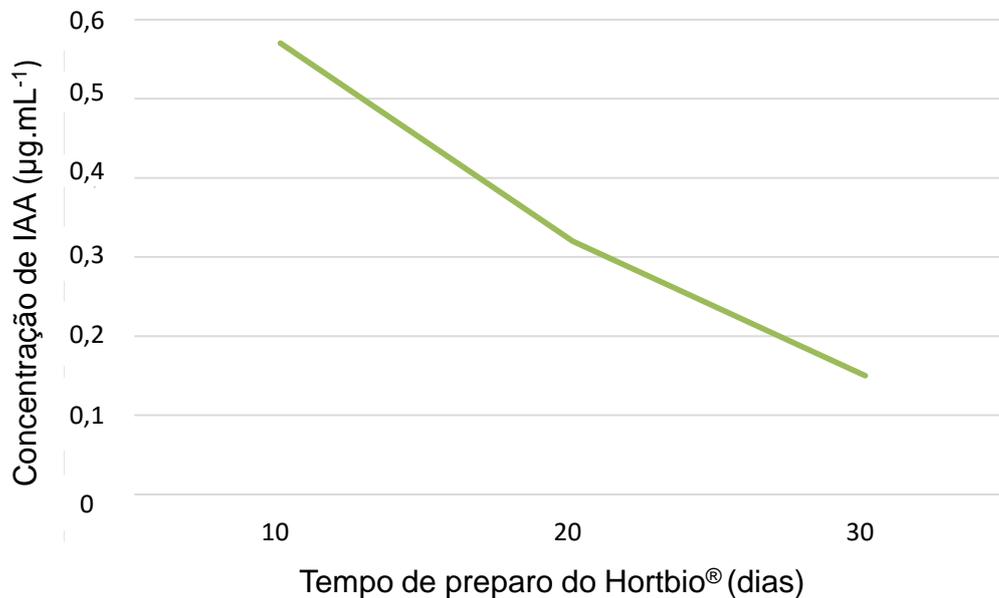


Figura 10. Concentração de AIA quantificada após 10, 20 e 30 dias de fermentação do Hortbio[®].

Segundo Zeiger (2004), concentrações que tangem entre 10^{-3} mol.L⁻¹ (1mM) a 10^{-6} mol.L⁻¹ (1µM) de auxina exibem efeito positivos no crescimento de plantas (Figura 4). A concentração ótima de auxina para estimulação do crescimento vegetal é em torno de 10^{-6} a 10^{-5} mol.L⁻¹. Concentrações muito elevadas, acima de 10^{-4} mol.L⁻¹, a auxina torna-se inibitória ao crescimento radicular, e em concentrações mais baixas, menores do que 10^{-6} mol.L⁻¹, passa a ser menos eficaz sobre o crescimento vegetal, entretanto, influenciam o crescimento radicular.

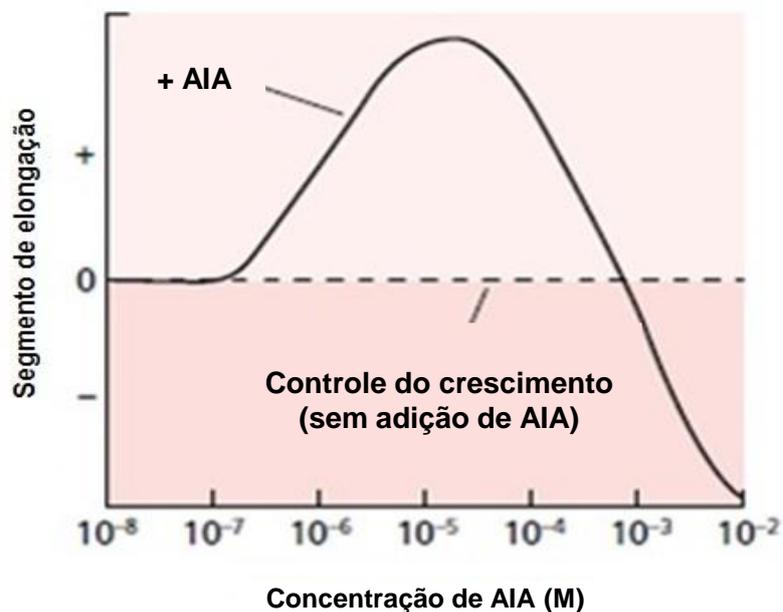


Figura 11. Curva dose-resposta do AIA. Concentrações intermediárias entre 10^{-4} e 10^{-6} mol.L⁻¹ mostram-se mais eficazes no crescimento apical do que doses mais elevadas. Doses inferiores não apresentam efeitos significativos. Imagem adaptada de Zeiger (2004).

Em estudos com alface, Zhang & Hasenstein (2000), avaliaram diferentes concentrações de auxinas no crescimento de raízes de plântulas de alface. Em concentrações baixas, entre 10^{-10} mol.L⁻¹ e 10^{-9} mol.L⁻¹ de AIA houve um modesto crescimento da raiz principal, contudo, em concentrações superiores a 10^{-7} mol.L⁻¹ o AIA inibiu o crescimento da raiz principal de alface. Entretanto, as concentrações mais elevadas de AIA estão ligadas a formação de raízes laterais em alface e ao crescimento apical da planta (ZHANG & HASENSTEIN, 1999).

Em experimentos com plântulas de alface, Takahashi et al. (2003), observaram que quando expostas a $0,1\mu\text{M}$ de AIA, ocorreu o desenvolvimento de pêlos radiculares e esses aumentam a área de contato da planta com o solo e possuem uma importante função na captação de água e nutrientes.

A concentração de AIA dosada no Hortbio® no tempo 10 de produção (utilizado para aplicação na alface) foi de $3,3 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Essa concentração é adequada para estimular o desenvolvimento apical da alface, de acordo com os

dados da literatura, inibiria o crescimento da raiz principal, porém aumentaria a formação de raízes laterais.

3.2 Avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica do Hortbio®

Não houve presença de *Salmonella* spp e coliformes totais em nenhum dos preparados do biofertilizante, estando estes em condições satisfatórias para uso. A ausência de *Salmonella* spp. e coliformes indicam que o uso do EM evita a contaminação por bactérias patogênicas que são comuns em biofertilizantes que utilizam esterco animal (MACHADO et al., 2006; SRIWURYANDARI; SEMBIRING, 2010).

Os limites máximos permitidos pela Instrução Normativa nº 46 de 2011 (BRASIL, 2011), com relação aos contaminantes biológicos, para fertilizantes são de 1000 (número mais provável por grama de sólidos totais) para coliformes fecais, ausência (10 gramas de matéria seca) para *Salmonella* sp. e 1 (número por 4 gramas de sólidos totais) para ovos viáveis de helmintos.

O Hortbio® 0, 30 e o 40 apresentaram resultados negativos para formas evolutivas de protozoários e helmintos. Nas amostras de Hortbio® 10 e 20 foram encontrados cistos de *Entamoeba coli* e *Endolimax nana* e ovos de Nematodas, como pode ser observado na Tabela 3. Os números de formas evolutivas encontradas nestas duas preparações foram superiores ao limite máximo permitido pela IN 46/2011, de 1 ovo viável de helminto em 4 g de biofertilizante.

Na Figura 5 estão apresentadas as diferentes formas evolutivas dos parasitas encontrados nos preparados do Hortbio® 10 e 20.

Tabela 10. Análise de agentes e contaminantes biológicos em diferentes preparados do biofertilizante Hortbio®.

Agentes e contaminantes biológicos	Hortbio®				
	Hortbio	Hortbio	Hortbio	Hortbio	Hortbio
	0	10	20	30	40
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-	-
Cisto <i>Entamoeba coli</i>	-	++	+	-	-
Cisto <i>Endolimax nana</i>	-	+	+	-	-
Ovos Nematodas	-	++	++	-	-

Cisto e ovo: até 5 (+); até 10 (++); mais de 10 (+++)

Negativo: -

A *Entamoeba coli* e *Endolimax nana* são comensais, não patogênicos para humano. No entanto, tem um significado epidemiológico importante, pois denota que resíduos fecais humanos ou de animais contaminaram o produto, que será posteriormente utilizado para a adubação de hortaliças (PAULA et al., 2003).

Se as fezes estiverem contaminadas com as formas patogênicas, como *Entamoeba histolytica*, por exemplo, poderá então contaminar as hortaliças, contaminando os humanos e causando amebíase (TUBINO et al., 2013).

Os ovos de Nematodas encontrados evidenciam que o Hortbio® foi contaminado com material fecal de animais (roedores, por exemplo) ou humanos. O que aponta que houve uma possível contaminação do material, pela água utilizada para o preparo ou por um dos componentes utilizados para o preparo do biofertilizante.

A água utilizada para a produção do biofertilizante pode ter sido a principal fonte de contaminação do produto, sendo que a presença dos contaminantes foram

encontradas em apenas dois preparados do Hortbio®. Em estudo realizado por Guilherme et al. (1999), mostram que *E. coli* e *E. nana* são parasitas mais predominantes no cultivo de hortaliças, sendo que esse fato pode ser atribuído pela água de irrigação utilizada.

