

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CAIO EVANDRO SANTOS DE FREITAS

**EFEITO DE BIOFERTILIZANTE INOCULANTE DE *Bacillus subtilis* e  
*Trichoderma* spp. EM ÁREAS DE CULTIVO AGRÍCOLA NO  
MUNICÍPIO DE NOVA TEBAS - PARANÁ.**

CAMPO MOURÃO

2017

CAIO EVANDRO SANTOS DE FREITAS

**EFEITO DE BIOFERTILIZANTE INOCULANTE DE *Bacillus subtilis* e  
*Trichoderma* spp. EM ÁREAS DE CULTIVO AGRÍCOLA NO  
MUNICÍPIO DE NOVA TEBAS - PARANÁ.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) do Campus Campo Mourão.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

Co-orientador: Prof. Me. Cristian Coelho Silva

CAMPO MOURÃO

2017

## TERMO DE APROVAÇÃO

EFEITO DE BIOFERTILIZANTE INOCULANTE DE *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. EM ÁREAS DE CULTIVO AGRÍCOLA NO MUNICÍPIO DE NOVA TEBAS - PARANÁ.

por

CAIO EVANDRO SANTOS DE FREITAS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 20 de Junho de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

---

Prof. Me. Cristian Coelho Silva

---

Prof. Dra. Elizabete Satsuki Sekine

---

Prof. Dra. Raquel de Oliveira Bueno

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, por me iluminar durante toda minha vida, inclusive acadêmica e profissional, e principalmente por me presentear com a minha família.

Aos meus pais, Dário e Marlei, por serem a razão da minha vida e inspiração, sendo exemplo de pessoas para se orgulhar e agradecer, por serem a base para eu alcançar meus objetivos, e principalmente para se amar.

Aos meus irmãos, Fábio, Isabela e Luis Henrique, pela lealdade e união que independente da distância é inseparável pelo coração.

A todos os professores, que estiveram presentes nessa caminhada acadêmica e colaboraram para minha formação. Em especial ao Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno que mais que orientador se tornou grande amigo, agradeço pela paciência e ensinamentos.

Agradeço a Prof. Dra. Raquel de Oliveira Bueno, Prof. Dra. Elizabete Satsuki Sekine, que de alguma forma ofereceram apoio, atenção e conhecimento em todo período deste trabalho, com excelente qualidade profissional além de serem excelentes amigos pessoais. Ao Prof. Me. Cristian Coelho Silva que além da caminhada acadêmica me proporcionou ótimas experiências a nível profissional de empresa sendo de grande valia para minha formação.

Aos meus amigos que tiveram grande contribuição para este trabalho e durante importantes momentos da graduação: Rafael Rosiello, Julio Cristófoli, Marcos Junior, Pamela Venturin, Marcos Junior e Edemilson Luiz. Também agradeço aos amigos que estiveram presentes ao meu lado desde o início da universidade e levarei para vida toda: Eduardo Leal, Pablo Boniol, Murilo Damasceno, João Macome e Natália Stier.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

## RESUMO

Os sistemas de cultivo com aplicações de insumos sintéticos utilizados pela agricultura atual alteram importantes atributos do solo que são regulados pela biota, além de causar diversos problemas relacionados ao meio ambiente e a saúde pública, sendo de extrema importância a substituição por insumos orgânicos, como os biofertilizantes. O presente trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito da aplicação de biofertilizante na comunidade microbiológica do solo em áreas de cultivo agrícola, com uso de biofertilizantes feito a partir de bactérias *Bacillus subtilis* e espécies de fungos do gênero *Trichoderma* spp.. Este estudo foi desenvolvido em propriedade rural particular no município de Nova Tebas, Paraná. Foram demarcados seis sítios amostrais e coletados três subamostras cada, homogeneizadas, totalizando uma amostra por sítio amostral, sendo três sítios amostrais controle e três tratados com o biofertilizante. Em seguida as amostras foram levadas ao laboratório de Ecologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Campo Mourão, para o processamento. Em laboratório, foi realizada remoção de materiais indesejados e peneiramento. Em seguida, para estabilização da umidade, o solo foi pesado a cada 24 horas até a perda de água. Posteriormente, realizou-se diluição em série das amostras, e plaqueamento em duplicata. A partir das análises estatísticas, realizadas com o número de unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC/g), concluiu-se que o biofertilizante resultou numa significativa evolução microbiológica do solo nas áreas tratadas, principalmente ao final do experimento, após cento e trinta e cinco dias de aplicação do biofertilizante, mostrando um maior adensamento microbiológico.

**Palavras-chaves:** Solo. cultivo. comunidade microbiológica. insumos orgânicos.

## ABSTRACT

The cropping systems with applications of synthetic inputs used by current agriculture alter important soil attributes that are regulated by biota, besides causing several problems related to the environment and public health, being of extreme importance the substitution by organic inputs, such as Biofertilizers. The objective of this work was to evaluate the effect of the application of biofertilizer in the microbiological community of the soil in agricultural areas with the use of biofertilizers made from *Bacillus subtilis* bacteria and fungi species of the genus *Trichoderma* spp.. This study was developed in private rural property in the municipality of Nova Tebas, Parana. Six sample sites were demarcated and three subsamples were collected each, homogenized, totalizing one sample per sample site, three control sampling sites and three biofertilizer treated. The samples were then taken to the Ecology Laboratory of the Federal Technological University of Paraná, Campus Campo Mourão, for processing. In the laboratory, removal of unwanted materials and sieving were performed. Then, for moisture stabilization, the soil was weighed every 24 hours until water loss. Subsequently, the samples were serially diluted and plated in duplicate. From the statistical analyzes carried out with the number of colony forming units per gram of soil (CFU/g), it was concluded that the biofertilizer resulted in a significant microbiological evolution of the soil in the treated areas, mainly at the end of the experiment, after one hundred and thirty-five days of application of the biofertilizer, showing a greater microbiological density.

**Key words:** Soil. cultivation. microbiological community. organic inputs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de localização da área de estudo pertencente ao município de Nova Tebas – PR. ....	16
Figura 2 – Localização dos sítios amostrais tratados e controle da na área de estudo da propriedade rural Sítio São Pedro no município de Nova Tebas – PR. ....	18
Figura 3 – Representação esquemática da distribuição das três subamostras de cada sítio amostral.....	18
Figura 4 – A: Pulverização do biofertilizante em um sítio amostral na área tratada. B: Aplicação do biofertilizante utilizando o pulverizador costal PJH.....	19
Figura 5 – A: Remoção de materiais indesejados do solo com auxílio de pinça. B: Processo de peneiramento com peneira de análise granulométrica de 1,40 mm de malha. ....	20
Figura 6 – Estabilização de 100g de solo de cada sítio amostral em estufa de secagem e esterilização a temperatura constante de 30 °C.....	20
Figura 7 – Metodologia utilizada para o plaqueamento do solo. A: Mistura de solo e solução salina em agitador magnético. B: Diluição seriada da mistura após tempo de agitação.....	21
Figura 8 – Representação esquemática da metodologia utilizada para estabilização de umidade em estufa, agitação do solo em solução salina, diluição e plaqueamento.....	21
Figura 9 – Contagem de colônias realizada através do contador de colônias PHOENIX CP 600, para quantificação dos microrganismos.....	22
Figura 10 – Colônias de bactérias aeróbias totais antes da estabilização do crescimento em área controle e área tratada. A: Placa da área controle em diluição $10^{-6}$ . B: Placa de área tratada em diluição $10^{-6}$ .....	23
Figura 11 – Metodologia de imersão em solução Vermelho Congo para quantificação de bactérias produtoras de celulase. A: Aplicação da solução em meio de cultura. B: Placas imersas. C: Lavagem das placas com solução NaCl 1M. ....	24
Figura 12 – Placas de Petri contendo colônias de bactérias produtoras de celulase positivas indicadas pelas setas, identificadas pelo halo transparente que formam ao redor de si em reação de hidrólise.....	25

<b>Figura 13 – Colônias de fungos totais antes e depois da estabilização do crescimento na segunda coleta. A: Ponto 1 da área controle antes da estabilização de crescimento das colônias; B: Ponto 1 da área controle após estabilização. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 14 – Sítio amostral na primeira e segunda coleta realizada respectivamente. A: Predomínio de vegetação herbácea. B: Predomínio de formações semi-arbustivas e arbustivas .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 15 – Área de estudo pertencente a propriedade rural Sítio São Pedro no município de Nova Tebas – PR na segunda coleta e aplicação realizada.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 16 – Descrição dos dados de UFC/g de solo de fungos para área controle e área tratada em cada período de coleta. AC: Área Controle; AT: Área Tratada; 1: Primeira Coleta; 2: Segunda Coleta; 3: Terceira Coleta. ....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 17 – Perda média de água por dessecação do solo, após estabilização, nos três períodos de coleta nos sítios amostrais controle e tratado. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 18 – Descrição dos dados de UFC/g de solo de bactérias aeróbias para área controle e área tratada em cada período de coleta. AC: Área Controle; AT: Área Tratada; 1: Primeira Coleta; 2: Segunda Coleta; 3: Terceira Coleta. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 19 – Descrição dos dados de UFC/g de solo de bactérias produtoras de celulase para área controle e área tratada em cada período de coleta. AC: Área Controle; AT: Área Tratada; 1: Primeira Coleta; 2: Segunda Coleta; 3: Terceira Coleta. ....</b>	<b>40</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>11</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Solo e Fração Biológica</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Biofertilizante</b> .....	<b>13</b>
<b>4 MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1 Área de Estudo</b> .....	<b>16</b>
<b>4.2 Coleta de Solo</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3 Bactérias Aeróbias Totais</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4 Bactérias Produtoras de Celulase</b> .....	<b>24</b>
<b>4.5 Fungos Totais</b> .....	<b>25</b>
<b>4.6 Análise Estatística</b> .....	<b>26</b>
<b>4.7 Evolução da Comunidade Microbiológica</b> .....	<b>26</b>
<b>5 RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1 Análise Química do Solo</b> .....	<b>28</b>
5.1.1. Fósforo (P) .....	29
5.1.2. Carbono Orgânico Total (COT) .....	30
5.1.3. Cálcio (Ca <sup>2+</sup> ).....	31
5.1.4. Magnésio (Mg <sup>2+</sup> ).....	32
5.1.5. Potássio (K <sup>+</sup> ) .....	32
5.1.6. C.T.C. (Capacidade de Troca Catiônica).....	33
5.1.7. Saturação por bases (V%) .....	34
5.1.8. Acidez Potencial e pH .....	34
<b>5.2 Quantificação de Fungos Totais</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2 Quantificação de Bactérias Aeróbias Totais</b> .....	<b>38</b>
<b>5.3 Quantificação de Bactérias Produtoras de Celulase</b> .....	<b>40</b>
<b>5.4 Evolução da Microbiota do Solo</b> .....	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por alimentos se tornou um problema mundial, e a agricultura atual utiliza inúmeros insumos, como agrotóxicos e fertilizantes químicos para elevar a produtividade e minimizar perdas. Portanto, esse uso descontrolado de agentes químicos pode ocasionar muitos problemas ambientais e de saúde pública, principalmente com a contaminação de corpos hídricos.

Os sistemas de cultivo com aplicações sintéticas podem alterar importantes atributos de qualidade do solo que são regulados pela sua biota. Além da agregação no solo, a biota contribui para decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes e degradação de poluentes. Para avaliação da qualidade do solo, um importante indicador é a atividade microbiana, devido à integração das suas propriedades físicas, químicas e biológicas, além de sensibilidade a interferências do ambiente, tanto naturais, como o clima, quanto antrópicas, onde são facilmente afetados por perturbações no solo, principalmente por poluentes e contaminação de metais pesados (DORAN; PARKIN, 1994; OBBARD; JONES, 1991; PARR; HORNICK; PAPENDICK, 1992).

Nesse contexto, a fertilidade do solo depende de toda dinâmica de regulação dos microrganismos e matéria orgânica. Assim, o declínio da atividade microbiana no solo reflete diretamente na sua qualidade, ou seja, a redução de microrganismos no meio reflete diretamente na capacidade do solo em desempenhar funções benéficas para a vegetação (BROOKES, 1995).

Para melhoria da qualidade do solo e aumento de produtividade com melhor desenvolvimento vegetal, o mais indicado é a adição de materiais orgânicos, como aplicação de biofertilizantes, que são produzidos a partir da mistura de materiais orgânicos, promovendo aumento da atividade e biomassa microbiana, contribuindo para conteúdo de carbono orgânico do solo, além da biomassa microbiana atuar na transformação de compostos orgânicos no solo (SAMPAIO; ARAÚJO; SANTOS, 2008).

Sendo assim o biofertilizante, como um incremento orgânico, é benéfico ao solo de uma área de cultivo, proporcionando melhores condições de crescimento e produtividade da cultura, devido a atuação no aumento da atividade biológica do solo, no metabolismo vegetal e na ciclagem de nutrientes do solo. Outra característica relevante da aplicação é a possível capacidade de degradação de agrotóxicos pelos

fungos e bactérias, podendo utilizar esses contaminantes como fonte de energia ou para atividades metabólicas. (BELLINI; FILHO; MORESKI, 2011; DELLAMATRICE et al., 2012).

