

JORGE AVELINO RODRIGUEZ LOZADA

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DO LODO DE ESGOTO DE ABATEDOURO DE AVES COM POTENCIAL DEGRADADOR DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS E PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

FLORESTAL
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Florestal

T

L925p
2015

Lozada Rodriguez, Jorge Avelino, 1980-
Prospecção de bactérias do lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial degradador de substâncias orgânicas e promotor do crescimento de plantas / Jorge Avelino Lozada Rodriguez. – Florestal, MG, 2015.

xi, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Lílian Estrela Borges.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Crescimento. 2. Aves - Abatedouro. 3. Efluentes. 4. Lodo biológico como fertilizante. 5. Bactérias. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários. II. Título.

CDD 22. ed. 633.15

JORGE AVELINO RODRIGUEZ LOZADA

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DO LODO DE ESGOTO DE ABATEDOURO DE AVES COM POTENCIAL DEGRADADOR DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS E PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de Junho de 2015.

Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)

Marius Altoé Baldotto
(Coorientador)

Marcos Paiva Del Giúdice

Lílian Estrela Borges Baldotto
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Primeiro ao Deus da vida porque sem ele nada seria possível.

À minha mãe Maria que desde o céu guia meus passos.

Ao meu pai pelo amor incondicional.

À minha namorada Leidy pelo carinho, entrega e dedicação.

Ao meu irmão Gustavo pelo apoio, solidariedade e carinho.

À minha família.

Aos meus amigos da Colômbia e do Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do programa Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários (MCENA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa outorgada.

À Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) pelo apoio financeiro.

À organização Francap S.A. e à bióloga Luciana Silva, por facilitar o material inicial de trabalho.

À professora Lílian Estrela Borges Baldotto pela paciência e as orientações.

Aos professores Marcos Paiva Del Giúdice, Marcos Rogério Tótola e Maribus Altoé Baldotto pela disponibilidade em avaliar o trabalho.

Aos professores do mestrado MCENA UFV- *Campus* Florestal.

Ao professor Divino Lopes da UFMG, pelos conselhos e força quando precisava.

Ao pessoal do Setor de Floricultura: “*Deboriña*”, “*Laziño*” e “*Chim*”.

Aos meus amigos da Republica Abatedouro, “Macumba”, “Picheo”, “Kreviño” pelo recebimento e pelas raivas (*quando tinha que estudar e não deixavam*).

A meus pais brasileiros Neide e Santos e aos meus irmãos Libério, Tamara e Adriel pela ajuda, força, papos e brigas.

Aos meus colegas e demais amigos aqui em Florestal.

A você por estar lendo este documento.

Muito obrigado... Gente...

BIOGRAFIA

JORGE AVELINO RODRIGUEZ LOZADA, filho de Gustavo Rodriguez e Maria Atriz Lozada, nasceu no município de Puerto Leguizamo – Putumayo - Colômbia no dia 28 de dezembro de 1980.

Iniciou os estudos básicos no Escuela Distrital Francisco de Miranda, em Bogotá – Colômbia e no Colégio Nacional Jose Maria Hernandez, em Pto. Leguizamo – Ptmayo.

No ano de 2000, iniciou o curso de graduação em Agronomia, na Universidade Nacional de Colômbia sede Bogotá, graduando-se em 2006.

Realizou extensão rural na ONG “CIFISAM” no município de San Vicente Caguan, 2005-2006.

Coordenador do projeto Estabelecimento de 216 ha de cacau, baixo um sistema agroflorestal, Tumaco Nariño, 2007-2010.

Pesquisador da Fundación de Asesorías ao sector Agropecuario, Villavicencio- Meta, 2010-2011.

Assistente de direção do Programa Nacional de Assistência Técnica Agropecuária para os municípios de AMA-CEPROAMA, Villavicencio- Meta, 2012-2013.

Em 2013, iniciou o curso de mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários na Universidade Federal de Viçosa *Campus* Florestal, concentrando seus estudos na área manejo de agro-ecossistemas.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| RESUMO | VII |
| ABSTRACT | X |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. HIPÓTESES | 3 |
| 3. OBJETIVOS | 4 |
| 3.1. Objetivo geral | 4 |
| 3.2. Objetivos específicos | 4 |
| 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 4.1. O Setor Avícola e os subprodutos gerados | 5 |
| 4.2. Lodo de esgoto de abatedouros de aves | 5 |
| 4.3. Bactérias degradadoras de substâncias orgânicas | 8 |
| 4.4. Bactérias promotoras de crescimento de plantas | 9 |
| 4.4.1. Bactérias fixadoras de nitrogênio | 9 |
| 4.4.2. Bactérias solubilizadoras de fosfato | 10 |
| 5. TRABALHOS | 11 |
| 5.1. Prospecção de bactérias de lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial degradador de substâncias orgânicas | 12 |
| INTRODUÇÃO | 13 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 17 |
| CONCLUSÕES | 22 |
| AGRADECIMENTOS | 23 |
| BIBLIOGRAFIA | 23 |
| 5.2. Seleção de bactérias diazotróficas isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves | 28 |
| INTRODUÇÃO | 30 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| CONCLUSÕES | 39 |
| AGRADECIMENTOS | 39 |
| BIBLIOGRAFIA | 40 |
| 5.3. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves na cultura do milho | 44 |
| INTRODUÇÃO | 46 |

| | |
|--|-----------|
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 49 |
| CONCLUSÕES..... | 55 |
| AGRADECIMENTOS..... | 55 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 55 |
| 6. CONCLUSÕES | 59 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| 8. ANEXOS | 65 |
| 8.1. Unidades Formadoras de Colônia. Trabalho 1 e 3. | 66 |
| 8.2 Caracterizações de Colônias de bactérias degradadoras de substâncias orgânicas e promotoras do crescimento de plantas..... | 67 |
| 8.2.1 Caracterização das colônias bacterianas amilolíticas..... | 67 |
| 8.2.2. Caracterização das colônias bacterianas queratinolíticas | 68 |
| 8.2.3. Caracterização das colônias bacterianas ligninolíticas | 69 |
| 8.2.4. Caracterização das colônias bacterianas proteolíticas | 70 |
| 8.2.5. Caracterização das colônias bacterianas solubilizadoras de fosfato ... | 71 |
| 8.2.6. Caracterização das colônias bacterianas diazotróficas | 72 |
| 8.2.7. Caracterização das colônias bacterianas celulolíticas. | 73 |
| 8.3. Análises de variância. | 74 |
| 8.3.1. Trabalho 2. Experimento de bactérias diazotróficas | 74 |
| 8.3.2. Trabalho 3. Experimento bactérias solubilizadoras de fosfato. | 75 |
| 8.4. Figuras..... | 76 |

RESUMO

LOZADA, Jorge Avelino Rodriguez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2015. **PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DO LODO DE ABATEDOURO DE AVES COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA ACELERAÇÃO DA COMPOSTAGEM E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS.** Orientadora: Lillian Estrela Borges Baldotto. Co-orientadores: Maribus Altoé Baldotto e Marcos Rogério Tótola.

Os lodos de esgoto de abatedouro de aves são gerados nas estações de tratamento de efluentes. O descarte destes, sem nenhum tipo de tratamento leva à contaminação do sistema água-solo e proliferação de vetores de doenças. Para atenuar esses problemas, existem na atualidade práticas para o manejo desses resíduos. Para uso na agricultura, é necessária a caracterização do potencial agrônomo, presença de substâncias tóxicas, presença de agentes patogênicos e estabilidade. Além de microrganismos patogênicos, há a possibilidade de o lodo abrigar microrganismos com potenciais biotecnológicos, como as bactérias degradadoras de substâncias orgânicas e as bactérias promotoras do crescimento de plantas. Objetivou-se neste trabalho: (i) caracterizar quimicamente os lodos de esgoto de abatedouro de aves; (ii) isolar, quantificar e caracterizar bactérias do lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial de degradar substâncias orgânicas, fixar o nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfato; (iii) selecionar isolados bacterianos diazotróficos com potencial de promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas de milho em casa-de-vegetação e (iv) selecionar bactérias solubilizadoras de fosfato natural na cultura do milho em casa de vegetação. Amostras de lodo foram coletadas na FRANCAP S.A. e processadas no laboratório do Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal. Foram determinados os teores totais de macronutrientes e micronutrientes, a porcentagem de C orgânico, a relação C/N e o pH. Para o isolamento e quantificação de bactérias com potencial de degradar substâncias orgânicas (amido, celulose, lignina, proteína, queratina) e solubilizar fosfato, 10 g de lodo foram homogeneizados em 90 mL de solução salina e dela, realizaram-se diluições seriadas até 10^{-12} . Alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram transferidas aos meios sólidos específicos. Foram determinadas as unidades formadoras de colônia para cada meio de cultivo. Para as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, 10 g do lodo foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina, e a partir dela, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} .

Alíquotas de 100 µL das diferentes diluições foram transferidas, em triplicata, para frascos de vidro contendo 5 mL dos meios de cultura semissólidos JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMV. Para todos os isolados, colônias individuais foram purificadas e caracterizadas com relação à morfologia da colônia, morfologia celular e coloração de Gram. Para avaliar a fixação biológica de nitrogênio em viveiro, realizou-se a inoculação bacteriana em sementes de milho. O experimento consistiu de 17 tratamentos (16 estirpes bacterianas e um controle sem inoculação), conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e tendo como unidade experimental um vaso contendo duas plantas de milho. Aos 45 dias, foram mensuradas as variáveis: altura da planta, número de folhas, diâmetro do colo, matéria fresca e seca da raiz e parte aérea e conteúdo de N. Para avaliar a solubilização de fosfato natural (FN), realizou-se um ensaio com dez tratamentos: oito isolados bacterianos + FN, FN e controle. O experimento foi conduzido por 45 dias, em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. A unidade experimental foi um vaso com duas plantas de milho. As variáveis mensuradas foram as características de crescimento da planta. No presente trabalho foi verificado que o lodo de esgoto de abatedouro de aves apresentou teores de N, P e K, de 9,5, 1,21 e 0,45 dag/kg, respectivamente. Foi possível isolar 56 estirpes de bactérias degradadoras de substâncias orgânicas, sendo dez amilolíticas, duas celulolíticas, 14 ligninolíticas, dez proteolíticas e 15 queratinolíticas. Os resultados da quantificação das unidades formadoras de colônia variaram entre $21,10 \times 10^{11}$ e $9,55 \times 10^{15}$ g/lodo. Para as bactérias diazotróficas, foram isoladas 16 estirpes sendo quatro no meio JMV, duas no JMV, quatro no NFb, três no JNFb, uma no LGI e duas no LGI-P. Todas as estirpes bacterianas diazotróficas apresentaram coloração gram-positiva e diferiram na morfologia celular, dez apresentaram formato de bastonete e seis no formato de cocos. Os maiores índices para a fixação de N, nas variáveis avaliadas, foram obtidos com o isolado UFV L-162, que resultou em uma matéria seca total de 0,68 g e um conteúdo de N de 22,14 mg/planta, representando incrementos de 74% e 133%, respectivamente, em relação ao controle. Para as bactérias solubilizadoras de fosfato, foram isoladas oito estirpes bacterianas. Todas produziram halo de solubilização *in vitro*, 90% apresentaram formato de cocos 10% de bastonete e todas apresentam coloração gram-positiva. Os resultados da solubilização de fosfato mostraram que com a inoculação da estirpe LSOF-7 em conjunto com FN promoveram incrementos na matéria seca de plantas de 20%

frente ao tratamento contendo apenas FN e 67% em relação ao controle. Conclui-se que os lodos de esgoto de abatedouros de aves são uma fonte de riqueza organo-mineral que podem melhorar a fertilidade dos solos, além de apresentarem uma ampla gama de bactérias com potencial de degradar substâncias orgânicas e promover o crescimento e desenvolvimento de plantas.

ABSTRACT

LOZADA, Jorge Avelino Rodriguez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **BACTERIA FROM POULTRY SLAUGHTER SLUDGE OF EXPLORATION POTENTIAL FOR BIOTECHNOLOGICAL ACCELERATION COMPOSTING AND PLANT GROWTH PROMOTION.** Advisor: Lílian Estrela Borges Baldotto. Co-Advisors: Marihus Altoé Baldotto and Marcos Rogério Tótola.

The slaughterhouse sewage sludge chickens are generated in wastewater treatment plants. Disposal of these, without any treatment leads to contamination of the soil-water system and disease vectors proliferation. To mitigate these problems exist in current practices in the management of such waste. For use in agriculture is needed to characterize the agronomic potential presence of toxic substances, the presence of pathogens and stability. In addition to pathogenic microorganisms have the possibility to host microorganisms with the sludge biotechnological potential, such as organic substances degrading bacteria and bacteria promoting plant growth. The objective of this study: (i) chemically characterize the slaughterhouse sewage sludge chicken; (ii) isolate, quantify and characterize bacteria from the slaughterhouse sewage sludge chicken with potential to degrade organic substances, fixation atmospheric nitrogen and phosphate solubilizing; (iii) select isolated bacterial diazotrophic with potential for promoting growth and development of corn plants at nursery and (iv) selecting natural phosphate solubilizing bacteria in corn in a greenhouse. Sludge samples were collected in Francap SA and processed in the laboratory of Floriculture Sector of the Federal University of Viçosa Forestal Campus. We determined the total contents of macronutrients and micronutrients, the percentage of organic C, the C / N and pH. For the isolation and quantification of bacteria with potential to degrade organic substances (amylolytic, cellulose, lignin, protein, keratin) and solubilize phosphate, 10 g of sludge were homogenized in 90 ml of saline and her serial dilutions were performed up to 10^{-12} . Aliquots of 100 μ L of each dilution were transferred to solid media specific. They determined the colony forming units to the culture medium. For atmospheric nitrogen fixing bacteria, the sludge 10 g were homogenized in 90 ml of saline solution and from it, dilutions were made. 100 μ L aliquots of different dilutions were transferred in triplicate to glass bottles containing 5 ml of semisolid culture media JNFb NFb, LGI, Q-LGI, and JMV

JVML. For all isolated, individual colonies were purified and characterized with respect to colony morphology, cell morphology and Gram staining. To evaluate the biological nitrogen fixation in the nursery, there was bacterial inoculation in corn seeds. The experiment consisted of 17 treatments (16 bacterial strains and uninoculated control), conducted in a completely randomized design, with six replications and with the experimental unit a pot containing two corn plants. At 45 days, the variables were measured: plant height, leaf number, stem diameter, fresh and dry weight of root and shoot and content of N. To evaluate the natural phosphate solubilization (FN) was held one test with ten treatments: Eight bacterial isolates + FN, FN and control. The experiment was conducted for 45 days in a completely randomized design with six replications, the experimental unit was a pot with two corn plants. The measured variables were the growth characteristics of the plant. In this study it was found that the poultry slaughterhouse sewage sludge showed concentrations of N, P and K, 9.5, 1.21 and 0.45 dag / kg, respectively. It was possible to isolate 52 strains degrading bacteria organic substances, ten amylolytic, two cellulolytic, 15 ligninolytic ten proteolytic and 15 keratinolytic. The results of the quantification of the colony forming units ranged between 21.10×10^{11} and 9.55×10^{15} g / sludge. For diazotrophs, 16 strains were isolated four JMV, two JVML, four NFb, three JNFb, a one LGI and two LGI-P. All nitrogen fixing bacterial strains showed Gram-positive staining and differs in cell morphology, ten presented rod-shaped and six coconuts format. The highest rates for nitrogen fixation in the evaluated variables were obtained with the isolated UFV L-162, which resulted in a total dry matter of 0.68 g and a nitrogen content of 22.14 mg / plant, representing increments 74% and 133%, respectively, compared to control. For the phosphate solubilizing bacteria, bacterin eight strains were isolated, all produced in vitro solubilization halo, showed 90% rod-shaped cocus and 10% and all have gram-positive staining. The results of the phosphate solubilization have shown that inoculation with LSOF-7 strain together with FN promoted increases in plant dry matter of 20% compared to treatment containing only FN and 67% compared to control. It follows that the poultry slaughterhouses sewage sludge are a source of organo-mineral resources that can improve the fertility of soils, in addition to having a wide range of bacteria with the potential to degrade organic substances and promote the growth and development of plants.

1. INTRODUÇÃO

A agroindústria brasileira de frango representa 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) e gera quatro milhões de empregos (ABPA, 2014). Do total da produção de 12,3 milhões de toneladas, 69% é destinado ao consumo interno e o restante, 31%, ao mercado internacional (UBABEF, 2014). O estado de Minas Gerais possui muitas granjas produtoras de aves, mas apenas 300 estão registradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA, 2013), dificultando a fiscalização dos processos e manejo dos subprodutos.

Um destes subprodutos é o lodo gerado nas estações de tratamento de efluentes, originado ao longo do processo produtivo de abate de aves (SEMAD, 2010). O descarte do lodo de esgoto de abatedouro de aves sem nenhum tipo de tratamento leva à contaminação do meio ambiente, proliferação de vetores de doenças, emissão de odores e gases poluentes (Heck et al., 2012). Para contornar esses problemas, existem, na atualidade, várias práticas para o manejo desses resíduos, dentre os quais estão os aterros, queimas, incineração, reciclagem, compostagem e como matéria prima para a elaboração de substratos (Franco, 2002).

Para uso na agricultura a caracterização do lodo deve incluir os seguintes aspectos: potencial agrônômico, presença de substâncias tóxicas, presença de agentes patogênicos e estabilidade, conforme descrito na resolução 375 do CONAMA (CONAMA, 2006). Além de microrganismos patogênicos, há a possibilidade do lodo abrigar microrganismos com potenciais biotecnológicos, como as bactérias degradadoras de substâncias orgânicas, as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico e as bactérias solubilizadoras de fosfato.

Dentro do primeiro grupo, estão as bactérias degradadoras de substâncias orgânicas, entre elas tem-se, por exemplo: (i) as bactérias amilolíticas, convertem amido em ácidos graxos voláteis (Gabarra, 2001); (ii) bactérias celulolíticas, têm a capacidade de degradar os hidratos de carbono poliméricos em compostos simples, tais como ácidos graxos e álcoois (Pires, 2008); (iii) bactérias ligninolíticas, utilizam como fonte de carbono a lignina (Basto-Neto, 2012); (iv) bactérias proteolíticas, degradam proteínas presentes na matéria

orgânica (Carpiné et al., 2010) e (v) bactérias queratinolíticas, decompõem estruturas queratinizadas como penas de aves (Pacheco, 2013).

O segundo grupo, das bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico despertam interesse em conveniência dos altos custos econômicos e ambientais resultantes da contínua aplicação de fontes nitrogenadas sobre culturas agrícolas (Guimarães, 2011). Estas bactérias têm a capacidade de transformar o N_2 abundante na atmosfera e que não pode ser utilizado pela maioria dos organismos, na forma inorgânica NH_3 . A partir daí, a amônia pode ser convertida em formas orgânicas e inorgânicas vitais (Cantarella, 2007). O processo mencionado recebe o nome de fixação biológica de nitrogênio e é realizado pelas bactérias conhecidas como diazotróficas, que podem apresentar vida livre, ou vivem associadas aos tecidos vegetais (Hallmann et al., 1997; Baldotto et al., 2008).

No terceiro grupo estão as bactérias que apresentam a capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico. O fósforo (P), depois do nitrogênio (N), é o segundo macronutriente de importância na produção agrícola mundial (Vance et al., 2003). Grandes quantidades desse elemento são aplicadas nas culturas agrícolas e ele pode ser imobilizado pelos colóides dos solos, tornando-se indisponível para as plantas (Omar, 1998). Para contornar esse problema, na atualidade, um foco de estudo são as bactérias solubilizadoras de fosfato. Segundo Rodriguez & Fraga (1999), essas bactérias permitem disponibilizar o fósforo fixado aos colóides do solo, favorecendo sua absorção pelas plantas e influenciando assim, a regulação dos ciclos biogeoquímicos nos sistemas agrários e naturais.

A capacidade das bactérias de degradar substâncias orgânicas, fixar o nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfato, estimula pesquisas com a finalidade de isolar, caracterizar e selecionar estirpes que possam promover o crescimento e desenvolvimento vegetal, com a finalidade de mitigar o impacto que tem sob o ambiente os subprodutos agroindustriais e a fertilização industrial.