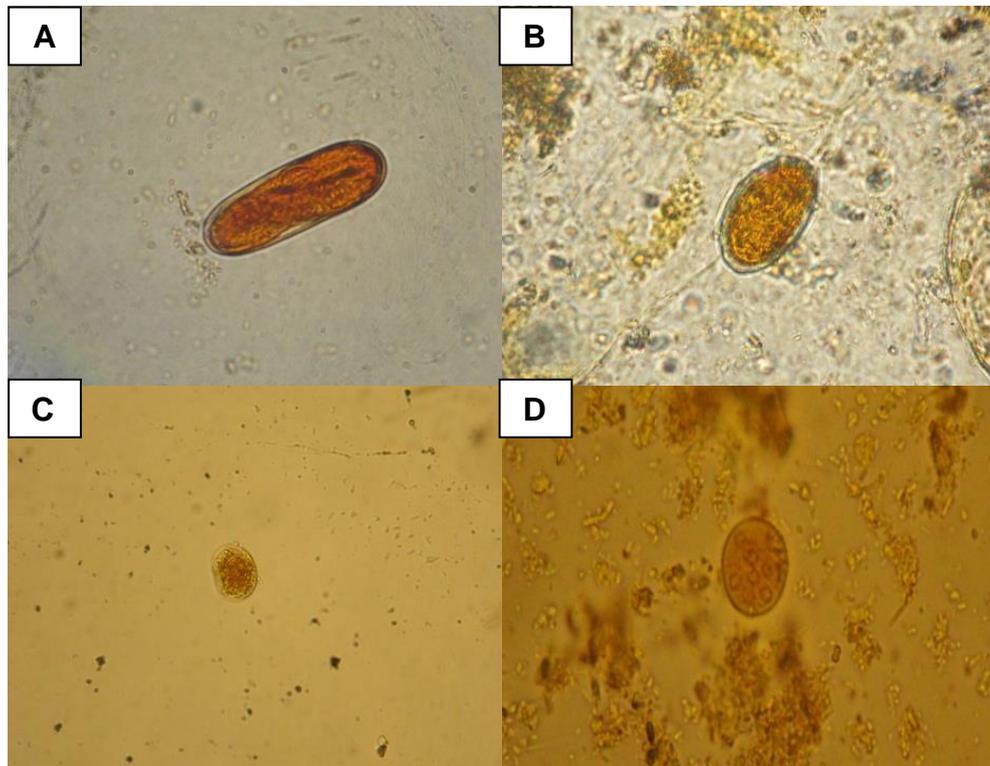


Figura 12. Formas evolutivas dos parasitas encontrados nos preparados 10 e 20 do Hortbio®: A e B. ovo de nematodae; C. Cisto de *Endolimax nana*; D. Cisto de *Entamoeba coli*. Coloração por lugol, microscopia óptica 40x. Fotos cedidas pela Profa. Eleuza Rodrigues Machado, da Universidade de Brasília.

CONCLUSÕES

As concentrações avaliadas de AIA nos diferentes tempos de produção mostram que o produto contém em sua formulação concentrações do hormônio capazes de estimular o crescimento de pêlos radiculares e raízes secundárias. Entretanto, houve redução do hormônio ao longo dos tempos de produção. Esse fato indica que possivelmente, micro-organismos reduziram a produção desse hormônio, devido à redução do crescimento desses ao longo do tempo de preparo do biofertilizante.

Quanto às análises parasitológicas, o número de formas evolutivas nos Hortbio® 10 e 20 foram superiores aos níveis permitidos para 1 ovo viável de

helminto em 4g de biofertilizante. As demais preparações se encontraram em condições satisfatórias. A possível fonte de contaminação do biofertilizante pode ter sido a água utilizada para o preparo do produto, ou a presença de moscas que veicularam os contaminantes. Dessa forma se faz necessário, um maior cuidado com as preparações do biofertilizante em momentos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ERWY, A. S. et al. Effect of chemical , organic and biofertilizers on photosynthetic pigments , carbohydrates and minerals of wheat (*Triticum aestivum*. L) irrigated with sea water. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 296–310, 2016.
- ALFA, M. I. et al. Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestion effluent of cow dung and chicken droppings. **Renewable Energy**, v. 63, p. 681–686, 2014.
- ALVES, S. B. et al. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 21, p. 16–21, 2001.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Salmonella. In: **Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online**. Capítulo 5, 2006.
- BONFIM, F. P. G. et al. **Caderno dos microrganismos eficientes (EM): Instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM**. Viçosa - Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa - MG, 2011.
- BRASIL. Legislação dos Orgânicos. Instrução Normativa nº 46, 2011.
- CHICONATO, D. A. et al. Bovine biofertilizer and irrigation layers on lettuce development and leaf chlorophyll. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 2, p. 140–147, 2014.
- GUILHERME, A. L. . et al. Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá , Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 405–411, 1999.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª ed. Washington: APHA; 2001. p. 69-82.
- LEAUNGVUTIVIROJ, C. et al. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, Phosphate and Potassium solubilization and auxin production. **Bioscience Biotechnology and Biochemical**, v. 74, n. 5, p. 1098–1101, 2010.
- LÜDKE, I. Produção orgânica de alface americana fertirrigada com biofertilizante em cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 3370–3377, 2009.
- MACHADO, D. C. et al. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. **Brazilian**

Journal of Microbiology, v. 37, p. 538–544, 2006.

OWAMAH, H. I. et al. Fertilizer and sanitary quality of digestate biofertilizer from the co-digestion of food waste and human excreta. **Waste management**, v. 34, n. 4, p. 747–52, abr. 2014.

PAULA, P. et al. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 535–537, 2003.

PEREG, L.; MCMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 349–358, 2015.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio Janeiro: Guanabara, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1995, n. 20, p. 282–285, 1992.

SOUZA, R. B. DE et al. **Composição do Hortbio**. Brasília - DF. EMBRAPA - CNPH, 2012.

SPAEPEN, S. Plant Hormones Produced by Microbes. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions - Microbes for Sustainable Agriculture**. p. 247–256, 2015.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, p. 1–14, 2011.

SRIWURYANDARI, L.; SEMBIRING, T. Liquid biofertilizer and compost from organic market waste. **Teknologi Indonesia**, v. 33, n. 2, p. 86–91, 2010.

SZKOP, M.; BIELAWSKI, W. A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 683–691, 2013.

TAKAHASHI, H. et al. Ethylene promotes the induction by auxin of the cortical microtubule randomization required for low-pH-induced root hair initiation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 9, p. 932–940, 2003.

TANSUPO, P. et al. Optimised separation procedures for the simultaneous assay of three plant hormones in liquid biofertilisers. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 157–162, 2010.

TUBINO, R. . et al. Perfil endoparasitário de estudantes do ensino fundamental de escola pública em Ceilândia-DF. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.**, v. 17, n. 5, p. 99–107, 2013.

ZEIGER, T. Auxin: The Growth Hormone. In: **Plant Physiology and Development**, v. 13, p. 624, 2004.

ZHANG N.; HASENSTEIN KH. Initiation and elongation of lateral roots in *Lactuca sativa*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 160, p. 511–519, 1999.

ZHANG, N.; HASENSTEIN, K. H. Halogenated auxins affect microtubules and root elongation in *Lactuca sativa*.. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, p. 397–405, 2000

CAPÍTULO 4

RESPOSTA DE TIPOS DE ALFACE A DIFERENTES DOSES DO BIOFERTILIZANTE HORTBIO® E ANÁLISE DA FERTILIDADE DO SOLO.

RESUMO

Os biofertilizantes são promissoras ferramentas no manejo sustentável do solo e na agricultura orgânica. Contudo, o insuficiente conhecimento limita a padronização e o uso adequado do produto. Esse trabalho objetivou avaliar a resposta de diferentes tipos de alface a diferentes doses do Hortbio® e avaliar a fertilidade do solo após a aplicação do biofertilizante. Um experimento randomizado foi conduzido em vasos. O esquema fatorial 6x3 foi realizado, consistindo em seis doses do biofertilizante (0, 50, 100, 150, 200, 250 kg.ha⁻¹ de N) e três tipos da alface (Crespa, Romana e Americana). Foram avaliados diferentes atributos agronômicos da alface, sendo eles: a altura (AP) e largura da planta (LP) das plantas, a massa fresca (MF), o número médio de folhas (NMF), bem como o comprimento (CC) e diâmetro do caule (DC). A fertilidade do solo foi avaliada pela determinação do Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, P, H+Al, capacidade de troca de cátions (CTC), pH e matéria orgânica do solo (MOS). A adição das doses 50 e 100 kg.ha⁻¹ de N apresentaram melhor rendimento quando observado os atributos agronômicos, e as doses mais elevadas (200 e 250 kg.ha⁻¹ de N) foram deletérias ao desenvolvimento da alface. A análise da fertilidade do solo mostrou que o Hortbio® aportou uma elevada concentração de K, Ca e Na, especialmente nas doses 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N. A partir desses dados, é possível sugerir que houve um processo de salinização do solo, o que prejudicou o desenvolvimento da alface. Portanto, é possível afirmar que o Hortbio® é um biofertilizante eficaz em aportar nutrientes necessários à alface, contudo se faz necessário o ajuste da composição.

PALAVRAS-CHAVES: Agricultura orgânica; micro-organismos eficientes; fertilidade do solo; *Lactuca sativa*.

ABSTRACT
KEYWORDS

1.0 INTRODUÇÃO

Diversos estudos mostram a necessidade de maior conhecimento acerca de sistemas de produção mais sustentáveis (LIMA et al., 2015, 2007b; MEDEIROS et al., 2008). Contudo, o crescente aumento populacional, demanda uma maior produção de alimentos. Nesse contexto, é importante a adoção de manejos agrícolas capazes de atrelar a eficácia produtiva com a sustentabilidade agrícola (AL-ERWY et al., 2016). Embora, a agricultura orgânica apresenta-se como uma alternativa promissora ao uso da fertilização mineral, ainda é necessário um maior conhecimento acerca do assunto. De acordo com Seufert et al. (2012), o sistema de cultivo orgânico oferece um rendimento menor que o apresentado pela adubação mineral em 22% para o cultivo de hortaliças.