Neste estudo, foram utilizados os microrganismos como incremento orgânico que compõem os biofertilizantes combinados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*. Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são importantes inoculantes agrícolas de biocontrole. Promovem o melhor desenvolvimento vegetal, tendo efeitos benéficos desde a germinação até o desenvolvimento da planta, pois atuam como bioestimulante do crescimento radicular, melhorando a assimilação de nutrientes pelas raízes além de agir no controle de patógenos (JUNIOR et al., 2014; VERMA et al., 2007). A bactéria *Bacillus subtilis*, também promove o melhor desenvolvimento e rendimento vegetal, contribuindo para incrementos na nodulação e redução de nematoides fitopatogênicos, devido a produção de endotoxinas que interferem no seu ciclo reprodutivo (ARAUJO; HUNGRIA, 1999).

Portanto, o presente trabalho teve como finalidade avaliar a evolução microbiológica do solo em áreas de cultivo agrícola no município de Nova Tebas, Paraná, com aplicação do biofertilizante combinado de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*. Este estudo foi realizado no Laboratório de Ecologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Campo Mourão em conjunto com a CELF – Energias Renováveis e Bioenergia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da aplicação do biofertilizante, a partir de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp., na comunidade microbiológica do solo em áreas de cultivo orgânico no município de Nova Tebas, Paraná.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar, por meio da quantificação de macronutrientes a dinâmica da comunidade microbiológica nas duas áreas;
- Quantificar fungos totais, bactérias aeróbias e bactérias produtoras de celulase presentes na área de estudo;
- Observar a evolução da comunidade microbiológica na área tratada com biofertilizante no período do experimento.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Solo e Fração Biológica

O solo é resultado da ação de processos de intemperismo físico e químico, ou seja, decomposição, responsável pela quebra mecânica e degradação química dos minerais das rochas, produzindo assim o material de origem dos solos denominado regolito. A pedogênese envolve processos de adições, perdas, transformações de materiais e energia, entre outros, onde o regolito evolui para a formar o solo, constituído então por horizontes ou camadas que dão suporte a vida vegetal. Cada formação varia de região para região, devido a fatores como rocha matriz, clima, relevo, organismos e tempo (LEPSCH, 2010).

Os solos possuem diferentes capacidades de retenção de elementos orgânicos e inorgânicos. A retenção e movimentação de elementos solúveis são determinadas pela textura e porosidade de cada solo, e pela característica de cada superfície coloidal, sendo fortemente influenciada pela quantidade de matéria orgânica e pela capacidade de drenagem do solo (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

Nesse sentido, o solo torna-se um recurso natural fundamental, e sua qualidade é formada por fatores químicos, físicos, biológicos e ecológicos, podendo ser modificados ou melhorados em prol de uma melhor qualidade. A qualidade é uma propriedade determinante para aumento de produtividade e sustentabilidade das culturas, influenciando não somente na produtividade, mas também na saúde das plantas, animais e conseqüentemente os seres humanos (FAGERIA, 2002).

Entre os componentes do solo, a fração biológica exerce grande influência nos demais, constituída por diversos microrganismos que atuam sobre a matéria orgânica do solo, no desenvolvimento de processos de síntese e de análise de compostos orgânicos, tornando o solo uma entidade biológica dinâmica e não um substrato morto, com meios físicos e químicos estáticos. As quantidades dos constituintes de uma população microbiana são facilmente alteradas quando o ecossistema sofre algum tipo de interferência, seja antrópica ou devido a variáveis ambientais como, temperatura, umidade, concentração de íons de Hidrogênio, composição da matéria orgânica, entre outros fatores (GALLI, 1964).

Dessa forma, a melhoria das condições nutricionais do solo, ou seja, o aumento da fertilidade, é dependente da dinâmica de ciclagem dos nutrientes e decomposição

de matéria orgânica, que é transformada pela biomassa microbiana (SRIVASTAVA; SINGH, 1991).

A biomassa microbiana é a parte viva mais ativa da matéria orgânica presente no solo, constituída por fungos, bactérias e actinomicetos, que atuam em processos de decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação do solo, entre outros. Sendo assim, a biomassa microbiana é um componente que regula a decomposição e acúmulo de matéria orgânica e transformações de nutrientes minerais, logo, a observação das propriedades microbiológicas (quantidade, atividade, composição e diversidade das comunidades microbianas) é importante bioindicador de qualidade do solo (JENKINSON; LADD, 1981; JUNIOR; MENDES, 2007; SINGH et al., 1989).

### **3.1 Biofertilizante**

A visão atual de produção sustentável atrai a demanda crescente de fertilizantes orgânicos como alternativo aos insumos químicos, havendo dessa maneira a necessidade de se criar alternativas para elevar a produtividade, sendo economicamente viável a substituição de fertilizantes e defensivos químicos, fornecendo benefícios socioeconômicos e ecológicos (BOMFIM, 2016).

Os biofertilizantes são formulações orgânicas sólidas ou líquidas decorrentes do processo de fermentação, advindo da decomposição de matéria orgânica e complexação de nutrientes pelos microrganismos, normalmente preparados com resíduos animais, vegetais ou agroindustriais. Utilizam células de microrganismos vivos ou latentes, capazes de promover o crescimento vegetal, realizando processos no solo que permitem o suprimento de macro e micronutrientes pelas plantas, tornando nutrientes e elementos nutritivos não utilizáveis em formas facilmente assimiláveis (ALFA et al., 2014; BERNARDO; BETTIOL, 2010; MEDEIROS; LOPES, 2006; NETO, 2006; RESENDE, 2006).

Outra vantagem de sua utilização é o aumento na disponibilidade de microrganismos, responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e liberação de metabólitos como compostos de proteínas, enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos. Os biofertilizantes possuem comunidade microbiana variável, dependendo do processo utilizado, podendo ser aeróbio ou anaeróbio, e do substrato

utilizado na sua produção. (ALFA et al., 2014; BERNARDO; BETTIOL, 2010; MEDEIROS; LOPES, 2006).

Sua aplicação em cultura promove a melhoria das características físico-químicas do solo, além de atuar no controle de pragas e doenças, apresentando efeitos de ação fungistática e bacteriostática sobre fitopatógenos, aumentando assim a resistência das plantas e conseqüentemente a produtividade com baixo custo. Podem ser utilizados em pulverizações foliares ou aplicações diretas no solo. (BETTIOL; TRATCH; GALVÃO, 1998; DIAS et al., 2002).

Como constituinte do biofertilizante, *Trichoderma* spp. são fungos de origem principal do solo, eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, seja diretamente através do micoparasitismo ou indiretamente, através de competição por nutrientes, protegendo a planta contra infecções. Promove também o desenvolvimento das plantas através de diversos mecanismos, aumentando sua resistência a condições desfavoráveis (BENÍTEZ et al., 2004).

Segundo Harman et al. (2004) e Vinale et al. (2008) para a agricultura, além do controle de patógenos que auxilia na germinação e melhor desenvolvimento da planta, o uso de *Trichoderma* spp. pode oferecer vantagens na decomposição de matéria orgânica. Esse gênero é extremamente importante na área de produtos biológicos, uma vez que não oferece impactos ambientais negativos, possui fácil reprodução em substratos naturais e conseguem sobreviver em ambientes com condições adversas.

Ainda sobre os componentes do biofertilizante, bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP), ou seja, são bactérias colonizadoras das plantas e que promovem estimulação do seu crescimento. Sua utilização no solo em agriculturas traz benefícios para a produção além de substituir insumos agrícolas sintéticos que contaminam o meio ambiente (ARAÚJO, 2008; CHANWAY et al., 2000; KATZ; DEMAIN, 1997; LIMA, 2010).

Os benefícios proporcionados por *Bacillus subtilis* vão desde a influência da germinação ao desenvolvimento, onde estão relacionados à solubilização de nutrientes com maior absorção de fósforo e nitrogênio, produção de fitohormônios estimuladores do crescimento e produção de sideróforos e antibióticos podendo inibir o efeito de bactérias e fungos patogênicos aumentando a resistência contra os mesmos (ARAÚJO, 2008; CHANWAY et al., 2000; KATZ; DEMAIN, 1997; LIMA, 2010).

Por fim, a aplicação de fungos e bactérias, provenientes de biofertilizante neste estudo, podem ter capacidade de degradação de numerosos poluentes orgânicos devido às atividades metabólicas e utilização como fonte de energia, possuindo capacidade de adaptação em ambientes desfavoráveis, principalmente na degradação de herbicidas e inseticidas que estão presentes no entorno da área de estudo, como Glifosato e Carbofuran, respectivamente (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005).

Os impactos provocados pela contaminação de agentes químicos atingem principalmente criações e animais domésticos, populações humanas, afetadas pela ingestão de alimentos contaminados, além do entorno de comunidades e ecossistemas próximos às áreas onde esses produtos são aplicados (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

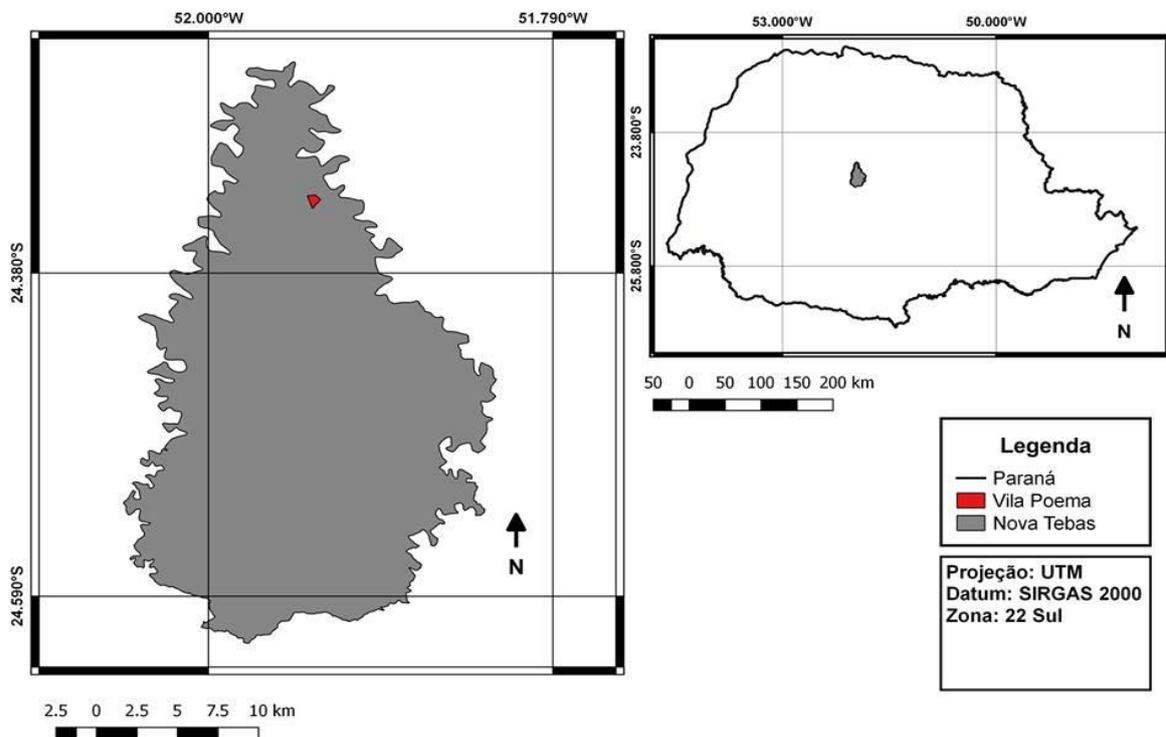
Ainda segundo o autor, outro impacto ambiental relevante é a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, pois atuam como transportadoras desses contaminantes para outras áreas. Se uma região agrícola estiver próxima a um manancial hídrico que abastece um município, toda população está sujeita a contaminação. A exposição a esses produtos causa doenças diversas, como cânceres, alergias, lesões renais, Doença de Parkinson, fibrose pulmonar entre outras (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

## 4 MATERIAL E METODOS

### 4.1 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado no município de Nova Tebas, Paraná (Figura 1), localizado na Mesorregião Centro Norte do Paraná, pertencendo ao terceiro planalto ou Planalto de Guarapuava, possuindo posição geográfica 24° 26' 17" S, 51° 56' 43" W, e altitude de 650 metros (LUZ; HAHN, 2011; INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2016).

Figura 1 – Mapa de localização da área de estudo pertencente ao município de Nova Tebas – PR.



Fonte: Autoria própria

O município de Nova Tebas possui área da unidade territorial de 545,686 km<sup>2</sup> e população de 7.398 habitantes, fazendo divisa com os municípios de Jardim Alegre, Iretama, Arapuã, Roncador, Manoel Ribas e Pitanga. A economia do município tem destaque para, culturas temporárias de milho, soja e cana-de-açúcar, além da pecuária e criação de outros animais segundo Censo Agropecuário de 2006 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA, 2016a; INSTITUTO

BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016b; INSTITUTO DE TERRAS, CARTOGRAFIA E GEOCIÊNCIAS, 2009).