O presente trabalho teve como objetivo realizar a prospecção de bactérias do lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial de degradar de substâncias orgânicas e promotoras de crescimento de plantas.

2. HIPÓTESES

Bactérias degradadoras de substâncias orgânicas e bactérias promotoras de crescimento de plantas habitam o lodo de esgoto de abatedouro de aves.

Bactérias diazotróficas isoladas do lodo de esgoto de abatedouro de aves promovem o crescimento e desenvolvimento de plantas de milho.

Bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves promovem o crescimento de plantas de milho quando inoculadas em conjunto com fosfato natural.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Isolar, caracterizar e selecionar bactérias oriundas do lodo de esgoto de abatedouro de aves com a capacidade de degradar substâncias orgânicas e promover o crescimento de plantas.

3.2. Objetivos específicos

- (i) Caracterizar quimicamente o lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (ii) Isolar e quantificar bactérias amilolíticas do lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (iii) Isolar e quantificar bactérias celulolíticas do lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (iv) Isolar e quantificar bactérias ligninolíticas do lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (v) Isolar e quantificar bactérias proteolíticas do lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (vi) Isolar e quantificar bactérias queratinolíticas do lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (vii) Isolar e quantificar bactérias diazotróficas do lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (viii) Isolar e quantificar bactérias solubilizadores de fosfato do lodo de esgoto de abatedouro de aves.
- (ix) Realizar a caracterização morfológica da célula e da colônia dos isolados bacterianos.
- (x) Selecionar os isolados bacterianos diazotróficos promotores de crescimento e desenvolvimento de plantas de milho.
- (xi) Selecionar os isolados bacterianos solubilizadores de fosfato promotores de crescimento de plantas de milho.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. O Setor Avícola e os subprodutos gerados

A produção de carne de frango do mundo para o ano de 2014 superou as 100 milhões de toneladas (FENAVI, 2014), constituindo-se em um produto importante na dieta mundial. Para o caso específico do continente americano, a FAO estima a produção de cerca de 40 milhões de toneladas, o que representa 40% da produção de aves no mundo (FENAVI, 2014).

No Brasil, o país atingiu uma produção de 12,3 milhões de toneladas de aves, das quais 69% foram utilizadas para atender o mercado local e 31% para abastecer os mercados internacionais (UBABEF, 2014).

A indústria avícola no Brasil emprega mais de 4 milhões de pessoas e representa 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) (ABPA, 2014). Com a exportação de 3.918 toneladas, o Brasil é considerado o principal exportador de carne de aves do mundo (USDA, 2013). O estado do Paraná ocupa o primeiro lugar de produção, com 31%, seguido por Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais com 16, 15, 11 e 8%, respectivamente (UBABEF, 2014).

No estado de Minas Gerais, 4,78% da produção têm como destino as exportações (IBGE, 2014). Apesar da existência de muitas granjas produtoras de aves, apenas 300 são registradas, segundo o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA, 2013), dificultando a adequada fiscalização dos processos e do manejo de subprodutos dessa atividade.

Segundo a FAO, os subprodutos da produção avícola são importantes se gerenciados e reciclados de forma adequada. Caso contrário, se tornam vetores de insetos e parasitas (FAO, 2012).

Esses subprodutos são gerados na cadeia de produção e de consumo de frango, dentre os quais se destacam: (i) farinhas feitas a partir de sangue, ossos, cascas de ovos, etc.; (ii) compostos orgânicos produzidos a partir de camas de frangos; (iii) ração produzidos a partir aves mortas; (iv) compostos orgânicos e biofertilizantes produzidos a partir de efluentes gerados no processo de abate (FAO, 2012).

4.2. Lodo de esgoto de abatedouros de aves

Nos abatedouros de aves são gerados efluentes líquidos, como consequência das atividades do processo produtivo: recepção, despenagem, evisceração,

desossa e sangria (SEMAD, 2010). A qualidade do efluente está diretamente relacionada com a eficiência na separação dos ossos, vísceras, penas e sangue (FAO, 2012).

Para os lançamentos desses efluentes, os órgãos ambientais fixam características que regulam e mitigam o impacto que têm sobre rios, solos, animais, florestas e população. Entre essas características estão: pH, carga orgânica, nitrogênio total, fósforo total e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (FAO, 2012).

O descarte dos lodos originados na estação de tratamento de efluentes sem nenhum tipo de tratamento leva à contaminação da água e do solo, aumento da proliferação de vetores de doenças, emissão de odores e poluentes gasosos (Heck et al., 2012).

Para contornar esses problemas, existem na atualidade vários sistemas para o manejo desses resíduos. E segundo Philippi (2001), as características destes resíduos, juntamente com a regulamentação ambiental, aspectos econômicos e obras de infraestrutura são fatores básicos na definição do sistema a implantar.

Um dos sistemas de tratamentos de efluentes mais empregados é do lodo ativado, que podem ser subdivididos em sistemas de lodo ativado convencional e de lodo ativado de aeração prolongada (Philippi, 2001).

Segundo Jordão e Pessoa (2005), nesses processos, o esgoto é misturado ao lodo ativado e submetido à agitação contínua e aeração em tanques. O lodo ativado é posteriormente separado do efluente por sedimentação. Uma parte do lodo ativado é restituída ao processo e a outra parte é enviada para o destino final.

A fundamentação principal desse sistema é o controle que se faz do crescimento bacteriano através da recirculação do lodo restituído ao sistema, com o intuito de permitir maior concentração de microrganismos no tanque aerador. Uma maior permanência desses microrganismos permite uma melhor eficiência do sistema (Berenger, 2009).

O lodo ativado convencional é constituído por dois decantadores (primário e secundário), e nesse sistema o lodo tem uma permanência de 4 a 10 dias. Esse período propicia eleva a eficiência do processo (Sobrinho, 1983). A concentração de lodos é elevada, a conveniência da recirculação dos sólidos sedimentados no decantador secundário, sendo por isso necessária a remoção de uma maior

proporção do lodo e uma estabilização do mesmo, numa etapa posterior (Silva, 2002).

Os lodos ativados de aeração prolongada são similares ao sistema convencional, diferenciando-se pelo fato da biomassa permanecer no sistema por um período mais longo (18 a 30 dias), recebendo a mesma carga da demanda bioquímica de oxigênio do esgoto afluente. Como resultado disso, as bactérias passam a utilizar a matéria orgânica para seu metabolismo, permitindo a estabilização do lodo dentro do mesmo tanque (Sobrinho, 1983). Segundo Von Sperling (2005), a consequência dessa simplificação no processo de estabilização gera aumento no gasto de energia para a aeração. Por outro lado, a redução da disponibilidade de alimento reduz a produção de lodo e faz com que a aeração prolongada seja um dos processos mais eficientes na diminuição da DBO.

Para uso na agricultura, a caracterização do lodo deve incluir os aspectos de potencial agrônômico, presença de substâncias tóxicas, presença de agentes patogênicos e estabilidade, atendo as disposições legais do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, com a resolução número 375 de 2006. Entre as partes mais importantes para seu uso, pode-se mencionar:

Sobre os tipos de lodos:

Lodos tipo B: apresentam uma redução significativa de patógenos através de diversos processos de estabilização.

Lodos tipo A: apresentam redução significativa de patógenos, mais redução adicional de patógenos, além da redução da atratividade de vetores.

Sobre o uso e proibições:

Art. 12. É proibida a utilização de qualquer classe de lodo de esgoto ou produto derivado em pastagens e cultivo de olerícolas, tubérculos e raízes, e culturas inundadas, bem como as demais culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo.

§ 1o Em solos onde for aplicado lodo de esgoto ou produto derivado, as pastagens poderão ser implantadas após um período mínimo de 24 meses da última aplicação.

§ 2o Em solos onde for aplicado lodo de esgoto ou produto derivado, somente poderão ser cultivadas olerícolas, tubérculos, raízes e demais culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo bem como cultivos inundáveis, após um período mínimo de 48 meses da última aplicação.

Art. 13. Lodos de esgoto ou produto derivados enquadrados como classe A poderão ser utilizados para quaisquer culturas, respeitadas as restrições previstas.

Art. 14. A utilização de lodo de esgoto ou produto derivado enquadrado como classe B é restrita ao cultivo de café, silvicultura, culturas para produção de fibras e óleos, com a aplicação mecanizada, em sulcos ou covas.

Para o caso da sanidade do material, a resolução fixou parâmetros para cada tipo de lodo:

- Tipo A de lodo de esgoto ou produto derivado: coliformes termotolerantes <103 numero mais provável (NMP) / g de sólidos totais (ST); ovos viáveis de helmintos < 0,25 ovo / g de ST; salmonela ausência em 10 g de ST; Vírus < 0,25 unidade formadoras de placa (UFP) ou unidade formadoras de foco (UFF) / g de ST.
- Tipo B de lodo de esgoto ou produto derivado: coliformes Termotolerantes <106 NMP / g de ST; ovos viáveis de helmintos < 10 ovos / g de ST.

Além de microrganismos patogênicos há a possibilidade de o lodo abrigar microrganismos não patogênicos com potenciais biotecnológicos, como as bactérias degradadoras de substâncias orgânicas, as bactérias fixadoras de nitrogênio e as bactérias solubilizadoras de fosfato.

4.3. Bactérias degradadoras de substâncias orgânicas

Bactérias heterotróficas degradam a matéria orgânica, contribuindo para a ciclagem de nutrientes ou despoluição nos casos de contaminação ambiental. Para esse último caso, o uso de bactérias está sendo empregado em processos de recuperação e despoluição ambiental (Serafin et al, 2001).

Já para o caso de bactérias que fazem a ciclagem de nutrientes é uma área que ainda precisa ser explorada, posto que a potencialidade apresentada por essas bactérias é promissora. Dentre essas bactérias, destacando-se: (i) as bactérias amilolíticas, convertem amido em ácidos graxos voláteis (Gabarra, 2001); (ii) as bactérias celulolíticas, têm a capacidade de degradar os hidratos de carbono poliméricos em compostos simples, tais como ácidos graxos e álcoois (Pires, 2008); (iii) as bactérias ligninolíticas, utilizam como fonte de carbono a lignina (Basto-Neto, 2012); (iv) bactérias proteolíticas, degradam proteínas presentes na matéria orgânica (Carpiné et al., 2010) e (v) bactérias

queratinolíticas, decompõem estruturas queratinizadas como penas de aves (Pacheco, 2013).

As bactérias amilolíticas foram estudadas, por exemplo, por Bastos-Neto et al. (2012), os quais isolaram diversos morfotipos a partir de cascas de mandioca, com foco na produção de enzimas de possível uso industrial.

Já as bactérias celulolíticas foram estudadas por Lara & Acosta (2013), que isolaram mais de 30 estirpes de estomago de térmitas, procurando demonstrar a importância dessas para a ciclagem de nutrientes.

A biodiversidade de bactérias ligno-celulolíticas em serapilheira de Mata Atlântica foi estudada também por Bogado (2009) o qual encontraram 51 morfotipos diferentes, dos quais só um pequeno grupo teve a capacidade de degradar resíduos ligno-celulolíticos.

As bactérias proteolíticas têm a capacidade de colonizar e sobreviver em diferentes ambientes, como no leite cru refrigerado a baixas temperaturas sendo um problema para a preservação e sanidade deste e outros produtos (Arcuri et al. (2008).

De modo semelhante para algumas bactérias já mencionadas, as bactérias queratinolíticas tem a capacidade crescer em diferentes ambientes. Afirmação constada por Lucas et al. (2003), onde isolaram 33 estirpes bacterinas dos solos.

4.4. Bactérias promotoras de crescimento de plantas

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem colonizar diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas. (Amorim & Melo, 2002).. Essas bactérias podem promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetativos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (Amorim & Melo, 2002).

4.4.1. Bactérias fixadoras de nitrogênio

O N é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o desenvolvimento vegetal (Franco & Döbereiner, 1994). Na maioria dos solos tropicais, a produção das culturas é severamente limitada pela deficiência de N. Dessa forma, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) é uma alternativa para um manejo sustentável dos solos (Hungria et al., 2000). A FBN é o processo pelo

qual o N₂ atmosférico inerte é transformado em NH₃, forma biologicamente útil para os organismos.

A seleção de bactérias diazotróficas pode ser feita por meio da detecção da atividade da enzima nitrogenase em culturas bacterianas (Park et al., 2005), pelo método de redução de acetileno ou por bioensaios como o desenvolvido por Döbereiner (1995). Esse método consiste em cultivar as bactérias em um meio semi-sólido, isento de N, e observar a formação de uma biopelícula aerotóxica característica, seguida de repicagens sucessivas no mesmo meio.

Nos últimos anos, a pesquisa científica vem trabalhando em busca de alternativas para a adubação nitrogenada, através de genótipos com maior potencial para FBN (Urquiaga et al., 1997), de práticas usadas no manejo da cultura que poderiam amplificar a FBN (Baldani et al., 1996).

4.4.2. Bactérias solubilizadoras de fosfato

Junto com o N, o fósforo (P) é um dos nutrientes mais necessários para a nutrição das plantas, exercendo funções metabólicas estruturais, funcionais e de transferência de energia (Nahas, 1994). A disponibilidade desse nutriente no solo é bastante limitada, havendo a necessidade da aplicação de fertilizantes solúveis para adequado crescimento das plantas (Vassileva et al., 1999). Uma alternativa ao processamento químico tradicional é o emprego de micro-organismos solubilizadores de fosfato, já que esses podem aumentar a quantidade de P prontamente disponível para a planta.

A capacidade dos microrganismos em solubilizar fosfatos inorgânicos, é atribuída à redução do pH do meio, principalmente pela exsudação de ácidos orgânicos (Withelaw, 2000). Essa capacidade das bactérias em solubilizar fosfato inorgânico estimula pesquisas com a finalidade de isolar, caracterizar e selecionar estirpes mais eficientes em promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Baldotto et al., 2010), com o intuito de reduzir a aplicação de fertilizantes fosfatados, mitigar os efeitos sobre o meio ambiente e baixar os custos de produção das culturas.

5. TRABALHOS

5.1. Prospecção de bactérias de lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial degradador de substâncias orgânicas

Resumo: Os lodos produzidos nas estações de tratamento de efluentes de abatedouros de aves são uma fonte de riqueza química, orgânica e microbiológica que ainda precisa ser explorada. Objetivou-se neste estudo: (i) realizar a caracterização química do lodo de esgoto de abatedouro de aves e (ii) isolar, quantificar e caracterizar bactérias amilolíticas, celulolíticas, ligninolíticas, proteolíticas e queratinolíticas provenientes do lodo. Amostras de lodo foram coletadas na FRANCAP S.A. e processadas no laboratório da Universidade Federal de Viçosa Campus Florestal. Foram determinados os teores totais de macro e micronutrientes, a porcentagem de C orgânico, a relação C/N e o pH. Para quantificação bacteriana, 10 g de lodo foram homogeneizados em 90 mL de solução salina e dela, realizaram-se diluições seriadas até 10^{-12} . Aliquotas de 100 μ L de cada diluição foram transferidas aos meios específicos. Foram determinadas as unidades formadoras de colônia para cada meio de cultivo. Colônias individuais foram purificadas e caracterizadas com relação à morfologia. O lodo apresentou teores de N, P e K, de 9,5, 1,21 e 0,45 dag/kg, respectivamente. No total, foram purificados e caracterizados 52 isolados, sendo dez amilolíticos, dois celulolíticos, 15 ligninolíticos, dez proteolíticos e 15 queratinolíticos. Os resultados da quantificação das unidades formadoras de colônia variaram entre $21,10 \times 10^{11}$ a $9,55 \times 10^{15}$. Conclui-se que os lodos de abatedouros de aves são uma fonte de riqueza organo-mineral que podem melhorar a fertilidade dos solos, além de apresentar uma ampla gama de bactérias com o potencial de degradar substâncias orgânicas.

Palavras-chaves: microbiologia agrícola, matéria orgânica, resíduos sólidos.

Prospección de bacterias de lodo de alcantarilla de mataderos de aves con potencial degradador de sustancias orgánicas.

Resumen: Los lodos producidos en las depuradoras de aguas residuales de mataderos de aves de corral son una fuente de riqueza química, orgánica y microbiológica aún por explorar. El objetivo de este estudio: (i) que realizar la caracterización química de lodos de matadero de aves (ii) aislar, cuantificar y caracterizar las bacterias amilolíticas,

celulolíticas, ligninolíticas, proteolíticas y queratinolíticas provenientes del lodo. Muestras de lodos se recogieron en Francap SA y fueron tratadas en el laboratorio de la Universidad Federal de Viçosa Campus Forestal. Se cuantificó el total de macro y micronutrientes, el porcentaje de C orgánico, la relación C / N y el pH. Para el recuento bacteriano, se homogeneizaron 10 g de los lodos en 90 ml de solución salina, y, se llevaron a cabo diluciones en serie hasta 10^{-12} . Alícuotas de 100 ul de cada dilución se transfirieron a medios específicos. Se determinó las unidades formadoras de colonias al medio de cultivo. Las colonias individuales se purificarón y caracterizarón con respecto a la morfología. El lodo mostró concentraciones de N, P y K, 9,5, 1,21 y 0,45 dag / kg, respectivamente. En total, se purificó y caracterizó 52 aislamientos, diez dos celulolíticas amilolítica, 15 ligninolítico diez proteolíticas y 15 queratinolíticos. Los resultados de la medición de las unidades formadoras de colonias oscilaron entre $21,10 \times 10^{11}$ a $9,55 \times 10^{15}$. De ello se desprende que los mataderos de aves de lodo son una fuente de riqueza órgano-mineral que puede mejorar la fertilidad del suelo, además de contener una amplia gama de bacterias con el potencial para degradar sustancias orgánicas.

Palabras claves: microbiología agrícola, matéria orgânica, resíduos sólidos.

INTRODUÇÃO

A indústria avícola no Brasil emprega mais de 4 milhões de pessoas e representa 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) (ABPA, 2014). Em 2013, o país atingiu uma produção de 12,3 milhões de toneladas de aves, das quais 69% foram utilizadas para atender o mercado local e 31% para abastecer os mercados internacionais (UBABEF, 2014), permitindo que o Brasil fosse considerado o principal exportador de carne de aves do mundo com 3.918 toneladas por ano (USDA, 2013). O estado do Paraná ocupa o primeiro lugar de produção com 31%, seguido por Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais com 16, 15, 11 e 8%, respectivamente (UBABEF, 2014). No estado de Minas Gerais, 4,78% da produção têm como destino as exportações (IBGE, 2014) e apesar da existência de muitas granjas produtoras de aves, apenas 300 são registradas (IMA, 2013), dificultando a adequada fiscalização dos processos e do manejo de subprodutos desta agroindústria.

Um dos subprodutos gerados no setor avícola é o lodo das estações de tratamento de efluentes de abatedouros, que são originados em toda a cadeia de produção de aves, começando na lavagem dos pisos e nas etapas de recebimento, higienização de caixas,

abate, sangria, escaldamento, depenagem, visceramento, resfriamento, embalagem e expedição (SEMAD, 2010). O lodo pode ser definido como uma mistura de substâncias que geralmente se caracteriza por apresentar minerais, colóides e partículas provenientes de matéria orgânica decomposta em suspensão no meio aquoso (CONAMA, 2006).

O descarte desses lodos originados nas estações de tratamento de efluentes sem nenhum tipo de tratamento leva à contaminação da água e do solo, aumento da proliferação de vetores de doenças e emissão de odores e poluentes gasosos (Heck et al., 2012). Para contornar esses problemas, se destacam na atualidade várias práticas para o manejo desses resíduos, dentre os quais estão os aterros, queima, incineração, reciclagem, compostagem, transformação em biofertilizantes e como matéria prima para a elaboração de substratos (Franco, 2002).

Para uso na agricultura, a caracterização do lodo deve incluir os seguintes aspectos: potencial agrônômico, presença de substâncias tóxicas, presença de agentes patogênicos e estabilidade, conforme descrito na resolução 375 do CONAMA (CONAMA, 2006). Com relação à presença de agentes patogênicos, considera-se a quantidade de diferentes microrganismos como coliformes termotolerantes, ovos viáveis de helmintos, salmonela e vírus entéricos (CONAMA, 2006).