Os biofertilizantes são uma promissora alternativa ao uso de fertilizantes minerais, pois utilizam para sua produção materiais de fácil acesso ao produtor, reduzindo os custos de produção, disponibilizam nutrientes de forma gradativa, acrescentam benefícios ao solo como a incorporação da matéria orgânica, assim como aumentam a produtividade agrícola (AL-ERWY et al., 2016; CHICONATO et al., 2014; MEDEIROS et al., 2008). O uso de biofertilizantes melhora as propriedades físico-químicas do solo, aumentando a capacidade de percolação, infiltração e retenção da água e a fertilidade do solo, pela incorporação de importantes nutrientes para o desenvolvimento vegetal (CHICONATO et al., 2014). Nesse contexto, os biofertilizantes são importantes nos sistemas agroecológicos, contudo, são necessárias maiores pesquisas para padronização de formulações (SOUSA et al., 2014).

O Hortbio[®] é um fertilizante biológico aeróbico desenvolvido pela Embrapa Hortaliças, localizada em Brasília – DF. Esse fertilizante utiliza como inóculo micro-organismos provenientes do solo, por meio da adição de serrapilheira ou micro-organismos eficazes capturados do solo por meio de arroz cozido (SOUSA et al., 2012). Atualmente, o Hortbio[®] já é utilizado por diversos produtores orgânicos do DF para o cultivo de hortaliças. Além de ser comprovada a sua eficiência, a produção do Hortbio[®] auxilia no reaproveitamento de resíduos que seriam descartados, o que promove maior sustentabilidade ao sistema produtivo (LÜDKE, 2009a).

A alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se entre as hortaliças por ser a folhosa mais consumida no Brasil, com maior importância comercial e figura entre as principais olerícolas no que diz respeito à produção, comercialização e ao valor nutricional (OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2001). Porém, o seu cultivo é dependente de insumos químicos, uma vez que, devido ao seu ciclo curto e elevada produtividade, demanda maior quantidade de nutrientes prontamente assimiláveis (PAULETTI, 2012).

Considerando esses aspectos, esse trabalho objetivou avaliar a eficácia do biofertilizante Hortbio®, em diferentes concentrações, em melhorar os atributos agronômicos da alface, assim como avaliar a fertilidade do solo após a aplicação do biofertilizante.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido entre os meses de setembro e novembro de 2014 na área de pesquisa e cultivo protegido de hortaliças da Embrapa Hortaliças, Brasília/DF (coordenadas geográficas 15°56' S e 48°08'W e altitude média de 997,6 metros). O clima da região segundo a classificação de Köppen é o tropical de savana (Aw) (SEBRAE-DF, 2004).

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em cultivo orgânico protegido, com alface cultivada em vasos, tendo como delineamento experimental cinco blocos distribuídos ao acaso em esquema fatorial 3x6 sendo avaliadas a resposta de três tipos de alface sendo, Crespa (Vanda), Americana (Laurel) e Romana (Dona) e seis tratamentos, os quais foram: (i) Sem adição do biofertilizante; (ii) 50 kg.ha⁻¹ de N com base nos teores do Hortbio®; (iii) 100 kg.ha⁻¹ de N com base nos teores do Hortbio®; (iv) dose de 150 kg.ha⁻¹ de N recomendada com base nos teores de N do Hortbio® e na cultura a ser cultivada (v) 200 kg.ha⁻¹ de N com base nos teores do Hortbio® e (vi) 250 kg.ha⁻¹ de N com base nos teores do Hortbio®. Os tratamentos resultaram da combinação entre as doses e as diferentes cultivares.

O cálculo da quantidade de biofertilizante a ser aplicado foi baseado na necessidade de nitrogênio para a cultura da alface que conforme Fontes (1999), recomenda 150 kg.ha⁻¹ de N. As concentrações de nitrogênio do Hortbio® foram avaliadas por Silva et al. (2010) e a partir desses dados foi feito o delineamento

experimental. As concentrações foram avaliadas entre 50 a 100 kg.ha⁻¹ de N acima da dose recomendada e 50 a 100 kg.ha⁻¹ de N abaixo da dose recomendada e a dose 0 como testemunha.

2.3 Elaboração do Hortbio®

Foi utilizada para a realização do experimento uma bombona plástica com capacidade de 200 litros. Para produção de 100 litros do biofertilizante foi utilizado: Farinha de sangue (1,1kg); Farelo de arroz (4,4kg); Farelo de mamona (1,1kg); Farinha de ossos (2,2kg); Sementes trituradas (1,1kg); Cinza de madeira (1,1kg); Rapadura triturada (0,55kg); Fubá (0,55kg) e 1 litro do inoculante EM. Ao final foi adicionada água não clorada para obter o volume final de 100 litros. Esses materiais foram misturados com auxílio de uma espátula de madeira na medida em que se adicionava a água. Durante a produção e utilização desse biofertilizante foi fornecido ar.

De acordo com Souza et al (2012), o Hortbio® pode ser utilizado a partir do seu décimo dia de preparo, tendo validade de 30 dias. Para aplicação na alface, foram feitas cinco preparações de Hortbio® utilizando o mesmo EM (micro-organismos eficazes) e os ingredientes do mesmo lote. Foi produzido um Hortbio® por semana com o objetivo de aplicar na alface semanalmente um Hortbio® com 10 dias de fabricação. O primeiro preparado utilizou o EM no tempo 0 de sua produção, ou seja, no dia que estava pronto para ser utilizado. O último preparado do Hortbio® foi feito utilizando o EM com 40 dias, devido a isso, o primeiro Hortbio® preparado foi denominado de Hortbio® 0 e o último preparado foi denominado como Hortbio® 40.

O Hortbio® foi armazenado em uma bombona plástica, com capacidade de 200 litros e mantido em local sombreado e fresco. A aeração foi realizada por 15 minutos a cada hora, com o auxílio de um compressor de ar e um temporizador. Antes da sua utilização o Hortbio® foi coado utilizando uma peneira.

O inoculante EM foi coletado em área de cerradão localizada na Embrapa Hortaliças (15°56'61.8S/48°08'42.7O) que pode ser observada na Figura 3.

Para a coleta dos micro-organismos do solo, 700gr de arroz cozido foi colocado em duas bandejas de plástico e uma de papelão, protegidos com sombrites, e então, foi exposto por um período de sete dias no solo, de acordo com

as recomendações do Caderno de Micro-organismos Eficazes (BONFIM et al., 2011).

Após a coleta do EM do solo, esse foi ativado para viabilizar o seu uso no biofertilizante. Para tanto foi adicionada a massa microbiana coletada do solo, 10% de fonte de sacarose na forma de melaço de cana e caldo de cana. Foi adicionado água não clorada até que fosse alcançado volume final de 10 litros. Para aeração, o sistema foi oxigenado durante 15 minutos a cada hora. Após sete dias o inoculante estava pronto para ser utilizado.

O EM foi ativado e armazenado em geladeira, a 4°C, para utilização na preparação do Hortbio®. O solo de coleta do EM foi analisado de acordo com as recomendações de Embrapa (1997). Os resultados obtidos podem ser avaliados na Tabela 11.

Tabela 11. Análise química do solo da região de coleta do EM.

Amostras	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H ⁺ Al	Matéria Orgânica g/dm ³
		----- g/kg							
Bandeja 1	6,3	7,8	169	11	14,9	6,7	0	0,7	77,6
Bandeja 2	6,6	9,9	178	11	19,5	7,3	0	1,1	51,8
Bandeja 3	6,6	15,1	189	12	21,7	7,8	0	0,5	103,6

Bandeja 1 e 2; plástico. Bandeja 3; papelão.

2.4 Plantio da alface e aplicação do Hortbio®

A alface foi semeada em placas de poliestireno com 128 células, contendo substrato comercial (Plantmax HT®) em casa de vegetação. Três diferentes tipos foram utilizadas para esse experimento, sendo elas: a Crespa cv. Vanda, Americana cv. Laurel e Romana cv. Dona. O fornecimento de água às mudas foi feito via irrigação por microaspersão. As alfaces foram transplantadas para vasos de 5 litros após 21 dias da semeadura. O solo utilizado foi do tipo Latossolo Vermelho Eutrófico, de textura argilosa (EMBRAPA, 2006) e foi previamente autoclavado. A aplicação do Hortbio® foi realizada uma semana após o transplante e depois semanalmente até a colheita, sendo realizada, ao todo cinco aplicações.

Foi avaliada a análise da capacidade de campo do solo, e a partir desses dados, foi calculada a quantidade adequada de água necessária por bloco para as

diferentes concentrações de Hortbio®. A irrigação foi feita de forma controlada, duas vezes por dia, por aplicação manual.

2.5 Avaliação das diferentes dosagens de Hortbio® nas características agronômicas de alface

As características agronômicas avaliadas foram: a altura (AP) e largura (LP) das plantas (cm), a massa fresca (MF) (em balança comercial) (g), o número médio de folhas (foram consideradas aquelas maiores que 5 cm de comprimento) (NMF), bem como o comprimento (CC) (cm) e diâmetro do caule (DC) (mm).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e posterior análise de comparação de médias utilizando o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade utilizando o *software* Assistat Versão 7.7 (SILVA, 2009).