A respeito da vegetação, o município de Nova Tebas situa-se numa área de Floresta Ombrófila Mista Montana com ocorrência, ao norte do município de uma área de transição para a Floresta Estacional Semidecidual Montana. Apresenta clima predominante da região, segundo a classificação de Köppen, do tipo subtropical úmido mesotérmico, sem estação seca definida, com tendência de concentração de chuvas nos meses de verão. A temperatura média anual gira em torno de 20° C, com verões frescos e invernos com ocorrência de geadas severas. (NOVA TEBAS - PR, 2013)

Segundo o levantamento de reconhecimento dos solos publicado pelo Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos - SNLCS, no município de Nova Tebas há predomínio de Neossolos Litólicos, Latossolos Vermelhos e Nitossolos Vermelhos. O município está situado sobre a Placa Sul-Americana, na bacia intracratônica do Paraná, no Terceiro Planalto Paranaense, abrangendo uma área recoberta de rochas ígneas efusivas básicas pertencentes à Formação Serra Geral, representada por um espesso pacote de lavas basálticas continentais (EMPRESA BRASILEIRA DE PEQUISA AGROPECUÁRIA, 2007; PLANO MUNICIPAL DE SANEAMENTO BÁSICO MUNICÍPIO DE NOVA TEBAS / PR, 2013).

Mais especificamente, o estudo foi realizado no empreendimento rural Sítio São Pedro, de posições geográficas 24° 18' 23" S, 51° 57' 45.58" W. A propriedade possui área total de 300 alqueires. A produção é baseada nas culturas orgânicas de acerola, manga, morango, mamão, milho, feijão, mandioca, laranja, abacate, banana, hortaliças e outras frutíferas. O empreendimento conta com a certificação orgânica IBD (Inspeções e Certificações Agropecuárias e Alimentícias) para garantia de qualidade e credibilidade do produto ao consumidor, sendo a única certificadora 100% brasileira com atuação internacional e a maior da América Latina (IBD CERTIFICAÇÕES, 2017).

#### **4.2 Coleta de Solo**

Para quantificação dos microrganismos presentes naturalmente na área de estudo, foram realizadas três coletas de solo, com intervalos de 100 dias entre a primeira e segunda coletas, e 35 dias entre a segunda e terceira, sendo as coletas realizadas nos dias 14/12/2016, 24/03/2017 e 28/04/2017.

Antes de realizar a coleta do solo retirou-se a serapilheira e todo material orgânico presente no solo. A coleta foi realizada com auxílio de trena, enxadão, pá e posterior armazenagem em sacos plásticos identificados. Os sacos plásticos foram transportados abertos, para evitar possível alteração na temperatura e consequente variação na população dos microrganismos.

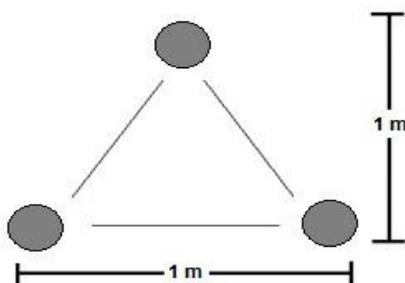
Como o estudo também visou comparar sítios amostrais com e sem uso dos biofertilizantes, foram adotadas áreas controle, contemplando áreas naturais sem aplicação do biofertilizante, e áreas tratadas, com aplicação. Sendo assim, para área controle e tratada, igualmente foram demarcados três sítios amostrais cada totalizando seis sítios amostrais (Figura 2). Dentro de cada sítio amostral coletou-se três subamostras, com cada uma em formato de círculo com 20 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade, formando uma área amostral triangular conforme Figura 3 (SANTOS, 2015).

**Figura 2 – Localização dos sítios amostrais tratados e controle da na área de estudo da propriedade rural Sítio São Pedro no município de Nova Tebas – PR.**



Fonte: Adaptado software Google Earth

**Figura 3 – Representação esquemática da distribuição das três subamostras de cada sítio amostral.**



Fonte: Adaptado de Santos (2015)

Sendo assim, a aplicação do biofertilizante foi realizada nos três sítios amostrais tratados (Figura 2). Ressaltando que para a primeira coleta, a área tratada ainda não tinha recebido aplicação do mesmo. O incremento orgânico que foi aplicado em solo neste estudo, é o biofertilizante líquido, composto por nutrientes, melaço, água, substrato de resíduo de mandioca manipueira e microrganismos inoculados, sendo fungo *Trichoderma* spp. e bactéria *Bacillus subtilis*.

O biofertilizante foi manipulado na empresa CELF – Energias Renováveis e Bioenergia, localizada no município de Campo Mourão, Paraná, um dia antes de cada coleta, com fungos *Trichoderma* spp. em concentração de  $1 \times 10^{10}$  UFC/g de pc, em formulação de pó molhável, bactérias *Bacillus subtilis* em concentração  $1 \times 10^{11}$  UFC/g de inóculo, de formulação líquida, em meio de resíduo de mandioca manipueira de concentração 175 mL/L. O inóculo líquido das bactérias foi realizado em concentração de 45% resíduo de mandioca manipueira, 45% água, 10% melaço e pH corrigido para 7,0.

A composição de fungos, bactérias e água foi realizada na proporção em litros de bactérias:fungos:água = 1:1:20, diluindo-se 50g de *Trichoderma* spp. em 950 ml de água, e 300 mL de *Bacillus subtilis* em 700 mL de água, sendo realizada mistura de 1L de fungos com 1L de bactérias diluídos em 18L de água. Para pulverização do biofertilizante nos sítios amostrais tratados foi utilizado pulverizador costal JACTO PJH de 20 litros de capacidade, sendo realizada manualmente em um raio de dois metros do centro de cada sítio amostral (Figura 4).

**Figura 4 – A: Pulverização do biofertilizante em um sítio amostral na área tratada. B: Aplicação do biofertilizante utilizando o pulverizador costal PJH.**



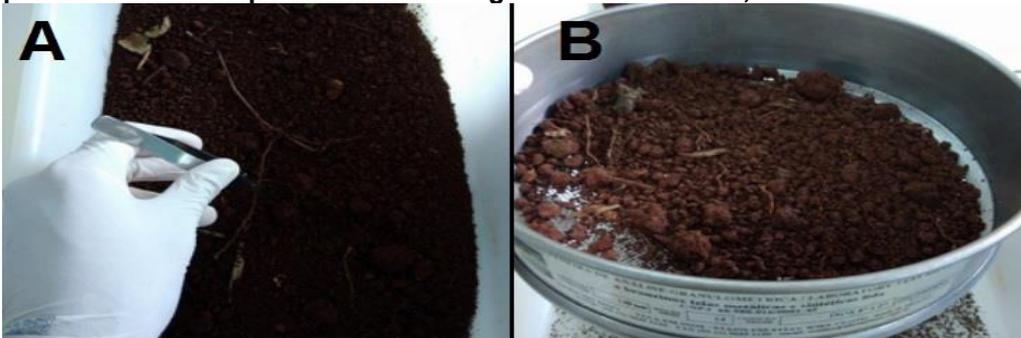
Fonte: Autoria própria

As três subamostras de cada sítio amostral foram unidas e homogeneizadas, totalizando uma amostra composta por sítio, acondicionadas em sacos plásticos

devidamente identificados. Em seguida as amostras foram levadas ao laboratório de Ecologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Campo Mourão, para o processamento.

Em laboratório, o solo foi distribuído em bandejas plásticas, para auxílio na remoção de materiais indesejados (raízes, galhos e folhas) com auxílio de pinça. Em seguida, necessitou ser peneirado com peneira de análise granulométrica de tela metálica com 1,40 mm de malha (Figura 5), mantendo protegido da luz, calor e excesso de umidade, sendo avaliado no dia da coleta. Para estabilização da umidade, foi utilizado 100g de solo de cada sítio amostral armazenado em estufa de secagem e esterilização THELGA 1500W em temperatura constante de 30 °C (Figura 6), sendo pesado todos os dias com auxílio da balança de precisão MARTE AY220 até a estabilização de umidade, quando a amostra de solo não variar o peso devido à perda total de água (ALVES, 2013).

**Figura 5 – A: Remoção de materiais indesejados do solo com auxílio de pinça. B: Processo de peneiramento com peneira de análise granulométrica de 1,40 mm de malha.**



Fonte: Autoria própria

**Figura 6 – Estabilização de 100g de solo de cada sítio amostral em estufa de secagem e esterilização a temperatura constante de 30 °C.**

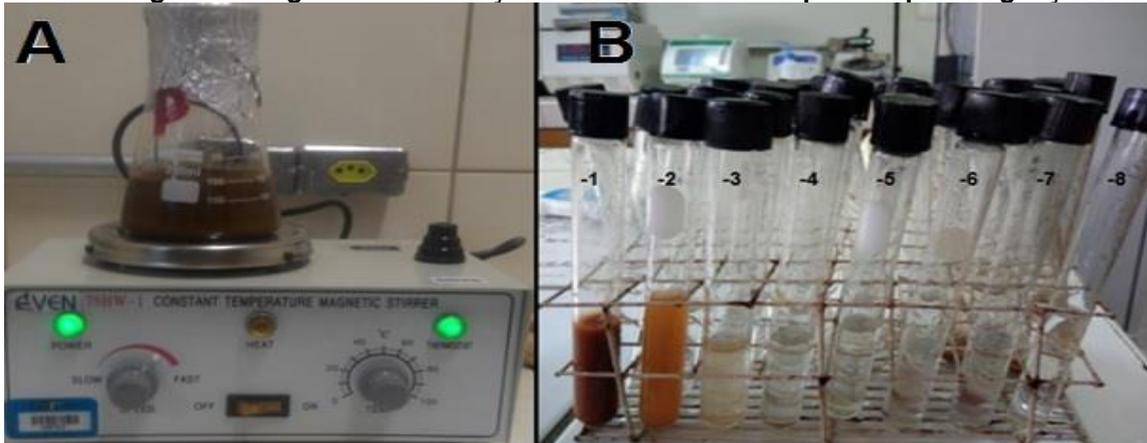


Fonte: Autoria própria

Posteriormente realizou-se diluição em série das amostras, onde uma alíquota de 10 g de cada amostra foi diluída em 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) estéril,

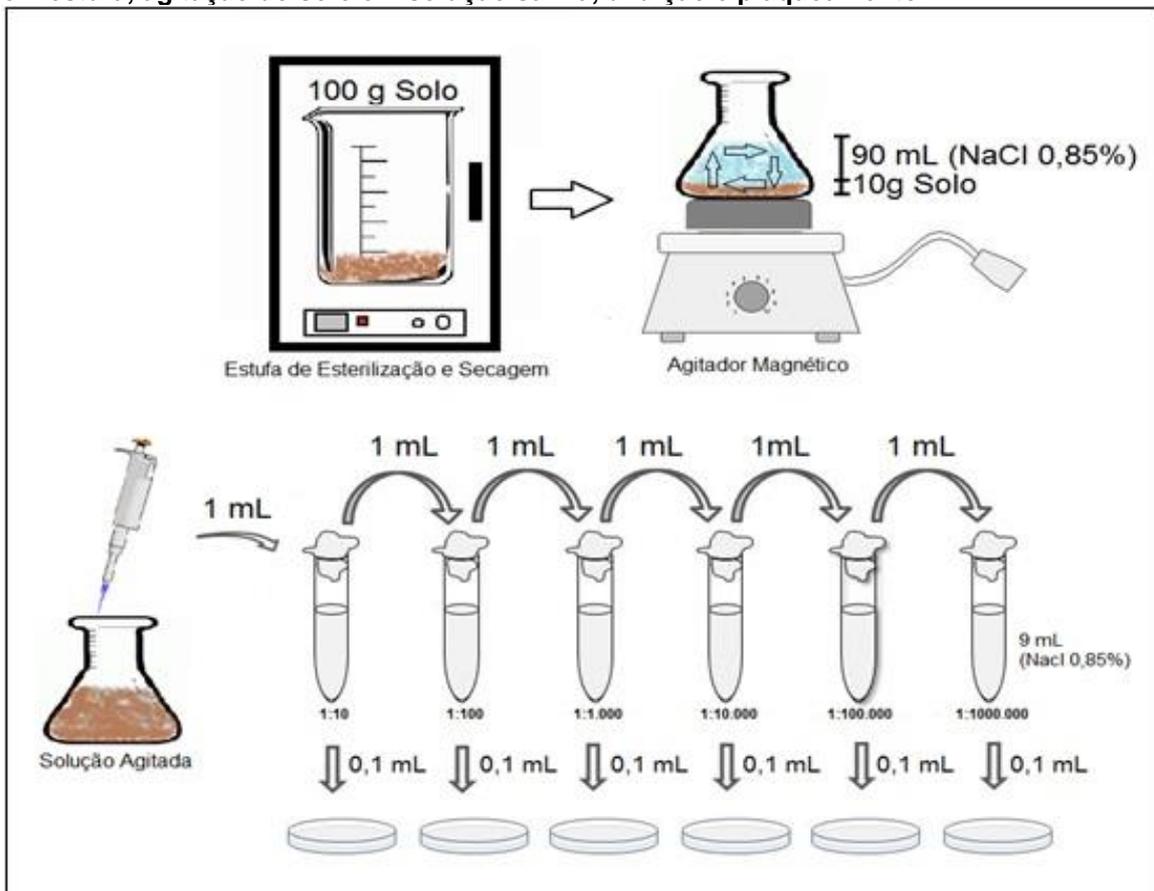
mantendo sob agitação em agitador magnético EVEN 78HW-1 com rotação rápida durante 40min (Figura 7). Em seguida, para realização da diluição seriada, foi aplicado 1 mL da solução obtida em 9mL de solução salina estéril, sendo esta diluição de  $10^{-1}$ . A representação esquemática da metodologia aplicada está resumida na Figura 8.