Além de microrganismos patogênicos, há a possibilidade de o lodo abrigar microrganismos não-patogênicos com potencial biotecnológico, como as bactérias degradadoras de substâncias orgânicas. Dentre essas bactérias estão, por exemplo: (i) as bactérias amilolíticas, que convertem amido em ácidos graxos voláteis (Gabarra, 2001); (ii) as bactérias celulolíticas, que possuem a capacidade de degradar os hidratos de carbono poliméricos a compostos simples, tais como ácidos graxos e álcoois (Pires, 2008); (iii) bactérias ligninolíticas, as quais utilizam a lignina como fonte de carbono (Basto-Neto, 2012); (iv) as bactérias proteolíticas, que degradam proteínas presentes na matéria orgânica (Carpiné, et al., 2010) e (v) as bactérias queratinolíticas, que decompõem estruturas queratinizadas, como penas de aves (Pacheco, 2013).

São inúmeros os serviços ambientais que prestam as bactérias aos agroecossistemas, alguns notadamente conhecidos e manejados, como os inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio (Döbereiner, 1995) e solubilizadoras de fosfato natural (Baldotto et al., 2010). Outros conhecidos a longo tempo, mas pouco utilizados comercialmente, como a capacidade de reciclar nutrientes e acelerar os processos de degradação de matéria orgânica.

Para América Latina o manejo dos subprodutos agroindustriais é de vital importância devido ao crescente volume produzido anualmente (FAO, 1983). Segundo a mesma entidade, o maior limitante para este manejo, é a falta de pacotes tecnológicos econômicos e de fácil uso. Dentro desse contexto, pesquisas biotecnológicas voltadas à seleção de bactérias que sejam capazes de transformar, reduzir e mitigar os impactos ambientais que geram os subprodutos das diferentes agroindústrias são almejadas.

O presente trabalho teve como objetivos: (i) caracterizar quimicamente o lodo de esgoto de abatedouro de aves e (ii) isolar, quantificar e caracterizar bactérias oriundas do lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial de degradar substâncias orgânicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de lodo

Amostras de lodo foram coletadas no sistema de tratamento de efluentes do tipo Lodos Ativados / Aeração Prolongada de um abatedouro de aves pertencente a FRANCAP S.A., localizado município de Pará de Minas, MG. As amostras foram transportadas para o Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, onde foram realizados os trabalhos microbiológicos nos anos de 2013 e 2014.

Caracterização química do lodo

Amostras do lodo foram secas em estufa de circulação forçada a 60 °C e enviadas para o Laboratório de Análise de Solos Viçosa Ltda, para determinação dos teores totais de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), boro (B), cobalto (Co), porcentagem de C orgânico, relação entre carbono e nitrogênio (C/N) e pH (EMBRAPA, 1997).

Isolamento e quantificação de bactérias degradadoras de substâncias orgânicas

Amostras de 10 g do lodo foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina (NaCl, 0,85 g L⁻¹) e a partir dessa diluição (10⁻¹) foram realizadas diluições seriadas até 10⁻¹².

Para o isolamento de bactérias amilolíticas, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido constituído de 10 g de amido, 0,4 g de cloreto de amônio (NH₄Cl), 0,8 g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄), 0,12 g de cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O), 0,12 g de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), 15 g de

ágar bacteriológico, 2 mL do fungicida Cerconil ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), 1000 mL de água destilada, seguindo-se incubações por 3 dias (Bastos-Neto et al., 2012).

Para o isolamento de bactérias celulolíticas, amostras de 100 μL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido constituído de 10 g de celulose microcristalina (CMC), 3 g de nitrato de sódio (NaNO_3), 1 g de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0,5 g sulfato de magnésio (MgSO_4), 0,5 g de cloreto de potássio (KCl), 10 g de sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 20 g de ágar bacteriológico, 2 mL de fungicida Cerconil ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), 1000 mL de água destilada, pH ajustado para 6,5 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e/ou hidróxido de potássio (KOH). Após incubação a 30°C por 3 dias, 10 mL de corante vermelho congo ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) em tampão Tris HCl, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0 foram adicionados às placas por 30 min, seguido da lavagem com 5 mL de cloreto de sódio (NaCl , $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) (conforme método Bortolazzo, 2011).

Para o isolamento de bactérias ligninolíticas, amostras de 100 μL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido constituído de 1,2 g de nitrato de 3,0 g de fosfato de potássio monobásico, 6,0 g de fosfato de potássio dibásico, 0,2 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,05g de cloreto de cálcio, 0,001g de sulfato de zinco, 0,01g de sulfato de manganês, 1,0 g de extrato de levedura, 10,0 g de lignina, 15 g de ágar bacteriológico, 2 mL do fungicida Cerconil ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e 1000 mL de água destilada, pH ajustado para 6,5 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e/ou hidróxido de potássio, seguindo-se incubação a 30°C por 3 dias (conforme método de Bogado, 2009).

Para o isolamento de bactérias proteolíticas, amostras de 100 μL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido constituído de 100 mL de leite desnatado, 5 g de peptona de carne, 3 g de extrato de levedura, 12 g de ágar bacteriológico, 4 mL de fungicida Cerconil ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), 1000 mL de água destilada, pH ajustado para 6,5 com ácido sulfúrico e/ou hidróxido de potássio, seguindo-se incubações a 30°C por 3 dias (conforme método de Bach, 2010).

Para o isolamento de bactérias queratinolíticas, amostras de 100 μL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido constituído de 1 g de farinha de pena, 0,5 g de cloreto de sódio, 0,3 g de fosfato de potássio dibásico, 0,4 g de fosfato de potássio monobásico, 15 g de ágar bacteriológico, 2 mL de fungicida Cerconil ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), 1000 mL de água destilada, pH ajustado para 6,5 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e/ou hidróxido de potássio, seguindo-se incubações a 30°C por 3 dias. A farinha de pena foi confeccionada por meio da lavagem das penas em detergente Triton X-100 1% por 24

horas, seguido da lavagem em água destilada, secagem em estufa a 60 °C e moagem em moinho tipo Willey (Bach, 2010).

Para todos os meios de cultivo foram quantificadas as bactérias por meio da obtenção das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Para a purificação dos isolados bacterianos, colônias individuais presentes nas maiores diluições dos meios de cultivo foram transferidas para meio líquido DYGS (2 g de glicose, 2 g de ácido málico, 1,5 g de peptona bacteriológica, 2g de extrato de levedura, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de ácido glutâmico, em 1000 mL de água destilada e pH ajustado para 6,8) e mantidas a 30°C, a 120 rpm por 24 h. Em seguida, as bactérias foram transferidas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo para verificação da pureza dos isolados. Os isolados foram estocados em microtubos plásticos contendo água destilada autoclavada para uso de rotina.

Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

Todos os isolados bacterianos foram caracterizados considerando-se as características das colônias e das células. Aos cinco dias de crescimento em meio sólido DYGS, as colônias bacterianas foram caracterizadas em tamanho, forma (circular ou irregular), elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada, uimbicada), bordo (ondulado, lobado, dentado, filamentosos, inteiro) e superfície (plana, rugosa, papilada) como proposto por Perin (2002). Para caracterização celular foram considerados as variáveis formato celular e coloração de Gram (Gram, 1884). O teste Gram consistiu em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano em uma lâmina com o reagente cristal violeta, por um minuto, lugol, por um minuto, álcool por cinco segundos e safranina por trinta segundos, e depois, a lâmina foi visualizada ao microscópio ótico. As bactérias que adquiriram coloração azul-violeta foram caracterizadas como gram-positivas e as de coloração vermelha como gram-negativas.

Análises estatísticas

Os dados obtidos de UFC sofreram transformação logarítmica para posterior cálculo da média e erro padrão da média para cada meio de cultivo, com três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química do lodo

Os dados das análises químicas do lodo de esgoto de abatedouro de aves são apresentados na tabela 1. Os valores apresentados diferem dos relatados na literatura para outros lodos provenientes de estações de tratamento de efluentes. Como exemplo, Armstrong (2006) observou valores de 0,51, 0,02 e 0,20% para N, P e K, respectivamente, ao estudar o lodo proveniente de reator anaeróbio de lodo fluidizado (Ralf) da Estação de Tratamento Atuba. Em pesquisa feita sobre a produção de moranga irrigada com lodo de estação de tratamentos de efluentes doméstico, os valores foram de 2% para N e 5% para K (De Oliveria et al., 2013). Neste mesmo sentido, Ribeiro et al. (2012) estudando sobre a produção de mamoeiro com lodo de esgoto, reportaram valores para os macronutrientes N, P, e K de 0,7, 0,02, 16%, respectivamente. Os hábitos da alimentação das espécies, o tipo de resíduo e o sistema de tratamentos dos efluentes influenciam a composição química dos lodos (Meurer, 2000).

Tabela 1. Análise química dos teores totais do lodo de esgoto proveniente da Estação de Tratamento Lodos Ativados / Aeração Prolongada da Organização FRANCAP S.A.

| N | P | K | Mg | S | CO | Zn | Fe | Mn | Cu | B | pH | C/N |
|------------------|------|------|------|------|-------|-----------------|------|-----|-----|--------------------|-----|------|
| -----dag/kg----- | | | | | | -----mg/kg----- | | | | (H ₂ O) | | |
| 9,5 | 1,21 | 0,45 | 1,35 | 0,18 | 18,72 | 517 | 1908 | 114 | 342 | 8,3 | 6,7 | 1,96 |

Teores Totais, determinados no extrato ácido (ácido nítrico com ácido perclórico)

N - Método do Kjeldahl

CO - Método Walkley – Black

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que os lodos produzidos em abatedouros de aves são uma fonte de riqueza químico-orgânica e que podem ser destinados para diversos usos. Santos et al. (2014), tendo concluíram que o lodo de esgoto da mesma estação de tratamentos proporcionou aumento da fertilidade dos substratos, elevando principalmente os níveis de N, Ca e P. Em ensaios realizados por Neto et al. (2012), nos quais as análises químicas de lodo apresentam resultados similares aos encontrados na tabela 1, os autores verificaram que a porcentagem de germinação de algodoeiro foi proporcional ao aumento da concentração de biossólidos na água residual. Assim, pode-se inferir que quanto, maior a concentração de matéria orgânica na água, maiores serão os teores de ácido húmicos (Costa et al., 2008), cujo efeito no crescimento e desenvolvimento de plantas já foi amplamente relatado na literatura (Baldotto e Baldotto, 2014). Ribeiro et al. (2012), estudando mamoneira irrigada com diferentes concentrações de lodo de esgoto de estação de tratamentos de lodo doméstico, verificaram que o uso

desse produto proporciona uma boa produtividade em comparação com a adubação convencional.

Pelos valores observados na tabela 1 e pelas pesquisas feitas por diversos autores (Neto et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Santos et al. 2014; Costa et al., 2008), pode-se afirmar que os lodos podem ser utilizados como biofertilizantes para plantas que não sejam utilizadas como pastagem ou cultivos olerícolas, tubérculos, e culturas inundadas ou outras culturas que cuja parte comestível esteja em contato com o solo, atendendo a resolução N° 375, de 29 de Agosto 2006 do CONAMA, bem como para comporem substratos, condicionadores de solos e como observado no presente trabalho, como fonte inicial para o isolamento de bactérias com potencial biotecnológico.

Quantificação e isolamento de bactérias degradadoras substâncias orgânicas

Na Tabela 2, apresentam-se os números de isolados bacterianos aeróbicos como o potencial de biodegradar diferentes compostos orgânicos, por meio de cultura e o \log_{10} das unidades formadoras de colônias (UFC), Esses resultados refletem o tipo de manejo de lodo usado na empresa FRANCAP S.A. O sistema de lodo ativado utilizado para o tratamento de águas residuais caracteriza-se por ser um processo no qual uma massa biológica cresce e floclula sempre em presença de oxigênio, permitindo assim a proliferação de microrganismos aeróbicos (Sobrinho, 1983). Neste mesmo sentido, 52 morfotipos de bactérias foram isolados dos cinco meios específicos de cultura com a potencialidade degradar matéria orgânica, já que, 95% da população microbiana presente na matéria orgânica pertencem ao grupo das população microbiana presente na matéria orgânica pertencem ao grupo das decompositoras e principalmente bactérias heterotróficas que são as responsáveis pela biodegradação da fração orgânica solúvel da matriz (Ferreira, 2006).

Tabela 2. Número de isolados bacterianos, diluições por meio específico de cultivo e \log_{10} Unidades Formadoras de Colônia. (UFC) por grama de lodo.

| Meio de cultivo | Nº de isolados | Diluição | Log UFC |
|-----------------|----------------|------------|---------|
| Amilolítico | 14 | 10^{-9} | 12,8 |
| Celulolítico | 2 | 10^{-12} | 16 |
| Queratinolítico | 11 | 10^{-8} | 13,5 |
| Ligninolítico | 15 | 10^{-10} | 14 |
| Proteolítico | 10 | 10^{-8} | 12 |
| Total | 52 | | |

O número de isolados bacterianos amilolíticos, 14(Tabela 2), corresponde, de forma proporcional, ao trabalho de Bastos-Neto et al. (2012), os quais encontraram 19 morfotipos de bactérias isoladas da casca de mandioca. Ao fazer a conversão logarítmica das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do valor encontrando pelos autores o resultado foi inferior (7,4) ao encontrado no presente trabalho (12,8). Esse fato confirma que o manejo da FRANCAP S.A. reflete a riqueza microbiológica amilolítica potencial apresentado pelos lodos para a produção de enzimas amilases (De Jesus, 2013; Albuquerque et al., 2010).

Para as estirpes celulolíticas, os resultados da tabela 1 apresentam apenas 2 isolados bacterianos, mas os valores absolutos das UFC foram os mais altos, $16 \log_{10}UFC/g$ de lodo. Ressalta-se que para este meio de cultivo a diferenciação morfológica das bactérias foi dificultada pela coloração escura do meio e pelo fato da maioria das colônias bacterianas ser translúcido. Na literatura existem relatos, por exemplo, de Giovedy (2011), que obteve 73 tipos de bactérias celulolíticas de serrapilheira, das quais 34% apresentaram capacidade de degradação in vitro. Outros estudos reportam o isolamento de 39 morfotipos de bactérias, das quais 9 apresentaram resultados positivos na degradação de celulose de serrapilheira (Lara & Acosta, 2013). Nessa mesma pesquisa, embora os autores verificassem maior número de isolados de bactérias, seguindo-se incubações a 30°C por 3 dias foi de 8, metade do valor apresentado na tabela 2 para o lodo de abatedouro de aves.

Para as bactérias queratinolíticas, com base nos números encontrados na tabela 2 (15 isolados) e ($13,5 \log_{10}UFC/g$), pode-se afirmar que o lodo de abatedouro de aves apresentou valores elevados, tendo em conta o tipo de material, pois estudos feitos por Lucas et al. (2003) encontraram 33 isolados bacterianos queratinolíticos obtidos diretamente de penas de galinhas..

As bactérias ligninolíticas apresentaram os maiores valores para número de isolados e de UFC (Tabela 2). São poucos os trabalhos sobre o isolamento de bactérias decompositoras de lignina. Bogado (2009), investigando a biodiversidade de bactérias lignocelulolíticas em serapilheira da Mata Atlântica, encontrou 51 morfotipos de bactérias e com $8 \log_{10}UFC/g$ de composto; o mesmo autor afirma que do total das bactérias, só 20% apresentaram a capacidade de degradar lignina.

Dentre as bactérias estudadas, as proteolíticas apresentaram os menores valores de UFC (Figura 1), apesar da capacidade ampla de colonizar e permanecer em diferentes tipos de ambientes. Arcuri et al. (2008), encontraram em leite cru e refrigerado a 2°C valores de $6,5 \log_{10}UFC/ml$, indicando uma alta concentração desse tipo de bactéria. Nessa mesma linha de

estudo, outra pesquisa com leite refrigerado a 4°C, obteve 2,3 log UFC / ml (Pinto et al., 2006), reafirmando o dito anteriormente sobre a capacidade de permanência em diferentes condições ambientais.

Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

Realizou-se a caracterização dos 52 isolados bacterianos obtidos a partir de lodo de esgoto de abatedouro de aves, acompanhando os critérios propostos por Perin (2002) e a coloração de Gram (1884). Os resultados são apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente. Nessas tabelas, observa-se a elevada diversidade morfológica que apresentaram as colônias bacterianas isoladas do lodo de esgoto de abatedouro de aves.

Tabela 3. Caracterização celular das bactérias isoladas de lodo de estação de tratamentos de efluentes de abatedouro de aves.

| Isolados | Formato Celular | Coloração Gram |
|------------------|-----------------|--------------------|
| Amilolíticos | 50% Bastonete | 100% gram positivo |
| | 50% Cocos | |
| Celulolíticos | n.i.* | n.i.* |
| Ligninolíticos | 10% Bastonete | 90% gram positivo |
| | 90% Cocos | 10% gram negativo |
| Proteolíticos | 30% Bastonete | 90% gram positivo |
| | 70% Cocos | 10% gram negativo |
| Queratinolíticos | 30% Bastonete | 90% gram positivo |
| | 70% Cocos | 10% gram negativo |

* n.i.: Não identificado

Embora os isolados bacterianos apresentem diversidade de cores, formas e tamanho, em geral, acompanham uma tendência, por exemplo, quase 80% possuem tamanho superior a 1mm, borda inteira, formato celular de cocos e são gram-positivos. Faria et al. (2006) também observaram uma elevada incidência de bactérias gram-positivas no lodo de esgoto das estações de tratamento de Franca e Barueri, 77% e 61% em um total de 77 e 143 isolados, respectivamente. Esses mesmos autores inferiram que as bactérias gram-positivas mais comuns no lodo pertenceriam aos gêneros *Bacillus*.

Tabela 4. Caracterização morfológica das colônias das 52 estirpes bacterianas isoladas de estação de tratamentos de efluentes de abatedouro de aves.

| Isolados | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Muco |
|------------------|-----------------|---------------|--------------------------|-----------------------------|------------|---------------------------|------|
| Amilolíticos | 60% \geq 1 mm | 90% circular | 80% plana | 70% inteira | 90% lisa | 100% branco | - |
| | 40% < 1 mm | 10% irregular | 20% lente | 20% ondulada 10% dentada | 10% rugosa | | |
| Celulolíticos | n.i | 100% circular | n.i* | 100% inteira | n.i* | 100% translúcida | - |
| Ligninolíticos | 100% \geq 1mm | 71% circular | 64% plana | 64% inteira | 100% lisa | 79% branco | - |
| | | 29% irregular | 26% lente | 21% dentada 15% lobada | | 21% translúcida | |
| Proteolíticos | 89% \geq 1 mm | 67% circular | 56% convexa | 80% inteira | 90% lisa | 70% branco | + |
| | 11% < 1 mm | 33% irregular | 44% lente | 20% ondulada | 10% rugosa | 20% creme 10% vermelho | |
| Queratinolíticos | 67% \geq 1 mm | 80% circular | 60% plana | 93% inteira | 100% lisa | 73% branco | - |
| | 33% < 1 mm | 20% irregular | 26% lente 14% convexa | 7% dentada | | 27% translúcida | |

* n.i. : Não identificado

Como foi possível observar neste trabalho, nos lodos de efluentes de estações de tratamentos de abatedouros de aves existem agentes microbiológicos que interatuam e convivem, cumprindo funções específicas e/ou com a potencialidade de degradar compostos ou substâncias orgânicas variadas. Esta elevada diversidade permite criar frentes de investigações em diversos campos, que culminem em processos biotecnológicos aplicáveis diferentes áreas da sociedade. Entre áreas potenciais cita-se o manejo dos ecossistemas urbanos e agrários, uma vez que, em razão da ação dos microrganismos degradadores de matéria orgânica, os subprodutos das agroindústrias, como por exemplo, resíduos de culturas, lodos de esgotos e resíduos domiciliares, podem entrar em processos de ciclagem de nutrientes, diminuindo assim o impacto desses resíduos sobre o ambiente.

CONCLUSÕES

1. O lodo de esgoto de abatedouro de aves apresenta diversidade funcional e morfológica de bactérias com potencial degradador de substâncias orgânicas.