2.6 Análise de fertilidade do solo

Foram avaliadas as propriedades químicas do solo do local de coleta do EM e do solo utilizado no plantio da alface, de acordo com as recomendações de EMBRAPA (1997). O solo foi deixado exposto ao ar, até sua completa secagem e, posteriormente, peneirado com o auxílio de uma peneira de 2mm. No solo peneirado, foi feita a determinação do solo a concentração de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+} , K^{+} , acidez potencial (H+Al) e P orgânico. Também foi avaliado, capacidade de troca de cátions (CTC), pH e matéria orgânica do solo (MOS). As análises foram realizadas na Embrapa Hortaliças – DF.

Os dados foram verificados se seguiam distribuição normal. Posteriormente, os dados foram avaliados pelo teste F a 5% de significância. As médias das doses foram avaliadas utilizando o teste Tukey, ao mesmo nível de significância. A relação entre as variáveis de fertilidade e atributos agronômicos foram determinadas utilizando a correlação de Pearson e Análise de Componentes Principais (ACP).

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos atributos agronômicos avaliados estão apresentadas na Tabelas 12 e 13. Houve significância estatística da interação dos fatores avaliados (doses e tipos de alface) para os seguintes atributos agronômicos: MF, NMF, CC e DC. Os efeitos apenas da dose foram observados somente para LP.

As doses intermediárias do Hortbio® (50 e 100 kg.ha⁻¹ de N) apresentaram-se como doses ótimas comuns às alfaces do tipo americana e crespa. A alface Americana, entretanto, apresentou MF similar àquelas encontradas nas concentrações anteriormente citadas também para a dose 150 kg.ha⁻¹ de N. Por outro lado, as doses 0, 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N apresentaram os menores valores de produtividade para ambas as alfaces citadas previamente. Diferentemente, a alface romana não respondeu às diferentes doses do biofertilizante e apresentou pior rendimento quando comparada aos outros tipos de alface.

A alface Crespa apresentou melhor desempenho para MF e NMF especialmente quando submetida à dose 50 kg.ha⁻¹ de N do biofertilizante. Para MF a dose 100 kg.ha⁻¹ de N apresentou melhor rendimento. O DC apresentou maior valor na dose 150 kg.ha⁻¹ de N. Para o CC não houve diferença estatística entre as doses para a alface Crespa. A alface Romana não apresentou diferença estatística para NMF, CC e DC entre as doses 0 e 150 kg.ha⁻¹ de N, porém as doses 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N reduziram o crescimento dessa variedade. A alface Americana apresentou melhores resultados quando submetida à dose 50 kg.ha⁻¹ de N para os atributos MF, CC e DC. Para MF, as doses 100 e 150 kg.ha⁻¹ de N também foram superiores às demais. E para DC as doses 0 e 100 kg.ha⁻¹ de N também obtiveram resultados superiores.

Tabela 12. Atributos agronômicos da alface que apresentaram correlação estatística entre as doses e os tipos de alface analisados.

Massa Fresca (g)						
	0	50	100	150	200	250
Crespa	50,18 aB	113,98 aA	87,23 aA	35,42 bB	22,20 aB	31,22 aB
Romana	22,88 aA	41,15 bA	40,63 bA	33,08 bA	4,30 aA	5,16 aA
Americana	37,60 aB	117,33 aA	88,45 aA	116,94 aA	41,08 aB	3,38 aC
Número Médio de Folhas						
	0	50	100	150	200	250
Crespa	12,40 aB	22,00 aA	15,40 aB	18,25 aB	16,40aB	4,00bC
Romana	13,20 aA	15,40 bA	14,00 aA	12,80 bA	5,00bB	4,80bB
Americana	12,60 aA	15,60 bA	13,40 aA	12,00 bA	8,20bA	12,60aA
Comprimento do Caule (cm)						
	0	50	100	150	200	250
Crespa	3,42 aA	3,92 aA	3,88 aA	4,52 aA	3,38 aA	1,76 bB
Romana	2,88 aA	3,62 aA	3,48 aA	2,94 bA	1,26 bB	1,48 bB
Americana	2,70 aB	4,18 aA	2,56 aB	2,68 bB	1,86 bB	3,01 aB
Diâmetro do Caule (cm)						
	0	50	100	150	200	250
Crespa	1,7 aB	2,0 aB	2,1 aB	2,6 aA	1,6 aB	0,6 bC
Romana	1,2 aA	1,7 aA	1,7 aA	1,5 bA	0,5 bB	0,8 bB
Americana	1,7 aA	2,2 aA	2,0 aA	1,5 bB	1,0 bB	1,3 aB

Letras minúsculas (colunas) e maiúsculas (linhas) iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo Fontes (1999), a recomendação de adubação para a cultura de alface é de 150 kg.ha⁻¹ de N, nesse estudo as doses que mais favoreceram o crescimento vegetal foi a 50 e 100 kg.ha⁻¹ de N. Esse resultado possivelmente pode ser explicado pelo fato que o experimento foi conduzido em vasos, que reduzem a perda de nutrientes, sendo assim necessário um menor aporte nutricional. Esse

dado também reforça o fato das doses 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N apresentarem efeitos deletérios às plantas, sendo que essas doses ultrapassam, até mesmo, a recomendação para a cultura em campo. Os efeitos benéficos de uma adequada adubação nitrogenada são relatados por Resende et al. (2009) que afirmam haver melhor produção de MF e maior crescimento da planta nesses casos. Contudo, Araújo et al. (2011) avaliando a resposta da alface a diferentes concentrações de adubação nitrogenada, observaram um efeito linear decrescente quando elevadas doses de N estavam disponíveis e relacionaram tais resultados ao desequilíbrio nutricional das plantas provocado pelo excesso de N, que havia sido fornecido pela degradação de matéria orgânica incorporada ao solo e pelas aplicações de fertilizantes nitrogenados.

Em relação a testemunha (dose 0 kg.ha⁻¹ de N), a aplicação do Hortbio[®] promoveu maior MF e NMF para a Americana e a Crespa. Veronka et al. (2008), não observou diferença estatística entre a testemunha e as alfaces tratadas com o biofertilizante Supermagro, assim como Sousa et al. (2014), não verificou influência significativa de diferentes doses sobre a MF e NMF quando adubadas com biofertilizante oriundo de urina de vaca. A MF e NMF são importantes atributos avaliados em alface pois estão diretamente relacionados com a produtividade e valor de mercado da hortalíça (ARAÚJO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2004).

A MF apresentou grande variação de acordo com a concentração aplicada. Para a alface Crespa, a MF variou de 113,98g a 31,22g e para a Americana a variação foi de 117,33g a 3,38g quando comparada a dose 50 com a 200 kg.ha⁻¹ de N, respectivamente. Muito embora não tenham sido observados efeitos das diferentes doses sobre a MF, as médias desse atributo para a alface Romana variaram entre 41,15 a 5,16g, denotando grande variação dos dados que provavelmente estão ligadas à má resposta desse tipo de alface ao biofertilizante utilizado. Esses dados vão contra os dados àqueles apresentados por Veronka et al. (2008) que apontam que doses crescentes da adubação orgânica geram respostas positivas à alface como aumento da MF e NMF. Resende et al. (2009) observaram que a adubação nitrogenada com dose igual a 66,4 kg.ha⁻¹ de N promoveu a maior MF da alface.

O aumento da massa fresca da alface está associado a fertilização nitrogenada, tanto na forma orgânica como mineral (OLIVEIRA et al., 2009a). Entretanto, é de comum relato na literatura em que doses excessivas de

fertilizantes levam à queda de produtividade em diferentes culturas agrícolas (SHRIVASTAVA; KUMAR, 2015).

Muito embora a dose 50 kg.ha⁻¹ de N seja inferior a recomendação é possível que exista a atuação de substâncias promotoras do crescimento vegetal, como o hormônio auxina (ZEIGER, 2004), comumente encontrados em formulações de biofertilizantes (PEREG; MCMILLAN, 2015a). A presença desse hormônio pode ter promovido um efeito estimulador que pode estar associado com a resposta positiva observada.

Houve uma tendência de o CC diminuir com as aplicações de doses mais altas do biofertilizante. O CC para a alface Crespa não apresentou diferença estatística entre a testemunha e as alfaces cultivadas até a dose 200 kg.ha⁻¹ de N. A alface Romana apresentou o mesmo comportamento até a dose 150 kg.ha⁻¹ de N. A Americana apresentou maior CC na dose 50 kg.ha⁻¹ de N. Para todos os tipos, a dose 250 kg.ha⁻¹ de N reduziu o CC.

O CC é importante na avaliação da alface, pois remete à produtividade da alface (YURI et al., 2004). Esse parâmetro é importante para a resistência ao pendoamento, que é agravado por altas temperaturas (DIAMANTE et al., 2013). A dose 250 kg.ha⁻¹ de N, foi a de menor produtividade, em que houve menor CC, variando de 3,01cm a 1,48cm entre os tipos de alface. A dose 50 kg.ha⁻¹ de N foi a única em que foi observada resultados positivos para todos os tipos de alface, sendo que o CC variou de 4,18cm a 3,62cm. Em cultivos comerciais o CC muito grande, acima de 9 cm, é inadequado para o processamento, pois aumentam as perdas, sendo que caules com, aproximadamente 6cm seriam os mais adequados (YURI et al., 2004). Oliveira et al. (2009), observaram o crescimento do CC em 0,83 cm.planta⁻¹ em resposta ao aumento da concentração do biofertilizante, sendo que ao utilizar a concentração 150 kg.ha⁻¹ de N, aproximadamente, o CC foi igual a 6,97cm.