**Figura 7 – Metodologia utilizada para o plaqueamento do solo. A: Mistura de solo e solução salina em agitador magnético. B: Diluição seriada da mistura após tempo de agitação.**



Fonte: Autoria própria

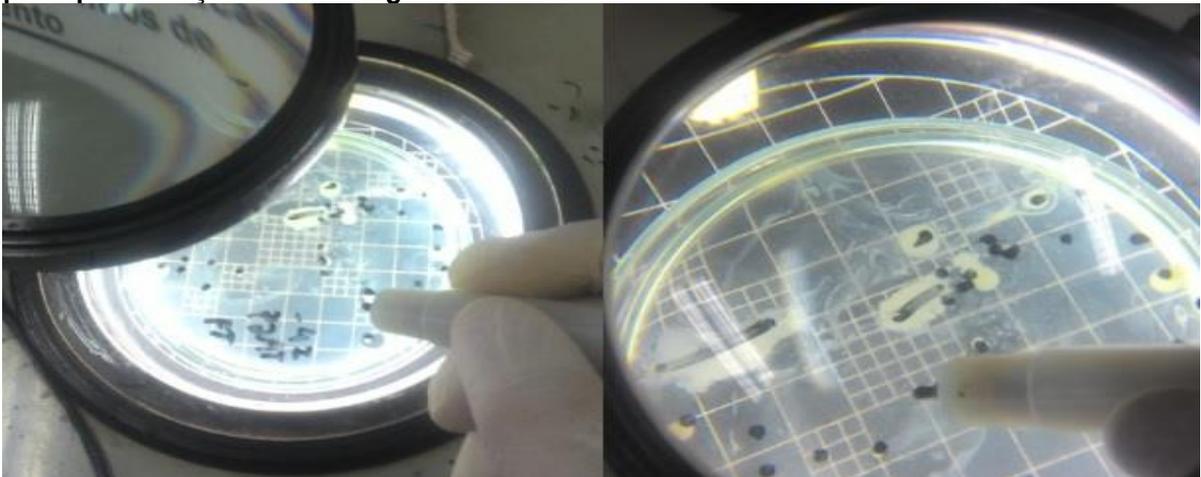
**Figura 8 – Representação esquemática da metodologia utilizada para estabilização de umidade em estufa, agitação do solo em solução salina, diluição e plaqueamento.**



Fonte: Autoria própria

O procedimento foi repetido até a diluição  $10^{-6}$  para cada sítio amostral, com posterior auxílio do agitador de soluções VORTEX MIXER KMC-1300V para homogeneização de cada diluição, da solução presente nos tubos de ensaio, e respectivo plaqueamento. Para quantificação de fungos totais, bactérias totais e bactérias produtoras de celulase foi utilizado o contador de colônias PHOENIX CP 600 (Figura 9) (ALVES, 2013).

**Figura 9 – Contagem de colônias realizada através do contador de colônias PHOENIX CP 600, para quantificação dos microrganismos.**



Fonte: Autoria própria

Para cálculo das unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC/g), após a quantificação dos microrganismos, utilizou-se a metodologia de contagem de colônias de bactérias e fungos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2012), seguindo a fórmula:

$$\text{UFC/g} = \text{número médio de colônias nas placas} \times \text{diluição da amostra} \times 10^*$$

\* este 10 refere-se ao fato de terem sido plaqueados apenas 100  $\mu\text{L}$  de suspensão.

A contagem da população de fungos e bactérias foi realizada através da técnica de contagem em placas, calculando-se a média de duas repetições por diluição, sendo consideradas ideais, as contagens que variaram de 30 a 300 colônias (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2012).

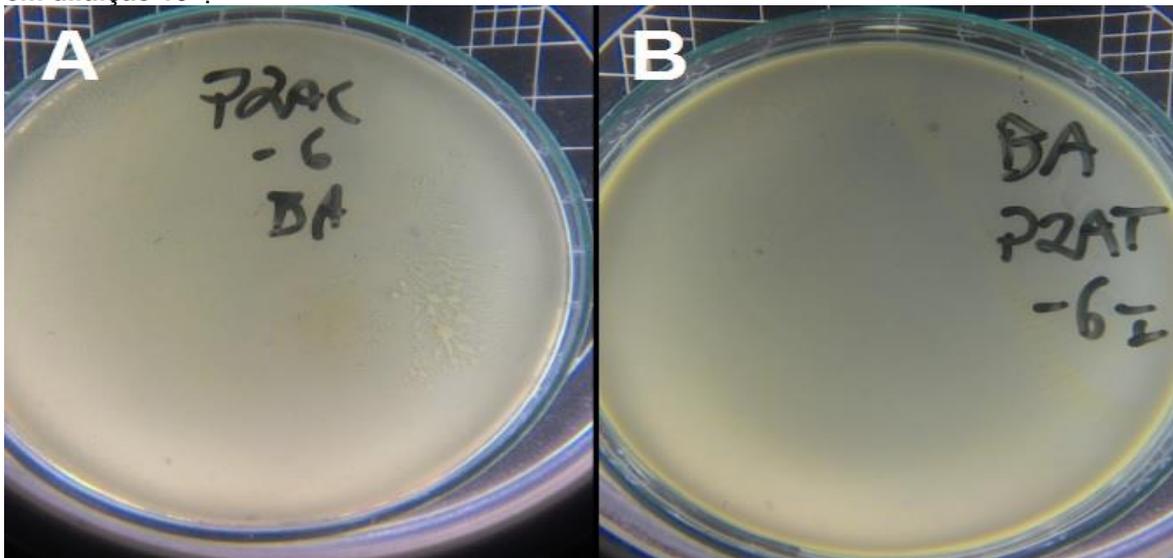
### 4.3 Bactérias Aeróbias Totais

Para o crescimento de bactérias aeróbias foi utilizado o Meio Luria-Bertani, de composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ): 10,0 Triptona; 5,0 Extrato de levedura; 10,0 NaCl; 15,0 Ágar; em água destilada de pH 7,0. O meio foi autoclavado a  $120^{\circ}\text{C}$  por 15 min em seguida vertido em placas de Petri, inoculando-se 0,1ml das diluições  $10^{-4}$  até  $10^{-6}$ . Sendo realizadas duas repetições para cada diluição (ALVES, 2013).

As placas foram incubadas a  $27^{\circ}\text{C}$  durante 48h antes de ser realizada a primeira contagem, realizando-se contagens diárias até estabilização do crescimento, sendo consideradas ideias para quantificação, as contagens que variaram de 30 a 300 colônias. A contagem da população de bactérias foi realizada através da técnica de contagem de placas, calculando-se a média de duas repetições por diluição (ALVES, 2013; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2012).

Os valores de UFC/g foram calculados para as diluições  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  para primeira e segunda coletas realizadas, e alterado para as diluições  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  para a terceira coleta. A alteração na diluição após a segunda coleta se fez necessária devido alta concentração de bactérias aeróbias totais antes e após estabilização do crescimento (Figura 10), tanto para área controle quanto para área tratada, não sendo ideal para a metodologia de técnica de contagem de placas.

**Figura 10 – Colônias de bactérias aeróbias totais antes da estabilização do crescimento em área controle e área tratada. A: Placa da área controle em diluição  $10^{-6}$ . B: Placa de área tratada em diluição  $10^{-6}$ .**



Fonte: Autoria própria

#### 4.4 Bactérias Produtoras de Celulase

Para análise das bactérias produtoras de celulase foram utilizadas as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , sendo inoculadas em placas de Petri contendo o meio Luria-Bertani adicionado 0,2% de carboximetilcelulose, incubadas, a  $27^{\circ}\text{C}$ , durante 48h antes da primeira contagem, realizando-se contagens diárias durante três dias até a obtenção da estabilização do crescimento (ALVES, 2013; REINHOL-HUREK et al.,1993).

Após estabilização do crescimento, as placas foram imersas em solução de vermelho congo ( $1\text{mg.mL}^{-1}$ ) por 30 min e lavadas com solução de NaCl 1M (Figura 11). Devem ser consideradas positivas as colônias que formarem, ao redor de si, um halo transparente, indicativo das áreas de hidrólise, correspondente à degradação do carboximetilcelulose (CMC), utilizado como substrato celulósico (Figura 12). A contagem da população de bactérias positivas foi realizada calculando-se a média de duas repetições por diluição (ALVES, 2013; FLORENCIO, 2011; REINHOL-HUREK et al.,1993).

Os valores de UFC/g foram calculados para diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  para primeira e segunda coletas realizadas, e alterado para as diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  para a terceira coleta. A alteração na diluição após a segunda coleta se fez necessária devido alta concentração de bactérias produtoras de celulase após estabilização do crescimento, tanto para área controle quanto para área tratada, não sendo ideal para a metodologia de técnica de contagem de placas.

**Figura 11 – Metodologia de imersão em solução Vermelho Congo para quantificação de bactérias produtoras de celulase. A: Aplicação da solução em meio de cultura. B: Placas imersas. C: Lavagem das placas com solução NaCl 1M.**



Fonte: Autoria própria

**Figura 12 – Placas de Petri contendo colônias de bactérias produtoras de celulase positivas indicadas pelas setas, identificadas pelo halo transparente que formam ao redor de si em reação de hidrólise.**



Fonte: Autoria própria

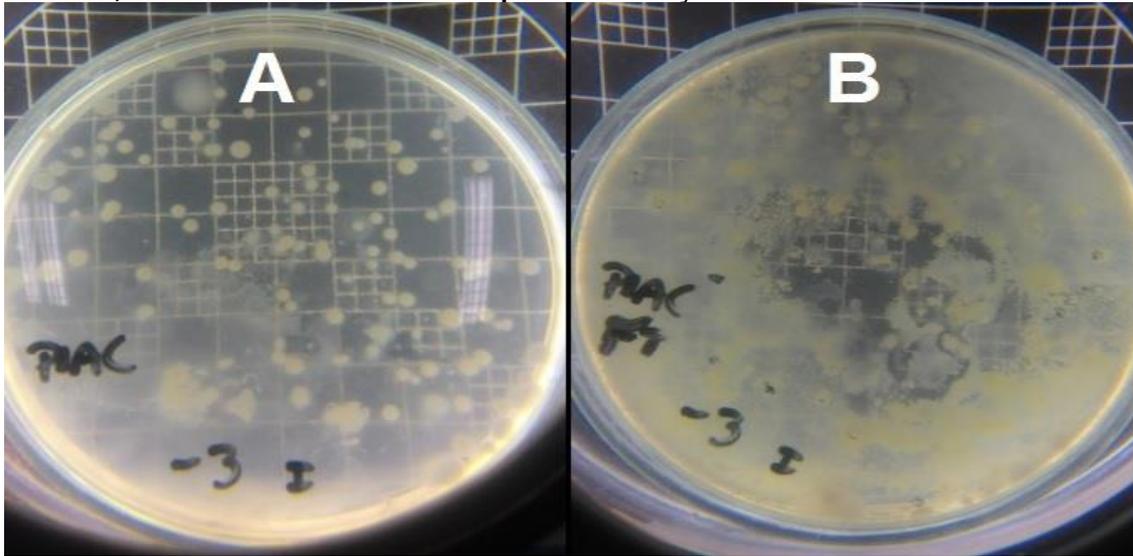
#### 4.5 Fungos Totais

Para avaliação da população de fungos foi utilizado o meio Martin's-Bengala Agar, com composição (g.L<sup>-1</sup>) de: 10,0 glicose; 5,0 peptona; 1,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,3 mL rosa-bengala 1%; 15,0 ágar; 1000 mL água destilada; pH corrigido para 5,5 com solução HCl 0,1 mol; e vertido em placas de Petri.

Em seguida foram utilizadas 0,1ml das diluições seriadas de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-4</sup> e inoculadas nas placas de Petri, levadas para estufa e incubadas por aproximadamente 4 a 5 dias a temperatura de 27° C, sendo realizada a contagem de colônias todos os dias. (ALVES, 2013).

Os valores de UFC/g foram calculados para diluições 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-4</sup> para primeira e segunda coletas realizadas, e alterado para as diluições 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-6</sup> para a terceira coleta. A alteração na diluição após a segunda coleta se fez necessária devido alta concentração de fungos após estabilização do crescimento (Figura 13), tanto para área controle quanto para área tratada, não sendo ideal para a metodologia de técnica de contagem de placas.

**Figura 13 – Colônias de fungos totais antes e depois da estabilização do crescimento na segunda coleta. A: Ponto 1 da área controle antes da estabilização de crescimento das colônias; B: Ponto 1 da área controle após estabilização.**



Fonte: Autoria própria

#### 4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Bioestat 5.3, igualmente para as bactérias aeróbias totais, bactérias produtoras de celulase e fungos totais. Primeiramente, foi realizada a estatística descritiva, onde analisou-se os dados quantitativos de UFC/g de solo obtidos e fez-se a comparação estatística entre as áreas controle e tratada nos três períodos de coleta. Em seguida foi realizado teste não paramétrico, devido ausência de normalidade dos dados amostrais através do Teste *Shapiro-Wilk*, aplicando-se análise de variância não paramétrica com Teste *Kruskal-Wallis* a priori, para análise da diferença as áreas controle e tratada, e respectivos períodos de coleta. A posteriori foi realizado o Teste *Dunn*, para confirmação da diferença entre as áreas.