2. Estão presentes no lodo de esgoto de abatedouro de aves em ordem crescente de quantidade as bactérias celulolíticas, ligninolíticas, amilolíticas, queratinolíticas e proteolíticas.
3. O lodo de esgoto de abatedouro de aves apresenta potencial para uso na fertilidade dos solos por possuir elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Organizações FRANCAP S.A., à bióloga Luciana Silva, à estagiária Fernanda Oliveira. Ao bolsista de iniciação científica Klever Silveira e à técnica de laboratório Débora Durães da UFV. Ao CNPq, FAPEMIG e FUNARBE pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa concedida ao primeiro autor no programa de pós-graduação Manejo e Conservação de Ecossistemas Agrários e Naturais da Universidade Federal de Viçosa.

BIBLIOGRAFIA

- ABPA- Associação Brasileira de Produção de Proteína Animal- 2014.
http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_aviculturano_brasil. 20 Ago. 2014.
- Albuquerque, B.; Sales, A.; Takaki G.; Messias, A.; da Silva, C. Detecção de amilase e urease em bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto da estação de tratamento Mangueira, Recife – Pernambuco. *Exacta*, v. 8, p. 289-298, 2010.
- Arcuri, E.; da Silva, Y.; Brito, M.; Brito, J.; Lange, C.; Magalhães, M. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotólicas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v. 38, p. 250-255, 2008.
- Armstrong, D. Lodo de esgoto alcalinizado como fonte de nitrogênio no desenvolvimento inicial da cultura do arroz. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006. 75p. Dissertação de Mestrado.
- Bach, E. Seleção, caracterização e identificação de bactérias queratinolíticas provenientes de solos brasileiros. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. 120p. Dissertação de Mestrado.

- Baldotto, L.; Baldotto, M.; Olivares, L.; Viana, A.; Bressan-Smith, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v. 34, p. 349-360 2010.
- Baldotto, M.; Baldotto L. Ácidos húmicos. *Revista Ceres*, v. 61, p. 856-881, 2014.
- Bastos-Neto, B.; Recareya, H.; do Espirito Santo M.; Ferrao-Gonzales, A. Isolamento e caracterização de microrganismos amilolíticos presentes na rizosfera de tuberosas amiláceas. *Diálogos & Ciência*, v.10, p.153-158, 2012.
- Bogado, I. Biodiversidade de bactérias lignocelulolíticas da Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2009. 85p. Dissertação de Mestrado.
- Bortolazzo, N. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2011. 103p. Dissertação de Mestrado.
- CONAMA. O Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução No 375 de 29 de Agosto de 2006. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. 25 Out 2014.
- Carpiné, D.; Dagostin, J.; Santa, H.; Chacón, D.; Terra N.; Santana, O. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias isoladas de salames artesanais. *Ambiência Guarapuava*, v. 6, p. 125-132, 2010.
- Costa, C.; Costa, B.; Costa, O.; Andrade, R.; Santos, J. Utilização de bioestimulante na produção de mudas de melancia. *Revista Verde*, v. 3, p. 110-115, 2008.
- De Jesus, J. Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de amilases isoladas da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2013. 97p. Dissertação de Mestrado.
- De Oliveira, P.; Gloaguen, T.; Gonçalves, R.; Santos D. Produção de moranga irrigada com esgoto doméstico tratado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.17, p.861–867, 2013.
- Dobereiner, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry*, v.29, p. 771-774, 1995.
- EMBRAPA- Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Manual de métodos de análise do solo. 2. ed. EMPRAPA, 1997. 212 p.
- FAO. Food Agriculture Organization of the United. <http://www.fao.org/docrep/018/ar127s/ar127s.pdf>. 20 de Fev. 2015.

- Faria C.; Campos, V.; de Souza, R.; Moreira, F.; de Moura, B.; Ribeiro, L.; Faria M. Isolamento e Caracterização de Bactérias do Lodo de Esgoto com Potencial Antagonismo a Nematoides. *Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais*, v.2, p. 247-256, 2006.
- Ferreira, F.; Luizão, J.; Miranda, F.; Silva, R.; Vital, T. Nutrientes na solução do solo em flores de terra firme na Amazônia central submetida à extração de madeira. *Acta Amazônica*, v. 36, p. 59-68, 2006.
- FRANCAP. Organizações Francap. <http://www.francap.ind.br/index.php>. 30 Mar 2015.
- Franco, D. A. Animal disposal – the environmental, animal disease, and public health related implications: an assessment of options. In: California Department Of Food And Agriculture Symposium, Sacramento, 2002. <http://www.rendermagazine.com/industry/animal-disposal>. 23 Ago 2014.
- Gabarra, P. Digestibilidade de nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos de novilhos Nerole alimentados com fontes proteicas e energéticas com diferentes degradabilidades ruminais. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2001. 101p. Dissertação de Mestrado.
- Giovedy, J.; Vilela, K.; Parma, M.; Silva, C.; Melo I. Isolamento e caracterização de bactérias celulolíticas de serrapilheira da caatinga. In: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 5, 2011, Campinas. Anais CIIC, 2011.
- Gram, C. *Fortsch. Med.* 2.185-188. 1884.
- Heck, K.; de Marco, E.; Hahn B.; Kluge, M.; Spilk, F.; Van-Der S. Temperatura de degradação de resíduos em processo de compostagem e qualidade microbiológica do composto final. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, p. 54–59, 2012.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-2013 http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_publ_completa.pdf. 21 Ago. 2014.
- IMA. Instituto Mineiro Agropecuário – 2013 <http://www.ima.mg.gov.br/produtos-de-origem-animal2/estabelecimentos-registrados>. 21 Ago. 2014.
- Lara, C.; Acosta R. Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 15, p. 8-16, 2013
- Lucas, S.; Broennimann, L.; Febbraro, P.; Heeb, P. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microbial Ecology*, v. 45, p. 282-290, 2003.
- Meurer, J. Fundamentos de química do solo. 2da. Ed. Gênese, 2000. 290p.

- Neto, O.; Filho, J.; Dias, N.; Rebouças, J.; De Oliveira, F.; Diniz, A. Fertigação do algodoeiro utilizando efluente doméstico tratado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, p. 200–208, 2012.
- Pacheco, G. Avaliação de complexos enzimáticos sobre o farelo de arroz integral e farinha de penas em dietas de cães. Porto Alegre: Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2013. 98p. Dissertação de Mestrado.
- Perin, L. Ecologia e diversidade de *Glucanocetobacter diazotrophicus* associada à cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002. 40p. Dissertação de Mestrado.
- Pinto, C.; Martins, M.; Vanetti M. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóficas proteolíticas. *Ciência Tecnológica do Alimento*, v. 26, p. 645, 2006.
- Pires, V. Estrutura e função de módulos não catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal: o efeito de enzimas exógenas na valorização nutritiva de dietas à base de *Lupinus albus* para leitões. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2008. 145p. Tese de Doutorado.
- Riffel, A. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseo bacterium* sp. e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratonolítica. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2006. 130p. Tese de Doutorado.
- Ribeiro, M.; Rocha, M.; dos Santos A.; da Silva, J.; Peixoto, M.; Paz, M. Crescimento e produtividade da mamoneira irrigada com diferentes diluições de esgoto doméstico tratado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, p. 639–646, 2012.
- Santos, F.; Kunz S.; Caldeira, M.; Azevedo, C.; Rangel, O. Características químicas de substratos formulados com lodo de esgoto para produção de mudas florestais. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, p. 971–979, 2014.
- SEMAD. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Diagnóstico Ambiental das Indústrias de Abate no Estado de Minas Gerais http://www.feam.br/images/stories/arquivos/producaosustentavel/diagnostico_industria_abate.pdf. 21 Ago. 2014
- Sobrinho, A. Estudo dos fatores que influenciam no processo de lodos ativados - determinação de parâmetros de projeto para esgotos predominantemente domésticos. *Revista DAE*, v. 132, p. 49, 1983.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. 2014
<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>. 20
Ago. 2014.

USDA. United State Department of Agriculture. 2013
[http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20Products
%20Anual_Brasilia_Brazil_8-15-2013.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20Products%20Anual_Brasilia_Brazil_8-15-2013.pdf). 20 Ago. 2014.

5.2. Seleção de bactérias diazotróficas isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves

Resumo: Os altos custos econômicos e ambientais gerados pela contínua fertilização nitrogenada têm incrementado o interesse na procura de sistemas que possam diminuir a aplicação de fertilizantes sem pôr em risco os rendimentos das culturas. O trabalho objetivou: (i) isolar e quantificar bactérias diazotróficas do lodo de esgoto de abatedouro de aves em diferentes meios de cultura; (ii) caracterizar as bactérias de acordo com a morfologia celular e morfologia da colônia e (iii) avaliar o crescimento e conteúdo de N em plantas de milho em resposta à inoculação como isolados bacterianos diazotróficos. No total obtidos isoladas 16 isolados bacterianos, sendo quatro no meio JMV, duas no JMVL, quatro no NFb, três no JNFb, uma no LGI e duas no LGI-P. Todas as estirpes bacterianas apresentaram coloração gram positiva. Dez isolados apresentaram formato de bastonete e seis apresentaram formato de cocos. Para avaliar a fixação biológica de nitrogênio em viveiro, realizou-se a inoculação bacteriana em sementes de milho. O experimento consistiu de 17 tratamentos (16 estirpes bacterianas e um controle sem inoculação), conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e tendo como unidade experimental um vaso contendo duas plantas de milho. Aos 45 dias, foram mensuradas as variáveis: altura da planta, número de folhas, diâmetro do caule, matéria fresca e seca da raiz e parte aérea e conteúdo de N. Os maiores valores das variáveis avaliadas foram obtidos com o isolado UFV L-162, que cuja inoculação resultou em uma matéria seca total de 0,68 g e um conteúdo de N de 22,14 mg/planta, representando incrementos de 74% e 133%, respectivamente, em relação ao controle. Conclui-se que bactérias diazotróficas habitam lodo de esgoto de abatedouro de aves e apontam para a possibilidade do uso das estirpes selecionadas como uma alternativa para estimular o desenvolvimento vegetal e enriquecimento de inoculantes e ou biofertilizantes.

Palavras chaves: *Zea mays* L., BPCP, resíduos sólidos.

Selección de bacterias diazotróficas aisladas de lodos de alcantarilla de mataderos de aves

Resumen: Los altos costos económicos y ambientales de la fertilización nitrogenada continua y a veces excesiva, han aumentado el interés en la búsqueda de sistemas que pueden reducir la aplicación de fertilizantes sin poner en peligro las cosechas. El estudio tuvo como objetivo: (i) aislar y cuantificar diazotróficas las aves de lodos de aguas residuales del matadero en diferentes medios de cultivo, (ii) caracterizar las bacterias de acuerdo con la morfología y la morfología de colonias de células y (iii) evaluar el crecimiento y el contenido de N en plantas de maíz en respuesta a la inoculación bacteriana. En total se aislaron 16 cepas bacterianas, cuatro de JMV medio, dos JMVL, cuatro NFb, tres JNFb, un LGI y dos LGI-P. Todas las cepas bacterianas mostraron tinción de Gram positiva y difieren en la morfología celular, donde diez con forma de bastón , y seis tenían formato cocus. Para evaluar la fijación biológica de nitrógeno en el vivero, hubo inoculación bacteriana en semillas de maíz. El experimento consistió en 17 tratamientos (16 cepas bacterianas y un control no inoculado), llevada a cabo en un diseño completamente al azar con seis repeticiones y con la unidad experimental un recipiente que contiene dos plantas de maíz. En 45 días, se midieron las variables: altura de planta, número de hojas, diámetro del tallo, peso fresco y seco de raíz y disparar y el contenido de N. Las tasas más altas en las variables evaluadas se obtuvieron con UFV L-162 lo que resultó en un total de materia seca de 0,68 g y un contenido de nitrógeno de 22,14 mg / planta, lo que representa un aumento del 74% y 133%, respectivamente, en comparación con el control. Se concluye que las bacterias fijadoras de nitrógeno naturalmente habitan las aves de lodos de aguas residuales de matadero y apuntan a la posibilidad de utilizar cepas seleccionadas como alternativa para estimular el desarrollo de la planta y el enriquecimiento de inoculantes y biofertilizantes.

Palabras claves: Zea mays L., BPCP, residuos sólidos.

INTRODUÇÃO

Os altos custos econômicos e ambientais resultante da fertilização nitrogenada têm incentivado a busca por estratégias que possam diminuir a aplicação de fertilizante sem pôr em risco os rendimentos das culturas (Guimarães, 2011). Além do fitomelhoramento cujo objetivo é a obtenção de variedades de plantas mais adaptáveis a solos de baixa fertilidade e a condições agroambientais desfavoráveis, trabalhos com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), que buscam o conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos, vêm sendo o foco da biotecnologia (Ebole de Santana et al., 2013).

As BPCP promovem o crescimento das plantas através de mecanismos diretos, tais como a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato, a síntese de reguladores de crescimento, e de mecanismos indiretos, tais como como a produção de sideróforos e aleloquímicos, o controle biológico e a indução de resistência local e sistêmica (Hallmann et al., 1997).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) representa uma das ações das BPCP e é realizada por meio de bactérias conhecidas como diazotróficas, as quais apresentam vida livre ou encontram-se associadas aos tecidos de plantas (Hallmann et al., 1997; Baldotto et al., 2008). A FBN é um processo essencial para transformar o N_2 , uma molécula estável e abundante na atmosfera, que não pode ser utilizada pela maioria das plantas e microrganismos, na forma inorgânica NH_3 e, a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas vitais em sistemas biológicos. A reação de redução do N_2 a NH_3 é realizada por microrganismos que contêm a enzima nitrogenase (Novakowski et al., 2011).

A partir da década de 1950 diferentes estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico iniciaram-se no Brasil. Nesses estudos, foi observada a existência de bactérias diazotróficas de vida livre nos solos tropicais (Döbereiner, 1953). Deste então, muitos trabalhos têm sido realizados para se compreender a interação planta-bactéria-ambiente (Ferreira et al., 2000; Junior e da Silva, 2000; Baldotto et al., 2010; Roesch et al., 2005; Grayson et al., 1998).

O conhecimento da associação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas de milho desperta interesse, posto que o milho umas das três culturas mais produzidas no mundo, incluindo no Brasil. Essa cultura, além de ter uma conotação econômica, é de vital importância no âmbito social e político (Oliveira et al., 2007). A produção de milho na agricultura brasileira é amplamente difundida. Porém, há diferenças de produção nas

distintas regiões do país. A maior produção está concentrada no Sul, Sudeste e Centro-Oeste, regiões responsáveis por 90% do total produzido, onde a cultura do milho ocupa a segunda maior área cultivada, depois da soja (CONAB, 2013).

As interações entre BPCP-milho-ambiente têm sido demonstradas em vários trabalhos e por diversos autores (Baptistas et al., 2011; Kappes et al., 2013; Ikeda et al., 2011), apresentando resultados promissores na procura de sistemas de fertilização econômicos e sustentáveis.

Bactérias diazotróficas já foram isoladas de diferentes fontes, como por exemplo órgãos das plantas (Grayson et al., 1998), solos (Nóbrega et al., 2004) e resíduos orgânicos (Aguiar, 2012). Os lodos de esgoto de abatedouro de aves, por apresentarem elevada riqueza microbiana (Bettioli e Fernandes, 2004), podem também abrigar bactérias diazotróficas. Esses lodos são definidos como uma mistura de substâncias que geralmente se caracterizam por apresentarem minerais, colóides e partículas provenientes de matéria orgânica decomposta em suspensão no meio aquoso (CONAMA, 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) isolar e quantificar bactérias diazotróficas de lodo de esgoto de abatedouro de aves em diferentes meios de cultura; (ii) caracterizar as bactérias de acordo com a morfologia celular e morfologia da colônia e (iii) selecionar os isolados bacterianos promotores de crescimento de plantas de milho em casa-de-vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e caracterização das amostras de lodo

Amostras de lodo de esgoto de abatedouro de aves (resíduo gerado no sistema de tratamento de efluentes do tipo Lodos Ativados/Aeração Prolongada) foram cedidas pelas Organizações FRANCAP S.A., município de Pará de Minas de Minas Gerais. As amostras foram transportadas para o Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, onde foram realizados os trabalhos microbiológicos nos anos de 2013 e 2014.

O lodo de esgoto de abatedouro de aves caracteriza-se quimicamente por apresentar: (N 9.5, P 1.1, K 0.45, Mg 1.35, S 0.18, CO 18.72) dag/Kg ; (Zn 517, Fe 1908 , Mn 114, Cu 342, B 8.3) mg/Kg ; pH 6.7; C/N 1.96.

Isolamento e quantificação de bactérias diazotróficas

O isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Amostras de 10 g do lodo foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina (NaCl, 0,85 g L⁻¹) e a partir dessa diluição (10⁻¹) foram realizadas diluições seriadas até a diluição 10⁻⁶. Aliquotas de 100 µL das diferentes diluições foram transferidas, em triplicata, para frascos de vidro contendo 5 mL dos meios de cultura semi-sólidos JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl (Döbereiner et al., 1995; Dos Santos, 2008). A formação de uma película aerotáxica típica na superfície do meio após 7 dias de incubação em câmara de crescimento a 30°C foi considerada como resultado positivo.

A contagem das bactérias presentes no meio de cultura foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (Döbereiner et al., 1995), utilizando a Tabela de McCrady para três repetições por diluição.

Os resultados obtidos foram submetidos à transformação logarítmica. Em seguida, foram calculadas as médias e o erro padrão da média para cada tratamento.

Caracterização celular e das colônias bacterianas

Após o isolamento, as bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 h, a 30°C e 120 rpm e colocadas em placas de Petri contendo esse mesmo meio acrescido de agar (15g /L) porém sólido. As placas permaneceram em estufa bacteriológica a 30°C por 7 dias, e as colônias resultantes, foram caracterizadas de acordo com as características das células (forma e coloração de Gram) e as características das colônias (forma, cor, tamanho, elevação, borda, superfície e mucosidade) (Perin, 2002).

Cada isolado bacteriano foi nomeado, seguindo-se o código: UFV L-ABC, onde UFV = Universidade Federal de Viçosa; L = Lodo; A = meio de cultura usado no isolamento (1 = JMV, 2 = JMVl, 3 = NFb, 4 = JNFb, 5 = LGI, 6 = LGI-P); B = diluição; C = número de ordem do isolado na coleção.

Seleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento de plantas de milho

O ensaio de seleção bacteriana consistiu de 17 tratamentos, sendo 16 isolados bacterianos e um controle (sem inoculação), conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições. A unidade experimental foi um vaso contendo 2 plantas de milho.

Para obtenção do pré-inóculo, as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 120 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi vertido em frascos de erlenmeyer contendo 200 mL de meio DYGS. Os frascos permaneceram por 24h. Sob

agitação de 120 rpm, a 30°C, para obtenção do inóculo. A inoculação foi realizada no erlenmeyer pela imersão das sementes de milho. Cada tratamento ficou imerso no meio bacteriano por 2 horas, com posterior aplicação do mesmo meio bacteriano no substrato. O controle foi imerso em meio líquido DYGS autoclavado. Posteriormente, as sementes foram transferidas para vasos de plástico de 0.7dm³. O substrato usado apresentava: pH 4,1; (P 6,8, K 78) mg/dm³; (Ca 0,6, Mg 0,3, Al 1,4, H+Al 7,59, SB 1,10, CTC₍₀₎ 2,50, CTC_(T) 8,69) cmol_c/dm³; V 13, m 56 %. O experimento foi conduzido em casa de vegetação.

Aos 45 dias após plantio, as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: altura da planta (ALT); diâmetro do caule (DIAM); número de folhas (NF); matéria fresca da raiz (MFR); matéria fresca da parte aérea (MFPA); matéria fresca total (MFT); matéria seca da raiz (MSR); matéria seca da parte aérea (MSPA); matéria seca total (MST), obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a 65 °C por 72 horas e posterior pesagem em balança de precisão.

A análise de nitrogênio (N) foi realizada pelo método Kjeldal no Laboratório de Análise de Solos Viçosa Ltda., com três repetições por tratamento (repetições que apresentaram a maior MST), após a digestão sulfúrica de folhas e raízes. Os conteúdos de N foram estimados por meio da multiplicação da matéria seca total (MST) pelo teor de nitrogênio.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do programa R e as médias foram comparadas pelo teste de TUKEY a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e quantificação de bactérias diazotróficas

O isolamento em meios de cultura isentos de N resultaram na obtenção de 16 estirpes de bactérias diazotróficas a partir de lodo de esgoto de abatedouro de aves (Tabela 1.)