O DC não apresentou diferença estatística entre as doses 0 a 100 kg.ha⁻¹ de N para a alface Crespa e a dose 150 kg.ha⁻¹ de N (2,6 cm) foi a dose de melhor rendimento. As alfaces Romanas e Americanas não apresentaram diferença estatística entre a testemunha e a dose 100 e 150 kg.ha⁻¹ de N, respectivamente. Para todos os tipos, as doses 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N reduziram significativamente o DC, sendo a variação do DC observada para a alface Americana de 2,6 a 0,6cm; para a alface Romana foi de 1,7 a 0,5cm e para a alface Americana foi de 2,2 a

1,0cm. Segundo Dias et al. (2009), o DC é um atributo agronômico da alface que reduz à medida que ocorre a redução de adubação. Santi et al. (2013) obteve variação de DC entre 1,6 a 1,9cm para alface Americana. Os resultados do presente trabalho indicam que o estresse causado pela aplicação de doses mais altas do biofertilizante também são capazes de reduzir o DC.

A LP (Tabela 6) não foi influenciada pelos tipos de alface. Entretanto, foram observados efeitos das doses sobre esse atributo agronômico. As doses de melhor rendimento foram as 50, 100 e 150 kg.ha⁻¹ de N, sendo que as doses 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N foram as piores, apresentando resultados inferiores ao da testemunha.

Tabela 13. Largura da planta apresentou significância estatística com as diferentes doses do Hortbio avaliadas.

Largura da Planta (cm)						
Média/Doses	0	50	100	150	200	250
Média das doses	10,50B	14,24A	13,79 A	12,69A	8,50C	6,96 C

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Não houve significância estatística da altura da planta com as doses do biofertilizante avaliadas e com os diferentes tipos de alface.

A análise de fertilidade do solo, foi influenciada pelas diferentes doses do Hortbio[®] aplicadas, como pode ser visto pela Tabela 14. O pH na dose 0 kg.ha⁻¹ de N apresentou-se próximo à neutralidade. Valores similares foram encontrados até a dose 100 kg.ha⁻¹. O uso da dose de 150 kg.ha⁻¹ promoveu a redução do pH quando comparado ao controle, porém foi estatisticamente similar aos valores encontrados nas doses entre 50 e 250 kg.ha⁻¹. Os valores de pH encontrados para a dose 250 kg.ha⁻¹ também não diferiram do controle. A redução do pH no solo pode estar atrelada à degradação da MOS pela ação da microbiota residente. Já o aumento do pH na dose 250 kg.ha⁻¹ de N pode estar relacionado ao efeito tóxico das elevadas concentrações do produto na microbiota que resultou em uma menor degradação da MOS. Para as variáveis P, K, Na, Ca, CTC houve uma tendência de aumento, com o aumento da dose aplicada. O Hortbio[®] não apresentou efeito sobre os teores de Mg e de MOS.

Tabela 14. Relação entre as médias dos dados de fertilidade nas diferentes doses do Hortbio aplicadas.

Doses	pH	P	K	Na	Ca	Mg	H ⁺ Al	CTC	Matéria Orgânica
		----- mg.dm ⁻³ -----			----- cmol _c .dm ⁻³ -----				g.kg ⁻¹
0	6,94 a	9,96 b	107,87 c	6,20 b	7,64 c	2,86 ^{ns}	0,55 b	11,37 c	40,03 ^{ns}
50	6,75 ab	11,34 b	114,67 c	6,60 b	7,45 c	3,11 ^{ns}	0,89 ab	11,75 bc	39,17 ^{ns}
100	6,65 ab	12,79 ab	154,00 bc	7,13 ab	8,00 bc	3,00 ^{ns}	1,08 a	12,50 abc	38,50 ^{ns}
150	6,59 b	13,51 ab	237,93 b	6,67 b	8,89 ab	4,45 ^{ns}	1,15 a	14,19 abc	39,01 ^{ns}
200	6,61 b	13,67 ab	349,07 a	9,13 a	9,07 a	3,01 ^{ns}	1,17 a	14,67 ab	37,99 ^{ns}
250	6,63 ab	15,69 a	415,00 a	9,13 a	9,54 a	2,93 ^{ns}	1,11 a	15,14 a	37,63 ^{ns}

Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. O NS sobrescrito denota não significância estatística dos dados apresentados

Medeiros et al. (2007) avaliaram o efeito de um composto orgânico, fertilizante organo-mineral, substância húmica e diferentes biofertilizantes em mudas de alface. O aporte de nutrientes promovido pelos biofertilizantes tanto para Ca, K e Na do Hortbio® foram inferiores ao desse experimento. Entretanto, o composto orgânico e substância húmica apresentaram maior concentração de Ca, Mg, P e matéria orgânica. Chiconato et al. (2013) ao avaliarem um biofertilizante bovino obteve menores concentrações de P, K, Ca e Mg aos encontrados nesse estudo, sendo que o aumento de doses, apresentou melhor resultado para alface.

Embora as concentrações de P apresentaram crescente aumento em função do aumento da concentração do biofertilizante, essas ainda são inferiores aos teores normalmente recomendados para o cultivo de hortaliças. Segundo as Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes de Minas Gerais (1999), a aplicação de 18mg/dm^3 de P é considerado muito bom. Porém, o Hortbio® não forneceu concentrações adequadas de P nem mesmo na dose $250\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de N. Marrocos et al. (2012), avaliaram um fertilizante orgânico à base de esterco bovino e galinha e encontrou concentrações de P cinco e sete vezes superiores a encontradas nesse estudo, respectivamente.

O K foi o elemento aportado em maior concentração, se apresentando em doses superiores à considerada ótima a partir da dose $100\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de N. Segundo as Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes de Minas Gerais (1999), a aplicação de 120mg/dm^3 de K é considerado muito bom. Embora seja um dos nutrientes mais extraídos do solo pela alface (KANO, 2010), a elevada concentração desse cátion no solo pode levar a ocorrência do processo de salinização do solo, o que causa efeitos deletérios às plantas como redução na absorção de água (SILVA, 2014).

O Mg não apresentou aumento das concentrações em nenhuma das doses tratadas em relação ao controle. Esse resultado aponta para uma baixa eficiência do Hortbio® em fornecer esse elemento para a alface.

A ACP entre os casos avaliados está disponível na Figura 17. A ACP permite a detecção, ou não, de amostras anômalas e a relação e agrupamento entre essas (LIMA et al., 2015). Os dois principais fatores explicam 87% da variância dos dados avaliados, corroborando os resultados encontrados.

A ACP mostrou clara separação em dois grupos; sendo o da direita, os tipos e doses que apresentaram melhor resposta ao Hortbio® e o grupo da esquerda os que

apresentaram as piores respostas à aplicação do biofertilizante. O resultado apresentado pela ACP, corrobora os apresentados sobre os atributos agronômicos em resposta as doses e aos tipos de alface. As doses intermediárias do Hortbio® (50 e 150 kg.ha⁻¹ de N) apresentaram-se como doses ótimas comuns às alfaces do tipo americana e crespa, contudo, as doses maiores (200 e 250 kg.ha⁻¹ de N) atuaram de maneira contrária. A romana apresentou resultados negativos em todas as doses, exceto a dose 50 kg.ha⁻¹ de N que, entretanto, ainda assim apresentou rendimento inferior àqueles observados para a americana e crespa, e assim permaneceu segregada dos dois maiores grupos formados pela ACP.

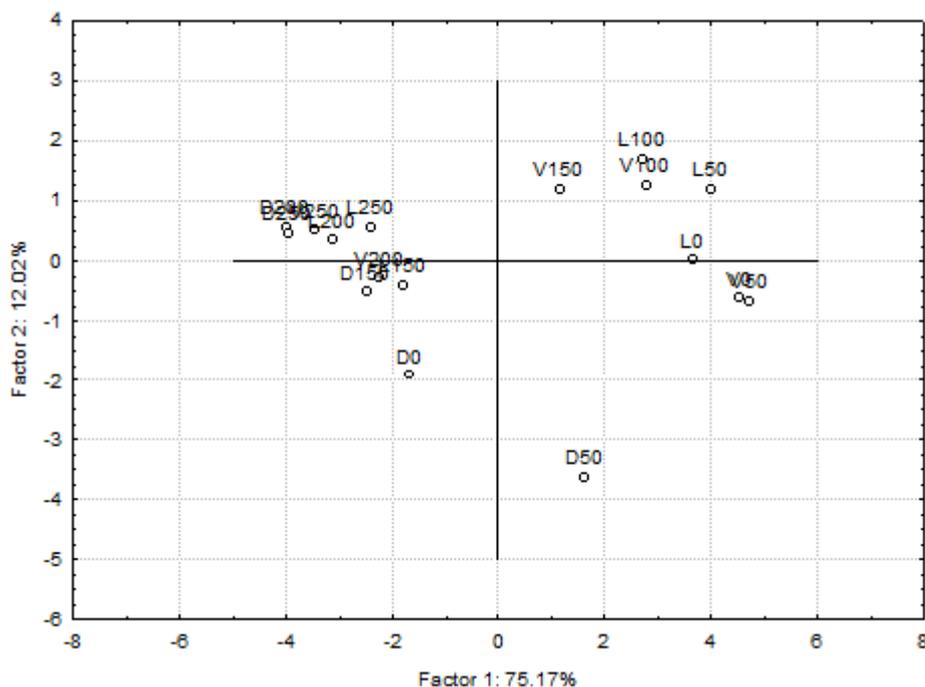


Figura 13. Análise de Componentes Principais (ACP) entre as doses do biofertilizante e entre os tipos de alface em função dos dados de fertilidade do solo. D; Alface Romana. V; Alface Crespa. L; Alface Laurel.