#### 4.7 Evolução da Comunidade Microbiológica

A observação da evolução da comunidade microbiológica na área tratada com biofertilizante foi realizada a partir da comparação quantitativa dos fungos e bactérias. Inicialmente, a comparação foi realizada com as amostras de solo coletadas das áreas controle e tratada anterior à primeira aplicação do biofertilizante. Em seguida, após a primeira coleta e aplicação do biofertilizante, as duas observações restantes foram

realizadas com intervalo de 100 dias entre a primeira e segunda coleta, e 35 dias entre a segunda e terceira coleta, analisando o crescimento populacional dos microrganismos e a consequente eficiência do biofertilizante aplicado utilizando os procedimentos citados anteriormente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise Química do Solo

A análise química dos macronutrientes do solo foi realizado pelo Laboratório Santa Rita, localizado no município de Mamborê, Paraná, sendo realizada para comparação entre amostras de solo da área controle e área tratada. Quanto ao efeito da aplicação do biofertilizante, observa-se que resultou em valores superiores principalmente de Fósforo, Carbono Orgânico Total (COT), Cálcio, Magnésio e Potássio para área tratada (Tabela 1).

**Tabela 1 – Análise química do solo realizada pelo Laboratório Santa Rita dos macronutrientes do solo coletado no município de Nova Tebas - PR.**

		Resultado de Análise Química do Solo	
		Amostra	
	Macronutrientes	Área Controle	Área Tratada
mg/dm <sup>3</sup>	Fósforo (P)	25,51	128,48
	Carbono Orgânico Total (COT)	22,99	29,31
cmolc/dm <sup>3</sup>	pH em CaCl <sub>2</sub>	5,82	6,58
	Alumínio (Al <sup>3+</sup> )	0	0
	Acidez Potencial (H <sup>+</sup> +Al <sup>3+</sup> )	3,83	2,64
	Cálcio + Magnésio (Ca <sup>2+</sup> +Mg <sup>2+</sup> )	14,08	17,01
	Cálcio (Ca <sup>2+</sup> )	10,74	13,44
	Magnésio (Mg <sup>2+</sup> )	3,34	3,57
	Potássio (K <sup>+</sup> )	0,52	1,28
	Soma de Bases (SB)	14,6	18,29
	C.T.C	18,43	20,93
	%	Saturação por bases (V%)	79,21
Saturação complexo de troca	Saturação por alumínio (m%)	0	0
	Saturação por cálcio (%Ca <sup>2+</sup> )	58,27	64,21
	Saturação por magnésio (%Mg <sup>2+</sup> )	18,12	17,06
	Saturação por potássio (%K <sup>+</sup> )	2,82	6,12
	Relações	Cálcio / Magnésio	3,22
Cálcio / Potássio		20,65	10,5
Magnésio / Potássio		6,42	2,79

Fonte: Laboratório Santa Rita

### 5.1.1. Fósforo (P)

O fósforo (P) é um macronutriente indispensável para crescimento e reprodução das plantas, podendo limitar seu crescimento em deficiência no solo. Além disso, desempenha função-chave principalmente na fotossíntese, no metabolismo de açúcares, resistência a doenças, baixas temperaturas e falta de umidade. Também promove a formação inicial e o desenvolvimento da raiz influenciando no crescimento e produção da planta sendo vital para a formação da semente (MALAVOLTA, 1996).

O teor de fósforo pós aplicação do biofertilizante teve valor extremamente elevado na área tratada, comparado à área controle, sendo de 128,48 mg/dm<sup>3</sup> e 25,51 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente. O biofertilizante aplicado no solo resultou em aumento de aproximadamente cinco vezes os níveis de P, se comparados à área não tratada.

Um dos fatores que possivelmente contribuíram com o aumento de P na área tratada, é o fornecimento no solo do nutriente pela própria aplicação do biofertilizante, contendo em sua composição resíduo de mandioca manipueira, com concentração de fósforo de 94 g/Kg (Tabela 2), segundo laudo de análise do Laboratório de Análises Ambientais e Agronômicas Acqua Sollus, localizado no município de Campo Mourão - PR.

**Tabela 2 – Laudo de análise dos macronutrientes do resíduo de mandioca manipueira presente na composição do biofertilizante.**

Resultado de Análise Físico-Químico		
Macronutrientes	Unidades	Resultado
Fósforo	g/Kg	94,00
Potássio	g/Kg	64,00
Nitrogênio	g/Kg	53,20

Fonte: Laboratório de Análises Ambientais e Agronômicas Acqua Sollus

Além do nutriente disponibilizado pelo biofertilizante, segundo Gaid e Gaur (1991) o aumento de P no solo ocorre devido a capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis por microrganismos, como comprova outros estudos mencionando a espécie *Trichoderma harzianum* e espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, presente na composição do biofertilizante, como microrganismos potenciais disponibilizadores de fósforo, contribuindo para suplementação das necessidades nutricionais das plantas com esse mecanismo (ALTOMARE et al., 1999; GOMES et al., 2010).

### 5.1.2. Carbono Orgânico Total (COT)

O aumento do teor de carbono orgânico total (COT) no solo é extremamente importante para produção agrícola, influenciando em maior retenção de umidade, melhor estruturação do solo, e maior retenção de cátions (SOUZA; MELO, 2003).

Conforme análise química do solo, COT os níveis também foram superiores nas áreas tratadas quando comparados a área controle, sendo 29,31 g/dm<sup>3</sup> e 22,99 g/dm<sup>3</sup> respectivamente, comprovando o efeito benéfico do biofertilizante aplicado durante o período do experimento. Conforme Lovato et al. (2004) as maiores taxas de carbono (C) no solo estão relacionadas a um maior aporte de material orgânico pelas culturas, principalmente pela capacidade de retenção de C da matéria orgânica, sendo observado pelo autor, aumento de produtividade com aumento do COT do solo, ou seja, com o desenvolvimento vegetacional da área, conseqüentemente há aumento no armazenamento de carbono do solo.

Juntamente com a aplicação do biofertilizante, outra variável que influencia em conjunto no aumento do COT é o porte vegetacional. Em estudo de fertilidade do solo em cerrado e pastagem na savana brasileira, os autores compararam pastagens de *Brachiaria decumbens* em condições degradada e produtiva, e foi observado maior teor de armazenamento de carbono em áreas de vegetação produtiva com maior profundidade de enraizamento. Sendo assim, uma possível justificativa do aumento de COT nas áreas tratadas, além da ação dos microrganismos no solo contribuindo para aumento nos níveis de carbono, é o porte vegetacional (LILIENFEIN et al., 2003).

Diferente da primeira coleta, onde a paisagem da área de estudo contemplava vegetação com predomínio de gramíneas (Figura 14), a vegetação presente na área na segunda coleta sofreu alterações, constituindo de formações herbáceas e semi-arbustivas (Figura 15), o que possivelmente contribuiu para aumento do COT no solo.

**Figura 14 – Sítio amostral na primeira e segunda coleta realizada respectivamente. A: Predomínio de vegetação herbácea. B: Predomínio de formações semi-arbustivas e arbustivas**



Fonte: Autoria própria

**Figura 15 – Área de estudo pertencente a propriedade rural Sítio São Pedro no município de Nova Tebas – PR na segunda coleta e aplicação realizada.**



Fonte: Autoria própria

### **5.1.3. Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )**

O cálcio contribui significativamente para a formação da fertilidade do solo, contribuindo para redução de acidez com deslocamento do hidrogênio das partículas da superfície do solo. É um nutriente essencial para os microrganismos que degradam a matéria orgânica, auxiliando bactérias a fixarem melhor o nitrogênio atmosférico (N) em formas utilizáveis pelas leguminosas e aumentando a absorção de todos os outros nutrientes pelas raízes das plantas (MALAVOLTA, 1996).

O aumento constatado desse macronutriente no solo, de  $10,74 \text{ cmolc/dm}^3$  na área controle para  $13,44 \text{ cmolc/dm}^3$  na área tratada, é essencial para o melhor desenvolvimento vegetal, sua deficiência no solo prejudica o desenvolvimento das plantas causando lento desenvolvimento do sistema radicular e do crescimento das folhas, reduz a nodulação em leguminosas e limita a absorção de água (MALAVOLTA, 1996).

Um possível fator de elevação nos níveis de cálcio para a área tratada, é a capacidade de solubilização desse nutriente pelos microrganismos presentes no biofertilizante aplicado. Em estudo de inoculação de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento em feijão-caupi, foram testados seis isolados de *Trichoderma* e todos foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio, apresentando *Trichoderma longibrachiatum* o melhor resultado para solubilização (OLIVEIRA, 2012).

Em estudo de isolamento e análise da atividade de microrganismos solubilizadores de fosfato, observou-se resultados de um isolado bacteriano do gênero *Bacillus*, capaz de solubilizar fosfato de cálcio, o que também possivelmente contribuiu com aumento dos níveis do nutriente no solo (SANTOS et al., 2010)

#### **5.1.4. Magnésio (Mg<sup>2+</sup>)**

O magnésio é um macronutriente essencial na nutrição vegetal, sendo constituinte de corretivos de acidez e de adubos. O Mg é classificado como um nutriente secundário, com quantidades inferiores ao cálcio (Ca), entretanto é o mais importante no solo para ativação de sistemas enzimáticos e para atividade fotossintética, pois a clorofila contém um composto rico em magnésio. Sua deficiência pode causar alterações na cor das plantas, folhas quebradiças e mais finas e redução da fotossíntese, influenciando no crescimento em geral da cultura (GOMES et al., 2008; MALAVOLTA, 1996).

O aumento desse macronutriente na área tratada em relação a área controle também foi observado, sendo 3,57 cmolc/dm<sup>3</sup> e 3,34 cmolc/dm<sup>3</sup> respectivamente. O aumento de Mg na área tratada possivelmente ocorreu devido aos mecanismos de solubilização de fosfatos, micronutrientes e minerais pelos microrganismos, principalmente *Trichoderma* spp. que é solubilizador de ferro manganês e magnésio, essenciais para o metabolismo vegetal (JULIATTI; RESENDE, 2014).

#### **5.1.5. Potássio (K<sup>+</sup>)**

O potássio (K) é conhecido principalmente por desempenhar uma função vital na fotossíntese e em muitos processos. A deficiência de K nas plantas impede sua utilização de água do solo, diminui o crescimento das plantas, tornando-as sujeitas as doenças e a perda de resistência (RAIJ, 1990).

O aumento do nível de potássio para área tratada foi praticamente duas vezes maior quando comparado a área controle, sendo 1,28 cmolc/dm<sup>3</sup> e 0,52 cmolc/dm<sup>3</sup> respectivamente. Esse aumento possivelmente está relacionado à incorporação no solo de K pela própria aplicação do biofertilizante, contendo concentração de 64g/Kg do resíduo mandioca manipueira utilizado (Tabela 2).

Outro fator de aumento de K no solo, observado em outros experimentos, está ligado à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos, principalmente por fungos ectomicorrízicos, saprofiticos e bactérias, que reagem com os minerais e liberam maior quantidade de K disponível no solo. Logo, essa produção de ácidos reduz o pH do solo aumentando a acidez potencial, entretanto não houve correlação neste estudo da possível produção de ácidos e redução do pH do solo (WALLANDER; WICKMAN, 1999).

#### **5.1.6. C.T.C. (Capacidade de Troca Catiônica)**

A capacidade de troca catiônica (CTC) é uma propriedade diretamente afetada pela acidez, sendo responsável pelo equilíbrio de íons. O valor de CTC do solo é resultado dos colóides minerais e orgânicos e pH do solo. Solos menos intemperizados, mais férteis, possuem maiores teores de cálcio, magnésio ou potássio, como foi observado para a área tratada, onde o mecanismo de solubilização de nutrientes pelos microrganismos disponibilizou maior quantidade dos mesmos, desta forma, a área tratada apresenta maior capacidade de troca catiônica, quando comparada a área controle, sendo encontrado os níveis de 20,93 cmolc/dm<sup>3</sup> e 18,43 cmolc/dm<sup>3</sup> respectivamente (HIRATA; FILHO, 2011; SILVA; SOUZA, 1998).

A importância do aumento na CTC está ligada principalmente a acidez do solo, onde solos mais intemperizados, se tornam mais ácidos pela perda dos cátions e substituição destes por Al<sup>3+</sup> e H<sup>+</sup>, sendo necessário para correção o aumento de cálcio, magnésio, potássio e fósforo, ou seja, o aumento desses macronutrientes disponibilizados com o efeito do biofertilizante nas áreas tratadas provocou o consequente aumento na CTC, reduzindo os efeitos de pH reduzido em solo agrícola (HIRATA; FILHO, 2011).

### **5.1.7. Saturação por bases (V%)**

Em estudo realizado por Ronquim (2010), a saturação por bases (V%) se mostrou um ótimo indicativo de fertilidade do solo, sendo classificados como solos férteis,  $V\% > 50\%$  e solos pouco férteis  $V < 50\%$ . Alguns solos pouco férteis podem ser muito pobres em cátions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  e apresentar teor de alumínio elevado, aumentando a acidez do solo podendo causar toxicidade às plantas, o que não ocorre no solo da área de estudo em questão, pois apresenta teores de alumínio zero e consequente elevado nível de saturação por bases, não prejudicando o crescimento vegetal.