Döbereiner (1995) e Roesch et al. (2005) isolaram bactérias *Burkholderia* spp, *Azospirillum* spp, *Herbaspirillum* spp, *Azospirillum amazonense*, *Acetobacter diazotrophicus*, foram encontradas utilizando os meios de cultura JMV, JMVL, NFb, JNFb, LGI e LGI-P, respectivamente. Existe a possibilidade que as 16 estirpes bacterianas isoladas (Tabela 1) pertençam a esses gêneros, porém é necessário fazer identificações rigorosas para comprovar este fato.

Ao ser comparado o número de isolados de bactérias diazotróficas do lodo de esgoto de abatedouro de aves (n=16) com o resultado de Bergamaschi et al. (2007), onde encontraram 76 estirpes em plantas de sorgo forrageiro, ou de Ikeda et al. (2010), que isolaram 414 bactérias endofíticas de plantas de milho, observa-se que a quantidade foi inferior, fato que pode ser explicado pelo efeito evolutivo da simbiose entre planta-bactéria-solo (Grayston et al., 1998). Outros estudos corroboram a premissa exposta por Grayston e colaboradores, já que, em estudos biogeográficos de bactérias de culturas como o milho (Roesch et al., 2005; Gomes et al., 2010), arroz (Ferreira et al., 2003) e cana-de-açúcar (Perin, 2003; Junior e da Silva et al., 2000), constataram um maior número de bactérias diazotróficas em raízes que na parte aérea.

Tabela 1. Número de estirpes bacterianas diazotróficas isoladas por meio de cultivo com a respectiva diluição e o Log₁₀ Numero Mais Provavel (NMP) por grama de solo.

| Meio de cultivo | Número de isolados | Diluição | NMP |
|-----------------|--------------------|------------------|------|
| JMV | 4 | 10 ⁻⁶ | 7,15 |
| JMVL | 2 | 10 ⁻⁶ | 6,46 |
| NFB | 4 | 10 ⁻⁶ | 6,95 |
| JNFB | 3 | 10 ⁻⁵ | 6,48 |
| LGI | 1 | 10 ⁻⁶ | 7,11 |
| LGI-P | 2 | 10 ⁻⁶ | 7,04 |
| Total | 16 | | |

A maior quantidade de bactérias diazotróficas foi observada no meio JMV (log do NMP/g de lodo = 7,15) e a menor no meio JMVL (log do NMP/g de lodo = 6,46) como observado no gráfico 1. Esses resultados são superiores aos encontrados por Milani et al. (2011) em cana-de-açúcar, quando isolaram bactérias do solo, raízes e folhas, na quantidade variando de 5,46 a 7,28 (log do NMP/g de planta). Já Reis et al. (2000) e Perin (2003) estudando gramíneas e cana-de-açúcar, apresentaram semelhanças com a quantidade de bactérias encontradas no lodo de abatedouro de aves. A presença dessas bactérias em quantidade elevada no lodo pode ser explicada pelo tipo de tratamento dos

lodos ativados, onde uma contínua injeção de ar permite a proliferação de microrganismos aeróbicos (Sobrinho, 1983).

Um fato corrente em trabalhos de prospecção de bactérias diazotróficas é a variabilidade dos resultados com relação à riqueza e abundância das estirpes. Nos lodos de abatedouros de aves foi observada riqueza baixa e abundância elevada. Em outros casos, como dos Santos (2008), estudando fruteiras tropicais, tanto a riqueza como a abundância de espécies foram elevadas e dependentes da época do ano.

Em um trabalho feito por Melloni et al. (2004), foram isoladas 36 estirpes bacterianas diazotróficas de solos em processo de recuperação depois de serem submetidos à mineração. Neste mesmo sentido, o log do NMP / g de solo, apresentou uma ampla variação, de 0 a 12. Os autores atribuíram os valores baixos encontrados ao baixo teor de matéria orgânica no solo, além, de aos baixos teores de K, P e à baixa saturação de bases. Resultado contraste com o obtido no presente trabalho, pois no lodo de abatedouros de aves, se evidencia que elevada abundância microbiana, fato que pode ser atribuído em parte, aos altos conteúdos de matéria orgânica presente neles. Já que, os microrganismos encontram nesta, as condições e nutrientes necessários para seu desenvolvimento.

Caracterização celular e das colônias bacterianas

Das 16 amostras analisadas e exibidas nas tabelas 2 e 3, 50% dos isolados bacterianos apresentaram colônias como diâmetro a 1. Na coloração, houve variação das tonalidades de branco-leitoso até amarelo-leitoso.

Tabela 2. Caracterização das colônias dos isolados bacterianos de lodo de esgoto de abatedouro de aves nos meios específicos. Identificação dos isolados bacterianos: nome UFV seguido dos caracteres que indicam: Lodo de esgoto de abatedouro de aves (L), meio de cultura usado no isolamento (1 – JMV, 2 – JMV L, 3 – NFb, 4 – JNFb, 5 – LGI, 6 – LGI-P), diluição, ordem.

| Caracterização das colônias | | | | | | | |
|-----------------------------|--|---------|----------|----------|----------|------------|------------|
| Isolado | Coloração | Tamanho | Elevação | Forma | Borda | Superfície | Mucosidade |
| UFV L-161 | Centro branco leitoso | <1 mm | Lente | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-162 | Centro branco claro, borda branca e translúcida. | <1 mm | Plana | Circular | Ondulada | Lisa | + |
| UFV L-163 | Centro branco leitoso, borda branca e translúcida. | 1 mm | Lente | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-164 | Centro branco, borda branca e translúcida. | 1 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-261 | Centro branco leitoso | 1 mm | Lente | Circular | Ondulada | Lisa | + |
| UFV L-262 | Centro amarelo leitoso | >1 mm | Convexa | Circular | Ondulada | Lisa | + |
| UFV L-361 | Centro branco leitoso | <1 mm | Lente | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-362 | Centro branco leitoso | >1 mm | Convexa | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-363 | Centro branco | 1 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-364 | Centro branco claro, borda translúcida. | >1 mm | Lente | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-451 | Centro branco leitoso, borda translúcida. | <1 mm | Plana | Circular | Ondulada | Lisa | + |
| UFV L-452 | Centro branco borda translúcida | <1 mm | Lente | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-453 | Centro branco leitoso, borda branca e translúcida. | >1 mm | Convexa | Circular | Inteira | Lisa | + |
| UFV L-562 | Centro branco claro, borda translúcida. | <1 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV L-661 | Centro branco claro, borda e clara | <1 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV L-662 | Centro branco claro, borda e clara | <1 mm | Convexa | Circular | Inteira | Lisa | - |

Quanto às outras características morfológicas das colônias: 100% apresentaram formato circular e superfície lisa; 75% com bordas inteiras e 25% onduladas; e para a elevação das colônias os resultados se distribuíram em 50%, 30% e 20% para lente, plana e convexa, respectivamente.

Ao realizar a caracterização celular foi observado que todos os isolados apresentaram coloração gram-positiva, 62,5 % o formato de bastonete e 37,5 % o formato de cocos. Resultado é similar ao obtido por Faria et al. (2009), onde 77% e 61 % das estirpes isoladas de lodo de esgoto de duas estações de tratamentos apresentaram coloração gram-positiva. Em contraste, Nóbrega et al. (2004), encontraram que os 72 isolados bacterianos

diazotróficos de solos recuperados depois de mineração, são bactérias gram negativas e com elevada variabilidade fenotípica.

Tabela 3. Caracterização celular dos isolados bacterianos fixadores de nitrogênio

| Estirpe | Forma | Coloração Gram |
|-----------|-----------|----------------|
| UFV L-161 | Bastonete | + |
| UFV L-162 | Bastonete | + |
| UFV L-163 | Bastonete | + |
| UFV L-164 | Bastonete | + |
| UFV L-261 | Cocos | + |
| UFV L-262 | Cocos | + |
| UFV L-361 | Cocos | + |
| UFV L-362 | Cocos | + |
| UFV L-363 | Cocos | + |
| UFV L-364 | Bastonete | + |
| UFV L-451 | Bastonete | + |
| UFV L-452 | Bastonete | + |
| UFV L-453 | Bastonete | + |
| UFV L-562 | Cocos | + |
| UFV L-661 | Bastonete | + |
| UFV L-662 | Bastonete | + |

Ensaio de seleção de bactérias diazotróficas em plantas de milho

Houve efeito positivo de inoculação de bactérias diazotróficas na planta de *Zea mays* para as variáveis MFR, MFT e conteúdo de N (Tabela 4).

O isolado bacteriano que propiciou o maior acúmulo de MFT foi o UFVL-163 com incremento de 27 % em relação ao controle. Dados que corroboram, os resultados de Perin et al. (2003), ao encontrar incrementos, na MFT em plantas de milho entre 2 a 28% após utilizar bactérias das espécies *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*. A cultura do milho é a mais utilizada para a produção de silagem, pois tem qualidades superiores a outras espécies (Cruz et al., 2001). O uso de BPCP em milho, destinado à silagem pode se tornar uma alternativa viável, econômica e rentável para produzir alimentos a espécies animais em sistemas estabulados, semi-estabulados ou em épocas de baixa produção de forragens (Matte, 2014).

Tabela 4. Características de crescimento de *Zea mays* em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas: ALT, altura da planta; DIAM, diâmetro do caule; NF, número de folhas; MFR, matéria fresca da raiz; MFPA, matéria fresca da parte aérea; MSR, matéria seca da raiz; MSPA, matéria seca da parte aérea; QMR, quadrado médio do resíduo; CV coeficiente de variação.

| Tratamento | ALT ¹ | DIAM ² | NF ² | MFR ⁴ | MFPA ⁵ | MFT ⁶ | MSPA ⁷ | MSR ⁸ | MST ⁹ | Cont./ N ¹⁰ |
|----------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------------|
| | cm | mm | unidade | g | | | | | | |
| Controle | 14,10 ab | 2,45 ab | 4 abcde | 1,62 b | 4,00 ab | 5,62 bc | 0,10 a | 0,28 abc | 0,39 ab | 9,48 b |
| UFV L-161 | 17,53 ab | 2,75 ab | 6 ab | 2,29 ab | 4,13 ab | 6,42 abc | 0,14 a | 0,45 ab | 0,60 ab | 14,68 ab |
| UFV L-162 | 17,24 ab | 3,08 ab | 6 ab | 2,18 ab | 4,74 a | 6,92 abc | 0,16 a | 0,51 a | 0,68 a | 22,14 a |
| UFV L-163 | 20,35 a | 3,33 ab | 6 a | 3,04 ab | 4,13 ab | 7,17 a | 0,20 a | 0,28 abc | 0,49 ab | 15,17 ab |
| UFV L-164 | 19,51 a | 3,37 ab | 6 ab | 3,10 a | 3,95 ab | 7,05 ab | 0,23 a | 0,31 abc | 0,55 ab | 13,50 ab |
| UFV L-261 | 18,76 ab | 3,50 a | 5 abcd | 2,20 ab | 3,31 ab | 5,51 abc | 0,16 a | 0,24 bc | 0,41 ab | 11,28 ab |
| UFV L-262 | 20,15 a | 2,65 ab | 5 abcd | 2,08 b | 3,00 ab | 5,08 abc | 0,17 a | 0,20 bc | 0,38 ab | 10,17 b |
| UFV L-361 | 17,84 ab | 2,58 ab | 4 bcde | 1,71 b | 3,62 ab | 5,33 bc | 0,11 a | 0,14 c | 0,25 b | 8,07 b |
| UFV L-362 | 13,45 ab | 2,43 b | 4 de | 1,7 b | 3,10 ab | 4,8 c | 0,10 a | 0,25 abc | 0,36 ab | 7,96 b |
| UFV L-363 | 17,54 ab | 2,93 ab | 4 de | 1,95 b | 4,62 a | 6,57 abc | 0,13 a | 0,23 bc | 0,36 ab | 9,12 b |
| UFV L-364 | 13,95 ab | 2,68 ab | 4 cde | 1,93 b | 3,40 ab | 5,33 bc | 0,15 a | 0,32 abc | 0,48 ab | 12,96 ab |
| UFV L-451 | 12,08 ab | 2,50 ab | 3 e | 1,93 b | 4,19 ab | 6,02 abc | 0,17 a | 0,18 c | 0,35 ab | 9,57 b |
| UFV L-452 | 18,95 ab | 3,04 ab | 5 abcd | 2,41 ab | 4,11 ab | 6,52 abc | 0,17 a | 0,29 abc | 0,47 ab | 10,73 b |
| UFV L-453 | 17,58 ab | 3,18 ab | 5 abcd | 2,44 ab | 3,75 ab | 6,19 abc | 0,16 a | 0,26 abc | 0,42 ab | 11,21 ab |
| UFV L-562 | 17,62 ab | 2,84 ab | 5 abcd | 1,97 b | 3,10 ab | 5,07 bc | 0,15 a | 0,30 abc | 0,41 ab | 8,280 b |
| UFV L-661 | 15,45 ab | 2,77 ab | 4 abcde | 2,04 b | 4,18 ab | 6,22 abc | 0,15 a | 0,18 c | 0,34 ab | 4,63 b |
| UFV L-662 | 15,16 ab | 3,92 ab | 6 abc | 2,19 ab | 2,55 b | 4,474 c | 0,16 a | 0,34 abc | 0,50 ab | 11,98 ab |
| QMR ¹¹ | 14,83 | 0,266 | 0,52 | 0,228 | 0,935 | 1,681 | 0,015 | 0,0168 | 0,028 | 13,696 |
| CV ¹² (%) | 22,8 | 17,6 | 15,1 | 22,0 | 25,6 | 21,8 | 76,9 | 45,3 | 37,4 | 32,9 |

¹ Altura; ² Diâmetro; ³ Numero de Folhas; ⁴ Matéria Fresca de Raiz; ⁵ Matéria Seca Parte Área; ⁶ Matéria Fresca Total; ⁷ Matéria Seca Parte Área; ⁸ Matéria Seca de Raiz; ⁹ Matéria Seca Total; ¹⁰ Conteúdo de Nitrogênio; ¹¹ Quadrado Meio do Resíduo; ¹² Coeficiente de Variação

A inoculação do isolado UFV- 164 resultam em um incremento de 91% da MSR, comparativamente com o controle. Os resultado superiores aos de Perin et al. (2003), que acharam em estudos com *Zea mayz*, após de ser inoculadas com bactérias diazotróficas (*H. seropedicae* e *A. brasilense*), um acúmulo de biomassa radicular de 3 e 17 %. Ao existir uma maior biomassa MFR, existe a possibilidade que as plantas sejam mais eficientes na absorção dos nutrientes e da água do solo. Por conseguinte, isto será refletido, em uma maior biomassa área, uma melhor sanidade vegetal e uma boa produção na maioria dos casos.

O contínuo e crescente consumo de fertilizantes nitrogenados, somado à inconstância dos resultados de inoculação de bactérias diazotróficas, fazem com que trabalhos de seleção de estirpes bacterianas, que possam suprir a total ou parcial demanda de N por parte das culturas seja necessário.

Os maiores incrementos do conteúdo de nitrogênio na planta foram encontrados com o uso da bactéria UFVL-162, correspondente a um incremento de 134% em relação ao controle. Obando et al. (2013) observaram incrementos no conteúdo de N de 41 % com a inoculação de *Azotobacter* em milho. De modo semelhante, Reyes et al. (2008) verificaram incrementos de 88% no conteúdo de N em plantas de milho inoculadas com rizobactérias.

No presente trabalho foi possível observar a capacidade de colonização das bactérias diazotróficas em ambientes de resíduos, tais como os lodos de esgoto de abatedouros de aves. O lodo de esgoto de abatedouros de aves pode ser incluído nos processos de restauração ambiental, como substrato e biofertilizante (Santos et al., 2014). Além de ser uma fonte de riqueza microbiana, para estudos de bactérias promotoras de crescimento de plantas.

CONCLUSÕES

1. As bactérias diazotróficas habitam naturalmente o lodo de esgoto do abatedouro de aves em quantidade superior a $4,6 \times 10^7$ células por grama de lodo.
2. Predominam no lodo de esgoto de abatedouro de aves bactérias diazotróficas gram-positivas, no formato de cocus ou bastonete, formando colônias com diferentes características morfológicas.
3. Os isolados bacterianos UFVL-162, UFVL-163 e UFVL-164 promovem o crescimento e desenvolvimento de plantas de milho e possuem potencial para uso no enriquecimento de inoculantes e biofertilizantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Organizações FRANCAP S.A.. À técnica de laboratório Débora Durães da UFV. Ao CNPq, FAPEMIG e FUNARBE pelo apoio financeiro e a

CAPES pela bolsa concedida ao primeiro autor no programa de pós-graduação Manejo e Conservação de Ecossistemas Agrários e Naturais da Universidade Federal de Viçosa.

BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, K. Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2012. 84p. Dissertação Mestrado.
- Araujo, F.; Foloni, S.; Wutzke, M.; da Silva A.; Rack, E. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. *Semina: Ciências Agrárias*, v.34, p.1043-1054, 2013.
- Baldotto, L.; Olivares, L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*. v.54, p.918-931, 2008.
- Baldotto, L.; Baldotto, M; Olivares, L.; Viana, P.; Bressan-Smith, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.34, p.349-360, 2010.
- Baptista, R.; Mauri, R.; Baldani, V. Tolerância de estirpes de bactérias diazotróficas a Al^{3+} , para inoculação em milho (*Zea mays*). *Revista de Ciências da Vida*, v.31, p.00-00, 2011.
- Bettiol, W.; Fernandes, P. Efeito do lodo de esgoto na comunidade microbiana e atributos químicos do solo. Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, Dezembro, p.6, 2004.
- Bergamaschi, C.; Roeschr L.; de Quadros, P.; Camargo, F. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciência Rural*, v.37, p.727-733, 2007.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento da safra brasileira de grãos 2012/13 - Oitavo levantamento, maio 2013. Brasília: Conab, 2013
- CONAMA. O Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução No 375 de 29 de Agosto de 2006. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. 25 Out 2014
- Cruz, J; Pereira, A.; Rodrigues, S.; Ferreira, J. Produção e utilização de silagem de milho e sorgo. Embrapa Milho e Sorgo, p. 544, 2001..
- Döbereiner J. *Azotobacter* em solos ácidos. *Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola*, v.11, p.1-36, 1953.

- Döbereiner, J.; Baldani, V.; Baldani, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. 66p, 1995.
- Dos Santos, S. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. 105p. Tese de Doutorado.
- Dotto, P.; do Carmo Lana, M.; Steiner, F.; Frandoloso, F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.5, p.376-382, 2010.
- Ebole de Santana, M.; Gómez, R.; Pereira, N.; de Souza, M. Gestão do Conhecimento Científico e Tendências Científicas em Biotecnologia na Venezuela: *Biotechnology in Venezuela*. *Revista Iberoamericana de Ciencia Tecnología y Sociedad*, v.7, p.45-62, 2013.
- Faria R.; Campos, P.; de Souza, M.; Moreira, S.; de Moura, B.; de Oliveira Ribeiro, L.; Farias, V. Isolamento e caracterização de bactérias do lodo de esgoto com potencial antagonismo a nematóides. *AMBIÊNCIA*, v.2,p. 247-256, 2009.
- Ferreira, S.; Sabino, C.; Guimarães, L.; Baldani, I.; Baldani, D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia*, v.37, p.06-12, 2003.
- FRANCAP. Organizações Francap. <http://www.francap.ind.br/index.php>. 30 Mar 2015.
- Gomes, L.; Perin, L.; Pereira, G.; Zilli, J. Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no estado de Roraima. *Embrapa Roraima*, v.43, p.35, 2010.
- Graepin, C.; Follmann, J.; Schroeder, K.; Neuhaus, F.; Rodrigues, A.; Kemerich, P. Compostagem como alternativa de destinação para o lodo flotado de abatedouro de frangos. *Revista Monografias Ambientais*, v.13, p.4011-4018, 2014.
- Gram, C. *Fortsch. Med.*2.185-188. 1884.
- Grayston, J.; Wang, S.; Campbell, C.; Edwards, A. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, v.30, p.369-378, 1998.
- Guimarães, S.; Bonfim-Silva S.; Kroth B.; Moreira C.; Moreira D. Crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp. *Enciclopédia Biosfera*, v.7, p.286-295, 2011.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, F. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.