A ACP mostrou-se uma ferramenta útil no agrupamento dos dados gerados, sem que houvesse perda de informações e reforça afirmativa que as doses intermediárias do biofertilizante foram adequadas para as alfaces do tipo americana e crespa; enquanto as doses mais elevadas apresentaram-se tão negativas quanto à testemunha e que a alface romana apresentou uma má resposta ao biofertilizante utilizado.

Silva (2014) ao avaliar a resposta da alface crespa cv. Verônica a diferente compostos orgânicos, observou que aqueles que apresentavam maiores teores de

nitrogênio na sua composição, quando aplicados em doses mais elevadas, reduziram a produtividade da alface, em decorrência ao excesso de N aplicado. Marrocos et al. (2012), alerta que o uso inadequado de fertilizantes orgânicos, podem ocasionar salinização do solo e prejudicar o desempenho das culturas, sendo necessário realizar o monitoramento periódico da salinidade para evitar possíveis efeitos negativos que podem prejudicar a produtividade de muitas culturas.

A análise dos coeficientes de correlação de Pearson apresentou correlação estatística entre os atributos agronômicos da alface e os dados de fertilidade do solo (Tabela 15). O K^+ apresentou correlação negativa com quase todos atributos avaliados, demonstrando que o aporte desse elemento no Hortbio® foi maior do que o necessário para a cultura. O mesmo é observado para Ca^+ e Na^{+2} para os atributos LP, NMF e CC. O P não apresentou relação com os atributos avaliados. Provavelmente esse efeito se deve ao baixo aporte de P ao solo pelo biofertilizante, conforme discutido previamente.

Tabela 15. Correlação entre os atributos agronômicos da alface e os dados de fertilidade do solo

	MF	AP	LP	NMF	CC	DC
P	-0,1 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	-0,3 ^{ns}	-0,29 ^{ns}
K	-0,53 [*]	-0,48 [*]	-0,63 [*]	-0,65 [*]	-0,65 [*]	-0,53 [*]
Na	-0,4 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	-0,52 [*]	-0,6 [*]	-0,51 [*]	-0,39 ^{ns}
Ca	-0,45 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	-0,54 [*]	-0,61 [*]	-0,61 [*]	-0,39 ^{ns}
Mg	0,49 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,31 ^{ns}
H+Al	0,04 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,1 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0 ^{ns}
CTC	-0,02 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,23 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,1 ^{ns}
MOS	-0,1 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,1 ^{ns}

Variáveis com * apresentaram correlação estatística. O NS sobrescrito denota não significância estatística dos dados apresentados

O K atua como catalisador de reações enzimáticas e está envolvido com a turgidez celular, abertura e fechamento dos estômatos e no processo de síntese, acumulação e transporte de carboidratos (CARRIJO et al., 2004). Esse elemento é o mais acumulado pela alface e exerce influência direta na formação da cabeça. Em excesso, o K pode comprometer a absorção de outros nutrientes como o: magnésio, manganês, ferro, zinco e cálcio (SILVA, 2013). A alta salinidade promovida por fertilizantes como o cloreto de potássio pode diminuir o potencial osmótico próximo à rizosfera e reduzir absorção de íons pelas raízes (SILVA et al., 2001). De acordo com Fontes (1999), são necessários 120 kg.ha⁻¹ de K para atender a demanda da cultura. Os dados nutricionais apresentados pelo Hortbio[®] (LÜDKE, 2009a) mostram que a concentração desse elemento se iguala à concentração de N, sendo assim o aporte de K foi superior ao recomendado, sendo esse dado ainda reforçado pelos dados de fertilidade do solo apresentados na Tabela 7. Mota et al. (2001), avaliaram diferentes doses de cloreto de potássio em alface, sendo que altas doses desse elemento, acima de 200 kg.ha⁻¹ de N foram prejudiciais à cultura.

Não foram observados efeitos nos teores de Mg e P significativos para a alface. Esse dado está de acordo com a análise das médias das doses, que mostrou que não houve adição de Mg por meio do Hortbio[®]. Houve adição de P por meio do Hortbio[®] nas diferentes doses, entretanto, a concentração adicionada desse elemento não foi suficiente para gerar uma melhora nos atributos agronômicos da alface.

Dessa forma, esse resultado indica uma ineficiência do Hortbio[®] em fornecer Mg e P, sendo assim necessária outra fonte para suprir essa ausência. Contudo, houve excesso de K, Na e Ca que possivelmente estão relacionados com o processo

de salinização do solo. Esse processo afeta a atividade dos íons em solução e os processos de absorção, transporte, assimilação e distribuição (SILVA et al., 2011b). O excesso de nutrientes afeta diretamente a produtividade das culturas, causa desequilíbrios osmóticos, deficiência nutricional e estresse oxidativo nas plantas, assim como limita a absorção de água (SHRIVASTAVA; KUMAR, 2015).

A principal fonte de K para o Hortbio® é a farinha de cinzas e de P é a farinha de ossos (SOUZA; ALCANTARA, 2008). Medeiros et al., (2007) ao avaliarem diferentes biofertilizantes, demonstraram que o biofertilizante que recebeu as maiores concentrações de farinha de cinzas, obteve maiores concentrações de K e Na e CE igual a 18,9 mS.cm⁻¹.

Ludke (2009) ao caracterizar o Hortbio® mostra que a condutividade elétrica (CE) do produto é igual a 5,9 mS.cm⁻¹, sendo essa superior à recomendada para a cultura da alface, que é igual a 1,3 mS.cm⁻¹ (FONTES, 1999).

As baixas concentrações de nutrientes necessários à alface, como o P, assim como a elevada concentração de outros elementos, geraram redução do tamanho e produtividade da alface. A Figura 18 mostra os diferentes tipos de alface tratados com a dose 200 kg.ha⁻¹ de N. É possível avaliar que houve necrose foliar e redução da MF para todas as alfaces.



Figura 14. Necrose foliar das alfaces tratadas com dose 200kg.ha⁻¹ de N do Hortbio®. Alface após três semanas de transplantio. (A) Americana; (B) Romana; (C) Crespa.

De acordo com Seufert et al. (2012), o uso da adubação orgânica para hortaliças é limitado, uma vez que não fornece nutrientes em concentrações adequadas. Os dados encontrados nesse estudo mostram que muito embora as concentrações dos nutrientes disponibilizados à alface não tenham sido adequadas à cultura, houve uma melhora dos atributos agrônômicos especialmente nas doses 50 e 100 kg.ha⁻¹ de N.

Os dados obtidos no estudo sugerem que deve ser feito um ajuste na composição do Hortbio[®], especialmente no que diz respeito aos teores de P, K e Mg, a fim de atender melhor às necessidades da cultura de alface.

4.0 CONCLUSÕES

As doses intermediárias do Hortbio[®] (50 e 100 kg.ha⁻¹ de N) apresentaram-se como doses ótimas comuns às alfaces do tipo americana e crespa. Por outro lado, as doses 0, 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N apresentaram os menores valores de produtividade para ambas as alfaces citadas previamente. Diferentemente, a alface romana não respondeu às diferentes doses do biofertilizante e apresentou pior rendimento quando comparada aos outros tipos de alface.

A avaliação da fertilidade do solo que recebeu as doses 200 e 250 kg.ha⁻¹ de N do Hortbio[®] apresentou elevada concentração de K, Na e Ca, que possivelmente culminaram em um processo de salinização do solo. Esse resultado refletiu na análise dos atributos agronômicos da alface que apontou redução em praticamente todas as variáveis avaliadas, quando se considera todos os tipos de alface. Possivelmente a redução da concentração da farinha de cinzas (maior fonte de potássio) poderia atenuar o efeito de salinização do solo.

Contudo, o Hortbio[®] ofereceu concentrações modestas, abaixo do necessário para a alface, de P e Mg. Provavelmente o aumento da concentração da farinha de ossos (fonte de P) elevaria as concentrações do elemento no biofertilizante e, conseqüentemente, o aporte desse no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ERWY, A. S. et al. Effect of chemical, organic and biofertilizers on photosynthetic pigments, carbohydrates and minerals of wheat (*Triticum aestivum*. L) irrigated with sea water. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 296–310, 2016.

ARAÚJO, W. F. et al. Resposta da alface a adubação nitrogenada. **Revista Agroambiente**, v. 5, n. 1, p. 12–17, 2011.

BONFIM, F. P. G. et al. **Caderno dos microrganismos eficientes (EM): Instruções práticas sobre o uso ecológico e social do EM**. Viçosa - Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa - MG, 2011.

CARRIJO, O. A. et al. **Fertirrigação de hortaliças**. Brasília. Embrapa, 2004.

CHICONATO, D. A. et al. Response of the Lettuce To the Application of Biofertilizer Under Two Levels of Irrigation. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 392–399, 2013.

CHICONATO, D. A. et al. Bovine biofertilizer and irrigation layers on lettuce development and leaf chlorophyll. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 2, p. 140–147, 2014.

DIAMANTE, M. S. et al. Produção e resistência ao pendoamento de alfaces tipo lisa cultivadas sob diferentes ambientes. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 1, p. 133–140, 2013.

DIAS, BRITO, NETO, DE L. Produção de alface hidropônica utilizando biofertilizante como solução nutritiva. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 158–162, 2009.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 2a edição. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 1997. 212p.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solo**. ,Embrapa, Rio de Janeiro - Brasil, 2006

FONTES, P. C. R. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5a Aproximação. Viçosa - Minas Gerais, 1999.

KANO, C. Influencia de doses de potássio nos teores de macronutrientes em plantas e sementes de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 287–291, 2010.