O nível superior de saturação por bases encontrado para área tratada de 87,39% é consequência do aumento de macronutrientes, sendo resultado da ação do inóculo no solo, onde possivelmente, com a solubilização de nutrientes realizada pelos microrganismos aplicados, a tendência é de aumento na disponibilidade dos mesmos para as plantas, diferente do nível de saturação por bases da área não tratada de 79,21%, onde há redução da atividade metabólica e consequentemente os cátions são reduzidos. Esse aumento na V% observado é de grande importância para melhoria no desenvolvimento vegetal e consequente aumento na produtividade das culturas, pois, ainda segundo Ronquim (2010), quanto mais reduzido for o índice V%, menor quantidade de cátions há disponível no solo, caracterizando solos lixiviados e arenosos com valores muito reduzidos de V%.

Em estudo de avaliação de efeito de saturação por bases sobre a produção de material seco e nutrição mineral do milho, os resultados demonstram que com o aumento do valor de V%, há influência positiva na produção de material seco e no crescimento e nutrição mineral do milho, justificado pela disponibilidade dos nutrientes para as plantas e pelo equilíbrio entre os mesmos no solo (MUNOZ HERNANDEZ; SILVEIRA, 1998).

### **5.1.8. Acidez Potencial e pH**

A acidez potencial do solo e o pH estão diretamente relacionados, nesse estudo, ao índice de saturação por bases (V%) e a capacidade de troca catiônica (C.T.C.) mencionados, onde baixos valores de V% e C.T.C. indicam pequenas

quantidades de cátions e macronutrientes, causando redução de pH e consequente aumento de acidez potencial.

No presente estudo, não houve correlação entre a redução de pH e a produção de ácidos orgânicos/inorgânicos pelos microrganismos, o que é de extrema importância para as culturas em solo agrícola, pois níveis reduzidos de pH caracterizam solos ácidos, limitando o desenvolvimento das culturas. Segundo estudo realizado por Narloch (2002), a solubilização de fosfatos realizada por mecanismos dos microrganismos para a disponibilização de nutrientes ocorre principalmente com a produção de ácidos orgânicos/inorgânicos e consequente aumento da acidez do solo.

A correlação não existente mencionada, também foi observada em estudo de estímulo da solubilização de fosfato resultante da co-inoculação da bactéria *Burkholderia cepacia*, onde constatou-se uma baixa produção de ácidos pelos microrganismos e consequente alcalinização do meio utilizado, entretanto houve solubilização significativa de fosfato pela bactéria mesmo com meio alcalino (BRAZ, 2011).

Reforçando o argumento da falta de correlação entre pH e os ácidos produzidos pela microbiota, em estudo de solubilização de  $AlPO_4$  com microrganismos, o autor constatou que a produção de ácidos orgânicos é realmente um importante e eficiente mecanismo de solubilização de nutrientes, entretanto, não a única eficaz, como se supõe na grande maioria das publicações, mencionando a necessidade de estudos adicionais sobre solubilização de nutrientes por microrganismos (ILLMER; BARBATO; SCHINNER, 1994).

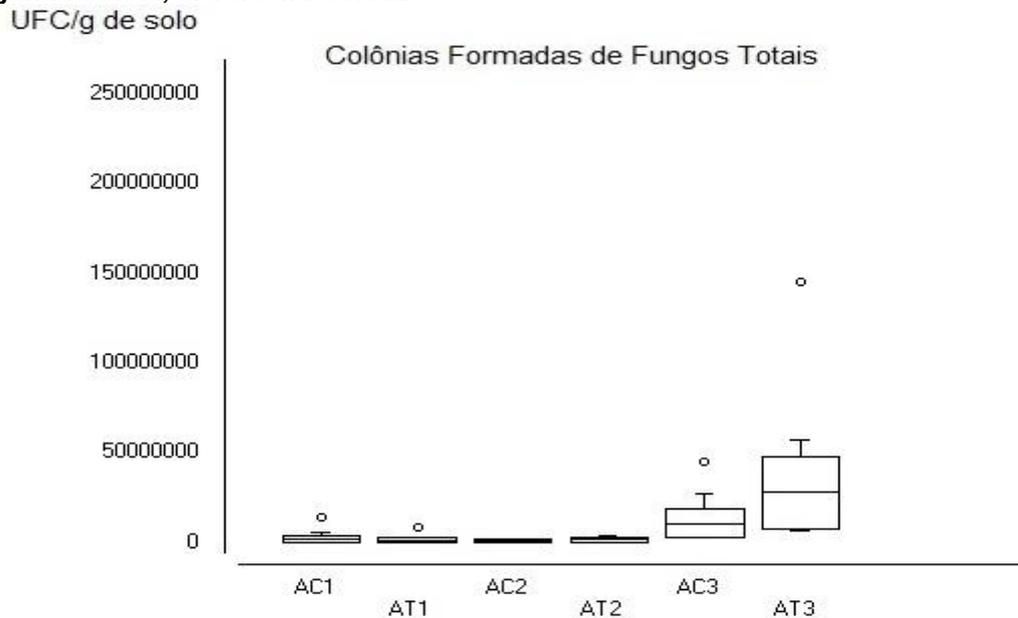
## 5.2 Quantificação de Fungos Totais

Como análise inicial dos valores de UFC/g de solo, foram obtidos os dados quantitativos através da estatística descritiva para área controle e área tratada nos três períodos de coleta (Figura 16), sendo as coletas realizadas nos dias 14/12/2016, 24/03/2017 e 28/04/2017 respectivamente, onde espera-se um aumento gradual de UFC/g de solo nas áreas tratadas devido aplicação do biofertilizante no solo.

A partir dos testes estatísticos foi obtido o valor de  $H = 30.1646$  e  $p = 0.00001$  a priori, ou seja, baseado no parâmetro  $p < 0.05$ , há diferença significativa entre pelo menos uma das áreas e períodos de coleta. A posteriori foi realizado o Teste *Dunn*,

confirmando a diferença entre os sítios amostrais ( $p < 0.05$ ) da área tratada na terceira coleta com pelo menos uma área controle ou tratada das demais coletas realizadas.

**Figura 16 – Descrição dos dados de UFC/g de solo de fungos para área controle e área tratada em cada período de coleta. AC: Área Controle; AT: Área Tratada; 1: Primeira Coleta; 2: Segunda Coleta; 3: Terceira Coleta.**

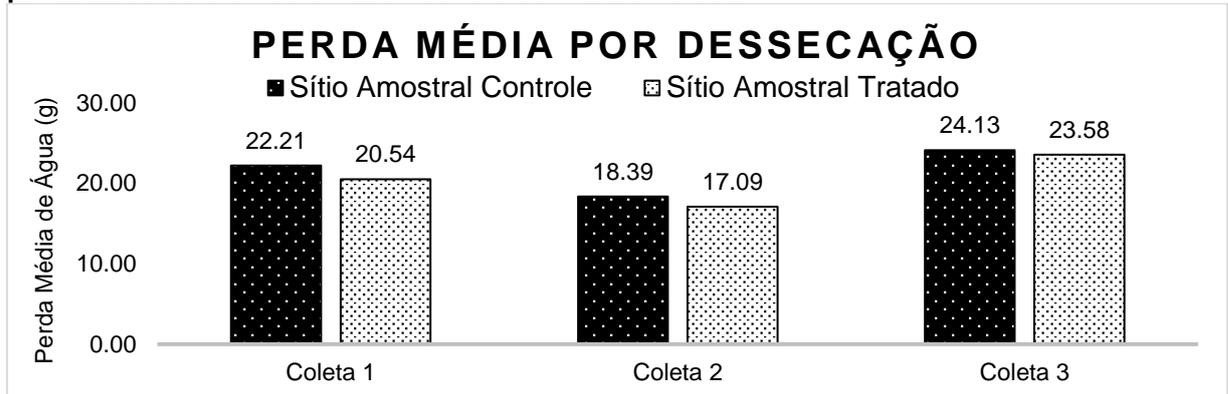


Fonte: Autoria própria

Principalmente a área tratada na terceira coleta, ao final do experimento, obteve maior diferença em relação as coletas anteriores, apresentando maior valor de  $1,45 \times 10^8$  de UFC/g de solo, comparado a  $8,2 \times 10^6$  UFC/g de solo do maior valor calculado para a primeira coleta. Isso se deve provavelmente a presença dos microrganismos e o tempo necessário para sua proliferação e permanência no solo. Ressaltando que um tempo maior com microrganismos se proliferando, sendo inoculado por mais de uma vez no período do experimento, resultou em aumento significativo da microbiota fúngica nas áreas tratadas demonstrando-se eficaz na recomposição da mesma.

Comparando os resultados de UFC/g de solo entre a primeira e segunda coleta (Figura 16), a semelhança entre as áreas controle e tratada ocorreram possivelmente devido ao tempo de exposição dos microrganismos aplicados no solo, e baixa umidade do solo na segunda coleta (Figura 17), sendo que entre o primeiro e segundo período de aplicação o inóculo ficou exposto no solo durante 100 dias, diferente do segundo para o terceiro período, que houve exposição durante 35 dias apenas.

**Figura 17 – Perda média de água por dessecação do solo, após estabilização, nos três períodos de coleta nos sítios amostrais controle e tratado.**



**Fonte: Autoria própria**

Foi realizado um estudo no estado indiano Bengala Ocidental, coletando-se solo em diferentes zonas agro-ecológicas, infestado com 10 isolados de *Trichoderma* em 10, 20, 30 e 40 dias após semear grão de bico, e foi observado aumento da população dos fungos ao longo do tempo, mas após o 40º dia começou a diminuir as populações. O mesmo pode ter ocorrido no presente estudo, onde o intervalo de aplicação entre a primeira e segunda coleta foi de 100 dias. Isso fez com que o biofertilizante ficasse mais exposto e a proliferação dos fungos fosse reduzida ao longo do tempo. Isso se evidenciou através das contagens de UFC/g de solo da primeira e da segunda coletas, mostrando números estatisticamente semelhantes (JASH; PAN, 2007).

Uma condição ambiental que talvez explique o crescimento diferencial de fungos totais para a terceira coleta em relação as demais é a umidade do solo. No processo de estabilização de umidade do solo, em estufa de esterilização e secagem, é notável a superior perda média de água do solo por dessecação na terceira coleta realizada, tanto para área controle quanto para área tratada, indicando maior umidade do solo nesse período (Figura 17).

O mesmo foi observado em estudo que analisou efeitos da umidade e temperatura do solo na capacidade saprofítica de *Trichoderma harzianum*, presente na composição do biofertilizante aplicado, onde houve crescimento dos fungos com o aumento da umidade do solo, exceto em condições de solo extremamente saturado e com lâminas d'água (EASTBURN; BUTLER, 1991).

Soulides e Allison (1961) também analisaram população microbiana através de contagens de microrganismos viáveis em placas de Petri, em quatro solos com diferentes características físicas e químicas, e obtiveram resultados que mostram uma

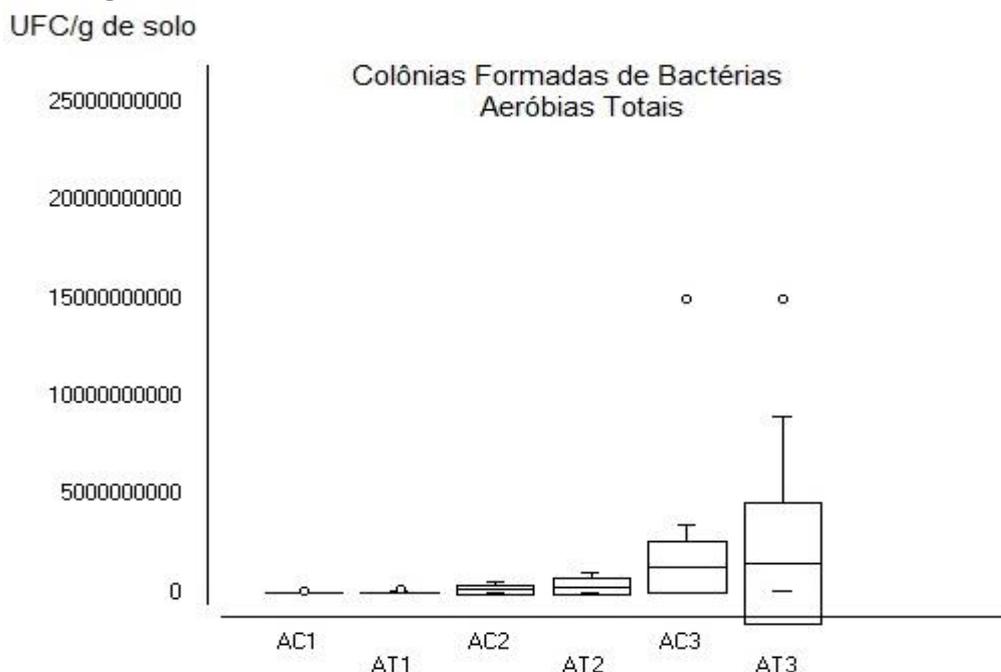
redução da população diretamente proporcional à umidade do solo, pois as reações bioquímicas são alteradas e a população microbiana tende a ficar inativa com redução de umidade. Ainda segundo Knudsen e Bin (1990), a umidade do solo e temperatura são favoráveis para o crescimento de hifas de *Trichoderma* sp.