- Ikeda, C.; Hungria, M.; Steffens, M.; Glienke, C.; Kava-Cordeiro, V.; Bassani, L. Galliteresawa, V. Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.). In: Embrapa Soja-Milho. Resumo em anais de congresso. In: Congresso Brasileiro de Genética, 56. 2010, Guarujá.
- Kappes, C.; Arf, O.; Arf, V.; Ferreira J.; Bem, E.; Portugal, R.; Vilela, R. Inoculação de sementes com bactérias diazotróficas e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Ciências Agrárias*, v.34, p.527-538, 2013.
- Kjeldahl, J. Neue Methode zur Bestimmung der Stickstoffs in organischen Korpen. *Zeits. anal. Chem*, v.22, p.336-382, 1883.
- Matte, L. Adição de inoculante com *Azospirillum brasilense* combinado com níveis de nitrogênio na cultura de milho para silagem. Descalvado: Universidade Camilo Castelo Branco, 2014. 47p. Dissertação de Mestrado.
- Milani, K; Machineski, O.; Balota, L. Ocorrência e isolamento de bactérias diazotróficas associadas à cana de açúcar. *Enciclopédica Biosfera*, v.7, p.1345-1351, 2011.
- Melloni, R.; Nóbrega, A.; Moreira, S.; Siqueira, O. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v.28, p.85-93, 2004.
- Nóbrega, A.; Moreira, S.; Siqueira, O.; Lima, S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v.28, p.269-279, 2004.
- Novakowiski, H.; Sandini, E.; Falbo, K.; de Moraes, A.; Novakowiski, J.; Cheng, C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Ciências Agrárias*, v.32, p.1687-1698, 2001.
- Obando, M.; Rivera, D.; Bonilla, R. Respuesta fisiológica a la fertilización por *Azotobacter chroococcum* AC1 y fertilización nitrogenada de síntesis sobre el maíz (*Zea mays* L.) en invernadero. *BioTecnología*, v.17, p.11-22, 2013.
- Oliveira, S.; Roel, R.; Arruda, J.; Marques, S. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, p.326-331, 2007.
- Perin, L. Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003. 68p. Dissertação Mestrado.

- Perin, L.; Silva, M.; Ferreira, S.; Canuto, L.; Medeiros, A.; Olivares, L.; Reis, M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia*, v.37, p.47-53, 2003.
- Quadros, D.; Roesch, W.; Silva, D.; Vieira, M.; Roehrs, D.; Camargo, O. Field agronomic performance of maize hybrids inoculated with *Azospirillum*. *Revista Ceres*, v.61, p. 209-218, 2014.
- Reis, M.; Baldani, I.; Baldani, D.; Döbereiner, J. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and Palm trees. *Critical Reviews in Plant Science*, v.19, p.227-247, 2000.
- Reyes, I.; Alvarez, L.; El-Ayoubi, H.; Valery, A. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, v.20, p.37-48, 2008.
- Roesch, W.; Camargo, O.; Selbach, A.; Sa, D.; Passaglia, P. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. *Ciência Rural*, v.35, p.924-927, 2005.
- Santos, F.; Kunz S.; Caldeira, M.; Azevedo, C.; Rangel, O. Características químicas de substratos formulados com lodo de esgoto para produção de mudas florestais. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, p.971-979, 2014.
- Sobrinho, P. A. Estudo dos fatores que influenciam no processo de lodos ativados - determinação de parâmetros de projeto para esgotos predominantemente domésticos. *Revista DAE*, v.132, p. 49-85, 1983.
- Valery, A.; Reyes, I. Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz variedad HIMECA-95. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v.15, p.81-88, 2013.

5.3. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves na cultura do milho

Resumo: O fósforo (P) é o segundo macronutriente mais limitante para a produção agrícola. A carência desse elemento é compensada pela aplicação de fertilizantes fosfatados. Para evitar uma escassez, estudos em diferentes áreas, vêm sendo feitos. Um desses é o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato. O trabalho objetivou: (i) isolar e quantificar bactérias solubilizadoras de fosfato de lodo de esgoto de abatedouro de aves, (ii) caracterizar os isolados bacterianos de acordo com a morfologia celular e morfologia da colônia e (iii) avaliar o crescimento de plantas de milho em resposta à aplicação dos isolados bacterianos em conjunto com fosfato natural. As bactérias foram isoladas em meio de cultura contendo fosfato de cálcio como fonte de P. A avaliação morfológica consistiu na descrição do formato celular, coloração de Gram e nas características das colônias. Para fazer uma avaliação da solubilização de fosfato natural (FN), realizou-se inoculação em sementes de milho na presença de fosfato de Araxá. O experimento consistiu de dez tratamentos: oito isolados bacterianos + FN, FN e controle. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação por 45 dias, em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo duas plantas de milho. As variáveis mensuradas foram as características de crescimento da planta. No total, foram isoladas oito estirpes bacterianas e todas formaram halo de solubilização de fosfato in vitro. Todos os isolados apresentaram coloração gram positiva e 90% apresentaram forma de bastonete e 10% forma de cocus. A inoculação da estirpe LSOF-7 em conjunto com FN promoveu incrementos na matéria seca de plantas de milho, 17% frente ao tratamento contendo apenas FN e 40% em relação ao controle. Conclui-se que os lodos de esgoto de abatedouro de aves contêm estirpes bacterianas com potencial de promoção do crescimento de plantas de milho.

Palavras chaves: bactérias promotoras de crescimento de plantas, fosfato natural, resíduos sólidos.

Selección de bacterias solubilizadoras de fosforo aisladas de lodo de aguas residuales de matadero aves en cultivo de maíz

Resumen: el fósforo (P) es el segundo macronutriente limitante para la producción agrícola, la falta de este elemento es compensada por la aplicación de fertilizantes de fosfato. Para evitar una escasez, estudios en diferentes campos están siendo realizados. Uno de ellos es el uso de bacterias solubilizantes de fosfato. El estudio tuvo como objetivo: (i) aislar y cuantificar, bacterias de solubilizadoras de fosfato de lodos de matadero de aves (ii) caracterizar las cepas bacterianas según la morfología celular y la morfología de las colonias y (iii) evaluar el crecimiento de las plantas en respuesta a la aplicación de aislamientos bacterianos en conjunto con roca de fosfato. Las bacterias se aislaron en medio que contiene fosfato de calcio como fuente cultivo de P. La evaluación morfológica, se hizo la descripción de la forma de la célula, la tinción de Gram y características de las colonias. Para hacer una valoración de la solubilización de fosfato natural (FN) se llevó a cabo la inoculación de la semilla de maíz en presencia de fosfato de Araxá. El experimento consistió en diez tratamientos: Ocho aislamientos bacterianos + FN, FN y control. El experimento se realizó en un invernadero durante 45 días, en un diseño al azar, con seis repeticiones y la unidad experimental fue un vaso con dos plantas. Las variables medidas fueron las características de crecimiento de la planta. En total, se aislaron ocho cepas bacterianas y todos formaron in vitro halo de solubilización de fosfato. Todos los aislamientos fueron tinción gram-positivas y 90% eran en forma de baston y 10% como cocus. Inoculación de la cepa LSOF-7 en combinación con FN promovió aumentos en materia seca de las plantas de maíz, 17% frente del tratamiento que contiene sólo FN y 40% en comparación con el control. Se concluye que en los lodos de aguas residuales de matadero de aves, contiene cepas bacterianas con potencial para promover el crecimiento de las plantas de maíz.

Palabras claves: bacterias promotoras de crecimiento de plantas, fosfato natural, residuos sólidos.

INTRODUÇÃO

Depois do nitrogênio (N), o fósforo (P) é o segundo macronutriente mais limitante para a produção agrícola (Vance et al., 2003). Sem a presença de P, funções biológicas básicas como a formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios, metabolismo energético e regulação enzimática, não poderiam ser possíveis (Rausch e Bucher, 2002).

Muitos solos são deficientes em P na forma solúvel para as plantas e, embora existam solos férteis, a concentração de P disponível geralmente é baixa (Barroti e Nahas, 2000; Gyaneshwar et al., 2002). Nos solos brasileiros, a carência desse elemento é compensada pela aplicação de fertilizantes fosfatados solúveis em doses altas. No entanto, apenas cerca de 5 a 30% são aproveitados pela planta, sendo o restante fixado no solo por meio de reações físico-químicas (Trollove et al., 2003). O fósforo inorgânico solúvel, aplicado aos solos como fertilizantes, é imobilizado em diversas formas de fosfatos, como por exemplo fosfato de cálcio, tricálcico, de ferro e de alumínio, e nessas formas o fósforo é pouco assimilado pelas plantas, necessitando-se assim aplicações de elevadas doses dos adubos fosfatados (Omar, 1998).

Perante o panorama de uma crescente demanda de insumos para a produção de alimentos, fontes não-renováveis de adubos fosfatados economicamente mais acessíveis tendem a se esgotar, resultando em incrementos dos preços dos mesmos (Richardson, 2001).

Para evitar uma possível carência desse nutriente, existem na atualidade diversos esforços de diferentes setores objetivando tornar as plantas mais adaptáveis a ambientes de baixa fertilidade, melhorando assim a capacidade das mesmas na procura e obtenção de nutrientes (Lynch, 2007). Outro foco de estudo é uso de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP), para possibilitar o uso de fontes de fósforo pouco solúveis, como os fosfatos naturais (Baldotto et al., 2012). O fosfato natural é um produto obtido por ataque da rocha fosfática, apresenta baixa concentração de P_2O_5 e pode ser aplicado como fertilizante de aplicação direta no solo ou como material para indústria de fertilizantes (Loureiro et al., 2008).

A capacidade dos microrganismos em solubilizar fosfatos inorgânicos redução do pH do meio, principalmente pela exsudação de ácidos orgânicos (Withelaw, 2000). As BSP têm sido identificadas entre os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* e exsudam, além de ácidos orgânicos, ligantes orgânicos, agentes complexantes, polímeros extracelulares,

ácidos inorgânicos, além de prótons durante a assimilação de NH_4^+ e de outros cátions. Os processos descritos anteriormente são também mecanismos que podem estar envolvidos no processo de solubilização de fosfatos inorgânicos por microrganismos (Rodriguez e Fraga 1999).

A capacidade das bactérias em solubilizar fosfato inorgânico estimula pesquisas com a finalidade de isolar, caracterizar e selecionar estirpes mais eficientes em promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Baldotto et al., 2010), com o intuito de reduzir a aplicação de fertilizantes fosfatadas, mitigar os efeitos sobre o meio ambiente e baixar os custos de produção das culturas.

O presente trabalho teve como objetivos: (i) isolar e quantificar bactérias solubilizadoras de fosfato do lodo de esgoto de abatedouro de aves, (ii) caracterizar as bactérias de acordo com a morfologia celular e morfologia da colônia e (iii) avaliar a capacidade das bactérias em solubilizar fosfato natural utilizando plantas de milho em casa-de-vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de lodo

Amostras de lodo de esgoto de abatedouro de aves (resíduo gerado no sistema de tratamento de efluentes do tipo Lodos Ativados/Aeração Prolongada) foram cedidas pelas Organizações FRANCAP S.A., município de Pará Minas- Minas Gerais. As amostras foram transportadas para o Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, onde foram realizados os trabalhos microbiológicos nos anos de 2013 e 2014.

O lodo foi caracterizado quimicamente por apresentar: (N 9.5, P 1.1, K 0.45, Mg 1.35, S 0.18, CO 18.72) dag/Kg ;(Zn 517, Fe 1908 , Mn 114, Cu 342, B 8.3) mg/Kg ; pH 6.7; C/N 1.96.

Isolamento e quantificação de bactérias solubilizadoras de fosfato

Amostras de 10 g de lodo foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina (NaCl , 0,85 g L^{-1}) e a partir dessa diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições seriadas até 10^{-12} . Amostras de 100 μL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido constituído de 10 g de glicose, 5 g de cloreto de amônio (NH_4Cl), 1 g de cloreto de sódio (NaCl), 1 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1 g de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), 15 g de ágar bacteriológico, 2 mL de fungicida Cerconil

(0,1 g L⁻¹), 1000 mL de água destilada, pH ajustado para 6,5 com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e/ou hidróxido de potássio (KOH) e incubadas a 30°C por 3 dias. A formação de halo translúcido ao redor da colônia indicou atividade solubilizadora de fosfato. Colônias individuais foram transferidas para meio líquido DYGS (Döbereiner et al., 1995) e mantidas a 30°C, 120 rpm por 24 h. Em seguida, as bactérias foram transferidas para placas de Petri contendo o mesmo meio descrito acima para determinação do índice de solubilização de fosfato e purificação dos isolados. O índice de solubilização foi calculado por meio da fórmula: diâmetro médio do halo de solubilização/diâmetro médio do halo da colônia. Os isolados foram estocados em microtubos plásticos contendo água destilada autoclavada para uso de rotina.

Caracterização morfológica das células e das colônias dos isolados bacterianos

Após o isolamento, as bactérias foram cultivadas em meio líquido DYGS por 24 h, a 30°C e 120 rpm e foram colocadas em placas de Petri contendo esse mesmo meio, porém sólido. As placas ficaram em estufa bacteriológica a 30°C por 7 dias e as colônias que ali cresceram foram caracterizadas de acordo com as características das células (forma, coloração gram) e as características das colônias (forma, cor, tamanho, elevação, borda, superfície e mucosidade) (Perin, 2003).

Cada estirpe foi nomeada seguindo o código: UFV LSOF-X; onde UFV = Universidade Federal de Viçosa, L = lodo, SOF = solubilizadora de fosfato, X = número de ordem do isolado na coleção.

Ensaio de seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato na cultura do milho em casa-de-vegetação

O experimento consistiu em dez tratamentos: oito isolados bacterianos + fosfato natural (FN), um tratamento contendo apenas FN, e controle (sem bactéria e sem FN). O experimento foi conduzido durante 45 dias em casa-de-vegetação, no delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo 2 plantas de milho.

Para obtenção do pré-inóculo, as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 120 rpm. O pré-inóculo foi vertido em frascos de erlenmeyer contendo 200 mL de meio DYGS. Os frascos permaneceram por 24h a 30°C sob agitação de 120 rpm para obtenção do inóculo. A inoculação foi realizada no erlenmeyer pela imersão das sementes de milho. Cada tratamento ficou imerso no meio bacteriano por 2

horas, com posterior aplicação do mesmo meio bacteriano no substrato. Os controles foram imersos em meio líquido DYGS autoclavado. Posteriormente, as sementes foram transferidas para vasos de 0,7 dm³ contendo solo caracterizado quimicamente por apresentar: pH 4.1 ; (P 6.8, K 78) mg/dm³; (Ca 0.6, Mg 0.3, Al 1.4, H+Al 7.59, SB 1.10, CTC_(t) 2.50, CTC_(T) 8,69) cmol_c /dm³; V 13, m 56 %. A aplicação de fosfato natural de Araxá (fluorapatita, com 22,7% P₂O₅ total, 4,3% de P₂O₅ solúvel em ácido cítrico 2% (1:100), em pó) se realizou na razão de 10g/kg de solo (Ribeiro et al., 1999).

Aos 45 dias após do plantio, as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: altura da planta (ALT); diâmetro do caule (DIAM); número de folhas (NF); matéria fresca da raiz (MFR); matéria fresca da parte aérea (MFPA); matéria fresca total (MFT); matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST) obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a 65 °C por 72 horas e posterior pesagem em balança de precisão.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do programa R e as médias foram comparadas pelo teste de TUKEY a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e quantificação de bactérias solubilizadoras de fosfato

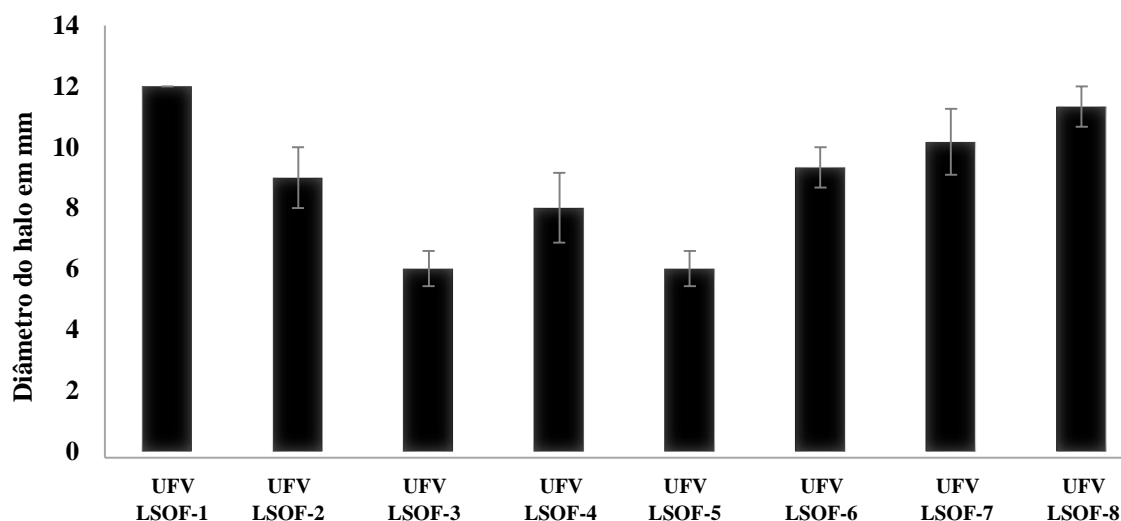
No lodo de esgoto de abatedouro de aves foi possível o isolamento de 8 estirpes bacterianas e a quantificação das UFC em 17,70x10¹⁵/g de lodo. Resultado que é superior à quantidade de bactérias achadas por Moratto et al. (2005) em estudos de bactérias diazotróficas em solos de páramos, onde os valores da UFC não superaram os 95x10⁵/g de solo. Becerra et al. (2011), trabalhando na caracterização de microrganismos solubilizadores de fosfato isolados de solos destinados à cultura de physalis (*Physalis peruviana* L.), encontraram que a diversidade populacional bacteriana solubilizadoras foi de 39x10⁴ UFC / g de solo, como valor máximo. Fato explicado por Caballero et al. (2006) onde afirmaram que a sobrevivência dos microrganismos a pH abaixo de 5,5 é difícil, devido às altas liberações de H⁺ que deslocam outros íons. Nos estudos de Becerra et al. (2011) e Moratto et al. (2005), os valores de pH foram iguais ou inferiores a 5,5. Outra possível explicação para esses valores encontrados é a inibição que apresentam as bactérias

promotoras de crescimento de plantas (BPCP) às altas concentrações de N nos solos, devido às contínuas fertilizações nitrogenadas (Moratto et al., 2005). O presente estudo tem como matéria prima para a obtenção dos isolados bacterianos, um material originado de resíduos agroindustriais, sem nenhum tipo de fornecimento adicional de N. Além disso, durante o tratamento de efluentes do tipo lodos ativados/aeração prolongada uma contínua coluna de ar é injetada sobre os resíduos (Sobrinho, 1983) e em muitas estações ocorre a aplicação de calcário, permitindo assim, a obtenção de um lodo com pH de 6,7, com uma rica variedade de microrganismos aeróbicos e capaz de abrigar BPCP.

Pode-se observar na Figura 1, que todas as bactérias isoladas do lodo de esgoto de abatedouro de aves solubilizam fosfato in vitro. Esta capacidade é detectada pela formação do halo translúcido que se forma em volta das colônias bacterianas.

O isolado UFVLSOF-1 apresentou o maior valor de solubilização de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) in vitro, com a formação de um halo de solubilização de 12 mm, seguido pelo isolado UFVLSOF-8, com halo de 11,3 mm (Figura 1). Os menores valores foram obtidos com os isolados UFVLSOF-3 e UFVLSOF-5, cujos halos foram próximos de 6 mm. Como é lógico pensar, quanto maior o halo de solubilização in vitro, maior será a capacidade de solubilização ex vitro e seu potencial de uso na formulação de inoculantes e biofertilizantes. Dados que acompanham a tendência da pesquisa de Ramirez et al. (2014) estudando o gênero *Bacillus* como microrganismo solubilizador de fosfato. Das 13 cepas avaliadas, 11 apresentaram halo de solubilização de fosfato (variando o diâmetro entre 2mm e 20 mm) e em 2 não foi possível observar o halo. Fato explicado, já que, os sítios do isolamento e o ambiente onde se encontram as bactérias têm influência na capacidade solubilizadora das mesmas. Pois existem, mecanismos indutores ou supressores genéticos controlados pela disponibilidade de fósforo do ambiente. Em outras palavras, a habilidade para solubilizar fósforo é dependente da carga genética da bactéria e do ambiente onde esteja alojada (Ramirez et al., 2014).