LIMA, C. E. P. et al. Short-Term changes in fertility attributes and soil organic matter caused by the addition of EM Bokashis in two tropical soils. **International Journal of Agronomy**, v. 2015, p. 9, 2015.

LIMA, R. C. M. et al. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 224–229, 2007.

LÜDKE, I. Produção Orgânica de Alface Americana Fertirrigada com Biofertilizante em Cultivo Protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 3370–3377, 2009.

MARROCOS, S. DE T. P. et al. Composição química e microbiológica de biofertilizantes em diferentes tempos de decomposição. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 4, p. 34–43, 2012.

MEDEIROS, D. C. DE et al. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 433–436, 2007.

MEDEIROS, D. C. DE et al. Qualidade de mudas de alface em função de substratos com e sem biofertilizante. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 186–189, 2008.

MOTA, J. H. et al. Efeito do cloreto de potássio via fertirrigação na alface-americana em cultivo protegido. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 542–549, 2001.

OLIVEIRA, A. C. B. DE et al. Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 2, p. 211–217, 2004.

OLIVEIRA, E. Q. DE et al. Produtividade de alface e rúcula, em sistema consorciado, sob adubação orgânica e mineral. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 36–40, 2010.

OLIVEIRA, L. C. DE et al. Soil and leaf fertilization of lettuce crop with cow urine. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 431–437, 2009.

PAULETTI, D. R. **Influência das plantas de cobertura nas características produtivas da alface e nos atributos físicos e químicos do solo**. Marechal Candido Rondon - PR. Dissertação de Mestrado, 2012.

PEREG, L.; MCMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 349–358, 2015.

RESENDE, G. M. et al. Rendimento e teores de macronutrientes em alface tipo americana em função de doses de nitrogênio e molibdênio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 153–163, 2009.

SANTI, A. et al. Desempenho agrônômico de alface americana fertilizada com torta de filtro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 338–343, 2013.

SANTOS, R. H. S. et al. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1395–1398, 2001.

SEBRAE-DF. **A questão ambiental no Distrito Federal**: informação e orientação para as atividades empresariais e para o público em geral. Brasília, p. 136, 2004.

SEUFERT, V.; RAMANKUTTV, N.; FOLEY, J. A. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. **Nature**, v. 485, p. 229–232, 2012.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi Journal**

of **Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 123–131, 2015.

SILVA, P. S. DA et al. **Produção de mudas de pimentão em substrato de coco verde fertirrigadas com biofertilizante em sistema orgânico**. *Horticultura Brasileira*, 28: S2714-S2720, 2010.

SILVA, M. A. G. da.et al. B. Efeito do cloreto potássio na salinidade de um solo cultivado com pimentão, *Capsicum annuum* L., em ambiente protegido. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 5, p. 1085-1089, 2001.

SILVA, A. O. A fertirrigação e o processo de salinização de solos em ambiente protegido. **Nativa Sinop**, v. 2, n. 3, p. 180–186, 2014.

SILVA, A. S. N. **Doses de fósforo e de potássio na produção da alface**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista - Unesp, 2013.

SILVA, F. L. B. et al. Interação entre salinidade e biofertilizante bovino na cultura do feijão-de-corda. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 4, p. 383–389, 2011.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p 71-78, 2002.

SOUSA, T. P. DE et al. Produção de alface (*Lactuca sativa* L.), em função de diferentes concentrações e tipos de biofertilizantes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 4, p. 168–172, 2014.

SOUZA, R. B. DE et al. **Composição do Hortbio**. Brasília - DF. EMBRAPA - CNPH, 2012.

SOUZA, R. B. DE; ALCANTARA, F. A. DE. **Adubação no sistema orgânico de produção de hortaliças**. Brasília - DF. Embrapa Hortaliças - CNPH, 2008.

VERONKA, D. A. et al. Efeito do biofertilizante no crescimento e na produção de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 1161–1165, 2008.

YURI, J. E. et al. Desempenho de cultivares de alface tipo americana em cultivo de outono no sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 2, p. 282–286, 2004.

ZEIGER, T. Auxin: The Growth Hormone. In: **Plant Physiology and Development**, v. 13, p. 624, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biofertilizantes são formulações que possuem uma complexa e variável comunidade microbiana. Atualmente, são poucos os estudos que identificam a diversidade microbiana de biofertilizantes tanto no sentido de avaliar o possível potencial biotecnológico dos micro-organismos inseridos na formulação, assim como detectar prováveis contaminantes. Nesse sentido, esse trabalho se enquadra em um dos poucos que fornecem esse tipo de informação, avaliando a microbiota cultivável, possíveis organismos com características funcionais e biotecnológicas desejáveis, assim como, a presença de micro-organismos patogênicos que inviabilizariam o seu uso.

Outras ferramentas são utilizadas atualmente para o estudo da diversidade microbiana, como a metagenômica, que esclareceria a diversidade dos micro-organismos cultiváveis e dos não cultiváveis. Contudo, os dados gerados nesse trabalho possibilitam a avaliação funcional dos micro-organismos isolados, sendo essa a perspectiva futura. A avaliação da capacidade de promoção do crescimento vegetal dos isolados e possivelmente a criação de um inóculo microbiano padronizado são os objetivos futuros oriundos dos resultados obtidos nessa dissertação.

De acordo com os resultados obtidos, é possível considerar que os micro-organismos presentes nos tempos iniciais de produção do biofertilizante estão envolvidos na produção de AIA. O decréscimo da concentração de AIA ao longo da produção do Hortbio[®] assim como a redução da comunidade bacteriana, pelos dados de contagem de colônias, sugere que há uma possível relação entre esses dados.

Porém, também se faz necessário o cuidado com a microbiota residente do produto, pois alguns são apontados como possíveis patógenos humanos como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, sendo que outras estirpes podem apresentar um papel fitopatogênico como *Aspergillus* e *Penicillium*. A presença de ovos de nematoda pode representar também uma fonte em potencial para contaminação de outros organismos relacionados, a exemplo dos nematóides fitopatogênicos. A presença desses organismos, geram uma preocupação quanto à segurança alimentar do produto. Dessa forma, é reforçada a necessidade do estudo da microbiota benéfica e padronização do inóculo, para assim, reduzir a presença de possíveis contaminantes.

A partir dos dados de fertilidade do solo, é possível avaliar que houve pouco fornecimento de P à alfaca. De acordo com os dados gerados pela caracterização molecular dos isolados, possivelmente exista na formulação micro-organismos solubilizadores de fosfato. O estudo de outros ciclos da cultura, utilizando o mesmo solo, possibilitaria a ação dos solubilizadores de fosfato e, possivelmente, aumentaria o fornecimento desse elemento às plantas.

ANEXOS

Qualidade das sequências obtidas dos micro-organismos isolados do Hortbio®.

Tabela 16. Dados obtidos da comparação das sequências dos isolados bacterianos com sequências depositadas no GenBank (NCBI).

Amostra	Código de acesso BLAST	Identidade	E-value	Cobertura
BEM 01	KP864637.1 / KP313762.1	100%	0	100%
BEM 02	JQ685227.1 / JX445127.1	100%	0	100%
BEM 03	KR780425.1 / KR780415.1	100%	0	100%
BEM 04	HQ283476.1/KU158219.1/KT835652.1	100%	0	99%
BEM 05	KF862927.1	100%	0	100%
BEM 06	KU921593.1/KU921591.1	99%	0	100%
BEM 08	KX066863.1/KX037118.1	100%	0	100%
BEM 10	KT989578.1/KU060801.1	99%	0	99%
BEM 11	KU976969.1/KT968361.1/KU976969.1	100%	0	100%
BEM 12	KX036611.1	100%	0	100%
BEM 19	KC788086.1	99%	0	99%
BEM 20	FR877753.1	99%	0	100%
BEM 25	JQ314039.1	100%	0	100%
BEM 26	KT720292.1/KT719618.1	100%	0	100%
B0.02	KF555607.1	100%	0	100%
B0.03	HQ683997.1/LK054641.1	99%	0	100%
B0.04	KP058396.1	99%	0	100%
B0.05	KT947109.1	100%	0	100%
B0.07	KP845286.1/KP058396.1	99%	0	100%
B0.09	HQ683997.1/LK054641.1	99%	0	100%
B0.10	GQ480491.1	86%	132	99%
B0.13	KM010139.1	99%	0	100%
B0.14	KJ009395.1	100%	0	100%
B0.16	KT720341.1	99%	0	100%
B5.02	JN644504.1	99%	0	99%
B5.03	HQ220155.1/HF585345.1	100%	0	100%
B5.04	KC853302.1/KC211309.1	99%	0	100%
B5.07	NR_041401.1	100%	0	100%
B5.08	KP764104.1	97%	0	100%
B5.09	KM007094.1/KJ742494.1	98%	0	100%
B5.11	KC211309.1/KC853302.1	100%	0	100%
B5.13	KT720198.1/KT719629.1	100%	0	100%
B5.14	KR703652.1	100%	0	97%
B5.15	KC853296.1	100%	0	100%
B5.16	KT719973.1/JQ818384.1	100%	0	100%
B5.18	KR190075.1	99%	0	100%
B5.19	KR189316.1	99%	0	100%