## 5.2 Quantificação de Bactérias Aeróbias Totais

Como análise inicial dos valores de UFC/g de solo, foram obtidos os dados quantitativos para área controle e área tratada nos três períodos de coleta (Figura 18), esperando-se um aumento gradual de UFC/g de solo nas áreas tratadas devido aplicação do biofertilizante no solo.

A partir dos testes estatísticos foi obtido o valor de  $H= 20.9744$  e  $p= 0.0008$  a priori, ou seja, baseado no parâmetro  $p<0.05$ , há diferença significativa entre pelo menos uma das áreas e períodos de coleta. A posteriori foi realizado o Teste *Dunn*, confirmando a diferença entre as áreas ( $p< 0.05$ ), principalmente da área tratada na terceira coleta ao final do experimento com a primeira coleta realizada, comprovando a influência positiva no crescimento bacteriano com as aplicações do inóculo no solo.

**Figura 18 – Descrição dos dados de UFC/g de solo de bactérias aeróbias para área controle e área tratada em cada período de coleta. AC: Área Controle; AT: Área Tratada; 1: Primeira Coleta; 2: Segunda Coleta; 3: Terceira Coleta.**



Fonte: Autoria própria

Os valores de UFC/g de solo para área tratada (Figura 18), foram superiores após a primeira aplicação do biofertilizante, para segunda e terceira coleta, sendo mais expressivo o crescimento de bactérias aeróbias totais na última coleta realizada na área tratada. Ressaltando que a área controle também teve valores crescentes de UFC/g de solo durante o estudo, porém, inferior a área tratada em todos os períodos após aplicação.

Diferente dos resultados de UFC/g de solo obtidos para fungos totais, mesmo com a umidade do solo sendo a mais reduzida na segunda coleta (Figura 17), ainda houve crescimento de bactérias tanto para área controle, quanto para área tratada, sendo que para área tratada os valores de UFC/g de solo foram superiores em todos os períodos após aplicação do biofertilizante.

Essa condição de crescimento de bactérias aeróbias mesmo com umidade do solo reduzida, principalmente de *Bacillus* spp. presente na composição do biofertilizante, também foi observada em estudo de aplicação no solo de efluentes de esgoto tratado em diferentes culturas, onde não houve chuva durante 40 dias de experimento e chuva de pouca intensidade aos 60 dias. Mesmo com predomínio de baixa umidade do solo durante o experimento verificou-se aumento notável no número de colônias de *Bacillus* spp. nos tratamentos (RIBAS; NETO, 2008).

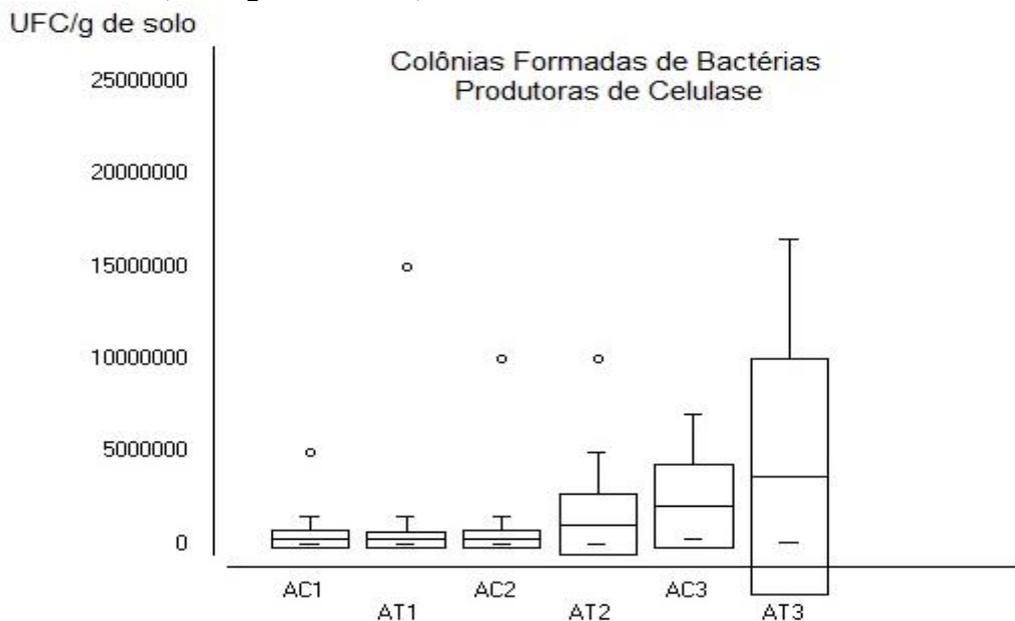
Possivelmente esse crescimento observado entre a primeira e segunda coleta para área controle, mesmo com baixa umidade no solo (Figura 17), seja justificado devido as características de algumas bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, contemplando espécies extremamente resistentes ao calor e agentes destrutivos, produzindo esporos como formas de resistência a condições adversas, principalmente de temperatura, além de possuírem simples exigências nutricionais para crescimento (BRITO et al., 2017; STANIER, 1969).

Para área tratada, provavelmente os valores de UFC/g de solo são superiores devido a própria aplicação do biofertilizante, contendo bactérias *Bacillus subtilis* em sua composição, em concentração  $1 \times 10^{11}$  UFC/g, contribuindo para o adensamento da comunidade microbológica da área, contendo maior valor de  $1,5 \times 10^{10}$  UFC/g de solo para a última coleta, onde o solo foi beneficiado por mais tempo com a ação do inóculo aplicado, comparado ao primeiro dia de aplicação com maior valor de  $2,0 \times 10^8$  UFC/g de solo.

### 5.3 Quantificação de Bactérias Produtoras de Celulase

Como análise inicial dos valores de UFC/g de solo, foram obtidos os dados quantitativos através da estatística descritiva para área controle e área tratada nos três períodos de coleta (Figura 19), esperando-se um aumento gradual de UFC/g de solo nas áreas tratadas devido aplicação do biofertilizante no solo, assim como observado para bactérias aeróbias totais e fungos totais.

**Figura 19 – Descrição dos dados de UFC/g de solo de bactérias produtoras de celulase para área controle e área tratada em cada período de coleta. AC: Área Controle; AT: Área Tratada; 1: Primeira Coleta; 2: Segunda Coleta; 3: Terceira Coleta.**



**Fonte: Autoria própria**

A partir dos testes estatísticos foi obtido o valor de  $H= 15,6743$  e  $p= 0,0078$  a priori, ou seja, baseado no parâmetro  $p<0.05$ , há diferença significativa entre pelo menos uma das áreas e períodos de coleta. A posteriori foi realizado o Teste *Dunn*, confirmando a diferença entre as áreas controle e tratada ( $p< 0.05$ ), comprovando a influência positiva no crescimento bacteriano produtor de celulase com as aplicações do inóculo no solo.

Em bactérias aeróbias, são descritas como produtoras de celulase espécies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis* presente na composição do biofertilizante, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus*. Os microrganismos produtores de celulase são extremamente importantes para o aumento da comunidade microbiana, pois a celulase produzida é uma enzima biocatalisadora da reação de hidrólise da celulose, sendo de grande importância para o fluxo de

carbono e energia no solo, uma vez que há degradação da celulose, as reações envolvidas tornam o carbono disponível para o crescimento de microrganismos no solo (DENG; TABATABAI, 1994; LYNCH et al., 1981; SINGH; HAYASHI, 1995).

A umidade também é uma condição ambiental muito importante para auxiliar o crescimento das bactérias produtoras de celulase, o que possivelmente influenciou no adensamento microbiológico, pois nem todas as bactérias tem pequenas exigências nutricionais e de condições ambientais. Muitas vezes nos primeiros 5 cm de solo de cultivo há poucos microrganismos, justamente devido à forte insolação e ressecamento do solo, diferente da profundidade de 5 a 15 cm que contém a maioria dos microrganismos aeróbios importantes para culturas agrícolas (PRIMAVESI, 2002).

#### **5.4 Evolução da Microbiota do Solo**

A importância de aplicação dos microrganismos presentes no biofertilizante, *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*, não está relacionada unicamente ao aumento na densidade microbiológica apenas desses microrganismos, beneficiando somente o aumento restrito desse fungo e bactéria no solo. Possivelmente a aplicação do biofertilizante também é de extrema importância para o aumento da diversidade microbiológica, pois esses microrganismos aplicados no solo tem a capacidade de auxiliar na colonização de outros microrganismos, que também contribuem para o crescimento vegetal.

Essa colonização ocorre principalmente com a maior disponibilidade de macronutrientes observada na análise química do solo, realizada pelos mecanismos de solubilização da microbiota, essenciais na constituição de aminoácidos, enzimas e coenzimas dos microrganismos, crescimento e funcionamento das células, além de serem constituintes de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando efeitos diretos na comunidade microbiológica a deficiência dos macronutrientes (GOLUEKE, 1991; SILVA, 2017).

Em estudo realizado com o objetivo de definir o efeito de fontes e doses de compostos nitrogenados sobre o crescimento de isolados de *Trichoderma* spp., observou-se interação significativa entre as doses de nitrogênio testadas, sendo macronutriente fundamental para o crescimento de diferentes isolados de *Trichoderma* (MENEZES et al., 2007).

Em outro estudo, de avaliação de crescimento de *Bacillus licheniformis* em diferentes condições de cultivo, tendo em vista que é outra importante bactéria promotora de crescimento vegetal, foi constatada a importância da disponibilidade de carbono para o crescimento celular, tendo como melhores resultados a caseína como fonte de carbono (SOUSA, 2008).

## 6 CONCLUSÃO

A área de cultivo agrícola em estudo apresentou diferenças entre a área tratada com biofertilizante e área controle. Os sítios amostrais tratados apresentaram maiores valores de UFC/g de solo para bactérias aeróbias totais, bactérias produtoras de celulase e fungos totais, em todos os períodos após aplicação, além de apresentar aumento no teor de macronutrientes devido a ação do inóculo e redução de acidez potencial. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que houve eficiência na evolução da comunidade microbológica do solo da área de estudo com a aplicação do biofertilizante.

Como se trata de importantes microrganismos inoculantes de biocontrole, com o adensamento microbológico promovido pela aplicação, pode haver maior influência positiva no crescimento vegetal através de diversos mecanismos, além de substituir o uso de insumos químicos, reduzir custos para o produtor rural e contribuir para o aumento da diversidade da microbiota, com a colonização de outros microrganismos benéficos a partir da solubilização de nutrientes necessários às plantas. Importante ressaltar a importância de trabalhos futuros na identificação/qualificação dos microrganismos presente no solo pós aplicação do biofertilizante.

## REFERÊNCIAS

- ALFA, M. I.; ADIE, D. B.; IGBORO, S. B.; ORANUSI, U. S.; DAHUNSI, S. O.; AKALI, D. M. Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestion effluent of cow dung and chicken droppings. **Renewable Energy**, Nigeria, v. 63, p. 681-686, 2014.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJORKMAN, T.; 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**, n. 7, v. 65, p. 2926–2933, 1999.
- ALVES, M. S. **Diversidade microbiológica cultivável de solos e seu potencial para avaliação da qualidade do solo**. (Bacharel em Ciências Biológicas). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 2013. 63 f.
- ARAÚJO, F. F. de. INOCULAÇÃO DE SEMENTES COM *Bacillus subtilis*, FORMULADO COM FARINHA DE OSTRAS E DESENVOLVIMENTO DE MILHO, SOJA E ALGODÃO. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, mar./abr. 2008.
- ARAÚJO, F. F. de; HUNGRIA, M. Nodulação e Rendimento de Soja Co-Infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1633-1643, set. 1999.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BIOESTAT 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Belém, Pará, 2007.
- BELLINI, G.; FILHO, E. S.; MORESKI, H. M. EPCC – ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR. 7., 2011, Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá: Cesumar, 2011. Disponível em: <[http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/gabriel\\_bellini.pdf](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/gabriel_bellini.pdf)>. Acesso em: 02 set. 2016.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Spain, v.7, p. 249-260, 2004.
- BERNARDO, E. R. A.; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Tropical Plant Pathology**, Brazil, v. 35, p. 37-42, 2010.
- BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVÃO, J. A. H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**. EMBRAPA-CNPMA (Circular Técnica, 02), Jaguariúna, p. 1-22, 1997.
- BONFIM, C. A. **BIOFERTILIZANTE HORTBIO®: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E EFEITO NA QUALIDADE DA ALFACE**. 2016. 136 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) – Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Brasília – DF, 2016.

BRAZ, R. R. **ESTÍMULO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO RESULTANTE DA CO-INOCULAÇÃO DE *Aspergillus niger* E *Burkholderia cepacia***. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal – SP, 2011.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Tipos de Microrganismos**. Agência de Informação Embrapa, 2017. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_182\\_21720039246.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.html)>; Acesso em: 08 mai. 2017.

BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biol Fertil Soils**, v. 19, p. 269-279, 1995.