Figura. 1 Solubilização de fosfato por bactérias isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves.



Nesse mesmo sentido, da Silva (2010) reporta que dentro das espécies bacterianas trabalhadas por ela em cana de açúcar, algumas não apresentaram capacidade de solubilização de fosfato, razão atribuída ao fato da estirpe não produzir exsudados suficientes para modificar o pH e permitir a solubilização do fertilizante. A capacidade das bactérias em crescer e solubilizar fosfatos se deve também a interação com o ambiente, dos Santos et al. (2012), por exemplo, observaram distintos níveis de tolerância das bactérias solubilizadoras de fosfato à diferentes concentrações de NaCl.

Não existe uma garantia de que as estirpes bacterianas que apresentaram os maiores índices de solubilização de fosfato *in vitro* ofereçam os melhores resultados nos testes em viveiro ou em campo, pois as condições agroambientais e de simbiose afetam o desempenho da inoculação.

Caracterização morfológica das células e das colônias dos isolados bacterianos

As características morfológicas das bactérias isoladas do lodo de esgoto de abatedouro de aves estão apresentadas nas tabela 1 e 2. Todas apresentaram coloração gram-positiva e mais de 85% apresentaram formato de cocos. Esses dados diferem dos obtidos por da Silva (2010), que encontrou apenas bactérias gram-negativas em isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato de rizosfera de cana de açúcar. Em estudo de Bobadilla e Rincón (2008), isolando BSP da compostagem feita a partir de resíduos de praças de comercialização de produtos vegetais, verificaram que 100% dos isolados bacterianos pertencem ao grupo das gram-negativas.

Com relação a morfologia das colônias, todas apresentaram formato circular, superfície lisa e ausência de mucosidade. Predominou a coloração branca (87,5%) seguida da coloração amarela (12,5%). Metade dos isolados apresentaram diâmetro da colônia igual a 1,5 mm, 25 % maior que 1 mm e os 25% restantes diâmetro inferior a 1mm. Houve predomínio de borda inteira (87,5%), seguida pela denteada (12,5%). Resultados que diferem dos encontrados por de Bobadilla e Rincón (2008), onde a coloração amarela (100%) predominou nas estirpes. No mesmo trabalho, a mucosidade foi observada em 80% dos isolados. Tanto para a superfície e bordas, o presente trabalho e o de Bobadilla e Rincón (2008) apresentaram 80% dos isolados com bordas inteiras e superfície lisa.

Tabela 1. Caracterização celular dos isolados bacterianos de lodo de esgoto de abatedouro de aves.

| Identificação dos isolados | Coloração Gram | Forma |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------|
| UFV LSOF-1 | Gram Positiva | Cocos |
| UFV LSOF-2 | Gram Positiva | Cocos |
| UFV LSOF-3 | Gram Positiva | Bastonetes |
| UFV LSOF-4 | Gram Positiva | Cocos |
| UFV LSOF-5 | Gram Positiva | Cocos |
| UFV LSOF-6 | Gram Positiva | Cocos |
| UFV LSOF-7 | Gram Positiva | Cocos |
| UFV LSOF-8 | Gram Positiva | Cocos |

Como foi exposto, trabalhos que caracterizem morfologicamente colônias de bactérias solubilizadoras de fosfato são poucos. Posto que, sempre estão associadas a outros tipos de funções como a fixação biológica de nitrogênio atmosférico ou as promotoras de crescimento de plantas. Neste sentido, Ikeda (2010), estudando isolados bacterianos endofíticos de raízes de milho, observou que 50% dos isolados apresentaram diâmetro de colônia maior que 1 mm e formato circular. Mesma tendência encontrada por Fernandes (2012), estudando bactérias endofíticas de mudas cítricas, onde quase 50% dos isolados apresentaram colônias com formato circular e 100% com borda inteira. A diferença mais notável, nesta caracterização foi que a autora observou que 80 % dos isolados apresentaram mucosidade, e nesta pesquisa não foi observado colônias com muco.

Tabela 2. Caracterização morfológica das colônias bacterianas isoladas de lodo de abatedouro de aves.

| Identificação dos isolados bacterianos | Característica Morfológica da Colônia | | | | | | |
|--|---------------------------------------|----------|-----------|----------|----------|------------|------------|
| | Coloração | Tamanho | Elevação | Forma | Borda | Superfície | Mucosidade |
| UFV LSOF-1 | Branco | > 1,0 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV LSOF-2 | Branco | > 1,0 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV LSOF-3 | Branco | = 1,5 mm | Lente | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV LSOF-4 | Branco | = 1,5 mm | Convexa | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV LSOF-5 | Branco | = 1,5 mm | Convexa | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV LSOF-6 | Branco | = 1,5 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | - |
| UFV LSOF-7 | Branco | < 1,5 mm | Pulvinada | Circular | Denteada | Lisa | - |
| UFV LSOF-8 | Amarelo | < 1,5 mm | Plana | Circular | Inteira | Lisa | - |

As pesquisas feitas têm demonstrado uma rica variedade de formas, tamanhos, cores e reações bioquímicas de bactérias que possuem capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e orgânico (Fernandes, 2012; da Silva, 2010; Ikeda, 2010; Baldotto, 2008; Bobadilla e Rincón, 2008). No entanto, esses trabalhos apresentam uma tendência com relação à morfologia das células e das colônias dos isolados bacterianos, em apresentarem colônias circulares, de coloração branca ou creme, com borda inteira, células com coloração gram-positiva e formato de cocus.

Ensaio de seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato na cultura do milho em casa-de-vegetação

As médias das variáveis de crescimento do milho em resposta à inoculação bacteriana na presença de FN e nos controles estão apresentados na tabela 3. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos com inoculação bacteriana e o controle para as variáveis ALT, NF, MFR, MFPA, MFT e MSPA, embora os resultados *in vitro* permitissem ter expectativas sobre a potencialidade de alguns isolados bacterianos em solubilizar fosfato natural e consequentemente incrementar as características de crescimento da planta. Esses resultados corroboram os registrados por Kölln et al. (2009), que verificaram que estirpes bacterianas apresentaram capacidade de solubilização de fosfato *in vitro* e, no entanto, não tiveram efeito significativo sobre as variáveis de crescimento de milho em presença de basalto como fonte de P

Tabela 3. Características de crescimento: altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DIAM), número de folhas (NF), matéria fresca da raiz (MFR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca total (MFT), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST); quadrado médio do resíduo (QMR) e coeficiente de variação (CV) de plantas de milho (*Zea mays*) em resposta à inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato

| Tratamentos | ALT ¹ | DIAM ² | NF ³ | MFR ⁴ | MFPA ⁵ | MFT ⁶ | MSR ⁷ | MSPA ⁸ | MST ⁹ |
|----------------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | - mm- | --mm-- | -unid- | -----g----- | | | | | |
| Controle | 364 a | 2,91 c | 4 a | 4,11 ab | 1,97 a | 6,09 a | 0,38 b | 0,22 a | 0,60 b |
| FN | 353 a | 3,15 bc | 4 a | 5,15 a | 2,40 a | 7,55 a | 0,51 ab | 0,33 a | 0,83 ab |
| UFVLSOF-1 + FN | 404 a | 4,00 a | 5 a | 5,30 a | 2,76 a | 8,07 a | 0,49 ab | 0,35 a | 0,84 ab |
| UFVLSOF-2+FN | 413 a | 3,75 ab | 4 a | 5,17 a | 2,66 a | 7,83 a | 0,52 ab | 0,33 a | 0,85 ab |
| UFVLSOF-3+ FN | 405 a | 3,68 abc | 4 a | 4,53 ab | 2,42 a | 6,95 a | 0,40 b | 0,32 a | 0,73 ab |
| UFVLSOF-4 + FN | 415 a | 3,66 abc | 4 a | 4,49 ab | 2,54 a | 7,03 a | 0,51 ab | 0,33 a | 0,84 ab |
| UFVLSOF-5 + FN | 399 a | 3,65 abc | 4 a | 4,09 ab | 2,32 a | 6,41 a | 0,41 b | 0,32 a | 0,38 ab |
| UFVLSOF-6 + FN | 390 a | 3,55 abc | 4 a | 4,20 ab | 2,40 a | 6,65 a | 0,42 bc | 0,36 a | 0,74 ab |
| UFVLSOF-7 + FN | 290 a | 3,56 abc | 4 a | 4,61 ab | 1,84 a | 6,81 a | 0,69 a | 0,30 a | 1,00 a |
| UFVLSOF-8 + FN | 380 a | 3,68 abc | 4 a | 3,34 b | 2,47 a | 5,82 a | 0,49 ab | 0,35 a | 0,84 ab |
| QMR¹⁰ | 47,13 | 0,17 | 0,067 | 0,78 | 0,37 | 1,68 | 0,017 | 0,0077 | 1,41 |
| CV¹¹ (%) | 18 | 11,7 | 6,5 | 19,5 | 25,5 | 21,8 | 27,5 | 27,1 | 17,1 |

¹ Altura; ² Diâmetro; ³ Número de Folhas; ⁴ Matéria Fresca de Raiz; ⁵ Matéria Seca Parte Área; ⁶ Matéria Fresca Total; ⁷ Matéria Seca Parte Área; ⁸ Matéria Seca de Raiz; ⁹ Matéria Seca Total; ¹⁰ Quadrado Meio do Resíduo; ¹¹ Coeficiente de Variação

Dias et al. (2009) não encontraram incrementos de crescimento de morango após a inoculação com estirpes solubilizadoras de fosfato. Por outro lado Pedrinho et al. (2010), verificaram aumentos significativos na biomassa de milho em resposta à inoculação bacteriana. Do mesmo modo, Baldotto et al. (2010) detectaram incrementos de biomassa e nos teores de N e P em plantas de milho inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato na presença de fosfato natural.

O isolado LSOF-7 promoveu incrementos significativos na biomassa das plantas de milho, foi o único tratamento que alcançou um peso de 1,00g, superior aos 0,60g do controle e aos 0,83g do tratamento só com FN, isto significa um rendimento de 40 e 17%, respectivamente. Segundo a AGEITEC (2011), com uma baixa tecnologia de produção, a densidade da cultura do milho é de 40.000 a 50.000 plantas/ ha. Ou uso da estirpe bacteriana LSOF-7 como inoculante pode resultar em cerca 17 % respeito aos outros tratamentos, logo, a potencialidade que apresenta esta estirpe, como possível inoculante é

promissora. Resultado que está na mesma linha de Gonzales et al. (2014) que encontraram incrementos em MST , com o uso de BPCP na cultura de milho.

Como também observado para as bactérias diazotróficas, o maior desafio para o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato é a estabilização dos resultados. Já que alguns autores como Pedrinho et al. (2010) e Baldotto et al. (2010) encontraram resultados significativos no crescimento de plantas em resposta à inoculação e outros como, Kölln et al. (2009) e Dias et al., (2009) não verificaram efeitos positivos. Essa instabilidade dos resultados, ainda não tem permitido a massificação dessas tecnologias (Kappes et al., 2013).

CONCLUSÕES

1. As bactérias solubilizadoras de fosfato habitam os lodos de esgoto de abatedouro de aves em densidades superiores a $17,70 \times 10^{15}$ UFC/g de lodo.
2. Os isolados bacterianos de lodo de esgoto de abatedouro de aves apresentam a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio in vitro.
3. O isolado UFVLSOF-7 promove o crescimento de plantas de milho e apresenta potencial para uso na formulação de inoculantes e biofertilizantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Organizações FRANCAP S.A. Aos estudantes Pamela Rocha e Phelipe Nazareth. À técnica de laboratório Débora Durães da UFV. Ao CNPq, FAPEMIG e FUNARBE pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa concedida ao primeiro autor no programa de pós-graduação Manejo e Conservação de Ecossistemas Agrários e Naturais da Universidade Federal de Viçosa.

BIBLIOGRAFIA

- AGEITEC. Agencia Embrapa de informação tecnológica (2011) www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_49_168200511159.html. 10 de fev. 2015.
- Baldotto, L.; Olivares, L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, v.54, p.918-931, 2008.

- Baldotto, L.; Baldotto, M.; Olivares, L.; Viana, P.; Bressan-Smith, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.34, p.349-360, 2010.
- Baldotto, L.; Silva Jr, G.; Canellas, L. P.; Olivares, L.; Baldotto, M. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. *Revista Ceres*, v.59, p.262-270, 2012.
- Barroti, G.; Nahas, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p. 2043-2050, 2000.
- Becerra, M.; Quintero, D.; Martínez, M.; Matiz, A. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v.5, p.195-208, 2011
- Bobadilla, C.; Rincón C. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Bogotá: Universidad Pontificia Javeriana, 2008. p.87. Tesis de Graduación.
- Caballero, T.; Camelo, M.; Bonilla, R.; Martínez, M. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de suelos algodoneros, departamentos de Cesar y Meta. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 2006. p.85 Tesis de Grado.
- Da Silva, J. Isolamento e caracterização de estirpes bacterianas associadas à cana de açúcar com características para a promoção de crescimento vegetal. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte de Fluminense Darcy Ribeiro, 2010. p. 96. Dissertação Mestrado.
- Dias, C.; Costa, E.; Andreote, D.; Lacava, T.;Teixeira, A.; Assumpção, C.; Melo, S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.25,p.189-195, 2009.
- Döbereiner, J.; Baldani, V.; Baldani, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. 66p, 1995.
- Dos Santos, I.; De Lima, D.; Barbosa, J.; Oliveira, J.; Freire, F.; Kuklinsky-Sobral, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana de açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. *Bioscience Journal*, v.28, p.142-149, 2012.
- Fernandes A. Bactérias endofíticas e fungo micorrizo arbuscular na produção de mudas cítricas. Campinas: Universidade Federal de Campinas, 2012. p.120.

- Ferreira, S.; Sabino, C.; Guimarães, L.; Baldani, I.; Baldani, D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia*, v.37, p.06-12, 2003.
- FRANCAP. Organizações Francap. www.francap.ind.br/index.php. 30 Mar 2015.
- González, M.; Contreras, L.; Acevedo, I.; Torres, D.; Meza, C. Respuesta del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación de bacterias fijadoras de N y solubilizadoras de P en un suelo del valle de río Turbio, estado Lara. *Revista Facultad de Agronomía*, v.1, p. 33-43, 2014.
- Gyaneshwar, P.; Kuma, G.; Parekh, L. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, v.245, p.83-85. 2002.
- Gram, C. *Fortsch. Med.* 2.185-188. 1884.
- Ikeda, A. Caracterização morfológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.). Universidade Federal do Paraná, 2010. 101p. Dissertação Mestrado.
- Junior, R.; da Silva, G. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.985-994, 2000.
- Kappes, C.; Arf, O.; Arf, V.; Ferreira J.; Bem, E.; Portugal, R.; Vilela, R. Inoculação de sementes com bactérias diazotróficas e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Semina*, v.34, p.527-538, 2013.
- Kölln, T.; Shiomi, F.; Kawakami, J.; Michalovicz, L.; Müller, L. Efeito de isolados de bactéria e pó de basalto no crescimento inicial de plantas de milho cultivadas em vaso. *Synergismus Scyentifica*, v.1, p.00-00, 2009.
- Loureiro, L; de Mello, B; Nascimento, M. Agrominerais–Fosfato. IN: Rochas & Minerais Industriais: Usos e Especificações. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p. 141-174, 2008.
- Lynch, P. Turner review no. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany*, v.55, 493-512, 2007.
- Moratto, C.; Martínez, J.; Valencia, H.; Sánchez, J. The effect of land use on phosphate solubilising fungi and diazotrophic bacteria on the bleak uplands of páramo of Guerrero, Cundinamarca department. *Agronomía Colombiana*, v.23, p.299-309, 2005.
- Omar, A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular– arbuscular– mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.14, p.211-218, 1998.

- Pedrinho, N.; Galdiano-Júnior, F.; Campanharo, C.; Carareto-Alves, L.; Lemos M. Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. *Bragantia*, v.69, p. 905-911, 2010.
- Perin, L. Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003. 68p. Dissertação Mestrado
- Ramírez, C; Leal, L.; Galves, Z.; Burbano, M. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA*, v.12, p.165-178, 2014.
- Rausch, C.; Bucher, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, v.216, p.23-37, 2002.
- Ribeiro, C.; Guimarães, G.; Alvarez, H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação. Viçosa MG: UFV, p.99-110, 1999.
- Richardson, A. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, v.28, p.897-906, 2001.
- Rodriguez, H; Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v.17, p.319-339, 1999.
- Sobrinho, P. A. Estudo dos fatores que influenciam no processo de lodos ativados - determinação de parâmetros de projeto para esgotos predominantemente domésticos. *Revista DAE*, v.49, p.132, 1983.
- Trovele, S.; Hedley, M; Kilrk G.; Bolan.S.; Loganathan, P. Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Australian Journal of Soil Research*, v.43, p.471-499, 2003.
- Vance, C.P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, v.157, p.423-447, 2003.
- Whitelaw, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, v.69, p.99-151, 2000.

6. CONCLUSÕES

1. Os lodos de esgoto de abatedouros de aves apresentam diversidade funcional e morfológica de bactérias com o potencial de degradar de substâncias orgânicas e promotoras do crescimento de plantas.

2. No total foram isoladas 76 estirpes bacterianas, das quais, 52 são degradadoras de substâncias orgânicas, sendo, dez amilolíticas, duas celulolíticas, 15 queratinolíticas, dez ligninolíticas e 15 proteolíticas. Dentre as bactérias promotoras do crescimento de plantas, foram isoladas 24 estirpes, sendo 16 diazotróficas oito solubilizadoras de fosfato inorgânico.

3. As estirpes diazotróficas UFVL-162, UFVL-163 e UFVL-164 apresentam capacidade de promover o crescimento e desenvolvimento de plantas de milho.

5. A estirpe solubilizadora de fosfato LSOF-7 apresenta capacidade de promover o crescimento de plantas de milho.

6. O lodo de esgoto de abatedouro de aves é rico em nutrientes e minerais que podem ser utilizados para melhorar a fertilidade de solos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim, R.; Melo, S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. Revista Brasileira de Fruticultura. v. 24, p.565-568, 2002.
- Arcuri, E.; da Silva, Y.; Brito, M.; Brito, J.; Lange, C.; Magalhães, M. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. Ciência Rural, v. 38, p. 250-255, 2008.
- ABPA- Associação Brasileira de Produção de Proteína Animal- 2014. Disponível:
http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_aviculturano_brasil. Consultado em 20 Agosto de 2014.
- Baldotto, L.; Baldotto, M; Olivares, L.; Viana, P.; Bressansmith, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.34, p. 349-360, 2010.
- Baldotto, L.; Olivares, L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. Canadian Journal of Microbiology, v.54,. p.918-931, 2008.
- Baldani, J.; Pot, B.; Kirchoff, G.; Falsen, E.; Baldani, D.; Olivares, L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Hartmann, A; Gillis, M.; Dobereiner, J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. International Journal of Systematic Bacteriology, v.46, p. 802-810, 1996.
- Bastos-Neto, B.; Recareya, H.; do Espírito Santo M.; Ferrao-Gonzales, A. Isolamento e caracterização de microrganismos amilolíticos presentes na rizosfera de tuberosas amiláceas. Diálogos & Ciência, v.30.p.153-158. 2012.
- Beranger, M. Avaliação da influência do pH na respiração de lodos ativados. In: Dissertação Mestrado . Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 213. 2009.
- Bogado, I. Biodiversidade de bactérias lignocelulolíticas da Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro. In: Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói. p. 85p. 2009.