B5.20	KC840814.1	99%	0	100%
B5.21	KT767973.1/HF585345.1	99%	0	99%
B5.22	KT034453.1	100%	0	100%
B10.01	LC096207.1	100%	0	100%
B10.02	KT944240.1/KT261225.1	99%	0	100%
B10.03	KT149756.1	100%	0	100%
B10.05	KF036184.1	99%	0	100%
B10.06	LC144977.1	98%	0	100%
B10.07	KU570298.1	96%	0	99%
B10.08	LN907773.1	99%	84	100%
B10.09	KC853302.1	100%	0	100%
B10.10	JX188070.1	100%	0	100%
B10.11	KT767971.1	99%	0	97%
B10.13	KU644444.1	97%	0	99%
B10.14	KU131248.1/KR558704.1	99%	0	100%
B10.15	KR265391.1	100%	0	100%
B10.17	KM871867.1	99%	0	100%
B10.19	AM990679.1	99%	0	99%
B10.20	KM108496.1	99%	0	100%
B10.21	KT149756.1	99%	0	99%
B10.22	KP764104.1	100%	0	100%
B15.03	JF690872.1	90%	142	100%
B15.04	KU312790.1/LC049186.1	99%	0	100%
B15.05	KC835090.1	100%	0	100%
B15.07	KC211309.1/KC853302.1	100%	0	100%
B15.08	KR698931.1/KP969055.1	100%	0	100%
B15.09	JF311905.1	100%	74	100%
B15.10	KP764104.1	100%	0	100%
B15.11	KU096948.1/KR265437.1	100%	0	100%
B15.12	JF311905.1	100%	0	100%
B15.13	HF585337.1/KM108527.1	99%	0	100%
B20.01	HQ683997.1	99%	0	100%
B20.03	AM990679.1	99%	0	95%
B20.04	JX188070.1	100%	0	100%
B20.05	JF311905.1	100%	0	100%
B20.06	GU126681.1	100%	0	99%
B20.07	KF555607.1	99%	0	100%
B20.09	JF311905.1	100%	0	100%
B20.10	LC096207.1	100%	0	100%
B20.11	KM613132.2	99%	125	100%
B20.12	KM233206.1	100%	0	100%
B20.14	KR265391.1	100%	0	100%
B20.15	KJ742494.1	92%	0	99%
B20.16	KU644444.1	100%	0	100%
B20.17	KM613133.2	99%	0	100%

B20.18	KC545886.1/LC144977.1	99%	0	100%
B20.19	JX030410.1	99%	0	100%
B20.22	KM613133.2	99%	0	100%
B25.01	GQ246706.1	100%	0	100%
B25.02	KM613133.2	99%	0	99%
B25.05	KP789072.1	97%	0	99%
B25.06	KC009697.1	96%	0	100%
B25.07	JF311905.1	100%	0	99%
B30.01	KJ685813.1/KJ524466.1	99%	0	100%
B30.02	EU073113.1	100%	0	100%
B30.03	FJ002585.1	98%	0	100%
B30.05	KM613133.2	99%	0	100%
B30.06	KT180319.1/LC096214.1/KT906207.1	100%	0	100%
B30.07	KT021514.1	100%	0	100%
B30.08	KC009697.1	96%	0	100%
B30.09	KU179338.1/KU230027.1/ KP813658.1/KT364458.1	99%	0	100%
B30.10	HQ683997.1	99%	0	100%
B30.11	KT361110.1	99%	0	100%
ACEM 01	KU158286.1	99%	0	100%
A0.08	KT020951.1/GU186207.1	99%	0	100%
A0.11	GU186207.1/KT020951.1	97%	0	98%
A10.01	KU570298.1/KP969055.1	99%	0	100%
A10.06	JX188070.1/JN848785.1	99%	0	100%
A10.13	NR_042904.1/AB915215.1	99%	0	100%
A10.14	KM019909.1/KC211309.1	99%	0	100%
A10.18	KU761531.1/KT795109.1	99%	0	100%
A10.19	JF513173.1	98%	0	99%
A15.05	KM257714.1	99%	0	100%
A15.09	KX139480.1/KU981098.1	100%	0	100%
A15.10	HE573742.1	92%	0	99%
A20.07	KJ889188.1	99%	0	99%
A20.08	KU987933.1	100%	0	100%
A20.09	KU686732.1	85%	163	99%
A20.10	JQ885620.1	98%	0	99%
A25.02	AB294556.1/KT380555.1	99%	0	100%
A25.07	KT748639.1/KT734759.1	100%	0	100%
A25.11	KT748639.1/KT734759.1	89%	136	98%
A25.13	KM518626.1	93%	0	98%
A30.02	KU305720.1/GQ284450.1	99%	0	100%

Tabela 17. Dados obtidos da comparação das sequências dos isolados dos fungos filamentosos com sequências depositadas no GenBank (NCBI).

Amostra	Código de acesso BLAST	Identidade	E-value	Cobertura
FEM 04	KP223716	93%	148	99%
FEM 05	HG936031	98%	177	57%
FEM 07	KP009257.1	100%	0	100%
FEM 08	KR703615.1/DQ681326.1	100%	0	100%
FEM 09	KR296884.1/KT004401.1	100%	0	100%
F0.01	KF975700	96%	145	99%
F0.02	HG936031	96%	166	97%
F0.03	KT310999.1/KR296884.1	100%	0	100%
F0.04	FJ427513.1	100%	0	100%
F0.05	KF578434	91%	161	98%
F0.06	KF975700	95%	131	82%
F0.07	KP223716	86%	103	98%
F0.09	KR704880.1	100%	0	99%
F5.03	HG936031	88%	114	97%
F5.05	KF975700	95%	152	94%
F5.06	HG936031	94%	154	98%
F10.01	HG936031	97%	165	93%
F10.04	KT803068.1/FJ478090.1	100%	0	100%
F20.01	KP223716	94%	148	99%
TEM 02	AB274312	99%	0	98%
TEM 05	AB274312	99%	0	99%
T0.04	HQ026745	99%	0	97%
T0.05	JN315018.1	100%	0	99%
T0.06	JN198474.1/JF439687.1	99%	0	99%
T0.07	KU182497	99%	0	97%
T5.01	KP399955.1	100%	132	100%
T5.04	KP329611.1	100%	0	100%
T5.07	KP132256.1	99%	160	99%
T10.01	KC113295.1	100%	0	100%
T15.04	KT207745.1	100%	0	100%
T20.01	JF909352.1	96%	146	97%
T20.02	KP769540.1	81%	66	93%
T25.01	KP132256.1	94%	134	98%
T30.01	KP132256.1	98%	160	100%

Tabela 18. Dados obtidos da comparação das sequências dos isolados de leveduras com sequências depositadas no GenBank (NCBI).

Amostras	Código de acesso BLAST	Identidade	E-value	Cobertura
LEM 1	KP975390.1	100%	0	100%
LEM 02	KP975393.1/KP966889.1	100%	0	100%
LEM 04	KF830179/KR632570	100%	0	98%
LEM 05	JQ779970.1	100%	0	99%
LEM 06	KJ794716.1	99%	0	100%
LEM 08	KP263785.1	99%	0	100%
LEM 09	KP171576.1/KF830179.1	99%	0	100%
LEM 10	KF830179/KR632570	99%	0	95%
LEM 11	KF830179/KR632570	99%	0	98%
LEM 12	KJ794716.1/EF375703.1	99%	0	100%
LEM 13	KP171576.1/KF830179.1	100%	0	100%
LEM 14	KP171598.1	98%	0	100%
LEM 15	KP171576.1/KF830179.1	100%	0	100%
LEM 16	KR995732.1/KM924538.1	100%	0	100%
L0.01	KP171576.1/KF830179.1	99%	0	100%
L0.03	KF308281/ KC4442248	99%	0	99%
L0.04	JX068674.1	100%	0	100%
L0.05	KJ794716.1	99%	0	100%
L0.06	KJ794716.1	99%	0	100%
L0.07	KP975393.1/KR069091.1	100%	0	100%
L0.08	KP975390.1	100%	0	100%
L0.09	KJ794716.1	99%	0	100%
L0.10	JQ965860	98%	0	97%
L0.11	KF308281/ KC4442248	99%	0	99%
L0.12	JQ965868/AB831021	97%	72	26%
L0.13	KP975390.1	100%	0	100%
L5.01	JQ965860	100%	0	100%
L5.02	KF830179.1/JX188108.1	100%	0	100%
L5.04	KP171576.1/KF830179.1	100%	0	100%
L5.06	KJ794716.1/EF375703.1	99%	0	99%
L10.01	KJ794716.1	100%	0	99%
L10.02	EF375703.1/DQ0682259	88%	0	88%
L10.03	EF375703.1/DQ377636	99%	0	96%
L15.01	JX407850	100%	77	100%
L20.01	KF268291.1	99%	0	100%
L20.02	KM234442	99%	0	98%
L20.03	KP966884.1	99%	0	100%
L20.04	KJ39841	99%	0	99%
L20.06	KM279362.1/LC015313.1	100%	0	100%

L20.07	LC093955.1	100%	0	100%
L20.08	LC093955.1	100%	0	100%
L20.09	LC093955.1	100%	0	100%
L20.10	LC093955.1	100%	0	100%
L20.11	KP966884.1	100%	0	100%
L20.12	KR995742.1	99%	0	100%
L25.01	KP966884.1	100%	0	100%
L25.02	KP966884.1	100%	0	100%
L25.03	LC093955.1	100%	0	100%
L25.04	LC093955.1	100%	0	100%
L25.05	LC093955.1	100%	0	100%
L25.06	KP966884.1	100%	0	100%
L25.07	KJ756753.1	99%	0	100%
L25.08	LC093955.1	100%	0	100%
L25.09	KP324972.1	97%	0	99%
L30.02	KJ756753.1	100%	0	100%
L30.03	KJ756753.1	100%	0	100%
L30.04	LC093955.1	99%	0	100%
L30.05	LC093955.1	100%	0	100%
L30.06	LC093944.1	100%	0	99%
L30.07	KM234461.1	93%	0	99%