CALORE, R. A.; FERREIRA, M. A. da; RODRIGUES, N. E. L.; OTUKA, A. K. Distribution Pattern, Surface Tension And Contact Angle Of Herbicides Associated To Adjuvants On Spraying And Control Of *Ipomoea hederifolia* Under Rainfall Incidence. **Revista Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 4, p. 756-768, jul./ago. 2015.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.

DELLAMATRICE, P. M.; COSTA, L. S.; MARQUES, A. S.; VIANA, M. S.; ARAÚJO, R. S. Degradação De Agrotóxicos Por Fungos Basidiomicetos Em Solo Agrícola Contendo Altos Níveis De Três Produtos Diferentes. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 22, p. 7-16, jan./dez. 2012.

DENG, S. P.; TABATABAI M. A. Cellulase Activity of Soils. **Soil Biology & Biochemistry**. Department of Agronomy, Iowa State University, U.S.A, v. 26, n. 10, p. 1347-1354, 1994.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M.; LEAL, M. A. A. de; SCHIMIDT, L. T. Uso de biofertilizante líquido na produção de Alfafa. In: **Embrapa Agrobiologia**, Seropédica – RJ, p. 1-16, 2002.

DORAN, J.W. & PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F. & STEWART, B.A. **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison, SSSA, p.1-20, 1994.

EASTBURN, D. M.; BUTLER, E. E. Effects of Soil Moisture and Temperature on the Saprophytic Ability of *Trichoderma harzianum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 83, n.1, p. 257-263, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Levantamento de Reconhecimento dos Solos do Estado do Paraná**. 2007. Mapa. Escala: 1:250.000. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/79286/1/MI-485.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Quantificação e Identificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis***. II – Curso Teórico e Prático, 2012. Disponível em: < [http://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2017.

FAGERIA, N. K. Soil quality vs. environmentally-based agricultural management practices. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 33, n. 13-14, p. 2301-2329, 2002.

FANTROUSSI, S. E.; AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268-275, 2005.

FLORENCIO, C. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp.** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.

GAIND, S.; GAUR, A. C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. **Plant and Soil**, v. 133, p. 141-149, 1991.

GALLI, F. Microrganismos do Solo. In: SEÇÃO DE FITOPATOLOGIA E MICROBIOLOGIA. 21., 1964, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1964. p. 247-252.

GOLUEKE, C. G. **Compost as a micronutrient supplier**. In: Principles of Composting. The staff of Biocycle Journal of Waste Recycling. p.161-162, 1991.

GOMES, E. A.; SOUZA, F. A. de; SOUSA, S. M. de; VASCONCELOS, M. J. V. de; MARRIEL, I. E.; SILVA, U. C. da. **Prospecção de Comunidades Microbianas do Solo Ativas no Aproveitamento Agrícola de Fontes de Fósforo de Baixa Solubilidade**. 1. Ed. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 36 p. 2010.

GOMES, M. A. F.; SOUZA, M. D. de; BOEIRA, R. C.; TOLEDO, L. G. de. **Nutrientes Vegetais no Meio Ambiente: ciclos bioquímicos, fertilizantes e corretivos**. 1. Ed. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. Documentos 66, 62 p. 2008.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma Species — Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts. **Nature Reviews | Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HIRATA, C. A.; FILHO, G. A. Abordagem Teórica das Interações Ambientais entre Nutrição de Plantas e Microrganismos. **Revista Geografia (Londrina)**, v. 20, n. 3, p. 191-216, 2011.

IBD CERTIFICAÇÕES. **Certificação Orgânico: IBD Orgânico e Orgânico Brasil**. Disponível em: < <http://ibd.com.br/pt/lbdOrganico.aspx>>. Acesso em: 05 mai. 2017.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble AlPO<sub>4</sub>, with p-solubilizing microorganisms. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 265-270, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**, 2016a. Disponível em: <  
<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=411727&idtema=3&search=parana|nova-tebas|censo-agropecuário-2006>>. Acesso em: 15 set. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. **Cidades: Nova Tebas**, 2016b. Disponível em: <  
<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=411727&search=||info%EF5es-completas>>. Acesso em: 01 set. 2016.

INSTITUTO DE TERRAS, CARTOGRAFIA E GEOCIÊNCIAS. **Formações Fitogeográficas - Estado do Paraná**. 2009. mapa. Escala: 1:2.000.000. Disponível em:<  
[http://www.itcg.pr.gov.br/arquivos/File/Produtos\\_DGEO/Mapas\\_ITCG/PDF/Mapa\\_Fitogeografico\\_A3.pdf](http://www.itcg.pr.gov.br/arquivos/File/Produtos_DGEO/Mapas_ITCG/PDF/Mapa_Fitogeografico_A3.pdf)> Acesso em: 20 de set. 2016.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Caderno Estatístico Município de Nova Tebas**, 2016. Disponível em: <  
<http://www.ipardes.gov.br/cadernos/MontaCadPdf1.php?Municipio=85250>>. Acesso em: 01 set. 2016.

JASH, S.; PAN, S. Variability in antagonistic activity and root colonizing behaviour of *Trichoderma* isolates. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 45, n. 1-2, p. 29-35, 2007.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial Biomass in Soil: Measurement and Turnover. In: PAUL, E.A. & LADD, J.M. eds. **Soil biochemistry**. New York, Marcel Dekker, v. 5, p. 415-471, 1981.

JULIATTI, F. C.; RESENDE, A. A. **Controle biológico. Trichoderma um agente versátil**. Cultivar Grandes Culturas, v. 15, p. 38-42, 2014.

JUNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, A. G.; REIS, H. B.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B.; MILLER, L. O. Eficiência da inoculação combinada de rizóbio e *Trichoderma* spp. em diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no cerrado (Savana Brasileira). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, p. 20-28, 2014.

JÚNIOR, F. B. R. dos; MENDES, I. C. de. **Biomassa Microbiana do Solo**. 1. Ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 38p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 205).

KATZ, E.; DEMAINE, A. L. The Peptide Antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 2, p. 449-474, jun. 1977.

KNUDSEN, G. R.; BIN, L. Effects of Temperature, Soil Moisture, and Wheat Bran on Growth of *Trichoderma harzianum* from Alginate Pellets. **Phytopathology**, v. 80, n. 8, p. 724-727, 1990.

LEPSCH, I. F. **Formação e Conservação dos Solos**. Google Books, 2010. Disponível em:

<<https://books.google.com.br/books?id=NH8LDAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 03 set. 2016.

LILIENFEIN, J.; WILCKE, W.; VILELA, L.; AYARZA, M.A.; LIMA, S.C.; ZECH, W. Soil fertility under native Cerrado and pasture in the Brazilian savanna. **Soil Science Society of American Journal**, v.67, p.1195-1205, 2003.

LIMA, F. F. de. **Bacillus subtilis E NÍVEIS DE NITROGÊNIO SOBRE O DESENVOLVIMENTO E A PRODUTIVIDADE DO MILHO**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2010.

LOVATO, T.; MIELNICZUK, J.; BAYER, C.; VEZZANI, F. Adição de carbono e nitrogênio e sua relação com os estoques no solo e com o rendimento do milho em sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, p. 175-187, 2004.

LUZ, L. D.; HAHN, F. A. NOVA TEBAS: TERRITÓRIOS E TERRITORIALIDADES. **Revista GEOMAE**, Campo Mourão – PR, v. 2, n. 1, p. 207-216, 2011.

LYNCH J. M.; SLATER J. H.; BENNETT J. A.; HARPER S. H. T. Cellulase Activities of Some Aerobic Micro-organisms Isolated from Soil. **Journal of General Microbiology**, v.127, p. 231-236, 1981.

MALAVOLTA, E. **Nutri-Fatos: informação agronômica sobre nutrientes para as culturas**. Piracicaba, SP: IPNI – Brasil, Potafos, n. 10, p. 1-24, 1996. (Arquivo do Agrônomo).

MEDEIROS, M. B. de; LOPES, J. da. S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p. 24-26, 2006.

MENEZES, M.E.L.; NASCIMENTO, K.L.; ERLO, R.; Brito, E.S.; MOTA, E.F.; GAVA, C. Crescimento de isolados de Trichoderma sp. em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio., 2007, Petrolina. **Anais da II Jornada de Iniciação Científica**. Petrolina: Embrapa Semi-árido. 2007. p. 71-76.

MUNOZ HERNANDEZ, R.J.; SILVEIRA, R.I. Efeito da saturação por bases, relações Ca:Mg no solo e níveis de fósforo sobre a produção de material seco e nutrição mineral de milho (*Zea mays*, L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 79-85, 1998.

NETO, E. A. T. **BIOFERTILIZANTES: Caracterização Química, Qualidade Sanitária e Eficiência em Diferentes Concentrações na Cultura da Alface**. 2006. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

NOVA TEBAS – PR. **Plano Municipal de Saneamento Básico Município de Nova Tebas / PR**. 2013. 114 p. Disponível em: < <http://novatebas.pr.gov.br/pmsb.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

OBBARD, J. C.; JONES, K. C. The effect of heavy metals on dinitrogen fixation by *rhizobium*-white clover in a range of long-term sewage sludge amended and metal-contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 79, p. 105-112, 1991.

OLIVEIRA, A. G. de. **EFEITO DA INOCULAÇÃO COMBINADA DE RIZÓBIO E *Trichoderma* spp. NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM FEIJÃO-CAUPI NO CERRADO**. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Tocantins. Gurupi – TO, 2012.

PARR, J. F.; HORNICK, S. B.; PAPENDICK, R. I. **Soil Quality: The Foundation of a Sustainable Agriculture**. 1992. Agricultural Research Service. US. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, and Pullman, Washington, USA.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. p. 21-41. ISBN 85-7541-031-8.

PRIMAVESI, A. A Microbiologia do Solo. **Manejo Ecológico do Solo – A Agricultura em Regiões Tropicais**, cap. 6, p. 172, 2002.

RAIJ, B. **Potássio: Necessidade e Uso na Agricultura moderna**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Potafos. Piracicaba- SP, p. 1-45, 1990.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; CLAEYSSSENS, M.; MONTAGU, M. van. Cloning, Expression in *Escherichia coli*, and Characterization of Cellulolytic Enzymes of *Azoarcus* sp., a Root-Invading Diazotroph. **Journal Of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 7056-7065, 1993.

RIBAS, T. B. C.; NETO, P. F. Disposição no solo de efluentes de esgoto tratado visando à redução de coliformes termotolerantes. **Revista Ambiente & Água**, Taubaté, v. 3, n. 3, p. 81-94, 2008.

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Campinas – SP, p. 1-30, 2010.

SAMPAIO, D. B.; ARAÚJO, A. S. F. de; SANTOS, V. B. dos. Avaliação de indicadores biológicos de qualidade do solo sob sistemas de cultivo convencional e orgânico de frutas. **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v. 32, n. 2, p. 353-359, 2008.

SANTOS, I. M. **BIOINDICADORES DE QUALIDADE DE SOLO: microrganismos em um estudo de caso**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental). Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015. 41 p.

SANTOS, T. M. C. dos; SILVA, M. L. Y. da; ASSIS, M. P. D. de; SANTOS, J. V. dos ; SANTOS, D. V. dos; SILVA, A. D. da. Isolamento e Atividade de Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos em Resposta a Fontes de N e teores de Ca e K em meio

de cultura. In: 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal - RN. **Anais...** Natal: 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010. v. 1. p. 2710.

SILVA, V. **Fisiologia e Crescimento Bacteriano**. Universidade Federal de Juíz de Fora, p. 1-17, 2017. Disponível em: <  
<http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/Fisiologia-e-crescimento-bacteriano-FAR.pdf>>. Acesso em: 11 mai. 2017.

SILVA, M. A. S. da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p.108–114, 2007.

SILVA, C. R. da; SOUZA, Z. M. de. **Eficiência do Uso de Nutrientes em Solos Ácidos: Manejo ee Nutrientes e Uso Pelas Plantas**. Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira – SP, 1998. Disponível em: <  
<http://www.agr.feis.unesp.br/acido.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties, and Biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 40, p. 1-44, 1995.

SINGH, J. S.; RAGHUBANSH, A. S.; SINGH, R. S.; SRIVASTAVA, S. C. Microbial biomass acts as a source of plant nutrientes in dry tropical forest and savana. **Nature**, v. 338, n. 6215, p. 499-500, 1989.

SOULIDES, D. A.; ALLISON, F. E. Effect of drying and freezing soils on carbon dioxide production, available mineral nutrients, aggregation, and bacterial population. **Soil Science**, v. 91, p. 291-298, 1961.

SOUZA, W. J. O.; MELO, W. J. Matéria Orgânica em um Latossolo Submetido a Diferentes Sistemas de Produção de Milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 1113-1122, 2003.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. Biofertilizantes Líquidos. **Manual de Horticultura Orgânica**, 2ª ed., p. 256-271, 2006.

SRIVASTAVA, S.C.; SINGH, J.S. Microbial C, N and P in dry tropical forest soils: effects of alternate land-uses and nutrient flux. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.23, n.2, p.117-124, 1991.

STANIER, R. Y. Grupos importantes de eubactérias unicelulares. In: STAINER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. A. **Mundo dos Micróbios**. Edgard Blucher e USP, São Paulo, 564 p., 1969.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 1-20, 2007.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA R.; BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S. L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, p. 80-86, 2008.

WALLANDER, H.; WICKMAN, T. Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. **Mycorrhiza**, v. 9, p. 25-32, 1999.