- Cantarella, H. Nitrogênio. In: Novais, F.; Alvarez, V.; Barros, N.; Fontes, F.; Cantarutti, B.; Neves, L. Ed. Fertilidade do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.422-423, 2007.
- Carpiné, D.; Dagostin, J.; Santa, H.; Chacón, D.; Terra N.; Santana, O. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias isoladas de salames artesanais. *Ambiência Guarapuava*, v.6.p.125-132. 2010
- CONAMA. O Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução No 375 de 29 de Agosto de 2006. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. Consultado 25 Outubro 2014.
- Döbereiner, J.; Baldani, V.; Baldani, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. 66p, 1995.
- FAO. Food Agriculture Organization of the United. Gestión de residuos de aves de corral en los países en desarrollo. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/al715s/al715s00.pdf>. Consultado Abril 20 2015.
- FENAVI. Federação Nacional de Avicultores de Colômbia. Disponível em: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160&Itemid=556. Consultado 20 Abril 2015.
- Franco, D. A. Animal disposal – the environmental, animal disease, and public health related implications: an assessment of options. In: California Department Of Food And Agriculture Symposium, Sacramento, 2002. <http://www.rendermagazine.com/industry/animal-disposal>. Consultado em 23 Agosto 2014.
- Franco, A.; Döbereiner, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica*, v.20.p.68-74, 1994.
- Gabarra, P. Digestibilidade de nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos de novilhos Nerole alimentados com fontes proteicas e energéticas com diferentes degradabilidades ruminais. In: Dissertação Mestrado. Escola “Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, p.101.2001.
- Guimarães, S.; Bonfim-Silva S.; Kroth B.; Moreira C.; Moreira D. Crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp. *Enciclopédia Biosfera*, v.7, p.286-295, 2011.

- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, F. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- Heck, K.; de Marco, E.; Hahn B.; Kluge, M.; Spilk, F.; Van-Der S. Temperatura de degradação de resíduos em processo de compostagem e qualidade microbiológica do composto final. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.17, p.54–59, 2012.
- Hungria, M.; Andrade, S.; Chueire, O.; Probanza, A.; Gutierrez-Manero, J.; Megias, M. Isolation and characterization of new efficient competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, v.32.p.515-1528,2000.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-2013 http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_publ_completa.pdf. 21 Ago. 2014.
- IMA- Instituto Mineiro Agropecuário – 2013. Disponível: <http://www.ima.mg.gov.br/produtos-de-origem-animal2/estabelecimentos-registrados>. Consultado em 21 Agosto 2014.
- Jordao, P.; Pessoa, A. Tratamento de esgotos domésticos. 4. ed. Rio de Janeiro, p. 932. 2005.
- Lara, C.; Acosta R. Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 15, p. 8-16, 2013.
- Nahas, E.; Centurion, F.; Assis, C. Efeito das características químicas dos solos sobre os micro-organismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.18, p.49-53,1994.
- Omar, A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular– arbuscular–mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J Microbiol Biotechnol* ,v. p.14:211–218, 1998.
- Pacheco, G. Avaliação de complexos enzimáticos sobre o farelo de arroz integral e farinha de penas em dietas de cães. In: Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p. 98.2013.
- Park, M.; Kim, C.; Yang, J.; Lee, H.; Shin, W.; Kim, S.; Sa, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiology Research*, v.160.p.127-133, 2005.

- Philipi, A. Desenvolvimento de um equipamento para testes de floculação através de floculação em meio granular expandido. In: Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. p.114.2001.
- Pires, V. Estrutura e função de módulos não catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal: o efeito de enzimas exógenas na valorização nutritiva de dietas à base de *Lupinus albus* para leitões. In: Tese de doutorado. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. p.145.2008.
- Riffel, A. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratonolítica. In Tese de Doutorado. Piracicaba Universidade de São Paulo, 130p. 2006.
- Rodriguez, H; Fraga,R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, Oxford v 17, p.319- 339,1999.
- Santos, P. Pós-tratamento de reatores anaeróbicos por filtros de areia intermitentes. In: Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande. p.41.2011.
- Schoenhals, M.; Sena. F.; José, J. Avaliação da eficiência do processo de coagulação/flotação aplicado como tratamento primário de efluentes de abatedouro de frangos. *Engenharia Ambiental*, v. 3, p. 005-024, 2006.
- SEMAD. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Diagnóstico Ambiental das Indústrias de Abate no Estado de Minas Gerais. Disponível em: http://www.feam.br/images/stories/arquivos/producaosustentavel/diagnostico_industria_abate.pdf. 21 Ago. 2014
- Serafin, L.; Barros, M.; Azevedo, L. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Editora Agropecuária, 2001.
- Silva, A. Polímero Orgânico Natural Trata Água e Efluentes. *Revista Química e Derivada*, v. 407, Agosto de 2002. <<http://www.quimicaederivados.com.br>. Acessado 30 Abril 2015.
- Sobrinho, P. A. Estudo dos fatores que influenciam no processo de lodos ativados - determinação de parâmetros de projeto para esgotos predominantemente domésticos. *Revista DAE*, v.132, p. 49-85, 1983.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* v.157.p.423-447.2003.

- UBABEF- União Brasileira de Avicultura. 2014. Disponível:
<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> Consultado em 20 Agosto de 2014.
- Urquiaga, S.; Resende A.; Alves, R.; Boddey, M.; Döbereiner, J. Fixação biológica de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar: Perspectivas. Workshop sobre avaliação e manejo dos recursos naturais em áreas de exploração da cana-de-açúcar. Aracajú, SE, EMBRAPA-CPATC, 11 a 13 de novembro, 1997.
- USDA. United State Department of Agriculture. 2013
http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20P%20products%20Annual_Brasilia_Brazil_8-15-2013.pdf. Acessado: 20 Agosto 2014.
- Vassilev, N.; Franco, I.; Vassileva, M.; Azcon, R. Improved Plant Growth With Rock Phosphate Solubilized by *Aspergillus niger* Grown on Sugar-Beet Waste. *Bioresouce Tecnology*, v.55, p.237-241,1996.
- Von-Sperling, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto. 3. ed. Belo Horizonte: DESA; Universidade Federal de Minas Gerais, p. 452. 2005.
- Whitelaw, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, v.69, p.99-151, 2000.

8. ANEXOS

8.1. Unidades Formadoras de Colônia. Trabalho 1 e 3.

| Meio | Repetição | UFC g/lodo |
|--------------------------|-----------|-------------------------|
| Amilolítico | 1 | 29,4x10 ¹² |
| | 2 | 0,49x10 ¹² |
| | 3 | 25,1x10 ¹² |
| | | 18,75 x10 ¹² |
| Celulolítico | 1 | 13,40x10 ¹⁵ |
| | 2 | 0,97x10 ¹⁵ |
| | 3 | 14,3x10 ¹⁵ |
| | | 9,55x10 ¹⁵ |
| Queratinolítico | 1 | 25,80 x10 ¹³ |
| | 2 | 25,00 x10 ¹³ |
| | 3 | 22,60 x10 ¹³ |
| | | 24,46 x10 ¹³ |
| Ligninolíticas | 1 | 0,810 x10 ¹¹ |
| | 2 | 0,830 x10 ¹¹ |
| | 3 | 20,50 x10 ¹¹ |
| | | 7,380 x10 ¹¹ |
| Proteolítico | 1 | 11,50 x10 ¹¹ |
| | 2 | 0,82 x10 ¹¹ |
| | 3 | 51,00 x10 ¹¹ |
| | | 21,10 x10 ¹¹ |
| Solubilizador de fosfato | 1 | 29,6 x10 ¹⁵ |
| | 2 | 23,4 0x10 ¹⁵ |
| | 3 | 0,114 x10 ¹⁵ |
| | | 17,70 x10 ¹⁵ |

8.2 Caracterizações de Colônias de bactérias degradadoras de substâncias orgânicas e promotoras do crescimento de plantas.

8.2.1 Caracterização das colônias bacterianas amilolíticas

| Isolado | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Muco |
|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|--|-------------|
| UFV- LAM1 | 2 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM2 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM3 | 2 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM4 | 2 mm | Circular | Plana | Denteada | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM5 | 1 mm | Circular | Plana | Ondulada | Lisa | Branco transparente | - |
| UFV- LAM6 | 2 mm | Circular | Lente | Ondulada | Rugosa | Branco amarelado (borda branca leitosa) | - |
| UFV- LAM7 | 1,5mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM8 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM9 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco translúcido | - |
| UFV- LAM10 | 2 mm | Irregular | Lente | Inteira | Lisa | Branco amarelado brilhante | - |
| UFV- LAM11 | 2 mm | Circular | Convexa | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM12 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco no centro (borda grossa transparente) | - |
| UFV- LAM13 | 1,5mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco amarelado | - |
| UFV- LAM14 | 1 mm | Irregular | Planz | Denteada | Lisa | Branco transparente | - |

8.2.2. Caracterização das colônias bacterianas queratinolíticas

| Isolado | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Muco |
|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|---|-------------|
| UFV- LAM1 | 1,5mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco translúcido e transparente | - |
| UFV- LAM2 | 3mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco leitoso com halo na borda translúcido | - |
| UFV- LAM3 | 1mm | Irregular | Plana | Inteira | Lisa | Branco translúcido | - |
| UFV- LAM4 | 1mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco translúcido (borda e halo translúcido) | - |
| UFV- LAM5 | 1mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Transparente | - |
| UFV- LAM6 | 1mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Transparente com um ponto branco | - |
| UFV- LAM7 | 3,5mm | Irregular | Plana | Inteira | Lisa | Transparente com um ponto central branco | - |
| UFV- LAM8 | 2mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco translúcido | - |
| UFV- LAM9 | 3,5mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV- LAM10 | 1mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Transparente com um ponto pequeno branco | - |
| UFV- LAM11 | 1mm | Circular | Convexa | Inteira | Lisa | Branco transparente | - |

8.2.3. Caracterização das colônias bacterianas ligninolíticas

| Isolado | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Muco |
|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|---|-------------|
| UFV-LL1 | 2 mm | Irregular | Plana | Denteada | Lisa | Transparente | - |
| UFV-LL2 | 2 mm | Irregular | Plana | Lobada | Lisa | Branco Transparente | - |
| UFV-LL3 | 2 mm | Irregular | Plana | Lobada | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV-LL4 | 1 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Transparente translúcido | - |
| UFV-LL5 | 2 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV-LL6 | 1 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branca | - |
| UFV-LL7 | 2,5 mm | Irregular | Plana | Denteada | Lisa | Branco leitoso com o halo transparente na borda | - |
| UFV-LL8 | 1,5 mm | Circular | Plana | Denteada | Lisa | Marrom | - |
| UFV-LL9 | 1,5 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso com halo transparente | - |
| UFV-LL10 | 2 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco leitoso com um halo pequeno transparente | - |
| UFV-LL11 | 2,5 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Transparente | - |
| UFV-LL12 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV-LL13 | 2 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco leitoso | - |
| UFV-LL14 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco sem halo | - |
| UFV-LL15 | 2,5 mm | Irregular | Plana | Denteada | Lisa | Branco leitoso com o halo transparente na borda | - |

8.2.4. Caracterização das colônias bacterianas proteolíticas

| Isolado | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Mucosidade |
|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|---|-------------------|
| UFV-LPR 1 | 5 mm | Irregular | Convexa | Inteira | Rugosa | Branco leitoso | + |
| UFV-LPR 2 | 6 mm | Irregular | Convexa | Ondulada | Lisa | Branco amarelado | - |
| UFV-LPR 3 | 4 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco amarelado | + |
| UFV-LPR 4 | 3 mm | Circular | Convexa | Inteira | Lisa | Branco avermelhado | - |
| UFV-LPR 5 | 6 mm | Irregular | Lente | Ondulada | Lisa | Branco leitoso | + |
| UFV-LPR 6 | 1mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco leitoso com o centro mais claro | - |
| UFV-LPR 7 | 3 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco amarelado com um ponto no centro | - |
| UFV-LPR 8 | 6 mm | Irregular | Umbonada | Inteira | Lisa | Transparente amarelado | + |
| UFV-LPR 9 | 1 mm | Circular | Convexa | Inteira | Lisa | Creme | - |
| UFV-LPR10 | 1 mm | Circular | Convexa | Inteira | Lisa | Vermelha | - |

8.2.5. Caracterização das colônias bacterianas solubilizadoras de fosfato

| Isolado | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Muco |
|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|---|-------------|
| UFV-SOF 1 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco-claro (borda branca e translúcida) | - |
| UFV-SOF 2 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco | - |
| UFV-SOF 3 | 1,5 mm | Circular | Lente | Inteira | Lisa | Branco amarelado | - |
| UFV-SOF 4 | 1,5 mm | Circular | Convexa | Inteira | Lisa | Branco amarelado no centro (borda branca) | - |
| UFV-SOF 5 | 1 mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Branco-claro | - |
| UFV-SOF 6 | 1,5 mm | Circular | Convexa | Inteira | Lisa | Branco amarelado | - |
| UFV-SOF 7 | 1,5mm | Circular | Pulvinada | Denteada | Lisa | Branco amarelado (borda fina e translúcida) | - |
| UFV-SOF 8 | 1,5mm | Circular | Plana | Inteira | Lisa | Amarelo | - |

8.2.6. Caracterização das colônias bacterianas diazotróficas

| Isolado | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Mucosidade |
|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|---|-------------------|
| UFV L-161 | 1mm | Circular | Lente | Inteira | lisa | Centro branco leitoso | + |
| UFV L-162 | 1mm | Circular | plana | ondulada | lisa | Centro branco claro, borda branca e translúcida | + |
| UFV L-163 | 1mm | Circular | Lente | inteira | lisa | centro branco leitoso, borda branca e translúcida | + |
| UFV L-164 | 1mm | Circular | plana | Inteira | lisa | Centro branco, borda branca e translúcida | + |
| UFV L-261 | 1mm | Circular | lente | ondulada | lisa | Centro branco leitoso | + |
| UFV L-262 | 1mm | Circular | convexa | ondulada | lisa | Centro amarelo leitoso | + |
| UFV L-361 | 1mm | Circular | lente | Inteira | lisa | Centro branco leitoso | + |
| UFV L-362 | 1mm | Circular | convexa | Inteira | lisa | Centro branco leitoso | + |
| UFV L-363 | 1mm | Circular | plana | Inteira | lisa | Centro branco | + |
| UFV L-364 | 1mm | Circular | lente | Inteira | lisa | Centro branco claro, borda translucida | + |
| UFV L-451 | 1mm | Circular | plana | ondulada | lisa | Centro branco leitoso, borda translucida | + |
| UFV L-452 | 1mm | Circular | lente | Inteira | lisa | Centro branco borda translucida | + |
| UFV L-453 | 1mm | Circular | convexa | Inteira | lisa | centro branco leitoso, borda branca e translucida | + |
| UFV L-562 | 1mm | Circular | plana | Inteira | lisa | Centro branco claro, borda translucida | - |
| UFV L-661 | 1mm | Circular | Lente | Inteira | lisa | Centro branco, borda branca e clara | + |
| UFV L-662 | 1mm | irregular | Lente | Inteira | lisa | Centro branco e pulverulento, borda translúcida | + |

8.2.7. Caracterização das colônias bacterianas celulolíticas.

| Isolado | Tamanho | Forma | Elevação | Borda | Superfície | Coloração | Mucosidade |
|----------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|---|-------------------|
| UFV L-CU 1 | 1mm | Circular | Lente | Inteira | lisa | Centro branco leitoso | - |
| UFV L-CU2 | 1mm | Circular | Lente | ondulada | lisa | Centro branco claro, borda branca e translúcida | - |

8.3. Análises de variância.

8.3.1. Trabalho 2. Experimento de bactérias diazotróficas

Quadro 1. Análise de variância para as características de crescimento da parte aérea e sistema radicular do milho, em resposta à inoculação de bactérias isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves.

| F.V | G.L | ALT | DIAM | NF | MFPA | MFR | MFT | MSPA | MSR | MST | Con/N |
|-----------------------------------|------------|--------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|
| | | -----cm----- | | UN | | | -----g----- | | | | mg/planta |
| Repetição | 5 | 27,53 | 0,1750 | 0,5175 | 0,1216 | 0,8131 | 0,5603 | 0,0020 | 0,0084 | 0,0099 | 7,467 |
| Tratamentos | 16 | 35,48 | 0,6889 | 3,8480 | 1,0475 | 2,1444* | 5,2192* | 0,0074 | 0,0530 | 0,0648 | 45,234* |
| Resíduo | 79 | 14,83 | 0,2667 | 0,5287 | 0,2285 | 0,9356 | 1,6815 | 0,0146 | 0,0167 | 0,0275 | 13,696 |
| C.V | | 22,89 | 17,67 | 15,11 | 22,016 | 25,66 | 21,83 | 76,95 | 45,34 | 37,49 | 32,919 |
| Nível de Significância 5%. | | | | | | | | | | | |

ALT, altura da planta; DIAM, diâmetro do caule; NF, número de folhas; MFR, matéria fresca da raiz; MFPA, matéria fresca da parte aérea; MFT, matéria fresca total; MSR, matéria seca da raiz; MSPA, matéria seca da parte aérea; MST, matéria seca total; Con/N, conteúdo de N; CV coeficiente de variação.

8.3.2. Trabalho 3. Experimento bactérias solubilizadoras de fosfato.

Quadro. 2 Análise de variância para as características de crescimento da parte aérea e sistema radicular do milho, em resposta à inoculação de bactérias isoladas de lodo de esgoto de abatedouro de aves.

| F.V | G.L | ALT | DIAM | NF | MFPA | MFR | MFT | MSPA | MSR | MST |
|----------------------|-----|--------------|---------|--------|-------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | | -----cm----- | | UN | -----g----- | | | | | |
| Repetição | 5 | 32,676 | 0,1361 | 0,0668 | 0,0189 | 0,3713 | 0,2419 | 0,0143 | 0,0228 | 0,0106 |
| * Tratamentos | 9 | 85,687 | 0,5865* | 0,0688 | 0,4812 | 2,1553 | 3,2047 | 0,0088 | 0,0425 | 0,0260* |
| Resíduo | 45 | 47,124 | 0,1758 | 0,0676 | 0,3700 | 0,7801 | 1,4159 | 0,0077 | 0,0178 | 0,0233 |
| C.V | | 18 | 11,77 | 6,55 | 25,55 | 19,59 | 17,17 | 27,13 | 27,58 | 18,96 |

* Nível de significância 5%.

ALT, altura da planta; DIAM, diâmetro do caule; NF, número de folhas; MFR, matéria fresca da raiz; MFPA, matéria fresca da parte aérea; MFT, matéria fresca total; MSR, matéria seca da raiz; MSPA, matéria seca da parte aérea; MST, matéria seca total ; CV coeficiente de variação.

8.4. Figuras.



Figura 1



Figura 2

Figuras 1 e 2. Meios de culturas específicos para isolamento de bactérias com o potencial de degradar substâncias orgânicas.

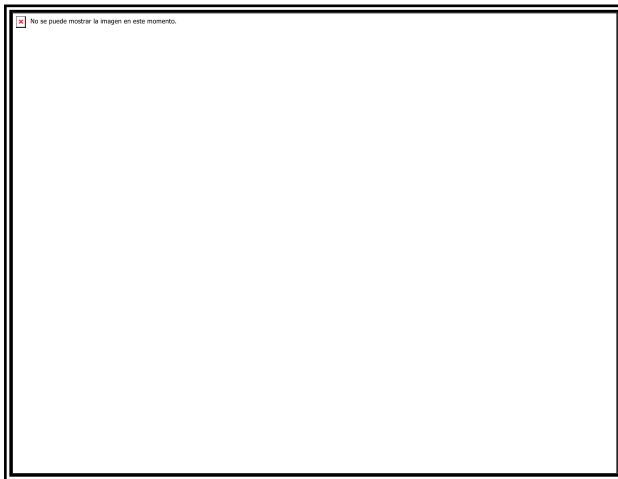


Figura 3



Figura 4

Figura 3. Placas na B.O.D. depois de ser inoculadas com alíquotas de lodo de abatedouro de aves. **Figura 4.** Placa com bacterinas isoladas de abatedouro de aves.



Figuras 5 a 8. Bactérias solubilizando fosfato *in vitro*.



Figura 9



Figura 10

Figura 9. Panorâmica: ensaio bactérias solubilizadoras de fosfato mais fosfato natural utilizando a planta do milho como bio-indicador. **Figura 10.** Plantas de milho sem e com uso de bactérias diazotróficas.